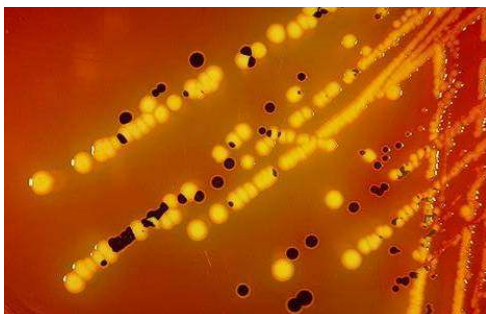


ISTRUZIONI PER L'USO

XLD AGAR

Piastrine pronte all'uso



XLD Agar: colonie di *Salmonella* spp (nere)
e di *E.aerogenes* (gialle)

1 - DESTINAZIONE D'USO

Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno selettivo e differenziale per l'isolamento dei patogeni enterici Gram-negativi, soprattutto *Salmonella* e *Shigella*, da campioni clinici e da altri materiali.

2 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA *

Xilosio	3,50 g	Sodio desossicolato	2,50 g
L-lisina	5,00 g	Sodio tiosolfato	6,80 g
Lattosio	7,50 g	Ferro ammonio citrato	0,80 g
Saccarosio	7,50 g	Rosso fenolo	0,08 g
Sodio cloruro	5,00 g	Agar	13,50 g
Estratto di lievito	3,00 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

Nella prima metà del ventesimo secolo, furono sviluppati e proposti diversi terreni di coltura per l'isolamento dei patogeni enterici da feci e da altri materiali. Alcuni di essi erano moderatamente selettivi e consentivano la crescita dei contaminanti fecali, altri mostravano un'eccessiva tossicità per la crescita dei patogeni, in particolare di *Shigella*.¹ Nel 1965, Welton I. Taylor introdusse l'agar xilosio lisina desossicolato (XLD) per migliorare il recupero di *Shigella*.² Diverse valutazioni cliniche dimostrarono le buone prestazioni dell'agar XLD nell'isolamento di *Shigella* e *Salmonella*.³⁻⁵

XLD Agar è un terreno selettivo e differenziale destinato all'isolamento dei patogeni enterici Gram-negativi, in particolare *Salmonella* e *Shigella* da campioni clinici.⁶⁻⁸ È raccomandato per la determinazione di *Salmonella* nei prodotti farmaceutici non sterili in accordo al metodo armonizzato EP, USP, JP⁹ e da FDA-BAM per il rilevamento di *Salmonella* negli alimenti¹⁰. La formula del terreno XLD raccomandata dalle norme ISO per la determinazione di *Salmonella* e *Shigella* negli alimenti e nell'acqua contiene una concentrazione inferiore di desossicolato di sodio e corrisponde alla formulazione Biolife XLD Agar ISO Formulation.

L'estratto di lievito fornisce carbonio, azoto, vitamine e oligoelementi per la crescita batterica; il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico del terreno; il sodio desossicolato è un agente selettivo, con attività inibitoria sui batteri Gram positivi. XLD Agar contiene tre sistemi indicatori: xilosio, lattosio e saccarosio combinati con rosso fenolo, lisina e rosso fenolo, tiosolfato di sodio e ferro ammonio citrato. I batteri-target vengono presuntivamente raggruppati valutando la degradazione dei carboidrati, la decarbossilazione della lisina e la formazione di H₂S.

La fermentazione degli zuccheri abbassa il pH e l'indicatore rosso fenolo registra questa acidità, virando da rosso a giallo. La maggior parte dei batteri enterici, inclusa *Salmonella*, fermenta lo xilosio con produzione di acidi; *Shigella* non fermenta lo xilosio, non provoca acidificazione del terreno e quindi cresce con colonie rosse. Dopo aver esaurito l'apporto di xilosio, le colonie di *Salmonella* decarbossilano la lisina, aumentando di nuovo il pH verso valori alcalini e sviluppano colonie rosse, simili a quelle di *Shigella*. Per prevenire una simile inversione del pH da parte dei coliformi positivi alla lisina, sono presenti nel terreno lattosio e saccarosio per produrre un eccesso di acidità. Inoltre *Salmonella* produce tiosolfato reductasi che causa il rilascio di una molecola di solfuro dal sodio tiosolfato presente nel terreno. Questa molecola di solfuro si accoppia con uno ione idrogeno per formare H₂S gassoso che, reagendo con il ferro ammonio citrato, forma un precipitato che dà luogo a colonie nere o con un centro nero.

4 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto del terreno in piastra
pH finale a 20-25°C

rosso arancio, limpido
7,4 ± 0,2

5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
XLD Agar CND:W0104010405; EDMA:14.01.04.01; RDM: 1456123/R	Piastrine pronte all'uso	542206	2 x 10 piastrine 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 delle colonie.

7 - CAMPIONI

XLD Agar è destinato all'esame batteriologico di campioni clinici come feci, tampone rettale, urine, bile,⁶⁻⁸ prodotti farmaceutici non sterili⁹ ed alimenti¹⁰. Quando possibile, raccogliere il campione prima dell'inizio della terapia antimicrobica. Applicare le norme di buona prassi di laboratorio (GLP) per la raccolta, il trasporto, la conservazione dei campioni clinici.¹¹ Consultare le norme e gli Standard applicabili per i dettagli sulla raccolta e la preparazione dei campioni non clinici.^{9,10}

8 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastrine 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.

Il massimo recupero di *Salmonella* dai campioni fecali si ottiene utilizzando un arricchimento in Selenite Broth seguito dalla semina su XLD Agar e su un secondo terreno.⁸

Per l'isolamento di *Shigella* da campioni fecali, si consiglia l'arricchimento in GN Broth, seguito dall'isolamento su due diversi terreni selettivi: XLD Agar e un secondo terreno meno selettivo (Mac Conkey Agar).⁸

Incubare le piastre di XLD Agar, inoculate con il campione o con il campione arricchito in terreno liquido, in aerobiosi a 35-37°C per 18-24 ore. Le colonie di *Salmonella* possono richiedere una incubazione di 48 ore per lo sviluppo completo del colore e del precipitato nero.

Per la determinazione di *Salmonella* nei prodotti farmaceutici non sterili seguire le indicazioni della Farmacopea Europea⁹, qui riassunte.

- 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. Mescolare ed incubare a 30-35°C per 18-24 ore.

- Mescolare la coltura e trasferire 0,1 mL in 10 mL di Rappaport Vassiliadis Enrichment Salmonella Broth EP (REF 401979) ed incubare a 30°C - 35°C per 18-24 ore.

- Trapiantare dalla brodcultura su piastre di XLD Agar ed incubare a 30-35°C per 18-48 ore.

Consultare gli Standard applicabili per il metodo di ricerca di *Salmonella* negli alimenti.¹⁰

9 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica e cromatica delle colonie isolate. Non esaminare le aree con crescita confluyente poiché la fermentazione degli zuccheri risulta inappropriata e dà luogo a letture non attendibili.

Si possono osservare diversi modelli di reattività sul XLD Agar¹²:

1. **Colonie rosse:** nessuna fermentazione degli zuccheri xilosio, saccarosio, lattosio, o fermentazione dello xilosio seguita da una rapida decarbossilazione della lisina, reazione alcalina; le colonie sono in realtà incolori e trasparenti, ma appaiono rosse a causa del colore di fondo del terreno: sospetta presenza di *Shigella* o *Providencia* o *Pseudomonas* o di *Salmonella* sp. H₂S negativa.

2. **Colonie rosse con centro nero:** fermentazione dello xilosio e decarbossilazione della lisina, con produzione di H₂S: esaurimento rapido dello xilosio e risultante alcalinità dovuta alla decarbossilazione della lisina, centro nero a causa della produzione di H₂S, possibile solo in ambiente alcalino: sospetta presenza di *Salmonella* H₂S positiva.

3. **Colonie opache, gialle:** fermentazione dello xilosio, lisina decarbossilasi assente e non fermentazione del lattosio e del saccarosio, pH acido: possibile presenza di *E. coli*, *Klebsiella/Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Proteus*.

4. **Colonie gialle:** fermentazione di lattosio o saccarosio, lisina decarbossilasi assente, pH acido: possibili coliformi o *P.vulgaris* saccarosio fermentante.

Per l'identificazione presuntiva di *Salmonella*, si consiglia di testare le colonie con una goccia di reagente MUCAP (REF 191500), osservando dopo 3-5 minuti per lo sviluppo di fluorescenza sotto la lampada di Wood, prodotta in presenza dell'enzima C₈ esterasi, tipico di *Salmonella* spp.¹⁴

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. 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.¹³

CEPPI DI CONTROLLO		INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>S.Typhimurium</i>	ATCC 14028	30-35 o 35-37°C / 18-24h / A	crescita, colonie rosse con centro nero
<i>S.flexneri</i>	ATCC 12022	30-35 o 35-37°C / 18-24h / A	crescita, colonie rosse
<i>E.faecalis</i>	ATCC 29212	30-35 o 35-37°C / 18-24h / A	inibito
<i>E.coli</i>	ATCC 25922	30-35 o 35-37°C / 18-24h / A	parzialmente inibito, colonie gialle

A: incubazione in aerobiosi; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection
La temperatura di incubazione scelta dipende dallo Standard seguito (CLSI¹³ o EuPh⁹)

11 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di piastre pronte all'uso di XLD Agar e della materia prima impiegata per la produzione (terreno in polvere XLD Agar REF 402206) 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 2 ceppi target: *S. Enteritidis* ATCC 13076, *S.Typhimurium* ATCC 14028. Le piastre di XLD Agar sono seminate con appropriate diluizioni in soluzione salina delle sospensioni di colonie dei ceppi target. Dopo incubazione a 30-35°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 rosse con centro nero), i risultati sono giudicati conformi. La produttività del terreno è valutata inoltre con metodo ecometrico semiquantitativo, con incubazione a 30-35°C per 18-24 ore, con il ceppo target *S.flexneri* ATCC 12022. Dopo incubazione le colonie di *Shigella* appaiono rosse con adeguata carica, comparabile con quella del Lotto di Riferimento. Per valutare la selettività del terreno vengono seminate con metodo Miles Misra modificato diluizioni da 10⁻¹ a 10⁻³ di una sospensione con densità pari a McFarland 0,5 di un ceppo non target Gram positivo (*E.faecalis* ATCC 19433) e di 1 ceppo non-target Gram negativo: *E.coli* ATCC 25922. Dopo incubazione a 30-35°C per 18-24 ore in aerobiosi, *E.faecalis* risulta completamente inibito alla diluizione 10⁻¹, la crescita di *E.coli* risulta parzialmente inibita con lo sviluppo di colonie gialle.

12 - LIMITI DEL METODO

- L'impiego di un unico terreno è raramente sufficiente per recuperare tutti i patogeni contenuti in un campione. È necessario pertanto utilizzare, insieme a XLD Agar, terreni aggiuntivi per l'isolamento di *Salmonella* e/o *Shigella*, con selettività inferiore, come Mac Conkey Agar e con selettività più elevata, come SS Agar; è consigliabile altresì la semina del campione su altri terreni culturali specifici per altri patogeni enterici.⁸

- Sul terreno possono crescere anche batteri non enterici come *Pseudomonas*; *Providencia rettgeri* e *Pseudomonas* possono sviluppare colonie rosse; alcuni ceppi di *Proteus* spp. possono sviluppare colonie con centro nero¹².





- S.Parathyphi A, S.Cholerae-suis, S.Pullorum e S.Gallarum possono crescere con colonie prive di centro nero e quindi essere simili a *Shigella*.¹²
- L'incubazione protratta oltre le 48 ore può portare a risultati falsamente positivi per i ceppi target.¹²
- 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 europea 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.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il terreno e con gli agenti microbici.
- 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 tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire le piastre non utilizzate e le piastre seminate con i campioni o con i ceppi di controllo e sterilizzate, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- 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. Jan Hudzicki. Hektoen Enteric Agar Protocol. American Society for Microbiology. 11 November 2010
2. Taylor WI. Isolation of shigellae I Xylose agars; new media for isolation of enteric pathogens. Am J Clin Pathol 1965; 44:471-475
3. Taylor WI, Schelhart D. Isolation of shigellae VI. Performance of media with stool specimens. Appl Microbiol 1968; 16:1387-1393
4. Taylor WI, Schelhart D. Isolation of shigellae VIII. Comparison of Xylose Lysine Deoxycholate Agar, Hektoen Enteric Agar, Salmonella-Shigella Agar and Eosin Methylene Blue Agar with stool specimens Appl Microbiol 1971; 21:32-7
5. Zajc-Satler J, Gragas AZ. Xylose Lysine Deoxycholate Agar for the isolation of Salmonella and Shigella from clinical specimens. Zentralbl Bakteriol Orig 1977; A237:196-200
6. 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
7. Public Health England- UK Standards for microbiology investigations (UK SMI): searchable index. 9 January 2019
8. Strockbine NA, Bopp CA, Fields PI, Kaper JB, Nataro JP. Escherichia, Shigella and Salmonella. In Jorgensen JH, Carrol KC, Funke G et al. editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015. p.685.
9. European Pharmacopoeia, current edition.
10. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 5: Salmonella. Rev 12/2019
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. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
13. CLSI (formerly NCCLS) Quality Control of Commercially Prepared Culture Media. Approved Standard, 3rd edition. M22 A3 vol. 24 n° 19, 2004
14. Ruiz J, Sempere MA, Varela C, Gomez J. Modification of the methodology of stool culture for Salmonella detection, J Clin Microbiol 1992; 30:525-526.

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 6	Aggiornamento del contenuto e del layout in accordo a IVDR 2017/746	05/2020

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

