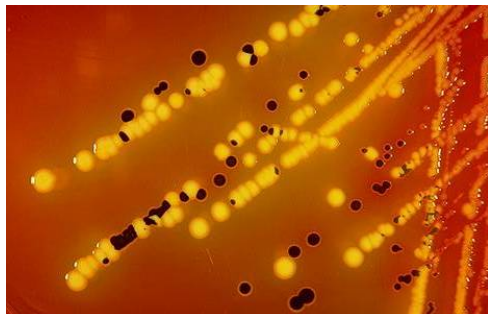


**ANVÄNDNINGSSINSTRUKTIONER**

XLD AGAR

Dehydrerat odlingsmedium



XLD Agar: Salmonellakolonier med stort svart centrum och *E.aerogenes* med gula kolonier

1 - AVSEDD ANVÄNDNING

In vitro-diagnostik. Selektivt och differentiellt medium för isolering av gramnegativa enteriska patogener, särskilt *Salmonella* och *Shigella*, från kliniska och icke-kliniska prover.

2 – TYPISK SAMMANSÄTTNING *

(EFTER REKONSTITUERING MED 1 LITER VATTEN)

Xylos	3,50 g	Natriumdesoxikolat	2,50 g
L-lysin	5,00 g	Natriumtiosulfat	6,80 g
Laktos	7,50 g	Järnammoniumcitrat	0,80 g
Sackaros	7,50 g	Fenolrött	0,08 g
Natriumklorid	5,00 g	Agar	13,50 g
Jästextrakt	3,00 g		

*Formeln kan justeras och/eller kompletteras för att uppfylla de erforderliga prestandakriterierna.

3 – METODENS PRINCIP OCH FÖRKLARING AV FÖRFARANDET

Under första hälften av 1900-talet utvecklades och föreslogs flera odlingsmedier för isolering av enteriska patogener från avföring och andra material. Vissa av dem var måttligt selektiva och tillät tillväxt av fekala föroreningar, andra visade överdriven toxicitet för tillväxt av patogener, särskilt *Shigella*.¹ 1965 introducerades Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) agar av Welton I. Taylor för förbättrad återvinning av *Shigella*.² Flera kliniska utvärderingar visade på den relativt höga effektiviteten hos XLD Agar vid primär isolering av *Shigella* och *Salmonella*.³⁻⁵ XLD-agar är ett selektivt och differentiellt medium avsett för isolering av gramnegativa enteriska patogener, särskilt *Salmonella* och *Shigella*, från kliniska prover.⁶⁻⁸ Det rekommenderas för detektion av *Salmonella* i icke-sterila farmaceutiska produkter enligt harmoniserad EP-, USP- och JP-metod⁹ och av FDA-BAM för detektion av *Salmonella* i livsmedel¹⁰. Den XLD-formel som rekommenderas av ISO-normerna för detektion av *Salmonella* och *Shigella* i livsmedel och vatten innehåller en lägre koncentration av natriumdesoxikolat och motsvarar Biolife-mediet XLD Agar ISO Formulation (REF 402208).

Jästextrakt tillför kol, kväve, vitaminer och spårämnen för bakterietillväxt; natriumklorid upprätthåller den osmotiska balansen i mediet; natriumdesoxikolat är ett selektivt medel för att hämma tillväxten av grampositiva bakterier. XLD Agar innehåller tre indikatorsystem: xylos, laktos och sackaros i kombination med fenolrött, lysin-hydroklorid och återigen fenolrött, natriumtiosulfat och järnammoniumcitrat. Målbakterierna grupperas preliminärt genom att man avläser effekten av kolhydratfermentering, lysindekarboxylering och bildning av vätesulfid.

Sockerjäsning sänker pH-värdet och fenolröda indikatorn registrerar detta genom att ändra färg från rött till gult. De flesta tarmbakterier, inklusive *Salmonella*, kan jäsna xylos för att producera syra; *Shigella* jäser inte xylos, orsakar inte förurning av mediet och växer därför med röda kolonier. Efter att xylosförrådet är uttömt kommer *Salmonella*-kolonierna att dekarboxylera lysin, vilket återigen höjer pH-värdet till alkaliskt och efterliknar de röda *Shigella*-kolonierna. För att förhindra liknande pH-återgång av lysinpositiva koliforma bakterier tillsätts laktos och sackaros för att producera överskott av syra. Dessutom producerar *Salmonella* spp. tiosulfatreduktas som orsakar frisättning av en sulfidmolekyl från natriumtiosulfat som finns i mediet; denna sulfidmolekyl kopplas ihop med en vätejon för att bilda H₂S-gas som reagerar med järnammoniumcitrat och bildar en fällning, vilket resulterar i kolonier som är svarta eller har en svart mitt.

4 – ANVISNINGAR FÖR BEREDNING AV MEDIUM

Lös upp 55 g i 1 000 ml kallt renat vatten. Värm till kokpunkt under frekvent omrörning för att lösa upp helt. Autoklavera inte. Kyl till 47–50 °C, blanda väl och fördela i sterila petriskålar.

5 – FYSISKA EGENSKAPER

Utseende på dehydratiserat medium
Utseende på lösning och beredda plattor
Slutligt pH vid 20–25 °C

gult, fint, homogent, fritt flytande pulver
Rödorange, klar
7,4 ± 0,2

6 – MEDFÖLJANDE MATERIAL – FÖRPACKNING

Produkt	Typ	REF	Förpackning
XLD Agar	Dehydrerat medium	4022062 4022064	500 g (9,1 L) 5 kg (91 L)

7 – MATERIAL SOM KRÄVS MEN INTE TILLHANDAHÅLLS

Vattenbad, sterila ögilor och svabbprover, inkubator och laboratorieutrustning efter behov, petriskålar, Erlenmeyerkolvar, kompletterande odlingsmedier och reagenser för identifiering av kolonierna.

8 – PROVER

XLD-agar är avsett för bakteriologisk bearbetning av kliniska prover såsom avföring, rektalprov, urin, galla,⁶⁻⁸ icke-sterila läkemedel⁹ och livsmedel¹⁰. Samla in prover före antimikrobiell behandling om möjligt. God laboratoriesed för insamling, transport och förvaring av kliniska prover bör tillämpas.¹¹ Konsultera lämpliga standardmetoder för detaljer om insamling och beredning av icke-kliniska prover.^{9,10}

9 – TESTFÖRFARANDE

Låt plattorna anta rumstemperatur och låt ytan på mediet torka.





Inokulera och stryk ut provet med en ögla över de fyra kvadranterna på plattan för att få väl isolerade kolonier, och se till att sektionerna 1 och 4 inte överlappar varandra. Alternativt, om materialet odlas direkt från en bomullspinne, rulla bomullsspinnen över ett litet område på ytan vid kanten; stryk sedan från detta inokulerade område.

Maximal återvinning av *Salmonella* från fekalprover uppnås genom att använda anrikningssteget i selenitbuljong följt av subkultur till XLD-agar och till ett andra plästeringsmedium.⁸

För isolering av *Shigella* från fekalprover rekommenderas anrikning i GN-buljong, följt av subkultur på två olika selektiva medier: XLD-agar och ett andra mindre selektivt medium (MacConkey-agar).⁸

Inkubera inokulerade XLD-agarplattor med provet eller med ett prov som anrikats i flytande medium under aeroba förhållanden vid 35–37 °C i 18–24 timmar. Kolonier på XLD-agar kan kräva 48 timmars inkubation för full färgutveckling och utveckling av svart fällning.

För detektion av *Salmonella* i icke-sterila läkemedel bör den teknik som rekommenderas av Europeiska farmakopén⁹ och som sammanfattas nedan följas:

- Förbered ett prov med en utspädning på 1:10 av minst 1 g av den produkt som ska undersökas och använd 10 ml eller den mängd som motsvarar 1 g eller 1 ml för att inokulera lämplig mängd Tryptone Soy Broth. Blanda och inkubera vid 30–35 °C i 18–24 timmar.
- Skaka behållaren, överför 0,1 ml Tryptone Soy Broth till 10 ml Rappaport Vassiliadis Enrichment *Salmonella* Broth EP (REF 401979) och inkubera vid 30–35 °C i 18–24 timmar.
- Subkultivera på en platta med XLD-agar och inkubera vid 30–35 °C i 18–48 timmar.

Se lämpliga referenser för detektion av *Salmonella* i livsmedel.¹⁰

10 – AVLÄSNING OCH TOLKNING

Efter inkubation observerar du bakterietillväxten och noterar de specifika morfologiska och kromatiska egenskaperna hos isolerade kolonier. Undersök inte områden med sammanflödande tillväxt, eftersom falskt negativa fermentationsreaktioner kan uppstå.

Tolkning av koloniernas färger¹²:

Röda kolonier: alkalisk reaktion, icke-fermentering av xylos/sackaros/laktos, eller fermentering av xylos följt av dekarboxylering av lysin: möjlig *Shigella* eller *Providencia* eller *Pseudomonas* spp. eller *Salmonella* sp. H₂S negativ

Röda kolonier med svart centrum: endast xylofermentering, lysinpositiv, H₂S-positiv, snabb utarmning av xylos och resulterande alkalinitet på grund av lysindekarboxylering, svart centrum på grund av H₂S-produktion endast möjlig i alkalisk pH-miljö: misstänkt *Salmonella* H₂S-positiv.

Ogenomskinliga gula kolonier: xylofermentering, lysin negativ och ingen fermentering av laktos och sackaros, surt pH: möjligen *E. coli*, *Klebsiella*/*Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Proteus* spp.

Gula kolonier: laktos- eller sackarosfermentering, lysin negativ, surt pH: möjliga koliforma bakterier eller sackarospositiv *P. vulgaris*.

För preliminär identifiering av *Salmonella* spp. rekommenderas att kolonin screenas genom att testa kolonin med en droppe MUCAP-reagens (REF 191500) och efter 3 till 5 minuter observera om fluorescens utvecklas under Woods lampa, vilket sker i närvaro av C₈ esterazoenzym, typiskt för *Salmonella* spp.¹⁴

11 – ANVÄNDARENS KVALITETSKONTROLL

Alla tillverkade partier av produkterna släpps för försäljning efter att kvalitetskontrollen har utförts för att kontrollera att specifikationerna uppfylls. Slut användaren kan dock utföra sin egen kvalitetskontroll i enlighet med lokala tillämpliga bestämmelser, i enlighet med ackrediteringskrav och laboratoriets erfarenhet. Nedan listas några teststammar som är användbara för kvalitetskontroll.¹³

KONTROLLSTAMMAR			INKUBATIONSTEMPERATUR/ T / ATM	FÖRVÄNTADE RESULTAT
<i>S. Typhimurium</i>	ATCC	14028	35–37 °C / 18–24 timmar / A	tillväxt, röda kolonier med svart centrum
<i>S. flexneri</i>	ATCC	12022	35–37 °C / 18–24 timmar / A	tillväxt, röda kolonier
<i>E. faecalis</i>	ATCC	29212	35–37 °C / 18–24 timmar / A	hämmad
<i>E. coli</i>	ATCC	25922	35–37 °C / 18–24 timmar / A	delvis hämmad, gula kolonier

A: aerob inkubation; ATCC är ett varumärke som står för American Type Culture Collection

12 – PRESTANDAEGENSKAPER

Innan produkten släpps ut på marknaden testas ett representativt prov av alla partier av dehydrerad XLD-agar med avseende på produktivitet och selektivitet genom att resultaten jämförs med ett tidigare godkänt referensparti.

Produktiviteten testas genom ett kvantitativt test med två målstammar: *S. Enteritidis* ATCC 13076, *S. Typhimurium* ATCC 14028; XLD-agarplattor inokuleras med decimala utspädningar i saltlösning av koloniernas suspensioner och inkuberas vid 35–37°C i 18–24 timmar. Kolonierna räknas på båda sätserna och produktivetsförhållandet (*Pr*) beräknas. Om *Pr* är ≥ 0,7 och om koloniernas morfologi och färg är typiska (röda kolonier med svart centrum) anses resultaten vara godtagbara och överensstämma med specifikationerna. Dessutom testas produktivetskaraktäristika genom semikvantitativ ekometrisk teknik med målstammen *S. flexneri* ATCC 12022. Efter inkubation utvärderas och registreras koloniernas färg och tillväxt.

Selektiviteten utvärderas med modifierad Miles-Misra-ytdroppmetod genom att inokulera plattorna med decimala utspädningar i saltlösning från 10⁻¹ till 10⁻⁴ av en 0,5 McFarland-suspension av icke-målstammarna *E. faecalis* ATCC 19433 och *E. coli* ATCC 8739. Tillväxten av *E. faecalis* hämmas vid utspädningen 10⁻¹, tillväxten av *E. coli* hämmas delvis och kolonierna uppvisar en typisk gul färg, enligt specifikationerna.

13 – METODENS BEGRÄNSNINGAR

- Ett enda medium är sällan tillräckligt för att återvinna alla patogener som finns i ett prov. Därför bör ytterligare medier för isolering av *Salmonella* och/eller *Shigella* användas, med lägre selektivitet såsom MacConkey Agar och med högre selektivitet såsom SS Agar. Det rekommenderas att ytterligare medier för isolering av andra enteriska patogener inokuleras med provet.⁸
- Icke-enteriska organismer såsom *Pseudomonas* kan växa; *Pseudomonas* och *Providencia rettgeri* kan båda uppvisa röda kolonier. Vissa *Proteus* spp. kan utveckla svarta centrum.¹²
- *S. Paratyphi* A, *S. Cholerae*-suis, *S. Pullorum* och *S. Gallinarum* kan bilda röda kolonier utan svart centrum, vilket liknar *Shigella* spp.
- Inkubation som överstiger 48 timmar kan leda till falskt positiva resultat.¹²
- Även om de mikrobiella kolonierna på plattorna kan särskiljas på grundval av sina morfologiska och kromatiska egenskaper, rekommenderas att biokemiska, immunologiska, molekylära eller masspektrometriska tester utförs på isolat från renkultur för fullständig identifiering. Om det är relevant, utför test av antimikrobiell känslighet.
- Detta odlingsmedium är avsett som ett hjälpmedel vid diagnos av infektionssjukdomar. Tolkningen av resultaten måste göras med hänsyn till patientens kliniska historia, provets ursprung och resultaten från andra diagnostiska tester.



**14 – FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER OCH VARNINGAR**

- Det här är en produkt för kvalitativ *in vitro*-diagnostik, endast avsedd för professionellt bruk. Den ska användas av adekvat utbildad och kvalificerad laboratoriepersonal som iakttar godkända försiktighetsåtgärder mot biologiska risker och aseptiska tekniker.
- Uttorkade medier måste hanteras med lämpligt skydd. Konsultera säkerhetsdatabladet före användning.
- Detta odlingsmedium innehåller råmaterial av animaliskt ursprung. Kontroller av djuren *före* och *efter slakt* samt under produktions- och distributionscykeln för råvarorna kan inte helt garantera att denna produkt inte innehåller några överförbara patogener. Det rekommenderas därför att kulturmediet behandlas som potentiellt smittsamt och hanteras med iakttagande av de vanliga särskilda försiktighetsåtgärderna: förtär inte, andas inte in och undvik kontakt med hud, ögon eller slemhinnor. Ladda ner TSE Statement från webbplatsen www.biolifeitaliana.it, som beskriver de åtgärder som Biolife Italiana har vidtagit för att minska riskerna i samband med smittsamma djursjukdomar.
- Tillämpa god tillverkningssed vid beredningen av pläterade eller flaskförpackade medier.
- Alla laboratorieprover ska betraktas som smittsamma.
- Laboratorieområdet måste kontrolleras för att undvika föroreningar som odlingsmedium eller mikrobiella agens.
- Sterilisera allt biologiskt riskavfall innan det kasseras. Kassera det oanvända mediet och de steriliserade plattorna som inokulerats med prover eller mikrobiella stammar i enlighet med gällande lokal lagstiftning.
- Använd inte odlingsmediet som aktiv ingrediens i farmaceutiska preparat eller som produktionsmaterial avsett för konsumtion av människor och djur
- Analyscertifikaten och säkerhetsdatabladet för produkten finns tillgängliga på webbplatsen www.biolifeitaliana.it.
- Meddela Biolife Italiana Srl (complaint@biolifeitaliana.it) och berörda myndigheter om allvariga incidenter som inträffar i samband med användningen av *in vitro*-diagnostiken.
- Informationen i detta dokument har definierats efter bästa kunskap och förmåga och utgör en riktlinje för korrekt användning av produkten men utan förpliktelse eller ansvar. I alla fall måste gällande lokala lagar, förordningar och standardförfaranden följas vid undersökning av prover som tagits från mänskliga och djuriska organ, miljöprover och produkter avsedda för konsumtion av människor eller djur. Vår information befriar inte våra kunder från deras ansvar att kontrollera att våra produkter är lämpliga för det avsedda ändamålet.

15 – FÖRVARINGSFÖRHÅLLANDEN OCH HÅLLBARHET

Förvaras vid +10 °C /+30 °C på en torr plats, skyddad från direkt ljus. Vid korrekt förvaring kan produkten användas fram till utgångsdatum. Använd inte produkten efter detta datum. Undvik att öppna flaskan på fuktiga platser. Efter användning måste behållaren stängas ordentligt. Kassera produkten om behållaren och/eller locket är skadade, eller om behållaren inte är väl tillsluten, eller vid uppenbar försämring av pulvret (färgförändringar, hårdning, stora klumpar). Användaren ansvarar för tillverknings- och kvalitetskontrollprocesserna för beredda medier och för valideringen av giltighetstiden för de färdiga produkterna, beroende på typ (plattor/flaskor), tillsatta supplement och tillämpad förvaringsmetod (temperatur och förpackning).

16 – REFERENSER

1. Jan Hudzicki. Hektoen Enteric Agar Protocol. American Society for Microbiology. 11 November 2010
2. Taylor WI. Isolation of shigellae I. Xylose lysine 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.

TABELL ÖVER TILLÄMPLIGA SYMBOLER

REF eller Katalognummer	LOT Batch-kod	IVD Medicinteknisk produkt för <i>in vitro</i> -diagnostik	Tillverkare	Använd senast
Temperaturbegränsning	Innehållet räcker till <n> tester	Se bruksanvisningen	Förvara skyddat från direkt ljus	Förvaras torrt

REVIDERINGSHISTORIK

Version	Beskrivning av ändringarna	Datum
Revidering 2	Uppdaterad layout och innehåll	2020/05
Revidering 3	Uppdatering av "försiktighetsåtgärder och varningar" och "förvaringsförhållanden och hållbarhet"	2022/01
Revidering 4	Borttagning av föråldrad klassificering	2023/04

Anmärkning: mindre typografiska, grammatiska och formateringsändringar inkluderas inte i granskningshistoriken.

