



## **XLT4 AGAR BASE XLT4 SUPPLEMENT**

**Terreno di coltura in polvere e supplemento selettivo**

### **1 - DESTINAZIONE D'USO**

XLT4 Agar Base viene utilizzato con XLT4 Supplement per la preparazione di XLT4 Agar, un terreno altamente selettivo per la ricerca di *Salmonella* spp. diversi da *S.Typhi*.

### **2 - COMPOSIZIONE\***

#### **SUGAR FREE AGAR BASE-TERRENO DISIDRATATO**

##### **FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA**

Peptone	1,60 g
Estratto di lievito	3,00 g
L-lisina	5,00 g
Xilosio	3,75 g
Lattosio	7,50 g
Saccarosio	7,50 g
Fe-Ammonio citrato	0,80 g
Sodio tiosolfato	6,80 g
Sodio cloruro	5,00 g
Rosso fenolo	0,08 g
Agar	17,00 g

#### **XLT4 SUPPLEMENT (CONTENUTO DEL FLACONE)**

Tergitol 4	100 mL
(Niaproof 4/Sodio tetradecilsolfato)	

\* 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 sono stati sviluppati e proposti diversi terreni di coltura per l'isolamento di patogeni enterici da feci e altri materiali. Alcuni di essi erano moderatamente selettivi e consentivano la crescita di contaminanti fecali, altri mostravano un'eccessiva tossicità per la crescita di agenti patogeni.<sup>1</sup> Nel 1990, l'agar xilosio-lisina-tergitol 4 (XLT4) fu sviluppato da Miller e Tate<sup>2</sup> come modificazione dello xilosio-lisina desossicolato agar, per il recupero potenziato di *Salmonella* spp. Diverse valutazioni hanno dimostrato che il terreno XLT4 ha migliorato significativamente l'isolamento di *Salmonella* dai campioni di tamponi ambientali di allevamenti di polli rispetto agli altri terreni selettivi su piastra.<sup>3-5</sup> L'agar XLT4 ha dimostrato di inibire fortemente *Proteus*, *Pseudomonas*, *Providencia* e molte altre specie non salmonelle e di fornire buona differenziazione tra *Salmonella* e *Citrobacter*.<sup>3</sup>

L'agar XLT4 è incluso nell'elenco FDA-BAM dei metodi rapidi e dei substrati speciali per il rilevamento di batteri di origine alimentare.<sup>6</sup>

L'estratto di lievito fornisce carbonio, azoto, vitamine e oligoelementi per la crescita batterica. L'agar XLT4 contiene tre sistemi indicatori: xilosio, lattosio, saccarosio e lisina cloridrato combinati con rosso fenolo, tiosolfato di sodio e citrato di ammonio ferrico. I batteri target sono provvisoriamente raggruppati leggendo l'effetto della fermentazione dei carboidrati, della decarbossilazione della lisina e della formazione di idrogeno solforato.

La fermentazione degli zuccheri abbassa il pH e l'indicatore rosso fenolo lo registra passando dal rosso al giallo. Dopo aver esaurito la scorta di xilosio, le colonie di *Salmonella* decarbossilano la lisina, aumentando nuovamente il pH ad alcalino. Per prevenire una simile inversione del pH da parte dei coliformi lisina-positivi, vengono aggiunti lattosio e saccarosio per produrre acido in eccesso. Inoltre *Salmonella* spp. produce tiosolfato reductasi che provoca il rilascio di una molecola di solfuro dal tiosolfato di sodio; questa molecola di solfuro si accoppia con uno ione idrogeno per formare gas H<sub>2</sub>S che reagisce con il Fe-Ammonio citrato, formando un precipitato, dando origine a colonie nere o con centro nero. L'aggiunta di basse concentrazioni di peptone produce colonie di *Salmonella* più nere in tempi di incubazione più brevi (aumento della produzione di idrogeno solforato), pur mantenendo una forte inibizione dei batteri concorrenti.<sup>7</sup> La selettività si basa sull'uso del tensioattivo anionico Niaproof 4 (precedentemente Tergitol 4) che inibisce ampiamente la flora di accompagnamento indesiderata. Su agar XLT4, *Salmonella* spp. produce colonie nere o con centro nero e una periferia gialla o rosa. Altri batteri Gram-negativi sono marcatamente inibiti o producono colonie gialle o rosa senza colorazione nera.

### **4 - PREPARAZIONE**

Sospendere 58 g in 1000 mL di acqua purificata fredda e aggiungere 4,6 mL di XLT4 Supplement (REF 4240097). Riscaldare fino all'ebollizione con agitazione frequente, fino a sciogliere completamente. Non surriscaldare, non sterilizzare in autoclave. Raffreddare a 47-50°C, mescolare bene e distribuire in piastre Petri sterili. Non lasciare il terreno per più di 45 minuti nel lotto di acqua.

### **5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO**

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

### **6 - MATERIALI FORNITI**

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
XLT4 Agar Base	Terreno di coltura in polvere	4022072	500 g (8.6 L)
XLT4 Supplement	Supplemento liquido	4240097	100 mL

### **7 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI**

Bagnomaria, anse e tamponi sterili, incubatore e attrezzatura da laboratorio secondo necessità, beute, piastre Petri sterili, terreni di coltura e reagenti ausiliari.



## 8 – CAMPIONI

Campioni alimentari. Durante la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, seguire le regole della buona pratica di laboratorio e fare riferimento agli standard internazionali applicabili.

## 9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

La rilevazione di *Salmonella* negli alimenti e in altri campioni di interesse sanitario può richiedere quattro fasi successive: pre-arricchimento in terreno liquido non selettivo, arricchimento in uno o due terreni liquidi selettivi, semina su piastra e riconoscimento, conferma.

Lasciare che le piastre raggiungano la temperatura ambiente e che si asciughi la superficie del terreno.

Da un brodo di arricchimento per *Salmonella* adatto (ad esempio, Mueller Kauffman Tetrathionate Broth o Tetrathionate Broth o Selenite Cystine Broth) trasferire un'ansa di crescita su una piastra di XLT4 Agar.

Strisciare l'inoculo sui quattro quadranti della piastra per ottenere colonie ben isolate.

Incubare tra 34 °C e 38 °C ed esaminare dopo 24 e 48 ore.

## 10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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

*Salmonelle* spp. fermenta lo xilosio con acidificazione del terreno, e decarbossila la lisina con conseguente inversione del pH del terreno a valori alcalini. Colonie tipiche di *Salmonella* su XLT4 Agar dopo 18-24 ore di incubazione hanno un centro nero e una zona leggermente trasparente di colore giallo. Dopo 48 ore di incubazione le colonie di *Salmonella* diventano completamente nere o da rosa a rosse con centri neri. Varianti H<sub>2</sub>S-negative crescono con colonie giallo-rosate. Ceppi di *Salmonella* lattosio-positivi crescono con colonie gialle con o senza annerimento.

*Shigella* è parzialmente inibita e cresce con colonie rosse.

I batteri coliformi come *E. coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter* sono marcatamente inibiti e le colonie appaiono gialle senza annerimento. La crescita di altri batteri Gram-negativi è marcatamente o completamente inibita. I batteri Gram-positivi sono totalmente inibiti.

## 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.

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

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

## 12 – VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo di tutti i lotti di XLT4 Agar Base disidratato addizionato con XLT4 Supplement (REF 4240097) viene testato per produttività e selettività confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

La produttività è testata con una tecnica ecometrica semi-quantitativa con i seguenti ceppi target: *S. arizonae* ATCC 13314, *S. Enteritidis* ATCC 13076, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. Gallinarum* CB 506, *S. Dublin* CB 09:02, *S. Choleraesuis* CB X4. Dopo incubazione a 37°C per 24 ore, vengono valutati il colore delle colonie e la quantità di crescita: i ceppi target mostrano una buona crescita con colonie dal centro nero.

La selettività è valutata con il metodo della goccia di superficie di Miles-Misra modificato inoculando le piastre con opportune diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione McFarland 0,5 dei ceppi non target *E. faecalis* ATCC 19433, *E. coli* ATCC 25922, *C. freundii* ATCC 8090, *E. aerogenes* ATCC 13048, *P. mirabilis* ATCC 10005. La crescita di *E. faecalis*, *E. aerogenes*, *P. mirabilis* è totalmente inibita mentre la crescita di *E. coli* e *C. freundii* è parzialmente o non inibita e le colonie presentano i tipici colore giallo senza annerimento.

CB: Raccolta di ceppi microbici Biolife.

## 13– LIMITI DEL METODO

- Solo raramente un singolo terreno è utile per recuperare tutti i patogeni contenuti in un campione.
- L'agar XLT4 non è destinato alla rilevazione di *S. Typhi*.
- Le colonie di presunta *Salmonella* devono essere sottocoltivate e la loro identità confermata mediante opportuni test biochimici e sierologici.
- Si possono incontrare ceppi diversi da *Salmonella* che non sono completamente inibiti su questo terreno e devono essere differenziati da *Salmonella*.

## 14 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura ed il supplemento sono destinati esclusivamente al controllo microbiologico e all'uso professionale; devono essere utilizzati da personale di laboratorio adeguatamente addestrato e qualificato, osservando le precauzioni approvate in materia di rischio biologico e le tecniche asettiche.
- Il terreno di base e il supplemento devono essere utilizzati in associazione secondo le indicazioni descritte.
- I terreni in polvere e i supplementi contenenti antibiotici devono essere manipolati con adeguate protezioni. XLT4 Supplement è classificato come pericoloso. Prima dell'uso, consultare le schede di sicurezza dei materiali.
- 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](http://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.
- Prestare attenzione quando si apre l'anello metallico delle fiale per evitare lesioni.





- Il supplemento non è fornito sterile; va autoclavato con il terreno di base.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'area del laboratorio deve essere controllata per evitare contaminazioni con il terreno in polvere, il supplemento o i ceppi microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno e il supplemento non utilizzato 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 la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito [www.biolifeitaliana.it](http://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.

### 15 – CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

#### 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).

#### Supplemento selettivo

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +10°C /+30°C al riparo della luce. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. Il flacone del supplemento può essere aperto più volte fino ad esaurimento del contenuto. Prima dell'uso esaminare il liofilizzato e il prodotto ricostituito per rilevare segni evidenti di deterioramento (es. contaminazione, colore alterato o altra caratteristica anomala).

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 (piastre/provette/flaconi) e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento).

### 16 - BIBLIOGRAFIA

1. Jan Hudzicki. Hektoen Enteric Agar Protocol. American Society for Microbiology. 11 November 2010
2. Miller RG, Tate CR. XLT4: A highly selective plating medium for the isolation of Salmonella. The Maryland Poultryman, 1990 April: 2-7.
3. Tate CR, Mallinson ET, Scherrer JA. Xylose-lysine-tergitol 4: an improved selective agar medium for the isolation of Salmonella. Poult Sci. 1991;70:2429.
4. Miller RG, Tate CR, Mallinson ET, Scherr JA. Xylose-lysine-tergitol 4: an improved selective agar medium for the isolation of Salmonella. Poult Sci. 1992; 71:398.
5. Miller RG, Tate CR, Mallinson ET. Evaluation of two Isolation and two non isolation methods for detecting naturally occurring Salmonellae from broiler flock environmental drag-swab samples. J Food Prot. 1992; 55:964-967.
6. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. Appendix 1, Rapid Methods for Detecting Foodborne Pathogens. Version: January 2001. Content current as of June 18, 2009.
7. Miller RG, Tate CR, Mallinson ET Improved XLT4 Agar: Small addition of peptone to promote stronger production of hydrogen-sulfide by Salmonellae. J Food Prot 1994; 57:854-858.

### TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	LOT Numero di lotto	Fabbricante	Utilizzare entro	Proteggere dall'umidità	Fragile, maneggiare con cura
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> test	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Lato superiore	Proteggere dalla luce	

### CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 3	Aggiornamento del contenuto e del Layout	05/2023

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

