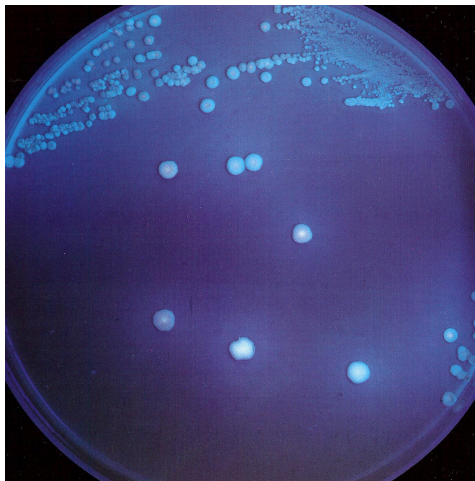


ISTRUZIONI PER L'USO

MAC CONKEY AGAR MUG

Piastre pronte all'uso

 Mac Conkey Agar MUG: colonie di *E.coli* fluorescenti alla lampada di Wood.

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, aerobi e non esigenti da campioni clinici e non clinici e per la differenziazione presuntiva di *Escherichia coli*.

2 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA *

Peptone di gelatina	17,000 g
Peptocomplex	3,000 g
Lattosio monoidrato	10,000 g
Sali biliari n° 3	1,500 g
Sodio cloruro	5,000 g
Rosso neutro	0,003 g
Violetto cristallo	0,001 g
Agar	13,500 g
4-Metilumbelliferil- β-D-glucuronide (MUG)	0,100 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 MUG è un terreno selettivo e differenziale basato sulla formulazione descritta da Trepeta ed Edberg¹ che modificarono il terreno classico MacConkey Agar introducendo il composto fluorogeno 4-metilumbelliferil- β-D-glucuronide (MUG), in accordo agli studi preliminari di Dahlen and Linden² e di Kilian and Bulow³. L'inclusione del MUG non modifica le caratteristiche di selettività del Mac Conkey Agar e la reazione di fermentazione del lattosio.¹

 Mac Conkey Agar MUG è impiegato per l'isolamento degli enterobatteri e di altri bacilli Gram-negativi da campioni clinici, per la differenziazione dei batteri fermentanti e non fermentanti il lattosio e per la presuntiva e rapida identificazione di *E.coli*, attraverso la determinazione dell'enzima β-glucuronidasi.^{1,4}

 Il MUG è idrolizzato dalla β-glucuronidasi prodotta da *E.coli* con formazione di glucuronide e di 4-metilumbelliferone; quest'ultimo composto è un fluoroforo che può essere evidenziato osservando le piastre sotto luce ultravioletta a 366 nm.

 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.⁴ I coliformi coltivano quindi con colonie da rosa-rosso a rosso-viola circondate da un alone di precipitazione, i microrganismi lattosio non fermentanti (es. *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Alkaligenes* ecc.) coltivano con colonie prive di colore. La sciamatura dei protei è controllata su Mac Conkey Agar MUG grazie all'impiego di peptoni e sali biliari selezionati che agiscono da inibitori di tale fenomeno. I ceppi di *E.coli* β-glucuronidasi positivi e lattosio positivi crescono con colonie da rosa-rosso a rosso viola, circondate da un alone opaco rosso e con una fluorescenza azzurrina sotto luce ultravioletta a 366nm.

4 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO I

Aspetto del terreno in piastra	terreno limpido o leggermente opalescente di colore rosso-viola
pH finale a 20-25°C	7,1 ± 0,2

5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Mac Conkey Agar MUG	Piastre pronte all'uso	541672	2 x 10 piastre ø 90 mm confezionamento primario: 2 sacchetti di cellophane confezionamento secondario: scatola di cartone

6 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e tamponi sterili da microbiologia, termostato e strumentazione di laboratorio, lampada di Wood, terreni di coltura accessori e reagenti per l'identificazione delle colonie.

7 - CAMPIONI

 Mac Conkey Agar MUG è destinato all'elaborazione batteriologica degli stessi campioni esaminabili con Mac Conkey Agar: urina e diversi campioni clinici umani con flora mista (ad esempio feci, materiali provenienti dalle vie respiratorie, ferite e ascessi ecc.).^{5,6,7} Raccogliere i campioni prima della terapia antimicrobica, ove possibile. Applicare le norme di buona prassi di laboratorio (GLP) per la raccolta, il trasporto, la conservazione dei campioni.⁵
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.




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 per 48 ore se necessario (alcuni ceppi di lattosio fermentanti esprimono una ritardata reazione tipica: *Citrobacter*, *Providencia*, *Serratia*, *Hafnia*).⁴

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. Esaminare quindi le colonie sotto lampada di Wood con emissione a 366 nm.

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

Le colonie di *E.coli* sviluppano una fluorescenza azzurrognola quando sono osservate sotto lampada di Wood.

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. E' comunque 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.⁸

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, fluorescenti alla lampada di Wood
<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 / 44-48 h / A	crescita inibita

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 pronte all'uso di Mac Conkey Agar MUG e della materia prima impiegata per la produzione (terreno in polvere Mac Conkey Agar MUG REF 401672) vengono testati per la produttività, la specificità e la selettività, avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato e considerato come Lotto di Riferimento.

La produttività e la specificità del terreno sono valutate con metodo ecometrico semiquantitativo, con incubazione a 35-37°C per 18-24 ore, con 2 ceppi target di Gram negativi fermentanti il lattosio e β -glucuronidasi positivi (*E.coli* ATCC 25922, *E.coli* ATCC 8739), con 3 ceppi di Gram negativi fermentanti il lattosio e β -glucuronidasi negativi (*E.aerogenes* ATCC 13048, *K.pneumoniae* ATCC 27736, *Y.enterocolitica* ATCC 23715) e con 5 ceppi non fermentanti il lattosio (*S.Typhimurium* ATCC 14028, *S.flexneri* ATCC12022, *P.mirabilis* ATCC 12453, *P.vulgaris* ATCC 8427, *P.aeruginosa* ATCC 9027). Dopo incubazione, i ceppi di *E.coli* sviluppano colonie da rosa-rosso a rosso-viola con alone rosso, fluorescenti alla lampada di Wood, i ceppi fermentanti il lattosio e β -glucuronidasi negativi sviluppano colonie da rosa-rosso a rosso-viola con alone rosso prive di fluorescenza sotto lampada di Wood, mentre le colonie dei lattosio non fermentanti appaiono incolori o verdi per *P.aeruginosa*. 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 una sospensione con densità pari a McFarland 0,5 di un ceppo non target Gram positivo (*E.faecalis* ATCC 29212). Dopo incubazione a 35-37°C per 44-48 ore in aerobiosi, *E.faecalis* risulta completamente inibito alla diluizione 10^{-1} .

Il terreno Mac Conkey Agar MUG è stato valutato su 1534 urinocolture, confrontando con piastre classiche di Mac Conkey Agar ed agar sangue e procedendo all'identificazione microbica con kit del commercio (Goglio et al.)⁹. Abbinando la positività alla β -glucuronidasi, la positività alla fermentazione del lattosio ed il test dell'indolo, l'identificazione delle colonie di *E.coli* ha una sensibilità del 100% ed una specificità del 85%. Le conclusioni degli autori sono state: la ricerca della β -glucuronidasi permette di anticipare di 24 ore la risposta dell'identificazione di *E.coli* al clinico con possibile impatto sulla condotta terapeutica.

Secondo i dati di Trepeta ed Edberg¹, l'agar MacConkey (MCM) addizionato con MUG si è rivelato sensibile nel rilevare i ceppi β -glucuronidasi positivi direttamente dai campioni clinici. Rispetto all'agar MacConkey (MCA), MCM ha mostrato un recupero migliore di *E.coli*: 255 campioni clinici sono stati processati con entrambi i terreni ed *E.coli* è stato isolato in 82 campioni con MCM ed in 77 campioni con MCA. MCM si è rivelato particolarmente utile per stabilire la presenza di *E.coli* nei campioni con flora mista. L'accuratezza è stata valutata esaminando i dati del Controllo Qualità. Sono stati valutati i risultati di 14 lotti prodotti dal 01/01/2018 al 24/04/2020. Il 100% dei lotti ha mostrato conformità ai criteri di accettazione definiti in termini di produttività e proprietà differenziali con ceppi target e selettività con ceppi non target.

12 - LIMITI DEL METODO

- E' stato riportato che circa il 40% di *Shigella* spp., vari bioserotipi di *Salmonella* (13% di *Salmonella* subgenus I), possono essere β -glucuronidasi positivi e sviluppare quindi colonie fluorescenti sotto lampada di Wood; solo eccezionalmente sono positivi al test ceppi di *Providencia*, *Enterobacter* e *Yersinia*^{1,10,11}
- Circa il 3-4% di *E.coli* sono β -glucuronidasi negativi (es. *E.coli* O157).¹⁰
- È stato segnalato che circa il 10% dei ceppi di *E.coli* non fermentano o fermentano lentamente il lattosio.¹²
- Incubazioni prolungate possono fornire risultati dubbi o confusi.⁴ Non prolungare l'incubazione oltre le 48 ore.
- A causa delle proprietà selettive di questo terreno, alcuni ceppi di batteri enterici Gram-negativi non crescono o crescono male.⁴ La mancanza di crescita o l'assenza di colonie tipiche non preclude la presenza di bacilli Gram-negativi nel campione.
- Alcuni enterococchi possono sviluppare piccole colonie con incubazione oltre le 24 ore.⁴
- Un singolo terreno di coltura è raramente utile per recuperare i ceppi target contenuti in un campione, pertanto sono necessarie colture in parallelo per recuperare gli organismi da tipizzare.
- Sono necessari test appropriati per l'identificazione completa e la tipizzazione epidemiologica delle colonie; se necessario, eseguire test di sensibilità antimicrobica utilizzando i metodi raccomandati.
- Il dispositivo non è destinato alla diagnosi di infezioni o alla guida della terapia antimicrobica. Viene utilizzato in una serie di indagini diagnostiche per fornire colonie microbiche isolate da campioni clinici di pazienti con sospetta infezione batterica.



**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. Trepeta RW, Edberg SC. Methylumbelliferyl- D-glucuronide-based medium for rapid isolation and identification of E. coli. J Clin Microbiol 1984; 19:172.
2. Dahlén G, Linder A. Screening plate method for detection of bacterial beta-glucuronidase. Appl Microbiol 1973;26 (6): 863-6
3. Killian M, Bulow P. 1976. Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae. Detection of bacterial glycosidases. Acta Pathol Microbiol Scand Sec B 1976; 84:245-251.
4. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
5. 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.
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. The Royal College of Pathologists- UK Standards for microbiology investigations (UK SMI): Bacteriology. <https://www.rcpath.org/profession/publications/standards-for-microbiology-investigations.html>.
8. CLSI (formerly NCCLS) Quality Control of Commercially Prepared Culture Media. Approved Standard, 3rd edition. M22 A3 vol. 24 n° 19, 2004
9. Goglio A, Vaiani R, Centemeri A, Passerini-Tosi C. Utilizzo del metilumbelliferil glucuronide nella valutazione rapida di E.coli. Valutazione in microbiologia clinica nella diagnostica delle urino colture. Comunicazione Convegno AMCLI Lombardia, Varenna, 21/06/1985; Ed Biolife Italiana : Documenta; 1985
10. Robison, B.J. 1984. Evaluation of a fluorogenic assay for detection of Escherichia coli in foods. Appl. Environ. Microbiol. 48:285-288
11. Kaluzewski S, D Tomczuk D. Evaluation of the Usefulness of Tests for Production of Beta-D-glucuronidase and Propylene Glycol Utilization for the Differentiation of Enterobacteriaceae Rods. Med Dosw Mikrobiol, 1995; 47:155-68.
12. Gokul Yaratha, MD, Sarah Perloff, DO, Kinesh Changala, MBBS. Lactose vs non-lactose fermenting E. coli: Epidemiology, Clinical Outcomes, and Resistance. Open Forum Infect Dis 2017; V4 (Suppl 1)

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Codice referenza a catalogo	LOT Numero di lotto	IVD Dispositivo medico diagnostico <i>in vitro</i>	Fabbricante	Lato superiore	Non ri-utilizzare	CE Marchio CE
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> test	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Utilizzare entro	Proteggere dalla luce	Fragile, maneggiare con cura	UDI Identificativo unico del dispositivo

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 5	Aggiornamento del contenuto e del layout in accordo a IVDR 2017/746	05/2020
Revisione 6	Rimozione della classificazione obsoleta	03/2023
Revisione 7	Sezioni modificate: uso previsto, campioni, caratteristiche delle prestazioni, limitazioni del metodo, precauzioni e avvertenze, riferimenti, tabella dei simboli applicabili	02/2026

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

