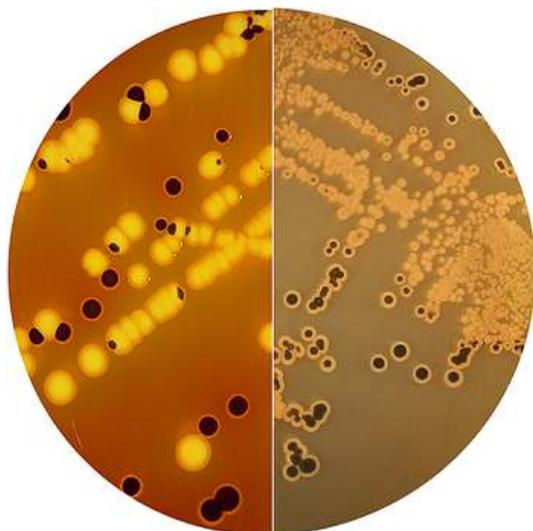


ISTRUZIONI PER L'USO

BIOSECTOR 32

XLD AGAR/SS AGAR

Piastre pronte all'uso a due settori


 Colonie di *Salmonella* sp. (nere) su XLD Agar e SS Agar

1 - DESTINAZIONE D'USO

Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreni selettivi e differenziali per l'isolamento dei patogeni enterici Gram-negativi, soprattutto *Salmonella* e *Shigella*, da campioni clinici e da altri materiali.

2 - COMPOSIZIONI - FORMULE TIPICHE
XLD AGAR*

| | | | |
|---------------------|--------|-----------------------|---------|
| Xilosio | 3,50 g | Sodio desossicolato | 2,50 g |
| L-lisina | 5,00 g | Sodio tiosolfato | 6,80 g |
| Lattosio | 7,50 g | Ferro ammonio citrato | 0,80 g |
| Saccarosio | 7,50 g | Rosso fenolo | 0,08 g |
| Sodio cloruro | 5,00 g | Agar | 13,50 g |
| Estratto di lievito | 3,00 g | Acqua purificata | 1000 mL |

SS AGAR*

| | | | |
|-------------------|----------|------------------|----------|
| Estratto di carne | 5,000 g | Ferro citrato | 1,000 g |
| Peptocomplex | 5,000 g | Rosso neutro | 0,025 g |
| Lattosio | 10,000 g | Agar | 13,500 g |
| Sali biliari n° 3 | 8,500 g | Verde brillante | 0,330 mg |
| Sodio tiosolfato | 8,500 g | Acqua purificata | 1000 mL |
| Sodio citrato | 8,500 g | | |

*Il terreno può essere compensato e/o corretto per adeguare le sue prestazioni alle specifiche.

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

La piastra a due settori XLD/SS si presta all'isolamento dei patogeni enterici Gram-negativi, soprattutto *Salmonella* e *Shigella*, da campioni clinici (feci) e da altri materiali.

XLD Agar è un terreno selettivo e differenziale destinato all'isolamento dei patogeni enterici Gram-negativi, in particolare *Salmonella* e *Shigella* da campioni clinici.¹⁻³ È raccomandato per la determinazione di *Salmonella* nei prodotti farmaceutici non sterili in accordo al metodo armonizzato EP, USP, JP⁴ e da FDA-BAM per il rilevamento di *Salmonella* negli alimenti⁵. 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.

SS Agar è un terreno selettivo e differenziale destinato all'isolamento dei patogeni enterici Gram-negativi, in particolare *Salmonella* da campioni clinici.^{3,6}

I peptoni forniscono carbonio, azoto ed oligoelementi per la crescita batterica; l'alta concentrazione di sali biliari n°3, il sodio citrato ed il verde brillante inibiscono i batteri Gram-positivi e la maggior parte dei coliformi del tratto intestinale. Poiché *Salmonella* è tollerante a queste sostanze inibenti, generalmente cresce più velocemente ed in numero superiore rispetto ai coliformi. Il lattosio è fermentato dai coliformi, o almeno dai ceppi che sono in grado di crescere in presenza dei sali biliari, con produzione di acidi. Le condizioni acide nel terreno fanno virare l'indicatore rosso neutro ad un colore rosa-rosso 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 da luogo a colonie nere o con un centro nero.

4 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO
XLD AGAR

Aspetto del terreno rosso, limpido
pH finale a 20-25°C 7,4 ± 0,2

SS AGAR

Aspetto del terreno rosso arancio, limpido o leggermente opalescente
pH finale a 20-25°C 7,0 ± 0,2

5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

| Prodotto | Tipo | REF | Confezione |
|-------------------------------|--------------------------------------|--------|---|
| Biosector 32 XLD Agar/SS Agar | Piastre pronte all'uso a due settori | 491032 | 2 x 10 piastre ø 90 mm a due settori confezionamento primario: 2 sacchetti di cellophane confezionamento secondario: scatola di cartone |

6 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Anse e tamponi sterili da microbiologia, termostato e strumentazione di laboratorio, terreni di coltura accessori e reagenti per l'identificazione delle colonie.



**7 - CAMPIONI**

La piastra a 2 settori XLD Agar/SS Agar è destinata all'esame batteriologico di campioni clinici come feci e tampone rettale^{3,6}. Quando possibile, raccogliere il campione prima dell'inizio della terapia antimicrobica. Applicare le norme di buona prassi di laboratorio (GLP) per la raccolta, il trasporto, la conservazione dei campioni.² Consultare le norme e gli Standard applicabili per i dettagli sulla raccolta e la preparazione dei campioni non clinici.^{4,5}

8 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastre a temperatura ambiente e lasciare asciugare la superficie dei due terreni.

Inoculare con il materiale strisciando con l'ansa sui due terreni, per disperdere l'inoculo ed ottenere colonie isolate. In alternativa se il campione è seminato direttamente dal tampone di raccolta, rotolarlo su una area ristretta in prossimità dei due bordi piastra, quindi strisciare su tutta la superficie dei due terreni con un'ansa.

Il massimo recupero di *Salmonella* dai campioni fecali si ottiene utilizzando un arricchimento in Selenite Broth seguito dalla semina su XLD Agar e su un secondo terreno.³ Per l'isolamento di *Shigella* da campioni fecali, si consiglia l'arricchimento in GN Broth.³

Incubare le piastre inoculate con il campione o con un campione arricchito in terreno liquido, in condizioni aerobiche a 35-37°C per 18-24 ore. Le colonie su agar XLD possono richiedere 48 ore di incubazione per lo sviluppo completo dei colori e del precipitato nero.

9 - 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.

Si possono osservare diversi modelli di reattività sul XLD Agar⁶:

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.

Su SS agar si osservano le seguenti tipologie di colonie.

1. Colonie lisce, opache, incolori con centro nero: ceppo lattosio non fermentante, H₂S positivo: probabile presenza di *Salmonella*.
2. Colonie lisce, opache, incolori, senza centro nero: ceppo lattosio non fermentante, H₂S negativo: probabile presenza di *Salmonella* H₂S negativa o di un ceppo di *Shigella* non inibito dal sistema selettivo del terreno.
3. Colonie rosa-rosse: fermentazione del lattosio: assenza *Salmonella*
E. coli cresce leggermente, con colonie rosse, con precipitato rosso attorno alle colonie; *E. aerogenes* può crescere con colonie da rosa a crema, grandi, mucoidi, opache.

Su entrambi i terreni si consiglia di testare le colonie tipiche per *Salmonella* con una goccia di reagente MUCAP Test (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.⁷

10 - 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 responsabilità 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.⁸

| CEPPI DI CONTROLLO | INCUBAZIONE T° / T / ATM | | | RISULTATI ATTESI |
|--------------------------|--------------------------|--|------------------------------|--|
| XLD AGAR | | | | |
| S.Typhimurium ATCC 14028 | | | 30-35 o 35-37°C / 18-24h / A | crescita, colonie rosse con centro nero |
| S.flexneri ATCC 12022 | | | 30-35 o 35-37°C / 18-24h / A | crescita, colonie rosse |
| E.faecalis ATCC 29212 | | | 30-35 o 35-37°C / 18-24h / A | inibito |
| E.coli ATCC 25922 | | | 30-35 o 35-37°C / 18-24h / A | parzialmente inibito, colonie gialle |
| SS AGAR | | | | |
| S.Typhimurium ATCC 14028 | | | 35-37°C / 18-24h / A | crescita, colonie incolori con centro nero |
| S.flexneri ATCC 12022 | | | 35-37°C / 18-24h / A | crescita, colonie incolori |
| E.faecalis ATCC 29212 | | | 35-37°C / 18-24h / A | inibito |
| E.coli ATCC 25922 | | | 35-37°C / 18-24h / A | parzialmente inibito, colonie rosa-rosso |

A: incubazione in aerobiosi; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection
La temperatura di incubazione scelta dipende dallo Standard seguito (CLSI⁸ o EuPh⁴)

11 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di piastre pronte a due settori e delle materie prime impiegate per la produzione (terreni in polvere XLD Agar REF 402206 e SS Agar REF 402075) vengono testati per la produttività e la selettività, avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato e considerato come Lotto di Riferimento.

XLD AGAR

La produttività è saggiata con metodo quantitativo con 2 ceppi target: S. Enteritidis ATCC 13076, S.Typhimurium ATCC 14028. Le piastre di XLD Agar sono seminate con appropriate diluizioni in soluzione salina delle sospensioni di colonie dei ceppi target. Dopo incubazione a 30-35°C per 18-24 ore in aerobiosi, vengono contate le colonie sviluppate sul lotto in esame e sul lotto di riferimento e calcolato l'indice di produttività. Nel caso tale indice sia superiore a 0,7 e nel caso la morfologia delle colonie sia tipica (colonie rosse con centro nero), i risultati sono giudicati conformi. La produttività del terreno è valutata inoltre con metodo ecometrico semiquantitativo, con incubazione a 30-35°C per 18-24 ore, con il ceppo target *S.flexneri* ATCC 12022. Dopo incubazione le colonie di *Shigella* appaiono rosse con adeguata





carica, comparabile con quella del Lotto di Riferimento. Per valutare la selettività del terreno vengono seminate con metodo Miles Misra modificato diluizioni da 10^{-1} a 10^{-3} di una sospensione con densità pari a McFarland 0,5 di un ceppo non target Gram positivo (*E.faecalis* ATCC 19433) e di 1 ceppo non-target Gram negativo: *E.coli* ATCC 25922. Dopo incubazione a 30-35°C per 18-24 ore in aerobiosi, *E.faecalis* risulta completamente inibito alla diluizione 10^{-1} , la crescita di *E.coli* risulta parzialmente inibita con lo sviluppo di colonie gialle. SS AGAR

La produttività del terreno è valutata con metodo ecometrico semiquantitativo, con incubazione a 35-37°C per 18-24 ore, con 7 ceppi target: *S.Enteritidis* ATCC 13076, *S.Typhimurum* ATCC 14028, *S.Gallinarum* di isolamento clinico, *S.arizonae* di isolamento clinico, *S.flexneri* ATCC 12022, *S.sonnei* ATCC.9290, *S.boydii* ATCC 9207. Le colonie di *Salmonella* appaiono incolori con centro nero, le colonie di *Shigella* si presentano incolori; 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 5 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. 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.

12 - LIMITI DEL METODO

- Su XLD Agar possono crescere anche batteri non enterici come *Pseudomonas*; *Providencia rettgeri* e *Pseudomonas* possono sviluppare colonie rosse; alcuni ceppi di *Proteus* spp. possono sviluppare colonie con centro nero⁶.
- Su XLD Agar *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*.⁶
- L'incubazione protratta oltre le 48 ore può portare a risultati falsamente positivi per i ceppi target.⁶
- Su SS agar le colonie di *Proteus* spp. possono mimare le caratteristiche colturali di *Salmonella*.⁶ La differenziazione tra *Proteus* e *Salmonella* può essere effettuata rapidamente sulla piastra, con il reattivo MUCAP Test.⁷
- Alcuni ceppi di *Shigella* e *Salmonella* fermentanti il lattosio possono crescere con caratteristiche simili ai coliformi e non essere riconosciuti su SS Agar.
- La presenza di cristalli nel contesto del terreno SS Agar, 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.

13 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno in piastra 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.
- Il prodotto qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione europea vigente.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materie prime di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione dei materiali 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 d'uso 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.
- Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il terreno e con gli agenti microbici.
- La singola piastra del prodotto qui descritto è monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerare un "prodotto sterile" non essendo soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto a biocontaminazione controllata, nei limiti di specifiche definite ed indicate sul documento di Controllo Qualità del prodotto.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire le piastre non utilizzate e le piastre seminate con i campioni o con i ceppi di controllo e sterilizzate, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto 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 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.

14 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Dopo il ricevimento, 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. Dopo l'apertura del sacchetto di plastica, le piastre possono essere usate entro 7 giorni, se conservate in ambiente pulito a 2-8°C. Non utilizzare le piastre se il sacchetto di plastica è danneggiato, non utilizzare le piastre rotte. Non utilizzare le piastre oltre la data di scadenza. Non utilizzare le piastre se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione, eccessiva umidità, eccessiva disidratazione, rotture dell'agar, colore alterato).



**15 - BIBLIOGRAFIA**

1. 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
2. Public Health England- UK Standards for microbiology investigations (UK SMI): searchable index. 9 January 2019
3. 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.
4. European Pharmacopoeia, current edition.
5. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 5: Salmonella. Rev 12/2019
6. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
7. 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.
8. CLSI (formerly NCCLS) Quality Control of Commercially Prepared Culture Media. Approved Standard, 3rd edition. M22 A3 vol. 24 n° 19, 2004

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

| | | | | | |
|----------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|---|-----------------------------|------------------|
| REF Numero di catalogo | o 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 | Non riutilizzare | Fragile maneggiare con cura | |

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

| Versione | Descrizione delle modifiche | Data |
|--|---|---------|
| Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 1 | Aggiornamento del contenuto e del layout in accordo a IVDR 2017/746 | 09/2021 |
| Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 2 | Eliminazione classificazioni obsolete | 03/2023 |

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

