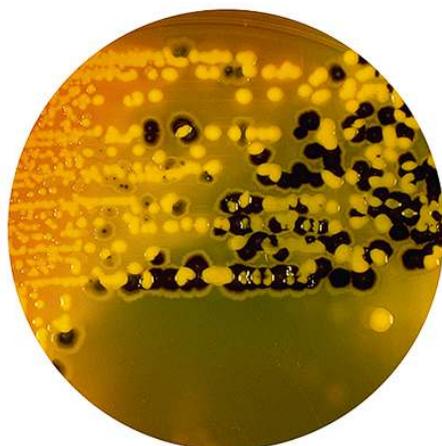


ISTRUZIONI PER L'USO

HEKTOEN ENTERIC AGAR

Terreno di coltura in polvere


 HEA: colonie di *Salmonella* (colore nero) e di *K.pneumoniae* (color giallo-arancio)

1 - DESTINAZIONE D'USO

 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 (PER LITRO, DOPO SCIoglimento IN ACQUA)*

Triptosio	12,000 g
Estratto di lievito	3,000 g
Sali biliari n° 3	9,000 g
Lattosio	12,000 g
Saccarosio	12,000 g
Salicina	2,000 g
Sodio cloruro	5,000 g
Sodio tiosolfato	5,000 g
Ferro ammonio citrato	1,500 g
Agar	15,000 g
Blu di bromotimolo	0,065 g
Fucsina acida	0,100 g

*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 Sylvia King e William I. Metzger², dell'Istituto Hektoen di Chicago, formularono nel 1968 il terreno HE agar con l'obiettivo di aumentare il recupero di *Shigella* spp. da campioni con flora mista. Arricchirono la formulazione del terreno SS Agar, sperimentata nel 1941 da Catherine Mayfield e Maud Gober³, con quantità supplementari di carboidrati e peptoni per compensare gli effetti inibitori dei sali biliari. I due coloranti aggiunti al terreno, il blu di bromotimolo e la fucsina acida, dimostrarono una tossicità inferiore rispetto ad altri coloranti, pertanto il recupero dei patogeni dai campioni si dimostrò significativamente superiore.⁴

 Hektoen Enteric Agar è un terreno selettivo e differenziale destinato all'isolamento dei patogeni enterici Gram-negativi, in particolare *Salmonella* e *Shigella*, da campioni clinici.⁵ Hektoen Enteric Agar è raccomandato dalla norma ISO 21567⁶ per l'isolamento di *Shigella* e da FDA-BAM⁷ per la determinazione di *Salmonella*, negli alimenti.

 Il peptone animale e l'estratto di lievito forniscono carbonio, azoto, vitamine ed oligoelementi per la crescita batterica; l'alta concentrazione di sali biliari n°3 ed i coloranti inibiscono i batteri Gram-positivi e la maggior parte dei coliformi del tratto intestinale. Poiché i patogeni enterici *Salmonella* e *Shigella* sono tolleranti a queste sostanze inibenti, generalmente crescono più velocemente ed in numero superiore rispetto ai coliformi.¹ Il lattosio, il saccarosio e la salicina sono fermentati dai coliformi, o almeno dai ceppi che sono in grado di crescere in presenza dei sali biliari e da alcune specie di *Proteus*, con produzione di acidi. Le condizioni acide nel terreno fanno virare l'indicatore blu di bromotimolo dal suo colore verde a pH neutro a un colore giallo-arancio ed inoltre inducono la precipitazione dei sali biliari con la formazione di una zona opaca attorno alle colonie. Il ferro ammonio citrato è un indicatore della formazione di idrogeno solforato. *Salmonella* spp. 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 – METODO DI PREPARAZIONE

Sospendere 76,6 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione per sciogliere completamente il terreno. Non autoclavare. Raffreddare a 47-50°C, mescolare e distribuire in piastre di Petri sterili.

5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere

fine granulometria omogenea, grigio-verde

Aspetto del terreno in soluzione ed in piastra

terreno limpido o leggermente opalescente di colore verde intenso

pH finale a 20-25°C

7,5 ± 0,2

6 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Hektoen Enteric Agar	Terreno di coltura in polvere	4015412	500 g (6.5 L)
		4015414	5 kg (65 L)

7 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio, piastre di Petri sterili, flaconi o beute autoclavabili, anse da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori per l'identificazione delle colonie.

8 - CAMPIONI

 Hektoen Enteric Agar è destinato all'esame batteriologico di campioni clinici come feci e tampone rettale^{8,9} e campioni non clinici come alimenti e mangimi^{6,7}. Applicare le norme di buona prassi di laboratorio (GLP) per la raccolta, il trasporto, la conservazione dei campioni clinici.⁸ Quando possibile, raccogliere il campione prima dell'inizio della terapia antimicrobica.

 Consultare le norme e gli Standard applicabili per i dettagli sulla raccolta e la preparazione dei campioni alimentari.^{6,7}




9 - 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 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 un'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 Hektoen Enteric Agar e su un secondo terreno di coltura.⁹

Per l'isolamento di *Shigella* da campioni fecali, si consiglia l'arricchimento in GN Broth, seguito dall'isolamento su due diversi terreni selettivi: Hektoen Enteric Agar e un secondo terreno meno selettivo (Mac Conkey Agar).⁹

Incubare le piastre di Hektoen Enteric Agar inoculate con il campione o con il campione arricchito in terreno liquido, in aerobiosi a 35-37°C per 18-24 ore.

10 - 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.

Le diverse caratteristiche cromatiche delle colonie possono essere interpretate come segue.¹

- Colonie blu-verdastre, verde chiaro o trasparenti con centro nero: nessuna fermentazione degli zuccheri, produzione di H₂S: sospetta presenza di *Salmonella*.
- Colonie blu-verdastre, verde chiaro o trasparenti: nessuna fermentazione degli zuccheri, assenza di H₂S: sospetta presenza di *Shigella* o di *Salmonella* H₂S negativa.
- Colonie gialle con un precipitato giallo arancio: fermentazione di lattosio, saccarosio o salicina, assenza di H₂S: assenza di *Salmonella* e/o *Shigella*.
- Colonie da salmone ad arancio: fermentazione della salicina, assenza di H₂S: assenza di *Salmonella* e/o *Shigella*.
- Colonie gialle, da salmone ad arancio con centro nero: fermentazione di lattosio o saccarosio o salicina, presenza di H₂S: probabile assenza di *Shigella* e di *Salmonella*, fatta eccezione per i rari ceppi di *Salmonella* lattosio positivi.

Poiché alcuni ceppi di *Proteus* spp. possono crescere con colonie blu verdastre con centro nero e nel caso vi sia una miscelazione di colonie di *Proteus* e di *Salmonella* H₂S positive, potrebbe essere difficile scegliere le colonie da sottoporre all'identificazione biochimica e sierologica. 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.¹⁰

11 - 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 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.¹¹

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
S.Typhimurium ATCC 14028	35-37°C / 18-24h / A	crescita, colonie verde chiaro con centro nero
S.flexneri ATCC 12022	35-37°C / 18-24h / A	crescita, colonie verde chiaro
E.faecalis ATCC 29212	35-37°C / 18-24h / A	inibito
E.coli ATCC 25922	35-37°C / 18-24h / A	parzialmente inibito, colonie da giallo a salmone

A: incubazione in aerobiosi; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

12 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti terreno in polvere Hektoen Enteric Agar vengono testati per la produttività e la selettività, avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato e considerato come Lotto di Riferimento.

La produttività del terreno è valutata con metodo ecometrico semiquantitativo, con incubazione a 35-37°C per 18-24 ore, con 6 ceppi target: S.Enteritidis NCTC 5188, S.Typhimurium ATCC 14028, S.Gallinarum di isolamento clinico, S.arizonae di isolamento clinico, S.flexneri ATCC 12022, S.sonnei ATCC 9290. Le colonie di *Salmonella* appaiono di colore verde chiaro con centro nero, le colonie di *Shigella* si presentano verde chiaro; 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) e diluizioni da 10⁻¹ a 10⁻⁶ di 6 ceppi non-target Gram negativi: *P.mirabilis* ATCC 10005, *P.vulgaris* ATCC 9484, *E.coli* ATCC 25922, *K.pneumoniae* ATCC 27736, *C.freundii* ATCC 8090, *E.aerogenes* ATCC 13048. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 ore in aerobiosi, *E.faecalis* risulta completamente inibito alla diluizione 10⁻¹, la crescita dei ceppi Gram negativi non target risulta parzialmente inibita con lo sviluppo di colonie con le tipiche caratteristiche cromatiche.

Il terreno in polvere Hektoen Enteric Agar preparato da Biolife è stato testato da Silvia King per l'isolamento di *Salmonella* e *Shigella* dalle feci, con risultati comparabili a quelli ottenuti con il terreno preparato nel suo Laboratorio.¹²

13 - LIMITI DEL METODO

- Le colonie di *Proteus* spp. non fermentanti il saccarosio o la salicina possono mimare le caratteristiche colturali di *Salmonella* o *Shigella*. La differenziazione tra *Proteus* e *Salmonella* può essere effettuata rapidamente sulla piastra, con il reattivo MUCAP Test.¹⁰
- Alcuni ceppi di *Shigella* e *Salmonella* fermentanti il lattosio possono crescere con caratteristiche simili ai coliformi e non essere riconosciuti su Hektoen Enteric Agar.
- Non incubare per più di 24 ore poiché può verificarsi una perdita del colore giallo/salmone delle colonie, a causa dell'utilizzo dei peptoni con produzione di alcalinità.¹
- L'impiego di un unico terreno è raramente sufficiente per recuperare tutti i patogeni contenuti in un campione. È necessario pertanto utilizzare, insieme ad Hektoen Enteric 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 colturali specifici per altri patogeni enterici.^{8,9}
- La presenza di cristalli nel contesto del terreno preparato in piastra, che si possono formare durante la conservazione a 2°C / 8°C, non inficia la qualità dell'analisi.





- 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.

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno 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.
- I terreni in polvere devono essere manipolati con adeguate protezioni. Prima dell'uso consultare la scheda di sicurezza.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materiali di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione delle materie prime 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 di sicurezza 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.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura in piastra o in flacone.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti come terreno di coltura o agenti microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno non utilizzato ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzato, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare il prodotto qui descritto come principio attivo per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.
- Comunicare a Biolife Italiana Srl (complaint@biolifeitaliana.it) ed alle Autorità competenti qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione all'uso del diagnostico *in vitro*.
- 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.

15 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Conservare a +10°C /+30°C al riparo della luce e dell'umidità. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Evitare di aprire il flacone in ambienti umidi. Una volta aperto, conservare il prodotto mantenendo il tappo del contenitore ben chiuso. Eliminare il prodotto nel caso il contenitore e/o il tappo fossero danneggiati, nel caso i contenitori non fossero ben chiusi o in caso di evidente deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi). L'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione del terreno e della validazione del periodo di validità del prodotto finito, in funzione della tipologia (piastre/flaconi) e del metodo di conservazione applicato (temperatura e confezionamento).

16 - BIBLIOGRAFIA

- Jan Hudzicki. Hektoen Enteric Agar Protocol. American Society for Microbiology. 11 November 2010.
- King S, WI Metzger WI. A new plating medium for the isolation of enteric pathogens: I. Hektoen enteric agar. *Appl Microbiol* 1968; 16:577-578.
- Mayfield CR, M Gober M. Comparative efficiency of plating media for the isolation of *Shigella dysenteriae*. *Am J Public Health* 1941; 31:363-368.
- King S, WI Metzger WI. A new plating medium for the isolation of enteric pathogens: II. Comparison of Hektoen Enteric Agar with S S and E M B Agar. *Appl Microbiol* 1968;16: 579-581.
- MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
- ISO 21567:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of *Shigella* spp.
- U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 5: Salmonella. Rev 12/2019.
- McElvania E, Singh K. Specimen Collection, Transport and Processing: Bacteriology. In Carrol KC, Pfaller MA et al. editors. Manual of clinical microbiology, 12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019.
- Strockbine NA, Bopp CA, Fields PI, Kaper JB, Nataro JP. Escherichia, Shigella and Salmonella. In Jorgensen JH, Pfaller MA et al. editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015.
- 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.
- CLSI (formerly NCCLS) Quality Control of Commercially Prepared Culture Media. Approved Standard, 3rd edition. M22 A3 vol. 24 n° 19, 2004.
- King S. Department of Microbiology, Cook County Hospital, Chicago. Personal communication. 1968.

401541 HEKTOEN ENTERIC AGAR

SDS

Regolamento (UE) 2020/878

Contiene: SALICINA

Classificazione: Sensibilizzazione cutanea, categoria 1

Etichettatura:



Avvertenze:

Indicazioni di pericolo: H317 Può provocare una reazione allergica cutanea.

Consigli di prudenza: P280 Indossare guanti protettivi.

P261 Evitare di respirare la polvere / i fumi / i gas / la nebbia / i vapori / gli aerosol.

P333+P313 In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.

P362+P364 Togliere gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.



**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	 Proteggere dalla luce	 Proteggere dall'umidità

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 3	Aggiornamento del contenuto e del layout	05/2020
Revisione 4	Modifica al cap. 4 (pH in conformità ad ISO 21567:2004)	12/2020
Revisione 5	Modifiche a: "precauzioni ed avvertenze", "conservazione e validità"	01/2022
Revisione 6	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023
Revisione 7	Inserimento della sezione relativa alla SDS	05/2025

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

