



XYLOSE LYSINE DESOXYCHOLATE (XLD) AGAR ISO FORMULATION

Terreno di coltura in polvere e pronto all'uso in piastra

1 - DESTINAZIONE D'USO

Terreno selettivo e differenziale per la determinazione di *Salmonella* e *Shigella* negli alimenti e nelle acque in accordo alle norme ISO.

2 – COMPOSIZIONE*

FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA

TERRENO IN POLVERE E PRONTO ALL'USO IN PIASTRA

Xilosio	3.75 g
L-lisina HCl	5.00 g
Lattosio	7.50 g
Saccarosio	7.50 g
Sodio cloruro	5.00 g
Estratto di lievito	3.00 g
Sodio desossicolato	1.00 g
Sodio tiosolfato	6.80 g
Ferro ammonio citrato	0.80 g
Rosso fenolo	0.08 g
Agar	14.50 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 XX secolo sono stati sviluppati e proposti diversi terreni di coltura per l'isolamento dei patogeni enterici dalle 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 Diversi lavori sperimentali hanno dimostrato l'efficienza relativamente elevata di XLD Agar nell'isolamento primario di *Shigella* e *Salmonella*.³⁻⁵

XLD Agar ISO Formulation è un terreno selettivo e differenziale destinato all'isolamento di *Salmonella* in campioni della catena alimentare secondo la norma ISO 6579,⁶ in campioni di acqua secondo la norma ISO 19250⁷ e per la determinazione di *Shigella* negli alimenti secondo la norma ISO 21567⁸.

XLD Agar ISO Formulation contiene una concentrazione inferiore di sodio deossicolato e una concentrazione leggermente superiore di xilosio rispetto alla formulazione standard di XLD Agar (REF 402206).

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 reduttasi 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 – PREPARAZIONE

Sospendere 54,9 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. Riscaldare fino all'ebollizione con agitazione frequente, per sciogliere completamente la polvere. Non surriscaldare, non autoclavare. Raffreddare a 47-50°C, mescolare bene e distribuire in piastre Petri sterili.

5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	fine granulometria omogenea, gialla
Aspetto del terreno in soluzione e in piastra	rosso-arancio, limpido
pH (20-25°C)	7,4 ± 0,2

6 – MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
XLD Agar ISO Formulation	Terreno in polvere	4022082	500 g (9.1 L)
		4022084	5 kg (91 L)
XLD Agar ISO Formulation	Piastre pronte all'uso	542208	2 x 10 piastre ø 90 mm

7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, piastre di Petri, beute, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

8 – CAMPIONI

Campioni della catena alimentare e campioni d'acqua. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, attenersi alle norme di buona pratica di laboratorio e fare riferimento agli standard internazionali applicabili.⁶⁻⁸



9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Determinazione di *Salmonella* negli alimenti⁶

La determinazione di *Salmonella* negli alimenti e in altri campioni di interesse sanitario richiede quattro fasi successive: pre-aricchimento in terreno liquido non selettivo, arricchimento in uno o due terreni liquidi selettivi, isolamento in piastra, test di conferma.

1. Portare le piastre a temperatura ambiente e lasciare asciugare la superficie del terreno.
2. Da Rappaport Vassiliadis Soy (RVS) Broth (REF 4019819) o MSR/V Medium (ref 401982) incubati a $41,5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$ per $24 \text{ h} \pm 3$ h e da MKTT Broth (REF 401745) incubato tra $34 \text{ }^\circ\text{C}$ e $38 \text{ }^\circ\text{C}$ per $24 \text{ h} \pm 3$ h, trasferire un'ansa di crescita su una piastra di XLD Agar ISO Formulation e su un altro terreno selettivo per *Salmonella*, basato su caratteristiche diagnostiche diverse da quelle di XLD agar (es, Chromogenic Salmonella Agar REF 405350).
3. Incubare le piastre di XLD Agar capovolte tra $34 \text{ }^\circ\text{C}$ e $38 \text{ }^\circ\text{C}$ ed esaminarle dopo 24 h. Incubare il secondo terreno selettivo in base alle istruzioni d'uso.

Determinazione di *Shigella* negli alimenti⁸

1. Da Shigella Broth contenente $0,5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ di novobiocina (Shigella Broth Base REF 4020402 addizionato con Novobiocin Antimicrobial Supplement REF 4240047), incubato in anaerobiosi a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ per 16 h - 20 h, trasferire un'aliquota di crescita su piastre di MacConkey Agar REF 401670 (bassa selettività), XLD Agar ISO Formulation (selettività moderata) e Hektoen Enteric Agar REF 401541 (massima selettività).
2. Incubare i terreni di coltura a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ per 20-24 ore. Se non si osservano colonie tipiche e la crescita di altri microrganismi è debole (in particolare sull'agar più selettivo), re-incubare le piastre per altre 24 ore. Esaminare nuovamente per la presenza di colonie tipiche di *Shigella*.

10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo incubazione, osservare la crescita batterica e registrare le caratteristiche morfologiche e cromatiche specifiche delle colonie isolate. Non esaminare le aree di crescita confluyente poiché potrebbero verificarsi reazioni di fermentazione falsamente negative.

- Le colonie tipiche di *Salmonella* su XLD Agar ISO Formulation presentano un centro nero e una zona leggermente trasparente di colore rossastro dovuta al cambiamento di colore dell'indicatore. Le varianti di *Salmonella* H₂S-negative crescono con colonie rosa con un centro rosa più scuro. *Salmonella* positiva al lattosio cresce con colonie gialle con o senza centro nero.
- Le colonie tipiche di *Shigella* su XLD Agar ISO Formulation sono traslucide con centro rosso, dello stesso colore dell'agar.

Il riconoscimento delle colonie di *Salmonella* richiede esperienza poiché il loro aspetto può variare in modo significativo. Qui di seguito sono riassunti i criteri di interpretazione delle colonie cresciute su XLD Agar⁹:

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.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 ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Nella tabella che segue sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.

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

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

12 – VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di XLD Agar ISO Formulation, in polvere e pronto all'uso (Test batch:TB) vengono testati per la produttività e la selettività, confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato (Reference Batch:RB).

La produttività viene testata mediante un test quantitativo con i ceppi target *S. Enteritidis* ATCC 13076 e *S. Typhimurium* ATCC 14028. Le piastre vengono inoculate con diluizioni decimali in soluzione salina delle sospensioni delle colonie e incubate a $35\text{-}37^\circ\text{C}$ per 18-24 ore. Le colonie vengono contate su entrambi i lotti e viene calcolato il rapporto di produttività ($\text{Pr:UFC}_{\text{TB}}/\text{UFC}_{\text{RB}}$). Se $\text{Pr} \geq 0,7$ e se la morfologia ed il colore delle colonie sono tipici (colonie rosse con centro nero), i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche. Inoltre, le caratteristiche di produttività vengono testate mediante tecnica ecometrica semiquantitativa con il ceppo target *S. flexneri* ATCC 12022. Dopo incubazione, vengono valutati e registrati il colore delle colonie e l'entità della crescita.

La selettività viene valutata con il metodo Miles-Misra modificato, inoculando le piastre con opportune diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione con torbidità pari a 0,5 McFarland dei ceppi non target *E. faecalis* ATCC 19433 ed *E. coli* ATCC 8739. La crescita di *E. faecalis* è inibita, mentre quella di *E. coli* è parzialmente inibita e le colonie presentano il tipico colore giallo.

13– LIMITI DEL METODO

- L'impiego di un unico terreno è raramente sufficiente per recuperare tutti i patogeni contenuti in un campione.
- Sul terreno possono crescere anche batteri non enterici come *Pseudomonas*; *Providencia rettgeri* e *Pseudomonas* e possono sviluppare colonie rosse; alcuni ceppi di *Proteus* spp. possono sviluppare colonie con centro nero⁹.





- S.Paratyphi A, S.Cholerae-suis, S.Pullorum e S.Gallinarum possono crescere con colonie prive di centro nero e quindi essere simili a *Shigella*.⁹
- L'incubazione protratta oltre le 48 ore può portare a risultati falsamente positivi per i ceppi target.⁹
- Le colonie microbiche presenti sulla piastra devono essere sottoposte, previa loro purificazione, ad una completa identificazione mediante test biochimici e sierologici appropriati.

14 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno qui descritto è per controlli microbiologici, è 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 disidratati devono essere maneggiati con adeguate protezioni. Prima dell'uso, consultare le schede 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.
- Ogni piastra di questo terreno di coltura è monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerarsi un "prodotto sterile" in quanto non sono soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto con biocontaminazione controllata, entro i limiti delle specifiche riportate sul Certificato di Controllo di Qualità.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'area di laboratorio con il terreno di coltura ed i ceppi microbici
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire i terreni non utilizzati ed i terreni inoculati con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzati, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare i prodotti qui descritti come principi attivi per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e le Schede di Sicurezza 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 dei prodotti, 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

Piastre pronte all'uso

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. Non usare oltre la data di scadenza. Le piastre estratte dal sacchetto di plastica possono essere utilizzate entro 7 giorni. Eliminare se vi sono segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, disidratazione, restringimenti o screpolature del terreno, colore atipico, eccesso di condensa).

Terreno disidratato

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 produzione e di controllo dei terreni preparati in laboratorio e della definizione del loro periodo di validità, in funzione della tipologia e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento).

Secondo la norma ISO 6579, le piastre preparate in laboratorio possono essere conservate a +2°C +8°C, protette dall'essiccazione, per un massimo di quattro settimane.⁶

16 - BIBLIOGRAFIA

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-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
6. ISO 6579-1:2017. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella —Part 1: Detection of Salmonella spp.
7. ISO 19250:2010 Water quality — Determination of Salmonella species
8. ISO 21567:2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of Shigella spp.
9. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985
10. 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 o REF Numero di catalogo	LOT Numero di lotto	 Monouso	 Fabbricante	 Lato superiore	 Proteggere dall'umidità
 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> saggi	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Utilizzare entro	 Fragile maneggiare con cura	 Proteggere dalla luce diretta

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 4	Aggiornamento del contenuto e del Layout	02/2023

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

