

SELMA® och SELMA PLUS®

Selektiv odlingsplatta för mastitdiagnostik av kliniska mastiter



SELMA



SELMA PLUS

SELMA är en tredelad agarplatta och SELMA PLUS är en fyrdelad agarplatta avsedd att underlätta den bakteriologiska diagnostiken av mjölkprov från kliniska mastiter. Indelningen av plattan i flera fält möjliggör användning av olika selektiva media, vilket ökar säkerheten och snabbheten i diagnostiken. De olika fälten är märkta 1, 2, 3 samt 4 i plattans botten.

I både SELMA och SELMA PLUS ingår ett fält med Nöt blodagar innehållande eskulin (1) där alla aeroba bakterier växer, ett fält med MacConkey-agar (2) där endast gramnegativa bakterier växer och ett fält med Mannitolsalt-agar (fält 3 på SELMA resp. fält 4 på SELMA PLUS) där stafylokocker och enterokocker växer. Vid växt med gult färgomslag kan det senare fältet också användas för bestämning av penicillinabildning hos stafylokocker.

På SELMA PLUS finns även ett fält med PGUA-agar (3) för direkt påvisande av *Escherichia coli*.

SELMA och SELMA PLUS är utvecklad vid SVA.

Viktig information till dig som använder SELMA-plattor:

SELMA och SELMA PLUS är speciellt framtagna för odling av mjölkprover!

Varje omgång av SELMA och SELMA PLUS tillverkas enligt kvalitetssäkrade rutiner på sektion för substratproduktion och testas för optimala egenskaper vid odling och typning av **mastitpatogener**. Akut klinisk mastit orsakas i regel av ett bakterieagens vilket därför oftast växer i renkultur.

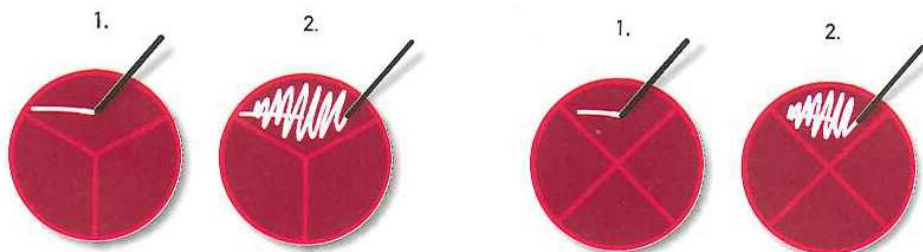
Mastitlaboratoriet vid SVA fungerar som referens- och rutinlaboratorium för mastitdiagnostik i Sverige. Mastit (juverinflammation) är den enskilt mest förlustbringande sjukdomen inom svensk mjölkproduktion. Diagnostiken utgör en viktig grund för behandling av mastit. En korrekt diagnos medför att eventuell antibiotikabehandling kan riktas direkt mot den orsakande bakterien och onödig antibiotikaförbrukning undviks. Detta är ett viktigt led i strävan att minimera antibiotikaanvändningen i Sverige.

Vid odling av prov från subkliniska mastiter, slemhinnor, hud och sår kan provet ofta innehålla en blandflora av flera olika bakterieagens. Vid dessa fall är det därför **inte lämpligt** att använda SELMA-plattan eftersom de små agarfälten på en flerfältsplatta gör att det är svårt att särskilja enskilda kolonier, vilket är viktigt för en korrekt avläsning. För odling av andra prover än mjölk rekommenderar vi därför våra odelade Nöt blodagar-plattor!

Odlingsanvisning

Samla först upp eventuellt förekommande kondensvatten i plastlocket och håll av. Skaka provröret. Doppa en 10 µl plastögla (blå) en gång per fält i väl blandat rör med mjölk, var noga med att öglan är fylld och sprid på plattan. Börja med nötblodagar-fältet (1) och sprid på det sätt som framgår av figureerna nedan.

För en korrekt diagnostik odlas endast en juverdel per platta.



Så snart som möjligt efter odling inkuberas plattan med locket nedåt i 37°C i 18-48 timmar. Första avläsningen sker efter 18-24 timmar. Förekommer ingen växt bör plattan inkuberas ytterligare ett dygn för kontroll av eventuell utväxt av mer långsamväxande bakterier.

Avläsning

Inspektera plattan i både reflekterande (små kolonier framträder) och genomfallande belysning (hemolys framträder). Ingen växt eller sparsam blandflora på nötblodagarfältet (1) innebär att mjölken innehåller ett så litet antal bakterier att en meningsfull bakteriologisk diagnostik inte är möjlig.

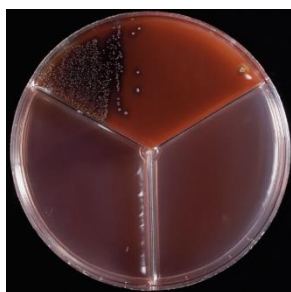
Differentialdiagnostik

Juverpatogena bakterier växer ut enligt följande (S=Selma, S+=Selma Plus):

Alla aeroba bakterier växer på blodagar (fält 1). Streptokocker växer endast på blodagar (fält 1). Stafylokocker och enterokocker växer på blodagar (fält 1) samt mannitolsaltagar (fält 3 på S, fält 4 på S+). Gramnegativa bakterier växer på blodagar (fält 1) och MacConkey-agar (fält 2) samt på PGUA-agar (fält 3 på S+).

Mannitolsaltagar särskiljer främst *Staphylococcus aureus* och koagulasnegativa stafylokocker. MacConkey-agar selekterar gram-negativa bakterier.

PGUA-agar särskiljer *Escherichia coli* från övriga gramnegativa bakterier t ex *Klebsiella* spp.



Streptokocker



Stafylokocker



Gramnegativa bakterier

Grampositiva bakterier

Stafylokokker:

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) och koagulasnegativa stafylokokker (KNS) växer på blodagar (fält 1) samt mannitolsaltagar (fält 3 på **S**, fält 4 på **S+**). *S. aureus* har oftast en karaktäristisk dubbelhemolys på blodagar, vilket KNS saknar. Närmast *S. aureus*-kolonin ses en helt klar zon och utanför denna en diffus zon. Mannitolsaltagar-fältet färgas så gott som alltid citrongult runt *S. aureus*-kolonierna, medan färgen oftast är oförändrad vid växt av KNS. Både *S. aureus* och KNS bör testas avseende penicillinasproduktion enligt nedan beskriven metodik.

Penicillinas-test

Stafylokokker kan testas med avseende på penicillinasbildning.

Vid gult färgomslag placeras en Cefinase-lapp (CEF-F) på utvuxna kolonier på mannitolsaltagar-fältet (fält 3 på **S**, fält 4 på **S+**).

OBS! Var noga med att kontrollera att det är renkultur. Testen kan inte utföras på nötblodagar (fält 1) eller på andra bakterieagens än stafylokokker.

Fler bakterieagens än stafylokokker kan ge gult färgomslag på mannitolsaltagar.

Inkubera plattan 15 till 30 minuter i 37°C. Rosa till rödfärgning av lappen innebär att stammen är penicillinasbildare (pc:as+). Färgomslaget syns bäst från plattans undersida. Ibland ses färgomslaget endast som små röda fläckar, där kolonierna ligger an mot lappen.

Vid växt på **mannitolsaltagar** (fält 3 på **S**, fält 4 på **S+**) **utan gult färgomslag**, lägger man Cefinase-lappen på ett objektglas. Det går inte att läsa av eventuellt färgomslag på Cefinase-lappen om agarfältet inte slagit om till gult. Genomfukta lappen med sterilt vatten eller koksaltlösning. För sedan över kolonimaterial till lappen med hjälp av en ögla, ta i första hand kolonimaterial från blodagarn. Inkubera i 37°C och läs av ett eventuellt färgomslag till rött inom 15 till 30 minuter. Det är viktigt att lappen hålls fuktig under hela inkuberingen genom att objektglaset läggs i en tom petriskål eller liknande.



Staphylococcus aureus
Pc:as +



Staphylococcus aureus
Pc:as + (underifrån)



Staphylococcus aureus
Pc:as - (underifrån)



koagulasnegativ stafylokokk
(mannitolpositiv)



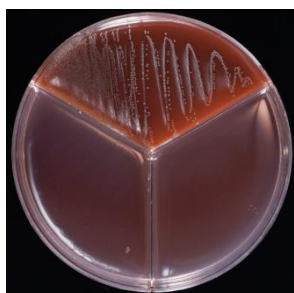
koagulasnegativ stafylokokk
(mannitolnegativ)



Staphylococcus pseudintermedius
(mannitolnegativ)

Streptokocker:

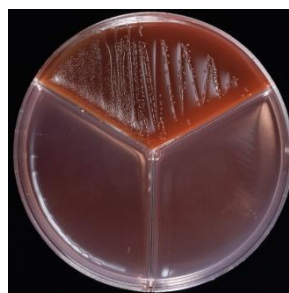
Samtliga streptokocker (Strept.) växer oftast ut till synliga kolonier på blodagar (1) inom 18-24 timmar. β -hemolyserande streptokocker som t ex *Streptococcus agalactiae* växer oftast med en klar hemolys runt kolonierna. α -hemolyserande streptokocker som *Streptococcus dysgalactiae* växer med en grönaktig hemolys runt kolonierna. *Streptococcus uberis* kan ge ett grönaktigt omslag och går inte att skilja från övriga streptokocker. Enterokocker växer ibland ut på mannitolsaltagar (fält 3 på S, fält 4 på S+) till små kolonier och färgar mediet gult.



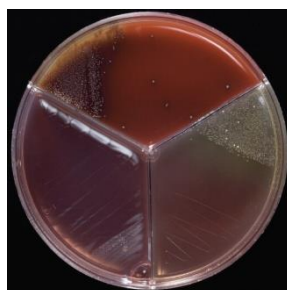
Streptococcus dysgalactiae



Streptococcus agalactiae
(i genomlysning)



Streptococcus uberis



Enterococcus spp.



Trueperella pyogenes
(i genomlysning)

Trueperella pyogenes:

Efter 18-24 timmar ses kolonierna på *Trueperella pyogenes* som knappt skönjbara nålstick i reflekterande belysning. I genomfallande belysning kan en svag diffus hemolys förekomma. Kolonierna framträder tydligare med en smal klar hemolyszon efter ytterligare ett dygns inkubering.

Gramnegativa bakterier:

Koliforma bakterier växer oftast ut till små kolonier på blodagar (fält 1) och MacConkeyagar (fält 2) redan inom 4 till 6 timmar. Kolonier av *Escherichia coli* (*E.coli*) och *Klebsiella* spp färgas rödvioletta på MacConkeyagar. Hemolyserande *E. coli* har en klar hemolyszon runt kolonierna på blodagar. *Klebsiella*-kolonierna är i regel ”smetigare” än *E. coli*-kolonierna och kan vara tråddragande med ögla.

E. coli kan differentieras från *Klebsiella* spp och övriga gramnegativa bakterier med hjälp av SELMA PLUS-plattan. *E. coli* färgar PGUA-agarn (fält 3 på S+) gulgrönt. Vid riklig växt av *E. coli* färgas hela PGUA-agarfältet gulgrönt, annars endast området runt kolonierna. Växt av *Klebsiella* spp ger inget färgomslag på PGUA-agarn.

Pseudomonas spp växer som grå- /grön-skimrande kolonier med typisk ”karamellukt” på blodagar, (fält 1), MacConkeyagar (fält 2) samt PGUA-agar (fält 3 på **S+**).

Proteus mirabilis svärmar oftast på blodagar (fält 1) och växer som enskilda kolonier på de övriga fälten utan färgomslag.



Escherichia coli



Klebsiella pneumoniae



Pseudomonas spp.



Proteus mirabilis



Enterobacter cloacae

Övriga bakterier

En rad andra bakterier kan ibland orsaka mastit, t ex *Bacillus* spp och arter inom *Enterobacteriaceae*. *Bacillus*-kolonier är relativt stora med oregelbunden kant, ofta med hemolys och kan ibland även växa ut på mannitolsaltagar (fält 3 på **S**, fält 4 på **S+**).

Jästsvamp växer oftast på blodagar (fält 1) men ibland även på mannitolsaltagar (fält 3 på **S**, fält 4 på **S+**) efter 48 timmar.

Corynebacterium bovis (som oftast är apatogen) växer med vita, torra, icke hemolyserande kolonier på blodagar (fält 1) efter inkubering i 48 timmar.

Verifiering

I de fall man är osäker på diagnosen bör plattan eller mjölkprovet sändas till veterinärbakteriologiskt laboratorium för verifiering. SVA är ett ackrediterat laboratorium sedan 1998. Många gånger är det också mycket viktigt att diagnosen kompletteras med en resistensundersökning av den isolerade bakterien.

Differentiering av *E. coli* och *Klebsiella* på:



Escherichia coli



Klebsiella spp.



Escherichia coli



Klebsiella spp.



Pseudomonas spp.



Pseudomonas spp.



Jästsvamp



Bacillus cereus

Avläsningsschema

Species	Nötblodagar med eskulin fält 1	MacConkey-agar fält 2	Mannitol-Salt-agar fält 3 på S, fält 4 på S+	PGUA-agar på Selma+ fält 3
Koagulasnegativa Stafylokocker	+ ev. hemolys		+	
<i>Staphylococcus aureus</i>	+ enkel eller dubbel hemolys		+ gult färgomslag	
<i>Staphylococcus Pseudintermedius</i>	+ enkel eller dubbel hemolys		+	
β -hemolyserande streptokocker	+ klar hemolys			
Övriga streptokocker	+ ev. grön hemolys			
Enterokocker	+ ev. svarta kolonier		svag växt gult färgomslag	
<i>Trueperella pyogenes</i>	+ Hemolys			
<i>Escherichia coli</i>	+ ev. hemolys	+ rödvioletta kolonier		+ gulgrönt färgomslag
<i>Klebsiella spp</i>	+ ev. hemolys	+ rödvioletta kolonier		+ inget färgomslag
<i>Pseudomonas spp</i>	+ ev. hemolys	+ ev. hemolys		+ ev. hemolys
<i>Proteus spp</i>	+ svärmar	+ enskilda kolonier		+ enskilda kolonier
Jästsvamp	+	(+)	(+)	(+)
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+		+
<i>Bacillus spp</i>	+ ev. hemolys		(+)	

+ = bakterieväxt

(+) = inte alltid växt

Förvaring och hållbarhet

SELMA och SELMA PLUS-plattor är hållbar i 2 månader från tillverkningsdatum vid kylförvaring och ska förvaras med **locket nedåt**.

Cefinase är hållbar 1 år. Förvaras i kyl.

Destruktion

Använda plattor destrueras genom bränning.

För beställning kontakta order@sva.se

Postadress: Statens veterinärmedicinska anstalt, SVA
75189 Uppsala

Leveransadress: Statens veterinärmedicinska anstalt, SVA
Travvägen 20, 75651 Uppsala

För mer information kontakta substrat@sva.se