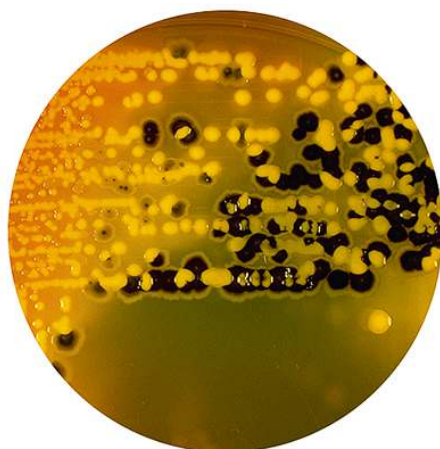


ISTRUZIONI PER L'USO

HEKTOEN ENTERIC AGAR

Terreno di coltura pronto all'uso in flacone

 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 *

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
Acqua purificata	1000 mL

*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

Sciogliere il contenuto del flacone in un'autoclave a 100 ± 2°C o in un bagnomaria termoregolato a 100°C. In alternativa, il flacone può essere posto in un recipiente contenente acqua, che viene posta su una piastra riscaldante e portata ad ebollizione; allentare leggermente il tappo prima del riscaldamento. Raffreddare il terreno a 47-50°C e distribuire in piastre sterili con le precauzioni dell'asepsi.

5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

 Aspetto del terreno
pH finale a 20-25°C

 terreno limpido o leggermente opalescente di colore verde intenso
7,5 ± 0,2

6 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Hektoen Enteric Agar	Terreno pronto all'uso in flacone	5115412	6 x 100 mL; confezionamento primario: flacone di vetro con tappo a vite; confezionamento secondario: scatola di cartone
		5115413	6 x 200 mL; confezionamento primario: flacone di vetro con tappo a vite; confezionamento secondario: scatola di cartone

7 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria o piastra riscaldante, termostato ed altra strumentazione di laboratorio, piastre di Petri sterili, anse, aghi, tamponi sterili da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori.





8 - CAMPIONI

Hektoen Enteric Agar è destinato all'esame batteriologico di campioni clinici come feci e tamponi rettali^{6,9} 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 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 mescolanza 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
<i>S.Typhimurium</i>	ATCC 14028	35-37°C / 18-24h / A	crescita, colonie verde chiaro con centro nero
<i>S.flexneri</i>	ATCC 12022	35-37°C / 18-24h / A	crescita, colonie verde chiaro
<i>E.faecalis</i>	ATCC 29212	35-37°C / 18-24h / A	inibito
<i>E.coli</i>	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 di flaconi e della materia prima impiegata per la produzione (terreno in polvere Hektoen Enteric Agar REF 401541) 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 culturali 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 in flacone 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.
- Fare attenzione quando si aprono i flaconi con tappo a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.
- Quando si utilizza una piastra riscaldante e/o un bagnomaria, far bollire sufficientemente a lungo per sciogliere l'intero terreno.
- Indossare guanti di protezione dal calore durante la procedura di liquefazione del terreno. Non mettere i flaconi caldi a contatto con il ghiaccio o in acqua fredda per accelerare il raffreddamento poiché ciò potrebbe causare rotture del vetro.
- Il tempo necessario per la completa liquefazione del terreno può variare considerevolmente e dipende dalla temperatura effettiva del dispositivo di riscaldamento, dalla sua potenza, dalle dimensioni e dal volume del flacone.
- Il prodotto qui descritto è soggetto a riscaldamento terminale a 100°C.
- Sterilizzare prima i rifiuti a rischio biologico della loro eliminazione. Smaltire le piastre e/o le provette non utilizzate e le piastre e/o le provette seminate con i campioni o con i ceppi di controllo e sterilizzate, 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.
- 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

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. Non utilizzare i flaconi oltre la data di scadenza. Dopo l'apertura della scatola, i flaconi possono essere utilizzati fino alla data di scadenza. Prima dell'uso verificare la chiusura e l'integrità del tappo a vite. I flaconi aperti devono essere utilizzati immediatamente per la preparazione di piastre e/o provette. Non utilizzare i flaconi se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione microbica, torbidità anomala, colore alterato, presenza di precipitato).

L'utilizzatore è responsabile della correttezza della preparazione delle piastre. L'utilizzatore è responsabile della validazione della shelf life delle piastre, in funzione del metodo di stoccaggio applicato (temperatura e confezionamento).



15 - BIBLIOGRAFIA

1. Jan Hudzicki. Hektoen Enteric Agar Protocol. American Society for Microbiology. 11 November 2010.
2. 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.
3. Mayfield CR, M Gober M. Comparative efficiency of plating media for the isolation of *Shigella dysenteriae*. *Am J Public Health* 1941; 31:363-368.
4. 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.
5. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
6. ISO 21567 :2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of *Shigella* spp.
7. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 5: *Salmonella*. Rev 12/2019.
8. 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.
9. 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.
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.
11. CLSI (formerly NCCLS) Quality Control of Commercially Prepared Culture Media. Approved Standard, 3rd edition. M22 A3 vol. 24 n° 19, 2004.
12. King S. Department of Microbiology, Cook County Hospital, Chicago. Personal communication. 1968.





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	 Non riutilizzare	 Fragile maneggiare con cura

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 2	Aggiornamento del layout e del contenuto in accordo a IVDR 2017/746	09/2021
Revisione 3	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

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

