

**ANVÄNDNINGSSINSTRUKTIONER****MAC CONKEY AGAR****Färdiga plattor**

Mac Conkey Agar: *E. coli* (kolonier med röd halo) och *Pseudomonas aeruginosa* (grönaktiga kolonier)

1 – AVSEDD ANVÄNDNING

Produkt för *In vitro*-diagnostik. Selektivt och differentiellt medium för isolering och differentiering av *Enterobacteriaceae* och andra gramnegativa baciller från kliniska och icke-kliniska prover.

2 – TYPISK SAMMANSÄTTNING *

Gelatinpepton	17,000 g
Peptoner (kött och kasein)	3,000 g
Laktos	10,000 g
Gallsalter nr 3	1,500 g
Natriumklorid	5,000 g
Neutralrött	0,030 g
Kristallviolett	0,001 g
Agar 13,500 g	
Renat vatten	1 000 ml

* Formeln kan justeras och/eller kompletteras för att uppfylla de prestandakriterier som krävs.

3 – PRINCIP FÖR METODEN OCH FÖRKLARING AV FÖRFARANDET

Mac Conkey Agar är ett selektivt, differentiellt medium baserat på den formulering som beskrevs av Alfred Theodore MacConkey 1900¹ och senare modifierades av Albert Grunbaum och Edward Hume 1902² med tillsats av neutralt rött och kristallviolett.

År 1930 publicerades tio modifieringar av "MacConkey's Basal Bile Salt Peptone"-agar i ett kompendium över mikrobiologiska medier, men av alla dessa var det Grunbaum och Humes formel som stod sig över tid och som (med mindre modifieringar) utgör grunden för modern MacConkey-agar. 120 år senare är MacConkey-agar fortfarande allmänt förekommande i kliniska och industriella laboratorier, där det rutinmässigt används för att detektera icke-krävande gramnegativa organismer i en mängd olika humana prover och icke-kliniska material.³

Mac Conkey Agar är avsett för isolering av *Enterobacteriaceae* och andra gramnegativa baciller samt för differentiering av laktosfermenterande från laktosfermenterande gramnegativa enteriska baciller. Mac Conkey Agar används för mikrobiologisk undersökning av humana kliniska prover^{5,6} ingår i FDA-BAM⁷ för primär isolering av enteropatogena *E. coli* livsmedel, uppfyller harmoniserade EP-, USP- och JP-specifikationer⁸ för detektion av *E. coli* i icke-sterila farmaceutiska produkter och rekommenderas av ISO 21150 för detektion av *E. coli* i kosmetika⁹.

Det ursprungliga MacConkey-mediet har modifierats i den aktuella beredningen: agarhalten är lägre, 5 g/L natriumklorid har tillsatts och koncentrationen av gallsalter och neutralt rött har modifierats.⁴ Dessa modifieringar främjar utmärkt tillväxt av de flesta stammar av *Salmonella* och *Shigella* och möjliggör bättre differentiering av dessa patogener från koliforma bakterier. Den selektiva verkan hos Mac Conkey Agar beror på närvaron av gallsalter nr 3, som hämmar tillväxten av grampositiva bakterier; denna hämmande verkan förstärks genom tillsats av kristallviolett. Peptonerna tillför kol, kväve och spårämnen för bakterietillväxt; natriumklorid upprätthåller den osmotiska balansen. Fermenteringen av laktos av koliforma bakterier orsakar försurning av mediet, med påföljande utfällning av gallsalterna och absorption av neutralt rött.⁴ De koliforma bakterierna växer med rödrosa till rödvioletta kolonier omgivna av en röd utfällningszon. Laktosfermenterande stammar (t.ex. *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Alkaligenes* osv.) utvecklar transparenta, färglösa kolonier utan utfällningszon. *Proteus* spp.-svärmningen kontrolleras delvis på Mac Conkey Agar genom användning av utvalda råvaror.

4 – FYSISKA EGENSKAPER

Medelstort utseende rödviolett, klar eller lätt opaliserande
Slutligt pH vid 25 °C 7,1 ± 0,2

5 – MATERIAL SOM TILLHANDAHÅLLS

Produkt	Typ	REF	Förpackning
Mac Conkey Agar	Färdiga plattor	541670	2 x 10 plattor ø 90 mm Primär förpackning: 2 cellofanpåsar Sekundär förpackning: kartong

6 – MATERIAL SOM KRÄVS MEN INTE TILLHANDAHÅLLS

Sterila öglor och svabbprover, inkubator och laboratorieutrustning efter behov, kompletterande odlingsmedier och reagenser för identifiering av kolonierna.

7 – PROVER

Mac Conkey Agar är avsett för bakteriologisk undersökning av flera humana kliniska prover med blandad flora (t.ex. urin, avföring, material från luftvägarna, sår och abscesser etc.)^{5,6} och icke-kliniska prover, såsom livsmedel, icke-sterila läkemedel, kosmetika^{7,8,9}. Samla in prover före antimikrobiell behandling om möjligt. God laboratiesed för insamling, förvaring och transport av proverna till laboratoriet bör tillämpas.

8 – TESTFÖRFARANDE

Låt plattorna anta rumstemperatur och låt ytan på mediet torka. Inokulera och stryk ut provet med en ögla över de fyra kvadranterna på plattan för att få väl isolerade kolonier, och se till att sektionerna 1 och 4 inte överlappar varandra. Alternativt, om materialet odlas direkt från en bomullspinne, rulla bomullspinnen över ett litet område av ytan vid kanten och stryk sedan ut från detta inokulerade område.

Inkubera i aerob atmosfär vid 35–37 °C i 18–24 timmar eller längre om nödvändigt (kanske upp till 48 timmar för senlaktosfermenterare: *Citrobacter*, *Providencia*, *Serratia*, *Hafnia*).⁴





För detektion av *E.coli* i icke-sterila läkemedelsprodukter bör den teknik som rekommenderas av Europeiska farmakopén⁸ och sammanfattas nedan följas:

- Förbered ett prov med en utspädning på 1:10 av minst 1 g av den produkt som ska undersökas och använd 10 ml eller den mängd som motsvarar 1 g eller 1 ml för att inokulera lämplig mängd Tryptone Soy Broth. Blanda och inkubera vid 30–35 °C i 18–24 timmar.
 - Skaka behållaren, överför 1 ml Tryptone Soy Broth till 100 ml Mac Conkey Broth EP EP och inkubera vid 42–44 °C i 24–48 timmar.
 - Odlar vidare på en platta med Mac Conkey Agar och inkubera vid 30–35 °C i 18–72 timmar.
- Tillväxt av kolonier indikerar möjlig förekomst av *E.coli*. Detta bekräftas genom identifieringstester.

9 – AVLÄSNING OCH TOLKNING

Efter inkubation observerar du bakterietillväxten och noterar koloniernas specifika morfologiska och kromatiska egenskaper.

Kolonier av laktosfermenterande bakterier är rödrosa till rödvioletta och kan vara omgivna av röda zoner av utfälld galla.

Kolonier av laktosfermenterande bakterier är färglösa eller vita eller ljusgula eller har en naturlig pigmentering (t.ex. gröna för *P.aeruginosa*).

10 – ANVÄNDARENS KVALITETSKONTROLL

Alla tillverkade partier av produkterna släpps för försäljning efter att kvalitetskontrollen har utförts för att kontrollera att specifikationerna uppfylls. Slut användaren kan dock utföra sin egen kvalitetskontroll i enlighet med lokala tillämpliga bestämmelser, i enlighet med ackrediteringskrav och laboratoriets erfarenhet. Nedan listas några teststammar som är användbara för kvalitetskontroll.¹⁰

KONTROLLSTAMMAR	INKUBATIONSTEMPERATUR/T/ATM	FÖRVÄNTADE RESULTAT
<i>E.coli</i> ATCC 8739	35–37 °C / 18–24 timmar / A	röda violetta kolonier med röd ogenomskinlig halo
<i>P.mirabilis</i> ATCC 12453	35–37 °C / 18–24 timmar / A	svärmar inte färglösa kolonier
<i>S.Typhimurium</i> ATCC 14028	35–37 °C / 18–24 timmar / A	färglösa kolonier
<i>E.faecalis</i> ATCC 29212	35–37 °C / 18–24 timmar / A	hämrad

A: aerob inkubation; ATCC är ett varumärke som står för American Type Culture Collection

11 – PRESTANDAEGENSKAPER

Innan produkten släpps ut på marknaden testas ett representativt urval av alla partier av färdiga Mac Conkey Agar-plattor och av råmaterialen som används för tillverkningen av färdiga plattor (dehydrerad Mac Conkey Agar REF 401670) med avseende på produktivitet och selektivitet genom att resultaten jämförs med ett tidigare godkänt referensparti (RB).

Produktiviteten testas genom ett kvantitativt test med målstammen *E.coli* ATCC 8739. Mac Conkey Agar-plattor inokuleras med decimala utspädningar i saltlösning av en suspension av kolonier och inkuberas vid 35–37 °C i 18–24 timmar. Kolonierna räknas på testbatchen (TB) och referensbatchen (RB) och produktivetsförhållandet (Pr=UFCTB/UFCTB) beräknas. Om Pr är ≥ 0,7 och om koloniernas morfologi och färg är typiska (rödrosa till rödvioletta kolonier med röd ogenomskinlig halo) anses resultaten vara acceptabla och överensstämmer med specifikationerna. Dessutom testas produktivetskaraktäristika med semikvantitativ ekometrisk teknik med följande laktosfermenterande stammar: *E.coli* ATCC 25922, *E.aerogenes* ATCC 13048, *K.pneumoniae* ATCC 27736 och laktosfermenterande stammar: *S.Typhimurium* ATCC 14028, *S.flexneri* ATCC 12022, *P.mirabilis* ATCC 12453, *P.vulgaris* ATCC 6380, *Y.enterocolitica* ATCC 23715, *P.aeruginosa* ATCC 9027. Typiska kolonier av laktosfermenterande bakterier är rosa-röda till rödvioletta med eller utan utfällningszoner; typiska kolonier av laktosfermenterande bakterier är färglösa eller gröna för *P.aeruginosa*. Tillväxten på plattorna efter inkubation utvärderas och ska vara jämförbar i båda satserna.

Selektiviteten utvärderas med modifierad Miles-Misra-ytdroppmetod genom att inokulera plattorna med decimala utspädningar i saltlösning från 10⁻¹ till 10⁻⁴ av en 0,5 McFarland-suspension av den icke-målinriktade grampositiva stammen *E.faecalis* ATCC 29212. Om tillväxten av den icke-målinriktade stammen hämmas vid utspädningen 10⁻¹ i båda satserna anses resultaten vara godtagbara och överensstämmer med specifikationerna.

12 – METODENS BEGRÄNSNINGAR

- Långvarig inkubation kan leda till förvirrande resultat; inkubera inte längre än 48 timmar.⁴
- På grund av detta mediums selektiva egenskaper växer vissa stammar av gramnegativa enterobakterier inte eller växer dåligt. På samma sätt kan vissa grampositiva organismer inte hämmas eller hämmas endast delvis.⁴
- Vissa enterokockstammar kan uppvisa tillväxt efter långvarig inkubation.⁴
- Mac Conkey Agar är inte ett tillfredsställande medium för detektion och räkning av koliforma organismer i livsmedel. En av de mest tillförlitliga metoderna använder violetteröd gallagar i platträkning.¹¹
- Även om de mikrobiella kolonierna på plattorna kan särskiljas på grundval av sina morfologiska och kromatiska egenskaper, rekommenderas att biokemiska, immunologiska, molekylära eller masspektrometriska tester utförs på isolat från renkultur för fullständig identifiering. Om det är relevant, utför test av antimikrobiell känslighet.
- Detta odlingsmedium är avsett som ett hjälpmedel vid diagnos av infektionssjukdomar. Tolkningen av resultaten måste göras med hänsyn till patientens kliniska historia, provets ursprung och resultaten från andra diagnostiska tester.

13 – FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER OCH VARNINGAR

- Det här är en produkt för kvalitativ *in vitro*-diagnostik, endast avsedd för professionellt bruk. Den ska användas av adekvat utbildad och kvalificerad laboratoriepersonal som iakttar godkända försiktighetsåtgärder mot biologiska risker och aseptiska tekniker.
- Denna produkt är inte klassificerad som farlig enligt gällande europeisk lagstiftning.
- Detta odlingsmedium innehåller råmaterial av animaliskt ursprung. Kontrollera av djuren före och efter slakt samt under produktions- och distributionscykeln för råvarorna kan inte helt garantera att produkten inte innehåller några överförbara patogener. Därför rekommenderas att de färdiga plattorna behandlas som potentiellt smittsamma och hanteras med iakttagande av de vanliga specifika försiktighetsåtgärderna: förtär inte, andas inte in och undvik kontakt med hud, ögon eller slemhinnor. Ladda ner TSE Statement från webbplatsen www.biolifeitaliana.it, som beskriver de åtgärder som Biolife Italiana har vidtagit för att minska riskerna i samband med smittsamma djursjukdomar.
- Alla laboratorieprover ska betraktas som smittsamma.
- Laboratorieområdet måste kontrolleras för att undvika föroreningar som odlingsmedium eller mikrobiella agens.
- Varje platta med detta odlingsmedium är endast avsedd för engångsbruk.
- Färdiga plattor ska inte betraktas som en "steril produkt" eftersom de inte genomgår slutsterilisering, utan som en produkt med kontrollerad biologisk kontaminering, inom gränserna för de specifikationer som anges i kvalitetskontrollcertifikatet.





- Sterilisera allt biologiskt farligt avfall före bortskaffande och kassera oanvänt medium och steriliserade plattor som inokulerats med prover eller mikroorganismer i enlighet med gällande lokal lagstiftning.
- Analyscertifikaten och säkerhetsdatabladet för produkten finns tillgängliga på webbplatsen www.biolifeitaliana.it.
- Meddela Biolife Italiana Srl (complaint@biolifeitaliana.it) och berörda myndigheter om allvarliga incidenter som inträffar i samband med användningen av *in vitro*-diagnostiken.
- Informationen i detta dokument har definierats efter bästa kunskap och förmåga och utgör en riktlinje för korrekt användning av produkten men utan förpliktelse eller ansvar. I alla fall måste gällande lokala lagar, förordningar och standardförfaranden följas vid undersökning av prover som tagits från mänskliga och djuriska organ, miljöprover och produkter avsedda för konsumtion av människor eller djur. Vår information befriar inte våra kunder från deras ansvar att kontrollera att våra produkter är lämpliga för det avsedda ändamålet.

14 – FÖRVARINGSFÖRHÅLLANDEN OCH HÅLLBARHET











Förvara plattorna i originalförpackningen vid 2–8 °C och skyddade från direkt ljus. Om de förvaras korrekt kan plattorna användas fram till utgångsdatumet. Använd inte plattorna efter detta datum. Plattor från öppnade plastpåsar kan användas i 7 dagar om de förvaras i en ren miljö vid 2–8 °C. Använd inte plattorna om plastpåsen är skadad eller om skålen är trasig.

Använd inte plattor som visar tecken på försämring (t.ex. mikrobiell kontaminering, uttorkning, krympning eller sprickbildning i mediet, atypisk färg, överdriven fuktighet).

15 – REFERENSER

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.

TABELL ÖVER TILLÄMPLIGA SYMBOLER

 REF eller REF Katalognummer	 LOT Batch-kod	 IVD Medicinteknisk produkt för <i>in vitro</i> -diagnostik	 Tillverkare	 Använd senast
 Temperaturbegränsning	 Innehållet räcker till <n> tester	 Se bruksanvisningen	 Endast för engångsbruk	 Ömtåligt, hantera med försiktighet

REVIDERINGSHISTORIK

Version	Beskrivning av ändringarna	Datum
Användningsinstruktioner (IFU) – Revidering 2	Uppdaterad layout och innehåll i enlighet med IVDR 2017/746	2020/05
Användningsinstruktioner (IFU) – Revidering 3	Borttagning av föråldrad klassificering	2023/03

Anmärkning: mindre typografiska, grammatiska och formateringsändringar inkluderas inte i granskningshistoriken.

