

MACCONKEY AGAR + CRYSTAL VIOLET

INSTRUKCJA UŻYCIA GOTOWEGO PODŁOŻA NA PŁYTCE

1. Przeznaczenie

MacConkey Agar + Crystal Violet jest podłożem selektywnym stosowanym do jakościowego wykrywania oraz różnicowania bakterii z rzędu *Enterobacteriales* oraz innych patogennych pałeczek Gram-ujemnych w próbkach materiałów klinicznych pochodzących od człowieka oraz innych próbkach.

Podłoże jest jednym ze standardowych podłoży stosowanych do wykonywania pierwszego posiewu głównie tych próbek, które zawierają mieszaną florę bakteryjną, np. kału, moczu, materiałów z dróg oddechowych, wymazów z ran i innych.

Funkcją podłoża MacConkey Agar + Crystal Violet jest wspomaganie diagnozy u pacjentów z zaburzeniami żołądkowo-jelitowymi (np. biegunka, wymioty), a także objawami wskazującymi na potencjalne zakażenia innych narządów i tkanek.

Większość bakterii Gram-ujemnych z rodziny *Enterobacteriaceae*, to bakterie fizjologicznej flory jelitowej, a także patogeny przewodu pokarmowego, które wykrywa się w tlenowych hodowlach kału. Większość *Enterobacteriaceae* to powszechne w środowisku, niepatogenne bakterie, które występują w jelicie grubym człowieka, a także mogą znajdować się na skórze i w gardle. Większość z nich to bakterie oportunistyczne, zakażające osoby osłabione, o obniżonej odporności. Mogą wywoływać zaburzenia gastryczne, które charakteryzują się biegunką, wymiotami, zakażeniami ran, układu moczowego, wtórne zapalenia płuc, a także posocznice.

Nr kat.:	Rodzaj podłoża:	Opakowanie:
1020PD90	podłoże stałe na płytce, gotowe do użycia	1x10 szt (90 mm)

2. Zasada działania

Peptony zwarte w podłożu są źródłem składników odżywczych. Obecny w podłożu fiolet krystaliczny hamuje wzrost paciorkowców kałowych i niektórych gronkowców. Do czynników hamujących wzrost bakterii Gram-dodatnich należą również sole żółciowe. Różnicowanie pałeczek Gram-ujemnych na organizmy zdolne i niezdolne do fermentacji laktozy możliwe jest dzięki obecności laktozy oraz czerwieni obojętnej, która stanowi wskaźnik pH podłoża. Bakterie posiadające zdolność do fermentacji laktozy powodują zakwaszenie podłoża co sprzyja wytrąceniu soli żółciowych. Wchłaniają czerwień obojętną przez co rosną w postaci czerwono-różowych do czerwono-fioletowych kolonii otoczonych lub nie różowym halo precypitatów soli żółci. Szczepy nie posiadające zdolności do fermentacji laktozy (np. *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Pseudomonas*) rosną w postaci bezbarwnych kolonii.

3. Skład podłoża

w g/l wody destylowanej:	
Enzymatyczny hydrolizat żelatynowy	17,0 g
Enzymatyczny hydrolizat kazeinowy	1,5 g
Enzymatyczny hydrolizat tkanek zwierzęcych	1,5 g
Laktoza	10,0 g
Sole żółciowe	1,5 g
Chlorek sodu	5,0 g
Czerwień obojętna	0,03 g
Fiolet krystaliczny	0,001 g
Agar	13,5 g

pH 7,1 ± 0,2 w temperaturze 25°C.

Wygląd podłoża - Podłoże klarowne, fioletowe

4. Przygotowanie pożywki

Pożywka jest gotowa do użycia. Bezpośrednio przed użyciem pożywkę należy doprowadzić do temperatury pokojowej.

5. Wyposażenie wymagane, nie dostarczone

Sprzęt ogólnolaboratoryjny niezbędny do wykonania badań, w tym ciepłarnia laboratoryjna.

6. Środki ostrożności

- Produkt przeznaczony wyłącznie do użytku profesjonalnego.
- Produkt nieautomatyzowany.
- Podłoże zawiera składniki pochodzenia zwierzęcego, co może wiązać się z obecnością biologicznych czynników chorobotwórczych, dlatego z podłożem należy postępować zgodnie z zasadami pracy z materiałem biologicznym potencjalnie zakaźnym.
- Nie należy używać płytek, jeżeli na podłożu są widoczne oznaki skażenia mikrobiologicznego, odbarwienia, wyschnięcia, pęknięcia lub inne oznaki pogorszenia jakości.
- Nie używać płytek uszkodzonych.
- Nie używać płytek po terminie ważności.
- Nie dopuszcza się ponownej inkubacji wcześniej posianych płytek.
- W celu zapewnienia poprawnych wyników badań, należy postępować zgodnie z niniejszą instrukcją.
- W przypadku, gdy postępowanie z pożywką podczas wykonywania badań będzie odbiegało od opisanego w niniejszej instrukcji, laboratorium jest zobowiązane do przeprowadzenia walidacji przyjętego postępowania.

7. Przechowywanie

Płytki z podłożem należy przechowywać w temperaturze 2–12°C do upływu terminu ważności. Podłoża przechowywać w oryginalnym opakowaniu, w pozycji odwróconej, z dala od bezpośredniego źródła światła. Aby uniknąć zamrożenia agaru, nie należy przechowywać płytek blisko ścian lodówki. Aby uniknąć pojawienia się większej ilości wody skroplonej na wieczku płytki nie należy otwierać zbyt często lodówki i nie przechowywać podłoży w przepelnionej lodówce.

8. Termin ważności

Podłoże przechowywane w temperaturze 2–12°C zachowuje swoje właściwości do 3 miesięcy od daty produkcji.

9. Materiał do badań

Próbki materiałów klinicznych pochodzące od człowieka (np. kał, mocz, materiał z dróg oddechowych, wymazy z rany) oraz inne próbki.

Próbki do badań pobierać zgodnie z aktualnymi wytycznymi właściwymi dla danego rodzaju próbki i miejsca jej pobrania. Próbki do badań do czasu dostarczenia do laboratorium przechowywać zgodnie z wytycznymi przechowywania i transportu materiału biologicznego. Generalnie, próbki dostarczyć do laboratorium najlepiej w ciągu 2 godzin od pobrania. Jeśli próbka nie będzie dostarczona do laboratorium w tym czasie, w zależności od rodzaju próbki, można ją umieścić w podłożu transportowym Cary-Blair lub Amies i przechowywać w temperaturze lodówki. W temperaturze lodówki próbki w podłożu transportowym mogą zachować stabilność do 2 dni.

10. Sposób wykonania

1. Przed użyciem podłoże należy doprowadzić do temperatury pokojowej.
2. Posiać próbkę rozprowadzając ją na powierzchni agaru.
3. Jeżeli próbka została pobrana na wymazówkę - końcówkę wymazówki delikatnie obracać na niewielkim obszarze agaru tuż przy brzegach płytki, a następnie wykonać posiew redukcyjny przy użyciu jałowej ezy.
4. Posianą płytkę inkubować w temperaturze $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
5. Wynik wzrostu odczytać po 18-24 godzinach inkubacji.

11. Odczyt i interpretacja wyników wzrostu

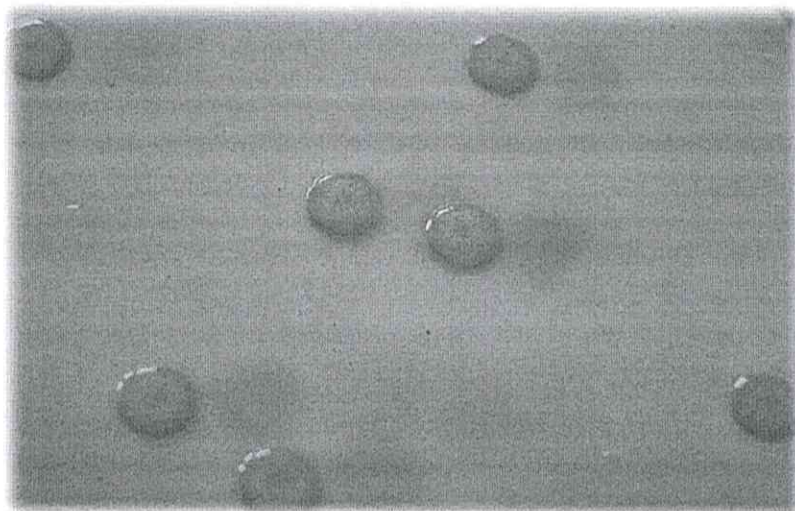
Po zakończeniu inkubacji obserwować:

- obecność wzrostu kolonii bakteryjnych,
- morfologię kolonii,
- barwę pożywki.

Typowa morfologia kolonii bakterii wyhodowanych na podłożu MacConkey Agar +Crystal Violet:

Mikroorganizm	Typowa morfologia kolonii
<i>Escherichia coli</i>	Kolonie różowe do różowo-czerwonych otoczone halo
<i>Enterobacter, Klebsiella</i>	Kolonie różowe, śluzowe
<i>Proteus</i>	Kolonie bezbarwne, wzrost mgławicowy
<i>Salmonella, Shigella</i>	Kolonie bezbarwne, pomarańczowe zabarwienie podłoża
<i>Pseudomonas</i>	Kolonie bezbarwne nieregularne

W celu ostatecznej identyfikacji wyhodowanych drobnoustrojów, należy przeprowadzić dodatkowe badania i/lub testy potwierdzające przy użyciu innych metod wykorzystywanych w laboratorium.



Morfologia kolonii i sposób wzrostu bakterii *Escherichia coli* na podłożu MacConkey Agar +Crystal Violet

12. Kontrola jakości

Właściwości odżywcze podłoża należy kontrolować z użyciem szczepów odniesienia dających oczekiwane reakcje dodatnie i ujemne. Badanie należy wykonywać używając czystych, świeżych hodowli szczepów odniesienia dających pożądaną reakcję. Do przeprowadzenia kontroli jakości podłoża, należy użyć następujących szczepów odniesienia:

Szczep odniesienia:	Intensywność wzrostu:	Morfologia kolonii:
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	dobry wzrost	różowe, obecność precypitatów
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	dobry wzrost	bezbarwne
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	dobry wzrost	bezbarwne
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	brak wzrostu	—

Dopuszcza się stosowanie innych szczepów odniesienia zapewniających spójność pomiarową, zgodnie z procedurami i instrukcjami kontroli jakości obowiązującymi w laboratorium. Procedury kontroli jakości powinny spełniać wymagania obowiązujących przepisów oraz wytycznych/rekomendacji.

13. Ograniczenia metody

- Z powodu zmienności wymagań odżywczych, niektóre szczepy mogą rosnąć słabo, albo nie rosnąć wcale na podłożu MacConkey Agar +Crystal Violet.
- Inkubacja płytek w warunkach zwiększonego stężenia CO₂ hamuje wzrost wielu pałeczek Gram-ujemnych.
- Przedłużona inkubacja może prowadzić do wzrostu np. niektórych gatunków enterokoków i uzyskania nieprawidłowych wyników oceny wzrostu
- Zawartość soli żółciowych i fioletu krystalicznego może hamować wzrost bakterii Gram-ujemnych o wysokich wymaganiach odżywczych np. *Haemophilus*.

- W przypadku próbek o bogatej florze bakteryjnej, zaleca się równoległe posianie próbki na podłoże nieselektywne, takie jak Columbia Agar +5% Sheep Blood lub inne, w celu wykrycia innych drobnoustrojów obecnych w próbce.

14. Charakterystyka metody

MacConkey Agar +Crystal Violet to podłoże o słabej wybiórczości. Umożliwia jednak wstępną klasyfikację bakterii jelitowych i innych drobnoustrojów Gram-ujemnych na organizmy zdolne i niezdolne do fermentacji laktozy. Najważniejszymi składnikami pożywki są fiolet krystaliczny, sole żółci, laktoza i czerwień obojętna. Fiolet krystaliczny i sole żółciowe hamują wzrost bakterii Gram-dodatnich, co umożliwia wzrost tylko bakteriom Gram-ujemnym z wyjątkiem *Neisseria* i *Pasteurella*. Obecność laktozy umożliwia wykazanie zdolności do fermentacji pałeczek Gram- ujemnych *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella*. Mikroorganizmy fermentujące laktozę produkują kwasy organiczne, przede wszystkim kwas mlekowy, który obniża pH. Czerwień obojętna zmienia kolor na jasno czerwony/różowy, gdy pH spada poniżej 6,8. W zależności od zdolności fermentacji laktozy przez mikroorganizmy, różne gatunki tworzą kolonie o różnym wyglądzie dzięki czemu pożywka MacConkey + Crystal Violet ma właściwości różnicujące. Gatunki bakterii Gram- ujemnych nie fermentujących laktozy tworzą kolonie koloru białego, ponieważ nie ma zmiany pH (*Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*). Bakterie słabo fermentujące laktozę wytwarzają kolonie wolniej niż pozostałe gatunki (*Serratia*, *Citrobacter*). Bakterie używające laktozy do produkcji otoczki tworzą lepkie, wilgotne kolonie (przykładem gatunków tworzących śluzowate kolonie jest *Klebsiella*).

15. Postępowanie ze zużytymi podłożami

Podłoża po badaniach oraz nieużyte podłoża należy utylizować zgodnie z aktualnie obowiązującymi przepisami dotyczącymi postępowania z odpadami medycznymi oraz procedurami laboratorium odnośnie utylizacji materiałów zakaźnych i potencjalnie zakaźnych.

16. Zgłaszanie zdarzeń niepożądanych

Zgodnie z obowiązującymi przepisami, zdarzenia niepożądane i incydenty, które można bezpośrednio powiązać z opisywanym podłożem, należy zgłaszać producentowi oraz Prezesowi Urzędu Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych na adres:

Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych
Al. Jerozolimskie 181C, 02-222 Warszawa;
Telefon: 48 22 492-11-00
Fax: 48 22 492-11-09








17. Piśmiennictwo

1. PI7102, Rev 5, March 2011
2. Murray, P. R., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (eds.). Manual of clinical microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
3. Marshall, R. T. (ed.). Standard methods for the examination of dairy products, 17th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
4. Vanderzant, C., and D. F. Splittstoesser (eds.). 2015. Compendium of methods for the microbiological examination of food, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C. Revision: 2 Effective Date: 2/24/2020 Technical Specification Sheet
5. Eaton, A. D., L. S. Clesceri, and A. E. Greenberg (eds.). 2017. Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
6. Association of Official Analytical Chemists. 2016. Official methods of analysis of AOAC International, 20th ed. AOAC International. Arlington, VA.
7. Mazura-Reetz, G. T. Neblett, and J. M. Galperin. 1979. MacConkey Agar: CO₂ vs. ambient incubation. Abst. Ann. Mtg. American Society for Microbiology. C179.
8. WHO, 2005, Guidelines for the control of shigellosis, including epidemics due to *Shigella dysenteriae* type 1, Geneva, Switzerland
9. Mossel, D.A.A., W.H.J. Mengerink, and H.H. Scholts. "Use of a modified MacConkey agar medium for the selective growth and enumeration of Enterobacteriaceae." *Journal of Bacteriology* 84.2 (1962): 381-381

Historia zmian dokumentu

Data zmiany	Sekcja	Opis zmiany
2022/03/18	Cały dokument	Dostosowanie do wymagań Rozporządzenia UE 2017/746

UWAGA**Historia zmian dokumentu nie uwzględnia zmian redakcyjnych.**

SYMBOL	NAZWA SYMBOLU	OPIS	NR REF.
	Wytwórca	Oznacza wytwórcę wyrobu medycznego zgodnie z definicją zawartą w dyrektywach unijnych 90/385/EWG, 93/42/EWG oraz 98/79/WE.	5.1.1
	Data produkcji	Oznacza datę produkcji wyrobu medycznego.	5.1.3
REF	Numer katalogowy	Oznacza numer produktu w katalogu producenta pozwalający zidentyfikować wyrób medyczny.	5.1.6
LOT	Numer serii / kod partii	Oznacza nadany przez producenta numer partii pozwalający zidentyfikować partię produktów, do której należy wyrób medyczny.	5.1.5
IVD	Wyrób do diagnostyki in vitro	Oznacza wyrób medyczny przeznaczony do diagnostyki in vitro	5.5.1
	Nie używać powtórnie	Oznacza wyrób medyczny przeznaczony do jednokrotnego użytku lub do użytku podczas leczenia jednego pacjenta w ramach jednej procedury medycznej.	5.4.2
	Wystarczy na wykonanie <n> testów	Oznacza nadaną przez producenta wartość na ile testów wystarczy wyrób.	5.5.5
	Data przydatności do użycia	Oznacza datę, po której wyrób medyczny nie powinien być używany.	5.1.4
	Przestrzegać zakresu temperatury	Wskazuje maksymalną i minimalną wartość temperatury, w której należy przechowywać, transportować lub użytkować przedmiot.	5.3.7
CE	Symbol bezpieczeństwa (Zgodność z wymogami UE)	Oznaczenie CE na produkcie stanowi deklarację producenta potwierdzającą zgodność produktu z zasadniczymi wymogami odpowiednich przepisów Unii Europejskiej dotyczących zdrowia, bezpieczeństwa i ochrony środowiska.	nd.
	Sprawdź w instrukcji użycia	Oznacza konieczność zapoznania się z instrukcją użytkowania	5.4.3
STERILE A	Sterylizowany aseptycznymi technikami przetwarzania	Wskazuje wyrób medyczny, który został wytworzony za pomocą zaakceptowanych technik aseptycznych.	5.2.2