

**ISTRUZIONI PER L'USO****MAC CONKEY AGAR****Piastre pronte all'uso**Mac Conkey Agar: *E. coli* (colonie con alone rosso) e *Pseudomonas aeruginosa* (colonie verdi)**1-DESTINAZIONE D'USO**Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno selettivo e differenziale per l'isolamento e la differenziazione delle *Enterobacteriaceae* e di altri bacilli Gram-negativi, da campioni clinici e non clinici.**2-COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA ***

| | |
|---------------------------|----------|
| Peptone di gelatina | 17,000 g |
| Peptoni (carne e caseina) | 3,000 g |
| Lattosio | 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 | 13,500 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

Mac Conkey Agar è un terreno selettivo e differenziale preparato sulla base della formulazione descritta da Alfred Theodore MacConkey nel 1900¹ e successivamente modificata da Albert Grunbaum ed Edward Hume nel 1902², con l'inserimento in formula del violetto cristallo e del rosso neutro. Dal 1930 sono state pubblicate almeno 10 modifiche al terreno "MacConkey's Basal Bile Salt Peptone", ma è stata la formula di Grunbaum e Hume a resistere alla prova del tempo ed è (con lievi modifiche) la base del moderno agar MacConkey; 120 anni dopo, l'agar MacConkey rimane onnipresente nei laboratori clinici ed industriali, dove viene utilizzato di routine per isolare organismi Gram-negativi non esigenti in una varietà di campioni clinici e non clinici.⁴

Il terreno è impiegato per l'isolamento e la differenziazione degli enterobatteri e di altri bacilli Gram-negativi e per la differenziazione dei batteri fermentanti e non fermentanti il lattosio. Mac Conkey Agar è indicato per l'esame di campioni clinici di origine umana^{5,6}, è suggerito da FDA-BAM⁷ per l'isolamento di *E. coli* enteropatogeni negli alimenti ed inoltre è indicato per la ricerca di *E. coli* nei prodotti farmaceutici non sterili, con metodo armonizzato EP, USP, JP⁸ ed è incluso nella norma ISO 21150 per la determinazione di *E. coli* nei cosmetici⁹.

Il terreno originale di Mac Conkey e di Grunbaum e Hume è stato modificato nell'attuale preparazione, diminuendo il contenuto d'agar, aggiungendo 5 g/litro di sodio cloruro e variando le concentrazioni dei sali biliari e del rosso neutro³. Le modificazioni attuate consentono una eccellente crescita della maggior parte delle specie di *Salmonella* e *Shigella* e permettono una migliore differenziazione di questi patogeni dai microrganismi appartenenti al gruppo dei coliformi.

L'azione selettiva del Mac Conkey Agar è dovuta alla presenza dei sali biliari n°3 che inibiscono la crescita dei batteri Gram positivi; l'attività inibitoria è potenziata dall'aggiunta di violetto cristallo. I peptoni forniscono azoto, carbonio e minerali per la crescita batterica; il sodio cloruro mantiene l'equilibrio osmotico del terreno. Il lattosio è incluso come carboidrato fermentabile: la sua degradazione da parte dei coliformi provoca una acidificazione del mezzo ed una conseguente precipitazione dei sali biliari con assorbimento del rosso neutro. I coliformi coltivano quindi con colonie rosso-viola circondate da un alone di precipitazione, i microrganismi lattosio non fermentanti coltivano con colonie prive di colore. La sciamaatura dei protei è controllata su Mac Conkey Agar grazie all'impiego di peptoni e sali biliari selezionati che agiscono da inibitori di tale fenomeno.

4-CARATTERISTICHE DEL TERRENO IN PIASTRA

Aspetto terreno limpido o leggermente opalescente, di colore rosso-viola
 pH finale a 25 °C 7,1 ± 0,2

5-MATERIALI FORNITI

| Prodotto | Tipo | REF | Confezione |
|--|------------------------|--------|---|
| Mac Conkey Agar CND: W0104010405; EDMA: 14.01.04.01; RDM: 1444687/R | Piastre pronte all'uso | 541670 | 2 x 10 piastre ø 90 mm confezionamento primario: 2 sacchetti di cellophane confezionamento secondario: scatola di cartone |

6-MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Anse e tamponi sterili da microbiologia, termostato e strumentazione di laboratorio, terreni di coltura accessori e reagenti per l'identificazione dei microrganismi.

7-CAMPIONI

Mac Conkey Agar si presta alla semina di numerosi campioni clinici contenenti flora mista tra i quali, urine feci, materiali dalle vie aeree, ferite, ascessi^{5,6} e non clinici quali alimenti, farmaci non sterili, cosmetici^{7,8,9}. Quando possibile, raccogliere il campione prima dell'inizio della terapia antimicrobica. Applicare le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, la conservazione ed il trasporto in laboratorio dei campioni.

8-PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastre a temperatura ambiente e lasciare asciugare la superficie del terreno. 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 le piastre a 35-37°C in aerobiosi per 18-24 ore o più a lungo se necessario (fino a 48 ore per alcuni ceppi di lattosio fermentanti che esprimono una ritardata reazione tipica: *Citrobacter*, *Providencia*, *Serratia*, *Hafnia*).⁴

Per la determinazione di *E.coli* nei prodotti farmaceutici non sterili seguire le indicazioni della Farmacopea Europea⁹, qui riassunte.

- Preparare una diluizione 1:10 del campione usando non meno di 1 g di prodotto da esaminare. Con 10 mL di tale diluizione o la quantità corrispondente a 1 g o 1 mL, inoculare un volume adeguato di Tryptic Soy Broth. Mescolare ed incubare a 30-35°C per 18-24 ore.
- Mescolare la coltura e trasferirne 1 mL in 100 mL di Mac Conkey Broth EP (REF 401679) ed incubare a 42-44°C per 24-48 ore.
- Trapiantare dalla brodcoltura in Mac ConKey Broth EP su piastre di Mac Conkey Agar ed incubare a 30-35°C per 18-72 ore.
- La possibile presenza di *E.coli* è indicata dalla crescita su piastra di colonie tipiche, confermate con i test di identificazione.

9-LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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

Le colonie dei batteri fermentanti il lattosio appaiono da rosa-rosso a rosso-viola, con o senza una zona rossa di precipitazione dei sali biliari.

Le colonie dei batteri non fermentanti il lattosio appaiono prive di colore o gialline o con la naturale pigmentazione (es. verde per *P.aeruginosa*).

10-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 qualità¹⁰.

| CEPPI DI CONTROLLO | INCUBAZIONE T° / T / ATM | RISULTATI ATTESI |
|---------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| <i>E.coli</i> ATCC 8739 | 35-37°C / 18-24h / A | colonie rosso-viola con alone rosso |
| <i>P.mirabilis</i> ATCC 12453 | 35-37°C / 18-24h / A | colonie incolori non sciamate |
| <i>S.Typhimurium</i> ATCC 14028 | 35-37°C / 18-24h / A | colonie incolori |
| <i>E.faecalis</i> ATCC 29212 | 35-37°C / 18-24h / A | crescita inibita |

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

11-CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di piastre di Mac Conkey Agar e della materia prima impiegata per la produzione (terreno in polvere Mac Conkey Agar REF 401670), vengono testati per la produttività e la selettività avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato e considerato come Lotto di Riferimento.

La produttività è saggiata con metodo quantitativo con il ceppo target *E.coli* ATCC 8739. Le piastre di Mac Conkey Agar del lotto in esame (TB) e del lotto di riferimento (RB), sono seminate con appropriate diluizioni in soluzione salina di una sospensione di colonie del ceppo target. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 ore in aerobiosi, vengono contate le colonie sviluppate sui due lotti e calcolato l'indice di produttività ($Pr = \frac{UFC_{TB}}{UFC_{RB}}$). Nel caso *Pr* sia superiore o uguale a 0,7 e nel caso la morfologia delle colonie sia tipica (colonie rosso viola con alone rosso), i risultati sono giudicati conformi.

Inoltre la produttività del terreno è valutata con metodo ecometrico semiquantitativo con serie di ceppi target Gram negativi fermentanti il lattosio (*E.coli* ATCC 25922, *E.aerogenes* ATCC 13048, *K.pneumoniae* ATCC 27736), e non fermentanti il lattosio (*S.Typhimurium* ATCC 14028, *S.flexneri* ATCC12022, *P.mirabilis* ATCC 12453, *P.vulgaris* ATCC 6380, *Y.enterocolitica* ATCC 23715, *P.aeruginosa* ATCC 9027). Dopo incubazione, le colonie dei ceppi target Gram negativi fermentanti il lattosio appaiono con morfologia e cromie tipiche (da rosa-rosso a rosso-viola con o senza alone rosso), mentre le colonie dei lattosio non fermentanti appaiono incolori o verdi per *P.aeruginosa*. Sono anche valutate le cariche microbiche di questi ceppi target e se esse sono comparabili nei due lotti, i risultati sono giudicati conformi alle specifiche.

Per valutare la selettività del terreno Mac Conkey Agar vengono seminate con metodo Miles Misra modificato diluizioni da 10⁻¹ a 10⁻⁴ di una sospensione con densità pari a McFarland 0,5 di un ceppo non target Gram positivo (*E.faecalis* ATCC 29212). Se, dopo incubazione a 35-37°C per 24 ore in aerobiosi, *E.faecalis* risulta completamente inibito alla diluizione 10⁻¹ in entrambi i lotti, i risultati sono considerati conformi alle specifiche.

12-LIMITI DEL METODO

- Incubazioni prolungate possono fornire risultati dubbi o confusi.⁴ Non prolungare l'incubazione oltre le 48 ore.
- A causa delle elevate caratteristiche di selettività, alcuni bacilli Gram negativi, particolarmente esigenti sotto il profilo delle esigenze nutritive, possono non crescere o crescere stentatamente sul terreno.⁴
- Alcuni enterococchi possono sviluppare piccole colonie con incubazione prolungate oltre le 24 ore.⁴
- Mac Conkey Agar non è un terreno soddisfacente per il rilevamento e l'enumerazione dei coliformi negli alimenti. Uno dei metodi più affidabili utilizza il Violet Red Bile Agar con la tecnica per inclusione.¹¹
- 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 qui descritto è 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).

15 - BIBLIOGRAFIA

1. MacConkey AT. Note on a new medium for the growth and differentiation of the *Bacillus coli communis* and the *Bacillus Typhi abdominalis*. The Lancet, July 07, 1900; vol 156, Issue 4010, P20.
2. Grunbaum AS, Hume EH. Note on media for distinguishing *B. coli*, *B. typhosus* and related species. Brit Med J, June 14 1902; p 1473-1474
3. Smith KP, The origin of MacConkey Agar. American Society for Microbiology: Articles, Oct. 14, 2019.
4. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
5. McElvania E, Singh K. Specimen Collection, Transport and Processing: Bacteriology. In Carrol KC, Pfaller MA et al. editors. Manual of clinical microbiology, 12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019.
6. Vandepitte J, Verhaegen J, P. Rohner P, Piot P, Heuck CC. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. 2nd edition Geneva: World Health Organization Geneva; 2003.
7. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Bacteriological Analytical Manual Chapter 4A Diarrheagenic *Escherichia coli*. Content current as of: 11/03/2017
8. European Pharmacopoeia, current edition.
9. ISO 21150:2015. Cosmetics- Microbiology -Detection of *Escherichia coli*.
10. CLSI (formerly NCCLS) Quality Control of Commercially Prepared Culture Media. Approved Standard, 3rd edition. M22 A3 vol. 24 n° 19, 2004
11. Harrigan WF., McCance ME. The Microbiological examination of foods. in Laboratory Methods in Microbiology, Elsevier B.V. 1966.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

| | | | | | |
|----------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|--|-----------------------------|------------------|
| REF Numero di catalogo | o REF | LOT Numero di lotto | IVD In vitro Diagnostic Medical Device | 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 layout e dei contenuti in accordo a IVDR 2017/746 | 2020/05 |

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

