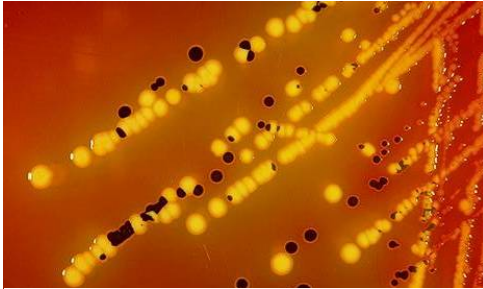




XLD AGAR

Paruošti naudoti plokštelės



XLD agar: *Salmonella* kolonijos su dideliu juodu centru ir *E. aerogenes* su geltonomis kolonijomis

1 - NAUDOJIMO PASKIRTIS

In vitro diagnostika. Selektivi ir diferencinė terpė Gram-neigiamų žarnyno patogenų, ypač *Salmonella* ir *Shigella*, izoliavimui iš klinikinių ir neklintinių mėginių.

2 – SUDĖTIS – TIPINĖ FORMULĖ *

Ksilozė	3,50 g	Natrio deoksicholatas	2,50 g
L-lizinas	5,00 g	Natrio tiosulfatas	6,80 g
Laktozė	7,50 g	Geležies amonio citratas	0,80 g
Sacharozė	7,50 g	Fenolio raudonasis	0,08 g
Natrio chloridas	5,00 g	Agaras	13,50g
Mielių ekstraktas	3,00 g	Išgrynintas vanduo	1000 ml

*Formulė gali būti koreguojama ir (arba) papildoma, kad atitiktų reikiamus veikimo kriterijus.

3 – METODO PRINCIPAS IR PROCEDŪROS PAAIŠKINIMAS

XX a. pirmojoje pusėje buvo sukurta ir pasiūlyta keletas auginimo terpių, skirtų žarnyno patogenų izoliavimui iš išmatų ir kitų medžiagų. Kai kurios iš jų buvo vidutiniškai selektyvios ir leido augti išmatų teršalams, kitos buvo pernelyg toksiškos patogenų, ypač *Shigella*, augimui.¹ 1965 m. Welton I. Taylor pristatė ksilozės lizino deoksicholato (XLD) agarą, skirtą *Shigella* izoliavimui pagerinti.² Keletas klinikinių vertinimų parodė, kad XLD agar yra palyginti veiksmingas pirminiam *Shigella* ir *Salmonella* izoliavimui.³⁻⁵

XLD agar yra selektyvi ir diferencinė terpė, skirta Gram-neigiamų žarnyno patogenų, ypač *Salmonella* ir *Shigella*, izoliavimui iš klinikinių mėginių.⁶⁻⁸ Jis rekomenduojamas *Salmonella* aptikimui nesteriliuose farmacijos produktuose pagal suderintą EP, USP, JP metodą⁹ ir FDA-BAM *Salmonella* aptikimui maisto produktuose¹⁰. ISO normose rekomenduojama XLD formulė *Salmonella* ir *Shigella* nustatymui maisto produktuose ir vandenyje yra mažesnės koncentracijos natrio deoksicholato ir atitinka Biolife terpę XLD agar ISO formulė.

Mielių ekstraktas teikia anglį, azotą, vitaminus ir mikroelementus bakterijų augimui; natrio chloridas palaiko osmosinę pusiausvyrą terpėje; natrio deoksicholatas yra selektyvus agentas, slopinantis gramteigiamų bakterijų augimą. XLD agar turi tris indikatorius: ksilozę, laktozę ir sacharozę, kombinuotas su fenolio raudoni, lizino hidrochloridu ir vėl fenolio raudoni, natrio tiosulfatu ir geležies amonio citratu. Tikslinės bakterijos yra preliminariai sugrupuotos pagal angliavandenių fermentacijos, lizino dekarboksilinimo ir vandenilio sulfido susidarymo poveikį. Cukrų fermentacija sumažina pH, o fenolio raudonasis indikatorius tai užregistruoja, pakeisdamas spalvą iš raudonos į geltoną. Dauguma žarnyno bakterijų, įskaitant *Salmonella*, gali fermentuoti ksilozę ir gaminti rūgštį; *Shigella* nefermentuoja ksilozės, nesukelia teršės rūgštėjimo, todėl auga raudonomis kolonijomis. Išnaudojus ksilozės atsargas, *Salmonella* kolonijos dekarboksilina liziną, vėl padidindamos pH iki šarminio ir imituodamos raudonas *Shigella* kolonijas. Siekiant išvengti panašaus pH grįžimo dėl lizino teigiamų koliforminių bakterijų, pridama laktozės ir sacharozės, kad susidarytų perteklius rūgštis. Be to, *Salmonella* spp. gamina tiosulfato reduktazę, kuri sukelia sulfido molekules išsiskyrimą iš terpėje esančio natrio tiosulfato; ši sulfido molekulė jungiasi su vandenilio jonu ir sudaro H₂S dujas, kurios reaguoja su geležies amonio citratu, sudaro nuosėdas, dėl to kolonijos yra juodos arba turi juodą centrą.

4 - FIZINĖS SAVYBĖS

Terpės išvaizda raudonai oranžinė, skaidri
Galutinis pH esant 20–25 °C 7,4 ± 0,2

5 – PATEIKTOS MEDŽIAGOS – PAKUOTĖ

Produktas	Tipas	REF	Pakuotė
XLD agar	Paruošti naudoti plokštelės	542206	2 x 10 plokštelių Ø 90 mm pirminė pakuotė: 2 celofano maišeliai antrinė pakuotė: kartoninė dėžutė

6 - REIKALINGOS, BET NEPATEIKTOS MEDŽIAGOS

Steriliūs kilpos ir tamponai, inkubatorius ir laboratorinė įranga pagal poreikį, pagalbinės auginimo terpės ir reagentai kolonijų identifikavimui.

7 – MĖGINIAI

XLD agar skirtas klinikinių mėginių, pvz., išmatų, tiesiosios žarnos tamponų, šlapimo, tulžies,⁶⁻⁸ sterilių farmacijos produktų⁹ ir maisto¹⁰ bakteriologiniam tyrimui. Jei įmanoma, mėginius surinkite prieš antimikrobinį gydymą. Reikia laikytis geros laboratorinės praktikos klinikinių mėginių surinkimo, transportavimo ir laikymo srityje.¹¹ Dėl neklintinių mėginių surinkimo ir paruošimo detalių žr. atitinkamus standartinius metodus.^{9,10}

8 – TYRIMO PROCEDŪRA

Leiskite plokštelėms pasiekti kambario temperatūrą ir išdžiūti terpės paviršiumi.

Inokuliuokite ir iššepkite mėginį kilpa per keturis plokštelės ketvirčius, kad gautumėte gerai izoliuotas kolonijas, užtikrindami, kad 1 ir 4 sekcijos nesutaptų. Arba, jei medžiaga kultivuojama tiesiogiai iš tampono, perbraukite tamponu per nedidelį paviršiaus plotą krašte; tada iššepkite iš šio inokuliuoto ploto.

Maksimalus *salmonelių* išgavimas iš išmatų mėginių pasiekiamas naudojant sodrinimo etapą selenito sultinyje, po kurio atliekama subkultūra į XLD agar ir antrąją plokštelę.⁸

Shigella izoliavimui iš išmatų mėginių rekomenduojamas sodrinimas GN sultinyje, po to subkultūravimas dviejose skirtingose selektyviose terpėse: XLD agar ir antrą, mažiau selektyvioje terpėje (Mac Conkey agar).⁸

Inokuliuotas XLD agar plokštelės su mėginiu arba su skysčio terpėje sodrintu mėginiu inkubuokite aerobinėmis sąlygomis 35–37 °C temperatūroje 18–24 valandas. Kad kolonijos ant XLD agar įgautų pilną spalvą ir susidarytų juodas nuosėdas, gali prireikti 48 valandų inkubacijos.

Salmonella nustatymui nesteriliuose farmacijos produktuose reikėtų laikytis Europos farmakopėjos⁹ rekomenduojamos ir toliau apibendrintos technikos:





- Paruoškite mėginį, naudodami ne mažiau kaip 1 g tiriamo produkto, praskiesto 1:10, ir naudokite 10 ml arba kiekį, atitinkantį 1 g arba 1 ml, kad inokuluotumėte tinkamą kiekį triptiko sojos sultinio. Sumaišykite ir inkubuokite 30–35 °C temperatūroje 18–24 valandas.
 - Pratrinkite indą, perkelkite 0,1 ml triptiko sojos sultinio į 10 ml Rappaport Vassiliadis sodrinto salmonelių sultinio EP (REF 401979) ir inkubuokite 30–35 °C temperatūroje 18–24 val.
 - Perkelkite į XLD agar plokštelę ir inkubuokite 30–35 °C temperatūroje 18–48 val.
- Dėl *salmonelių* aptikimo maisto produktuose kreipkitės į atitinkamas nuorodas.¹⁰

9 – SKAITYMAS IR INTERPRETAVIMAS

Po inkubacijos stebėkite bakterijų augimą ir užrašykite izoliuotų kolonijų specifines morfologines ir chromatinės savybes. Netikrinkite susilieusių augimo sričių, nes gali atsirasti klaidingų neigiamų fermentacijos reakcijų.

Kolonijų spalvų interpretavimas¹²:

Raudonos kolonijos: šarminė reakcija, ksilozės/sacharozės/laktozės nefermentacija arba ksilozės fermentacija, po kurios vyksta lizino dekarboksilinimas: galimas *Shigella* arba *Providencia* arba *Pseudomonas* spp. arba *Salmonella* sp. H₂ S neigiamas

Raudonos kolonijos su juodu centru: tik ksilozės fermentacija, lizinas teigiamas, H₂ S teigiamas, greitas ksilozės išsekvojimas ir dėl lizino dekarboksilinimo susidaręs šarmingumas, juodas centras dėl H₂ S gamybos, galimas tik šarminėje pH aplinkoje: įtariama *Salmonella* H₂ S teigiama.

Neskaidrios geltonos kolonijos: ksilozės fermentacija, lizino neigiamas ir laktozės bei sacharozės nefermentacija, rūgštinis pH: galimas *E. coli*, *Klebsiella/Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Proteus* spp.

Geltonos kolonijos: laktozės arba sacharozės fermentacija, lizino neigiamas, rūgštinis pH: galimi koliformai arba sacharozės teigiamas *P. vulgaris*

Norint preliminariai identifikuoti *Salmonella* spp., rekomenduojama patikrinti kolonijas, užlašinant ant jų vieną lašą MUCAP reagento (REF 191500) ir po 3–5 min. stebėti, ar po Woodo lempa atsiranda fluorescencija, kuri susidaro esant C₆ esterazės fermentui, būdingam *Salmonella* spp.¹⁴

10 – VARTOTOJO KOKYBĖS KONTROLĖ

Visos pagamintos produkto partijos yra išleidžiamos į pardavimą po to, kai atlikta kokybės kontrolė, siekiant patikrinti atitiktį specifikacijoms. Tačiau galutinis vartotojas yra atsakingas už kokybės kontrolės bandymų atlikimą pagal vietos galiojančius reglamentus, laikantis akreditacijos reikalavimų ir laboratorijos patirties. Toliau pateikiami kai kurie bandymų štamai, naudingi kokybės kontrolei¹³.

KONTROLINIAI ŠTAMAI

<i>S. Typhimurium</i>	ATCC	1402
<i>S. flexneri</i>	ATCC	12022
<i>E. faecalis</i>	ATCC	2921
<i>E. coli</i>	ATCC	25922

INKUBACIJOS TEMPERATŪRA / T / ATM

30–35 arba 35–37 °C / 18–24 val. / A
30–35 arba 35–37 °C / 18–24 val. / A
30–35 arba 35–37 °C / 18–24 val. / A
30–35 arba 35–37 °C / 18–24 val. / A

TIKĖTINI REZULTATAI

augimas, raudonos kolonijos su juodu centru
augimas, raudonos kolonijos
slopinamas
iš dalies slopinama, geltonos kolonijos

A: aerobinė inkubacija; ATCC yra American Type Culture Collection prekės ženklas
Inkubacijos temperatūra priklauso nuo taikomo standarto (CLSI¹³ arba EuPh⁵)

11 - EKSPLOATACINĖS CHARAKTERISTIKOS

Prieš pateikiant į rinką, visų paruoštų naudoti XLD agar plokščių ir žaliavų, naudojamų paruoštų plokščių gamybai (dehidratuotas XLD agar REF 402206), reprezentatyvus mėginys yra tikrinamas dėl produktyvumo ir selektyvumo, lyginant rezultatus su anksčiau patvirtintu etaloniniu partijos mėginiu.

Produktyvumas tikrinamas kiekybiniu bandymu su 2 tiksliniais štamais: *S. Enteritidis* ATCC 13076, *S. Typhimurium* ATCC 14028; XLD agar plokštelės inokuliuojamos dešimtainiais tirpalais fiziologiniame tirpale iš kolonijų suspensijų ir inkubuojamos 30–35 °C temperatūroje 18–24 valandas. Kolonijos suskaičiuojamos abiejose partijose ir apskaičiuojamas produktyvumo koeficientas (*Pr*). Jei *Pr* yra ≥ 0,7 ir jei kolonijų morfologija ir spalva yra tipinės (raudonos kolonijos su juodu centru), rezultatai laikomi priimtinais ir atitinkančiais specifikacijas. Be to, produktyvumo charakteristikos tiriamos taikant pusiau kiekybinę ekometrinę techniką su tikslinei rūšimi *S. flexneri* ATCC 12022. Po inkubacijos įvertinama ir užregistruojama kolonijų spalva ir augimo kiekis.

Selektyvumas vertinamas modifikuotu Miles-Misra paviršiaus lašų metodu, įterpiant į lėkšteles dešimtainius skiedinius fiziologiniame tirpale nuo 10⁻¹ iki 10⁻³ 0,5 McFarland suspensijos netikslinės rūšies *E. faecalis* ATCC 19433 ir *E. coli* ATCC 25922. Netikslinės *E. faecalis* rūšies augimas slopinamas 10⁻¹ atskiestu tirpalu, Gram-neigiamos netikslinės rūšies augimas iš dalies slopinamas, o kolonijos yra tipinės geltonos spalvos, kaip nurodyta specifikacijose.

Tikslumas buvo įvertintas peržiūrint kokybės kontrolės duomenis. Buvo įvertinti 33 partijų, pagamintų nuo 2019 m. sausio 1 d. iki 2020 m. gegužės 18 d., rezultatai. 100 % partijų atitiko nustatytus priimtumo kriterijus produktyvumo ir diferencinių savybių su tikslinėmis padermėmis bei selektyvumo su netikslinėmis padermėmis atžvilgiu.

12 – METODO APRIBOJIMAI

- Viena terpė retai kada yra naudinga visų mėginyje esančių patogenų išskyrimui. Todėl reikėtų naudoti papildomas terpes *Salmonella* ir (arba) *Shigella* izoliavimui, kurios yra mažiau selektyvios, pvz., Mac Conkey agaras, ir labiau selektyvios, pvz., SS agaras; rekomenduojama mėginyje pasėti papildomas terpes kitų žarnyno patogenų izoliavimui.⁸
- Gali augti ne žarnyno organizmai, pvz., *Pseudomonas*; *Pseudomonas* ir *Providencia rettgeri* gali sudaryti raudonas kolonijas. Kai kurie *Proteus* spp. gali susidaryti juodas centras.¹²
- *S. Paratyphi* A, *S. Cholerae-suis*, *S. Pullorum* ir *S. Gallinarum* gali formuoti raudonas kolonijas be juodo centro, todėl primena *Shigella* spp.
- Inkubacija, trunkanti ilgiau nei 48 valandas, gali duoti klaidingai teigiamus rezultatus.¹²
- Šis prietaisas nėra skirtas virškinimo trakto infekcijoms diagnozuoti ar antimikrobinio gydymo rekomendacijoms teikti. Jis naudojamas diagnostinių tyrimų rinkinyje, siekiant nustatyti mikrobu kolonijas, izoliuotas iš klinikinių mėginių, paimtų iš pacientų, įtariamų *Salmonella-Shigella* infekcija. Norint visiškai identifikuoti kolonijas ir nustatyti jų epidemiologinį tipą, reikia atlikti atitinkamus tyrimus; jei reikia, atlikite antimikrobinio jautrumo tyrimus, naudodami rekomenduojamus metodus.

13 – ATSARGUMO PRIEMONĖS IR ĮSPĖJIMAI





- Šis produktas yra kokybinis *in vitro* diagnostikos prietaisas, skirtas tik profesionaliam naudojimui, nėra automatizuotas ir nėra papildoma diagnostikos priemonė. Jį turi naudoti tinkamai apmokyti ir kvalifikuoti laboratorijos darbuotojai, laikydami biologinio pavojaus atsargumo priemonių ir aseptikos reikalavimų.
- Pagal galiojančius Europos Sąjungos teisės aktus šis produktas nėra klasifikuojamas kaip pavojingas.
- Ši augininė terpė yra gyvūninės kilmės žaliavų. Todėl rekomenduojama naudoti paruoštas plokšteles kaip potencialiai infekcines ir elgtis su jomis laikantis įprastų specialiųjų atsargumo priemonių: nevertoti, neįkvėpti, neleisti liestis su oda, akimis, gleivinėmis. Atsisakykite TSE pareiškimą iš svetainės www.biolifeitaliana.it, kuriame aprašomos priemonės, taikomos infekcinių gyvūnų ligų rizikai mažinti.
- Visi laboratoriniai mėginiai turėtų būti laikomi infekciniais.
- Laboratorijos patalpos turi būti kontroliuojamos, kad būtų išvengta užteršimo, pvz., kultūrinės terpės ar mikrobu.
- Kiekviena šio auginimo terpės plokštelė skirta vienkartiniam naudojimui.
- Paruošti naudoti indai neturi būti laikomi „steriliais produktais“, nes jie nėra galutinai sterilizuojami, bet yra produktai su kontroliuojamu biologiniu užteršimu, nevirsijančiu kokybės kontrolės sertifikate nurodytų specifikacijų ribų.
- Prieš išmesdami sterilizuokite visas biologinio pavojaus atliekas ir išmeskite nenaudotą terpę bei sterilizuotas lėkšteles, į kurias buvo įterpti mėginiai ar mikrobu štamai, laikydami galiojančių vietos teisės aktų.
- Produkto analizės sertifikatai ir saugos duomenų lapas yra pateikti interneto svetainėje www.biolifeitaliana.it.
- Apie bet kokį rimtą incidentą, susijusį su *in vitro* diagnostikos priemonių naudojimu, praneškite gamintojui (complaint@biolifeitaliana.it) ir atitinkamoms institucijoms.
- Gamintojas neatsako už jokių nuostolių ar žalą, kurie koku nors būdu atsiranda dėl produkto naudojimo nesilaikant pateiktų instrukcijų arba yra su tuo susiję.

14 – LAIKYMO SĄLYGOS IR GALIOJIMO LAIKAS

Gavus plokšteles, jas reikia laikyti originalioje pakuotėje 2–8 °C temperatūroje, apsaugant nuo tiesioginių saulės spindulių. Tinkamai laikomos plokštelės gali būti naudojamos iki galiojimo pabaigos datos. Plokštelių negalima naudoti pasibaigus galiojimo datai. Atidaryto plastikinio maišelio plokšteles galima naudoti 7 dienas, jei jos laikomos švarioje vietoje 2–8 °C temperatūroje. Plokštelių nenaudokite, jei plastikinis maišelis yra pažeistas arba indas yra sudaužytas. Plokštelių nenaudokite, jei yra gedimo požymių (pvz., mikrobiologinis užteršimas, dehidracija, terpės susitraukimas ar įtrūkimai, netipinė spalva, drėgmės perteklius).

15 – NUORODOS

- Jan Hudzicki. Hektoen Enteric Agar Protocol. American Society for Microbiology. 11 November 2010
- Taylor WI. Isolation of shigellae I. Xylose lysine agars; new media for isolation of enteric pathogens. Am J Clin Pathol 1965; 44:471-475
- Taylor WI, Schelhart D. Isolation of shigellae VI. Performance of media with stool specimens. Appl Microbiol 1968; 16:1387-1393
- 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
- Zajc-Sattler J, Gragas AZ. Xylose Lysine Deoxycholate Agar for the isolation of Salmonella and Shigella from clinical specimens. Zentralbl Bakteriol Orig 1977; A237:196-200
- 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
- The Royal College of Pathologists. Bacteriology. <https://www.rcpath.org/profession/publications/standards-for-microbiology-investigations/bacteriology.html>
- Strockbine NA, Bopp CA, Fields PI, Kapur 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.
- European Pharmacopoeia, current edition.
- U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 5: Salmonella. Rev 12/2019
- 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.
- MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
- CLSI (formerly NCCLS) Quality Control of Commercially Prepared Culture Media. Approved Standard, 3rd edition. M22 A3 vol. 24 n° 19, 2004
- 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.

TAIKOMŲ SIMBOLIŲ LENTELĖ

REF Katalogo numeris	LOT Partijos kodas	IVD <i>In vitro</i> diagnostikos medicinos prietaisas	Gamintojas	Šia puse į viršų	Tik vienkartiniam naudojimui	CE Europos atitikties ženklas
Temperatūros apribojimai	Turinio pakanka <n> bandymams	Žiūrėkite elektronines naudojimo instrukcijas	Naudoti iki	Laikyti toliau nuo saulės spindulių	Trapus, tvarkykite atsargiai	UDI Unikalus įrenginio identifikatorius

REDAGAVIMO ISTORIJA

Versija	Pakeitimų aprašymas	Data
2 redakcija	Atnaujintas išdėstymas ir turinys pagal IVDR 2017/746	2020/05
3 redakcija	Pasenusios klasifikacijos pašalinimas	2023/03
4 redakcija	Ekspluatacinės charakteristikos, metodo apribojimai, atsargumo priemonės ir įspėjimai, taikytinų simbolių lentelė.	2025/11

Pastaba: nedideli tipografiniai, gramatiniai ir formatavimo pakeitimai nėra įtraukti į peržiūrų istoriją.

