

MAC CONKEY SORBITOL AGAR CEFIXIME TELLURITE O157 SUPPLEMENT

Terreno di coltura in polvere e supplemento selettivo



Mac Conkey Sorbitol Agar: colonie di *E.coli* O157 sorbitolo negative a sinistra e di *E.coli* sorbitolo positive a destra

1 - DESTINAZIONE D'USO

Terreno selettivo e differenziale e supplemento selettivo per l'isolamento di *Escherichia coli* O157:H7, dagli alimenti e da altri campioni.

2 - COMPOSIZIONE

MAC CONKEY SORBITOL AGAR

FORMULA TIPICA (PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA)*

| | |
|--------------------|----------|
| 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 |

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

CEFIXIME TELLURITE O157 SUPPLEMENT (FLACONE DA 500 ML)

CONTENUTO DEL FLACONE DI SUPPLEMENTO

| | |
|--------------------|----------|
| Cefixime | 0,025 mg |
| Potassio tellurito | 1,25 mg |

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

I ceppi enteremorragici 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 trombotica 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; il supplemento selettivo Cefixime Tellurite O157 Supplement è preparato sulla base delle osservazioni pubblicate da Zadik⁸.

Il terreno completo Mac Conkey Sorbitol Agar con cefixime e potassio tellurito (CT-SMAC) risulta conforme alla formulazione riportata dalla norma ISO 16654 per l'isolamento di *E.coli* O157⁹ ed a quanto indicato 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. Per incrementarne la selettività e quindi la specificità dei risultati, al terreno può essere aggiunto potassio tellurito e cefixime: secondo i dati di Zadik⁸ tale aggiunta inibisce completamente o parzialmente la crescita del 67% di *E.coli* non O157 e quasi completamente la crescita di altri Gram negativi non fermentanti il sorbitolo.

Mac Conkey Sorbitol Agar, addizionato del supplemento contenente cefixime e potassio tellurito, è indicato per l'isolamento e la differenziazione di *E.coli* O157:H7 dagli alimenti e da altri materiali^{2,9}.

4 - METODO DI PREPARAZIONE

Sospendere 25,5 g in 500 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione, sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Nel caso si desideri impiegare il terreno addizionato di cefixime e di potassio tellurite (CT-SMAC), procedere come segue: ricostituire il contenuto di un flacone di Cefixime Tellurite O157 Supplement (REF 42ISEC) con 5 mL di acqua purificata sterile; agitare bene ed aggiungere a 500 mL di terreno raffreddato a 44-47°C. Mescolare con cura e trasferire in piastre di Petri sterili. Le piastre possono essere conservate in un sacchetto di plastica a 3 ± 2°C fino a 2 settimane.⁹

5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere

fine granulometria omogenea, grigiastria

Aspetto del terreno in soluzione ed in piastra

limpido o leggermente opalescente di colore rosso-viola

pH (20-25°C)

7,1 ± 0,2



**6 - MATERIALI FORNITI**

| Prodotto | Tipo | REF | Confezione |
|------------------------------------|-------------------------------|----------|--|
| Mac Conkey Sorbitol Agar | Terreno di coltura in polvere | 401669S2 | 500 g (9,8 L) |
| Cefixime Tellurite O157 Supplement | Supplemento liofilo | 42ISEC | 10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno |

7 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio tarata e controllata, piastre di Petri sterili, flaconi o beute autoclavabili, anse da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori.

8 - CAMPIONI

Campioni alimentari: fare riferimento alle norme ed agli Standard internazionali applicabili.²⁻⁹

Seguire le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, la conservazione ed il trasporto in Laboratorio dei campioni.

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

- Preparare la sospensione madre del campione diluendone una aliquota *m* con un volume pari a *9m* di Modified Tryptic Soy Broth (REF 402155M2) addizionato di novobiocina 20 mg/L (Novobiocin Antimicrobial Supplement -REF 4240045).
- Incubare la sospensione a 41,5±1°C per 6 ore. Proseguire l'arricchimento per ulteriori 12-18 ore a 41,5±1°C.
- Eseguire sulle colture arricchite, la fase di separazione e concentrazione immunomagnetica con sfere rivestite di anticorpi anti *E.coli* O157, dopo 6 ore e, di nuovo, se necessario, dopo 12-18 ore
- Seminare 2 aliquote da 50 microlitri del materiale ottenuto nella fase di separazione immunomagnetica, rispettivamente su una piastra di Mac Conkey Sorbitol Agar + cefixime e potassio tellurito (CT-SMAC) e su una piastra di un secondo terreno a scelta del microbiologo (es. Mac Conkey Sorbitol MUG Agar REF 401669 o Chromogenic *E.coli* O157 Agar REF 405581). Strisciare l'inoculo sulla superficie dei due terreni in modo da ottenere lo sviluppo di colonie ben isolate.
- Incubare le piastre a 37°±1 °C per 18-24 ore.

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.

Eseguire i test di conferma biochimici per *E.coli* e sierologici con gli antisieri specifici O157 ed H7.

La norma ISO16654⁹ richiede l'esecuzione preliminare del test dell'indolo (+) e la prova con antisiero O157. FDA BAM² indica l'esecuzione del test della β-galattosidasi (+), della β-glucuronidasi (-) e dell'indolo (+) e le prove con antisieri O157 e H7.

La colonia sorbitolo negativa, con il profilo biochimico di *E.coli* e positiva agli antisieri O157 ed H7 è confermata come *E.coli* O157:H7.

Se la colonia risulta O157 (+) ma H7 (-), essa può appartenere ad una variante immobile (O157:NM) e quindi richiede un test di conferma del suo potenziale tossigenico (ad esempio con tecnica PCR). La colonia può anche essere seminata su piastra di agar sangue per indurre la mobilità e ri-testata con antisiero H7. I ceppi O157:H7 ed i ceppi O157:NM che producono verocitotossina sono considerati patogeni. Tuttavia i ceppi O157:NM che non producono verocitotossina o altri fattori di virulenza non sono probabilmente patogeni. Vi sono molti ceppi di *E.coli* O157 con fattore H diverso da H7 (H3, H12, H16, H38, H45 ecc) e tali ceppi spesso non producono nessun fattore di virulenza.²

Per una esposizione completa dei criteri e dei metodi di identificazione si rimanda alla letteratura citata.^{2,12}

11 - CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

Ciascun lotto dei prodotti qui descritti 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 parzialmente inibita, colonie rosse |
| <i>S.aureus</i> ATCC 25923 | 35-37°C / 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 del terreno in polvere Mac Conkey Sorbitol Agar e del supplemento Cefixime Tellurite Supplement, usati congiuntamente, vengono testati per la produttività, e la selettività, avendo come riferimento lotti precedentemente approvati di terreno in polvere e di supplemento e considerati come Lotti di Riferimento.

La produttività e del terreno completo è valutata con metodo ecometrico semiquantitativo, con incubazione a 35-37°C per 18-24 ore, con i ceppi target *E.coli* O157:H7 ATCC 43888 and *E.coli* O157:H7 NCTC 12900, *E.coli* O157:H7 ATCC 43894. Dopo incubazione, 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 completo vengono seminate con metodo Miles Misra modificato diluizioni da 10⁻¹ a 10⁻⁶ di sospensioni con densità pari a McFarland 0,5 dei seguenti ceppi non target: *E.coli* ATCC 25922, *K.pneumoniae* ATCC 27736, *E.hermannii* ATCC 33650, *E.faecalis* ATCC 19433 and *S.aureus* ATCC 25923. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 ore in aerobiosi, *E.coli* e *K.pneumoniae* risultano parzialmente inibiti e sviluppano colonie rosse, *E.hermannii* risulta parzialmente inibito e sviluppa colonie incolori, *E.faecalis* e *S.aureus* sono inibiti alla diluizione 10⁻¹.



**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 CT-SMAC. Per la determinazione di tali ceppi negli alimenti riferirsi alla letteratura citata.²
- Sono stati segnalati ceppi di *E.coli* O157 sorbitolo positivi, ceppi β -glucuronidasi positivi e ceppi che non coltivano su CT-SMAC.^{13,14} Per la gestione di tali ceppi fare riferimento alla letteratura citata.^{11,12}
- 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.)
- Sebbene la destinazione d'uso e il metodo di utilizzo del terreno di coltura si riferiscano alla rilevazione di *E. coli* O157:H7 negli alimenti e quindi il prodotto non debba essere considerato un diagnostico *in vitro*, la letteratura riporta l'uso del terreno di coltura per campioni clinici umani.^{11,12} Le applicazioni cliniche devono essere validate dall'utilizzatore.
- 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.

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- I prodotti qui descritti sono destinati ai controlli microbiologici, sono per uso professionale e devono essere usati in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- Il terreno di coltura ed il supplemento qui descritti devono essere usati congiuntamente in accordo al metodo di preparazione indicato. Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- I terreni in polvere ed i supplementi contenenti antibiotici devono essere manipolati con adeguate protezioni. Prima dell'uso consultare le schede di sicurezza.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materiali di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione delle materie prime 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 di sicurezza 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 i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti come terreno di coltura, supplemento o agenti microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti biologici. Smaltire il terreno di base ed il supplemento non utilizzati ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare i prodotti qui descritti come principi attivi per preparazioni farmaceutiche o come materiali per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza dei prodotti qui descritti 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.

15 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ**Terreno in polvere**

Conservare a +10°C /+30°C al riparo della luce e dell'umidità. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Evitare di aprire il flacone in ambienti umidi. Una volta aperto, conservare il prodotto mantenendo il tappo del contenitore ben chiuso. Eliminare il prodotto nel caso il contenitore e/o il tappo fossero danneggiati, nel caso i contenitori non fossero ben chiusi o in caso di evidente deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).

Supplemento selettivo

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C /+8°C al riparo dalla luce diretta. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta; non utilizzare oltre questa data. Una volta aperto il flacone e ricostituito il liofilizzato, la soluzione ottenuta deve essere usata immediatamente. Esaminare il prodotto liofilo ed il prodotto ricostituito al momento dell'uso e scartare se vi fossero segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione, colore alterato o altra caratteristica anomala).

L'utilizzatore è responsabile del processo di produzione e di controllo dei terreni preparati in laboratorio e della definizione del loro periodo di validità, in funzione della tipologia (piastre/provette) e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento).

16 - BIBLIOGRAFIA












1. Centers for Disease Control. 1984. Update: sporadic hemorrhagic colitis. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 33:28
2. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4a Diarrheagenic *Escherichia coli*. Rev October 2018
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Rappaport F, Henig E. Media for the isolation and differentiation of pathogenic *Escherichia coli* (serotypes O111 and O55). J Clin Path 1952; 5:361-362.





8. Zadik PM, Chapman PA, and Siddons CA. Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic Escherichia coli O157. J. Med. Microbiol 1993; 39:155-158
9. ISO 16654:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for detection of E.coli O157
10. March SB, Ratnam S. Sorbitol-MacConkey Medium for detection of Escherichia coli O157:H7 associated with hemorrhagic cholitis. J Clin Microbiol 1986; 23: 869-872
11. Public Health England. Investigation of Faecal Specimens for Enteric Pathogens. B38. Issue 8.1. 2014
12. Public Health England. Identification of Vero cytotoxin-producing Escherichia coli including Escherichia coli O157. ID22. Issue 4. 2015.
13. Díaz S, Vidal D, Herrera-León S, Sánchez S. Sorbitol-fermenting, β -Glucuronidase-positive, shiga toxin-negative Escherichia coli O157:H7 in free-ranging red deer in South-Central Spain. Foodborne Pathog Dis 2018; 8:1313-1315
14. CDR Weekly. CDR. Sorbitol-fermenting Vero cytotoxin-producing E. coli (VTEC 0157). CDR. 2006

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

| | | | | | |
|--|--|---|---|--|---|
|  REF or REF Numero di catalogo |  LOT Numero di lotto |  Fabbricante |  Utilizzare entro |  Proteggere dall'umidità | |
|  Limiti di temperatura |  Contenuto sufficiente per <n> saggi |  Consultare le Istruzioni per l'Uso |  Lato superiore |  Proteggere dalla luce |  Fragile, maneggiare con cura |

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

| Versione | Descrizione delle modifiche | Data |
|-----------------|--|-------------|
| Revisione 3 | Aggiornamento del contenuto e del layout | 05/2020 |
| Revisione 4 | Modifiche a: "destinazione d'uso", "procedura dell'analisi", "precauzioni ed avvertenze", "conservazione e validità" | 05/2022 |

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

