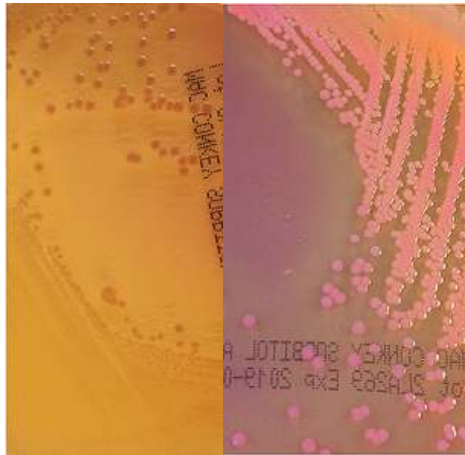


**ISTRUZIONI PER L'USO****MAC CONKEY SORBITOL AGAR****Piastre pronte all'uso**Mac Conkey Sorbitol Agar. A sinistra: *E. coli* O157 non fermentante il sorbitolo, a destra *E. coli* fermentante il sorbitolo**1 - DESTINAZIONE D'USO**Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno selettivo e differenziale per la determinazione di *Escherichia coli* O157:H7 da campioni clinici.**2 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA ***

Peptone	17,000 g
Peptocomplex	3,000 g
D-sorbitolo	10,000 g
Sali biliari n°3	1,500 g
Sodio cloruro	5,000 g
Rosso neutro	0,030 g
Violetto cristallo	0,001 g
Agar	14,500 g
Acqua purificata	1000 mL

* Il terreno può essere compensato e/o corretto per adeguare le sue prestazioni alle specifiche.

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

I ceppi enteroemorragici di *E. coli* (EHEC) produttori di verocitotossina/shigatossina (VTEC o STEC) hanno assunto un particolare significato clinico a partire dai primi episodi di tossinfezioni alimentari da loro sostenuti, segnalati negli anni 80.¹ Pur essendo noti più di 300 sierotipi VTEC, l'infezione è causata soprattutto dal sierotipo mobile *E. coli* O157:H7 e dalla sua variante immobile O157:NM (O157:H⁻).² La severità della patologia, che presenta quadri variabili da una diarrea non complicata ad una colite emorragica, fino alla sindrome emolitico-uremica ed alla porpora trombocitopenica, unitamente alla bassa dose infettante (10-100 cellule), rendono i ceppi VTEC/STEC particolarmente temibili, soprattutto per i soggetti più vulnerabili, quali i bambini e gli anziani.³ La virulenza dei ceppi è sostanzialmente dovuta alla produzione di una o di entrambi le shigatossine *Stx1* e *Stx2* e, più raramente, da loro varianti.² Le fonti dell'infezione sono state individuate nella carne cruda, nei prodotti a base di carne, succhi di frutta non pastorizzati, acqua, latte, germogli e verdura.⁴ Anche il contatto diretto con animali appartenenti alle specie serbatoio e la trasmissione persona-persona, per via oro-fecale, possono giocare un ruolo nella propagazione dell'infezione.⁵

E. coli O157:H7 è fenotipicamente distinguibile da *E. coli* per l'incapacità di fermentare il sorbitolo o di fermentarlo oltre le 24 ore di incubazione e per l'assenza dell'enzima β -glucuronidasi; sulla base di queste caratteristiche sono stati sviluppati diversi terreni colturali.⁶ Mac Conkey Sorbitol Agar è preparato secondo una modificazione della formula descritta da Rappaport ed Henig⁷ ed è conforme alla formulazione del terreno di base riportata dalla norma ISO 16654⁸ e da FDA-BAM².

Il terreno Mac Conkey Sorbitol Agar differisce dal Mac Conkey Agar per avere quale carboidrato fermentabile il sorbitolo al posto del lattosio. *E. coli* O157:H7 non fermenta il sorbitolo o lo fermenta oltre le 24 ore di incubazione e cresce sul terreno con colonie incolori, a differenza dei ceppi non O157, fermentanti il sorbitolo, che sviluppano le classiche colonie rosso-porpora, circondate spesso da un alone opaco rosa-rosso. La determinazione di *E. coli* O157:H7 su campioni fecali con Mac Conkey Agar con sorbitolo, secondo i dati di March¹⁰, ha una sensibilità del 100% una specificità del 85% ed una accuratezza del 86%.

L'azione selettiva del Mac Conkey Sorbitol Agar è dovuta alla presenza dei sali biliari n°3 che inibiscono la crescita dei batteri Gram positivi; l'attività inibitoria è potenziata dal violetto cristallo. Mac Conkey Sorbitol Agar è indicato per l'isolamento e la differenziazione di *E. coli* O157:H7 da campioni fecali.^{10,11}

5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENOAspetto del terreno
pH (20-25°C)limpido o leggermente opalescente di colore rosso-viola
7,1 ± 0,2**6 - MATERIALI FORNITI**

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Mac Conkey Sorbitol Agar CND: W0104010405; EDMA: 14.01.04.01; 1444685/R	Piastre pronte all'uso	541669S	2 x 10 piastre \varnothing 90 mm confezionamento primario: 2 sacchetti di cellophane confezionamento secondario: scatola di cartone

7 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Termostato ed altra strumentazione di laboratorio, anse e tamponi sterili da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori per l'identificazione delle colonie.

8 - CAMPIONINormalmente la ricerca di *E. coli* O157:H7 è eseguita su campioni fecali. Quando possibile, raccogliere il campione prima dell'inizio della terapia antimicrobica. Seguire le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, la conservazione ed il trasporto in Laboratorio dei campioni.¹¹⁻¹³



9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastre a temperatura ambiente e lasciare asciugare la superficie dell'agar.

Inoculare con il materiale strisciando con l'ansa su quattro quadranti della piastra, per disperdere l'inoculo ed ottenere colonie isolate, assicurandosi che la semina sul quarto quadrante non si sovrapponga a quella del primo. In alternativa se il campione è seminato direttamente dal tampone di raccolta, rotolarlo su una area ristretta in prossimità del bordo piastra, quindi strisciare su tutta la superficie del terreno con un'ansa. Incubare per 16-24 ore a 35-37°C in aerobiosi.

Si raccomanda una fase di arricchimento per tutti i campioni diarroici e con evidenti feci ematiche semi-formate o liquide, per i campioni di bambini sotto i 5 anni e in caso di focolai epidemici.^{12,13}

Eseguire l'arricchimento in Modified Tryptic Soy Broth (REF 402155M2) addizionato di novobiocina 20 mg/L (Novobiocin Antimicrobic Supplement - REF 4240045), con incubazione a 35-37°C per 16-24 ore.

Trapiantare un'ansata di brodo di arricchimento su piastra di CT-SMAC, strisciare l'inoculo su quattro quadranti della piastra per disperdere l'inoculo ed ottenere colonie isolate. Incubare per 16-24 ore a 35-37°C in aerobiosi.

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica e cromatica delle colonie.

Le colonie incolori (sorbitolo negative) possono essere presuntivamente identificate come *E.coli* O157.

Purificare le colonie tipiche con trapianto su Nutrient Agar con incubazione a 35-37°C per 18-24 ore.

Per la conferma di *E.coli* O157:H7 possono essere eseguiti i seguenti test: ossidasi (-), β-galattosidasi (+), β-glucuronidasi (-), indolo (+) e la presenza degli antigeni O157 e H7 mediante agglutinazione al lattice.^{2,8,11}

Per una esposizione completa dei criteri e dei metodi di identificazione per i campioni clinici si rimanda alla letteratura citata.^{11,13}

11 - CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

Ciascun lotto del prodotto qui descritto è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. È comunque responsabilità dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia, alle regole dell'accreditamento ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Qui di seguito sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE/ T°/ t / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>Escherichia coli</i> O157 ATCC 43894	35-37°C / 18-24 H / A	crescita, colonie incolori
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	35-37°C / 18-24 H / A	crescita, colonie rosse
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	35-37°C / 18-24 H / A	crescita inibita

A: incubazione in aerobiosi; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

12 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di piastre pronte e della materia prima impiegata per la loro produzione (terreno in polvere Mac Conkey Sorbitolo Agar REF 401669S), vengono testati per la produttività, e la selettività, avendo come riferimento lotti precedentemente approvati e considerati come Lotti di Riferimento.

La produttività e del terreno è valutata con metodo ecometrico semiquantitativo, con i ceppi target *E.coli* O157:H7 ATCC 43888, *E.coli* O157:H7 NCTC 12900, *E.coli* O157:H7 ATCC 43894. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 ore, i ceppi target sviluppano colonie incolori. Sono anche valutate le cariche microbiche di questi ceppi e se esse sono comparabili nei due lotti, i risultati sono giudicati conformi alle specifiche.

Per valutare la selettività del terreno vengono seminate con metodo Miles Misra modificato appropriate diluizioni di sospensioni con densità pari a McFarland 0,5 dei seguenti ceppi non target: *E.coli* ATCC 25922 e *S.aureus* ATCC 25923. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 ore in aerobiosi, *E.coli* sviluppa colonie rosse, *S.aureus* è totalmente inibito.

13 - LIMITI DEL METODO

- Il quadro clinico provocato da *E.coli* O157:H7 è simile a quello indotto da altri sierotipi non O157, ma produttori di verocitotossina (ceppi STEC O26, O111, O121, O103, O145, O45 ecc.). Tali ceppi fermentano il sorbitolo e non sono distinguibili sul terreno SMAC agar. Fare riferimento alla letteratura citata.¹¹⁻¹³
- I laboratori che utilizzano l'agar CT-SMAC dovrebbero anche inoculare una piastra di agar SMAC per isolare i ceppi di STEC sensibili al tellurito.¹¹
- Sono stati segnalati ceppi di *E.coli* O157 sorbitolo positivi e ceppi β-glucuronidasi positivi.^{14,15} Per la gestione di tali ceppi fare riferimento alla letteratura citata.¹¹⁻¹³
- Attenersi ai tempi ed alle temperature consigliate poiché *E. coli* O157 non coltiva a 44-45°C e poiché l'osservazione ritardata delle colonie può indurre ad errori di interpretazione.
- Alcuni enterococchi possono sviluppare piccole colonie con incubazione prolungate oltre le 24 ore.
- La presenza di colonie incolori sul terreno non è di per sé indicativa della presenza di *E.coli* O157 poiché altre specie batteriche sorbitolo negative possono coltivare con colonie incolori (*Escherichia hermannii*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* ecc.)
- Le colonie microbiche presenti sulla piastra, anche se differenziate sulla base delle loro caratteristiche cromatiche e morfologiche, devono essere sottoposte, previa loro purificazione, ad una completa identificazione con tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa e, se pertinente, sottoposte al test di sensibilità agli antibiotici.
- Il terreno di coltura ed il supplemento qui descritti sono da intendersi come un ausilio alla diagnosi delle infezioni microbiche. L'interpretazione dei risultati deve essere fatta considerando la storia clinica del paziente, l'origine del campione ed i risultati di altri test diagnostici.

13 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno in piastra qui descritto è un diagnostico *in vitro* di tipo qualitativo, per uso professionale e deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- Il prodotto qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione europea vigente.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materie prime di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione dei materiali non possono garantire in maniera assoluta che questo prodotto non contenga nessun agente patogeno trasmissibile; per queste ragioni si consiglia di manipolare il prodotto con le precauzioni d'uso specifiche per i materiali





potenzialmente infettivi (non ingerire, non inalare, evitare il contatto con la pelle, gli occhi, le mucose). Scaricare dal sito web www.biolifeitaliana.it il documento TSE Statement, con le misure messe in atto da Biolife Italiana S.r.l. per il contenimento del rischio legato alle patologie animali trasmissibili.

- Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il terreno e con gli agenti microbici.
- La singola piastra del prodotto qui descritto è monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerare un "prodotto sterile" non essendo soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto a biocontaminazione controllata, nei limiti di specifiche definite ed indicate sul documento di Controllo Qualità del prodotto.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire le piastre non utilizzate e le piastre seminate con i campioni o con i ceppi di controllo e sterilizzate, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.
- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego del prodotto, ma senza impegno o responsabilità. L'utilizzatore finale deve in ogni caso, rispettare le leggi, i regolamenti e le procedure standard locali per l'esame dei campioni raccolti dai diversi distretti organici umani ed animali, dei campioni ambientali e dei prodotti destinati al consumo umano o animale. Le nostre informazioni non esonerano l'utilizzatore finale dalla sua responsabilità di controllare l'idoneità dei nostri prodotti allo scopo previsto.

14 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a 2-8°C al riparo dalla luce diretta. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Dopo l'apertura del sacchetto di plastica, le piastre possono essere usate entro 7 giorni, se conservate in ambiente pulito a 2-8°C. Non utilizzare le piastre se il sacchetto di plastica è danneggiato, non utilizzare le piastre rotte. Non utilizzare le piastre oltre la data di scadenza. Non utilizzare le piastre se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione, eccessiva umidità, eccessiva disidratazione, rotture dell'agar, colore alterato).

16 - BIBLIOGRAFIA

- Centers for Disease Control. 1984. Update: sporadic hemorrhagic colitis. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 33:28
- U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4a Diarrheagenic *Escherichia coli*. Rev October 2018
- Griffin, P. M., S. M. Ostroff, R. V. Tauxe, K. D. Greene, J. G. Wells, J. H. Lewis, and P. A. Blake. 1988. Illnesses associated with *Escherichia coli* O157:H7 infections. A broad clinical spectrum. *Ann. Intern. Med.* 109:705-712.
- Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:603-609.
- Johnson RP, Wilson JB, Michel P, Rahn K, Renwick SA, Gyles CL, Spika JS. Human infection with verotoxigenic *Escherichia coli* associated with exposure to farms and rural environments. In: Stewart CS, Flints HJ, editors. *Escherichia coli* O157 in Farm Animals. CABI Publishing; Wallingford, U.K: 1999. pp. 147-168.
- Thompson JS, Hodge DS, Borczyk AA. Rapid biochemical test to identify verocytotoxin-positive strains of *Escherichia coli* serotype O157. *J Clin Microbiol.* 1990;28:2165-2168.
- Rappaport F, Henig E. Media for the isolation and differentiation of pathogenic *Escherichia coli* (serotypes O111 and O55). *J Clin Pathol* 1952; 5:361-362.
- ISO 16654:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for detection of *E.coli* O157
- March SB, Ratnam S. Sorbitol-MacConkey Medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J Clin Microbiol* 1986; 23: 869-872
- Atlas D, Snyder J. Media Reagents and Stains. In Jorgensen JH, Carroll KC, Funke G et al. editors. *Manual of clinical microbiology*, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015. p.345.
- Buchan BW et al. Media *Escherichia Shigella* and *Salmonella*. In Jorgensen JH, Carroll KC, Funke G et al. editors. *Manual of clinical microbiology*, 12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019. p.704.
- Public Health England. Investigation of Faecal Specimens for Enteric Pathogens. B38. Issue 8.1. 2014

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	o REF	LOT Numero di lotto	IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	Fabbricante	Utilizzare entro
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Non riutilizzare	Fragile maneggiare con cura	

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 5	Aggiornamento del contenuto e del layout in accordo a IVDR 2017/746	02/2021

Nota: lievi modifiche tipografiche, grammaticali e di formattazione non sono incluse nella cronologia delle revisioni.

