

**ISTRUZIONI PER L'USO****MANNITOL SALT AGAR****Piastre pronte all'uso**Mannitol Salt Agar: colonie di *S.aureus***1- DESTINAZIONE D'USO**

Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno selettivo e differenziale per l'isolamento e la differenziazione degli Stafilococchi da campioni clinici e non clinici.

2 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA *

Digerito pancreatico di caseina	5 g
Digerito peptico di tessuto animale	5 g
Estratto di carne	1 g
Sodio cloruro	75 g
D-Mannitolo	10 g
Rosso fenolo	0,025 g
Agar	15 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

Gli Stafilococchi sono cocci asporigeni Gram positivi, di dimensioni variabili, osservabili come singole cellule, in coppie o in ammassi irregolari. La temperatura ottimale di crescita è tra i 30°C ed i 37°C. Sono anaerobi facoltativi con metabolismo fermentativo. *S. aureus* è un batterio commensale, ubiquitario sulla pelle umana e sulla narice anteriore, ma spesso causa gravi infezioni nell'uomo.

Il terreno di coltura Mannitol Salt Agar è basato sul lavoro di Gordon¹ degli inizi del 900 nel quale la fermentazione del mannitolo fu usata per la prima volta per differenziare gli Stafilococchi patogeni da quelli non patogeni e sulla scoperta di Koch² sulla attività inibitoria del sodio cloruro al 7,5% nel terreno di coltura verso la maggior parte dei microrganismi, fatta eccezione per gli Stafilococchi.

Il Mannitol Salt Agar è un terreno selettivo e differenziale per l'isolamento degli Stafilococchi da campioni clinici^{4,5} e per la loro differenziazione tra mannitolo fermentanti e non fermentanti; la crescita di colonie mannitolo positive dai campioni clinici è indicativa della presenza di *S.aureus* e devono essere ulteriormente confermata ed identificata.⁶

Mannitol Salt Agar è conforme alle specifiche armonizzate di EP, USP, JP⁷ per la determinazione di *S.aureus* nei prodotti farmaceutici non sterili ed è raccomandato per la determinazione di *S.aureus* nei cosmetici.^{8,9}

I peptoni forniscono azoto carbonio e minerali per la crescita batterica, il sodio cloruro alla concentrazione di 75 g/L crea una elevata pressione osmotica nel terreno: gli Stafilococchi resistono a tale pressione e crescono sulla piastra mentre risulta inibitoria per la maggior parte degli altri batteri Gram positivi e per i batteri Gram negativi.² Il terreno inoltre contiene il mannitolo come carboidrato fermentabile ed il rosso fenolo come indicatore di pH. La fermentazione del mannitolo si traduce in una produzione di acidi con un abbassamento del pH ed il viraggio al giallo del terreno attorno alle colonie. I ceppi mannitolo non fermentanti che mostrano resistenza all'alta concentrazione salina, crescono con colonie circondate da una zona rosa-rosso-viola dovuta alla degradazione dei peptoni.⁶

4 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto	terreno limpido di colore rosso-viola
pH finale a 20-25 °C	7,4 ± 0,2

5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Mannitol Salt Agar	Piastre pronte all'uso	541665	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

Mannitol Salt Agar è indicato per la semina di campioni clinici di origine umana da siti non sterili come feci, materiali delle vie respiratorie, essudati purulenti, ascessi e ferite^{4,5,10} e di campioni non clinici quali i prodotti farmaceutici non sterili ed i cosmetici^{8,9}. Applicare le norme di buona prassi di laboratorio (GLP) per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni clinici.¹¹

Consultare gli standard e le norme applicabili per la raccolta e la preparazione dei campioni dei prodotti farmaceutici non sterili e dei cosmetici.^{7,8,9}

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 ed osservare dopo 24 e 48 ore.

Per la determinazione di *S.aureus* nei prodotti farmaceutici non sterili operare come segue.

Preparare una diluizione 1:10 del campione usando non meno di 1 g o 1 mL 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. Incubare a 30-35°C per 18-24 ore.

Trapiantare dalla brodocoltura su piastra di Mannitol Salt Agar ed incubare a 30-35°C per 18-72 ore.

9 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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

La possibile presenza di *S.aureus* è indicata dalla crescita su piastra di colonie gialle/bianche circondate da un alone giallo.

Gli Stafilococchi mannitolo non fermentanti producono colonie bianche senza modifica del colore del terreno o con la formazione di un alone rosso o viola.

Le colonie di *S.aureus* sospette devono essere confermate/identificate.¹⁰

10 - CONTROLLO QUALITA' 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 comune facoltà 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.¹²

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>S.aureus</i> ATCC 6538 o 25923	35°C / 18-24 H / A	crescita, colonie e terreno giallo
<i>S.epidermidis</i> ATCC12228	35°C / 18-24 H / A	crescita, colonie incolori con alone viola,
<i>P.mirabilis</i> ATCC 12453	35°C / 18-24 H / A	parzialmente inibito
<i>E.coli</i> ATCC 8739	35°C / 68-72 H / A	inibito

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

11 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di piastre di Mannitol Salt Agar e della materia prima impiegata per la produzione (terreno in polvere Mannitol Salt Agar REF 401665) 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 *S.aureus* ATCC 6538. Le piastre di Mannitol Salt Agar sono seminate con appropriate diluizioni in soluzione salina di una sospensione di colonie. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 ore in aerobiosi vengono contate le colonie sviluppate sul lotto in esame e sul lotto di riferimento e calcolato l'indice di produttività. Nel caso tale indice sia superiore a 0,7 e nel caso la morfologia delle colonie sia tipica (colonie bianche o gialle con alone giallo), i risultati sono giudicati conformi.

La produttività del terreno è valutata inoltre con metodo ecometrico semiquantitativo con i seguenti ceppi target: *S.aureus* ATCC 25923, *S.aureus* di isolamento clinico, *S.epidermidis* ATCC 12228. Dopo incubazione, i ceppi fermentanti il mannitolo crescono con colonie bianche o gialle con alone giallo, il ceppo non fermentante il lattosio con colonie bianche ed alone violetto. 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 diluizioni da 10⁻¹ a 10⁻⁴ di sospensioni con densità pari a McFarland 0,5 di ceppi non-target: *E.faecalis* ATCC 29212, *E.coli* ATCC 8739 e *P.mirabilis* ATCC 12453. Dopo 24-72 ore di incubazione, la crescita di *E.coli* e di *E.faecalis* risulta inibita alla diluizione 10⁻¹ e la crescita di *P.mirabilis* risulta parzialmente inibita.

12 - LIMITI DEL METODO

- Gli enterococchi possono crescere leggermente sul terreno con piccole colonie fermentanti il mannitolo. Il test della catalasi e l'osservazione microscopica aiuta nella differenziazione tra *Enterococcus* e *Staphylococcus*.¹³
- Pochi ceppi di *Staphylococcus* possono esibire una ritardata fermentazione del mannitolo; le piastre negative dovrebbero essere re-incubate per ulteriori 24 ore prima di essere eliminate.¹³
- *S.aureus* deve essere confermato con il test della coagulasi. Eseguire un ri-trapianto in un terreno non inibitorio per l'esecuzione del test.
- Il terreno è selettivo e specifico per *S.aureus* quando si osservano colonie tipiche dopo 24 ore di incubazione, tuttavia dopo 48 ore si possono ritrovare colonie di *Micrococcus*, *Bacillus* e *Serratia*.¹³
- Non il colore delle colonie ma il viraggio al giallo del terreno è indice della fermentazione del mannitolo; ciò è particolarmente importante poiché molti micrococchi sono pigmentati.⁶
- Sono stati segnalati ceppi di stafilococchi coagulasi negativi che fermentano il mannitolo e coltivano con viraggio al giallo del terreno.¹⁴
- Alcuni organismi target (ceppi di stafilococco potenzialmente patogeni) possono essere inibiti su questo terreno. La sensibilità della procedura descritta varia in base alla tipologia dei campioni clinici, alla quantità di organismi non target presenti, al numero di organismi target. Se è necessario rilevare tutti i potenziali patogeni, è consigliabile utilizzare anche un terreno non selettivo e non differenziale insieme al Mannitol Salt Agar.
- Per la rilevazione dei ceppi di *S.aureus* resistenti alla meticillina (MRSA) si dovrebbero applicare metodi di rilevazione più accurati, come le tecniche molecolari.
- 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 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.
- 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 le piastre dopo l'uso e prima della loro eliminazione. Smaltire le piastre non utilizzate e le piastre seminate con i campioni o con i ceppi di controllo in accordo alla legislazione vigente in materia.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il terreno e con gli agenti microbici.
- 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. Gordon MH. Reports of some characters by which various streptococci and staphylococci may be differentiated and identified. Local British Government Board, Rept Med Officer 1903-04; 33:388-430.
2. Koch FE. Electivnährboden für Staphylokokken. Zentr. Bakt. Parasitenk. I Orig 1942; 149:122-124.
3. Chapman GH. The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. J Bacteriol 1945; 50:201-203.
4. Vandepitte J, Verhaegen J, Engbaek K, Rohner P, Piot P, Heuck CC. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. 2nd ed. 2003; Geneve: World Health Organization.
5. Public Health England- UK Standards for microbiology investigations (UK SMI): searchable index. 9 January 2019
6. Shields P, Tsang AY. Mannitol salt agar plates protocol. American Society for Microbiology (ASM), October 9, 2006.
7. European Pharmacopoeia, current edition
8. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 23 Microbiological Methods for Cosmetics. July 2017
9. ISO 22718:2015 Cosmetics –Microbiology- Detection of Staphylococcus aureus
10. Becker K, Skow R, Von Eiff C. Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase Positive Cocci. In Jorgensen JH, Carrol KC, Funke G et al. editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington,DC: American Society for Microbiology; 2015. p.354
11. Baron EJ, Specimen Collection, Transport and Processing: Bacteriology. In Jorgensen JH, Carrol KC, Funke G et al. editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington,DC: American Society for Microbiology; 2015. p.270.
12. CLSI (formerly NCCLS) Quality Control of Commercially Prepared Culture Media. Approved Standard, 3rd edition. M22 A3 vol. 24 n° 19, 2004
13. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
14. Thakur P, Nayyar C, Tak V, Karnika Saigal K. Mannitol-fermenting and tube coagulase-negative staphylococcal isolates: unraveling the diagnostic dilemma. J Lab Physicians 2017; 9(1):65-66.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	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 7	Aggiornamento del contenuto e del layout in accordo a IVDR 2017/746	05/2020
Revisione 8	Rimozione della classificazione obsoleta	03/2023

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

