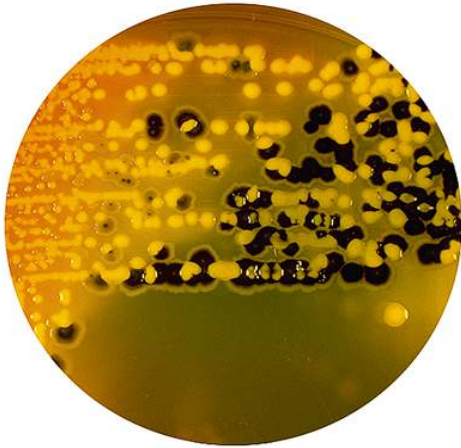




HEKTOEN ENTERIC AGAR

Piastre pronte all'uso



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

1 - DESTINAZIONE D'USO

Dispositivo 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 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO I

Aspetto del terreno in piastra
pH finale a 20-25°C

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

5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

| Prodotto | Tipo | REF | Confezione |
|----------------------|------------------------|--------|---|
| Hektoen Enteric Agar | Piastre pronte all'uso | 541541 | 2 x 10 piastre ø 90 mm 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

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}. 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 clinici.⁸ Consultare le norme e gli Standard applicabili per i dettagli sulla raccolta e la preparazione dei campioni alimentari.^{6,7}

8 - 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 una 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.

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.

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-arancio 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

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 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 verdi 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 registrate di American Type Culture Collection

11 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di piastre pronte all'uso di Hektoen Enteric Agar 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 verdi 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 appropriate diluizioni di una sospensione con densità pari a McFarland 0,5 di un ceppo non target Gram positivo (*E. faecalis* ATCC 29212) e 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, 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 proprio Laboratorio.¹²

L'accuratezza è stata valutata esaminando i dati relativi al controllo qualità. Sono stati valutati i risultati di 30 lotti prodotti dal 1° gennaio 2019 al 21 maggio 2020. Il 100% dei lotti ha dimostrato la conformità ai criteri di accettazione definiti in termini di produttività e proprietà differenziali con i ceppi target e selettività con i ceppi non target.

12 - 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, che si possono formare durante la conservazione a 2°C / 8°C, non inficia la qualità dell'analisi.





- Il dispositivo non è destinato alla diagnosi di infezioni gastrointestinali né alla guida della terapia antimicrobica. Viene utilizzato in una serie di indagini diagnostiche per fornire colonie microbiche isolate da campioni clinici di pazienti con sospetta infezione da *Salmonella-Shigella*. Per l'identificazione completa e la tipizzazione epidemiologica delle colonie sono necessari test appropriati; se necessario, eseguire test di sensibilità antimicrobica utilizzando i metodi raccomandati.

13 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Questo prodotto è un dispositivo diagnostico *in vitro* qualitativo destinato esclusivamente all'uso professionale, non è automatizzato e non è uno strumento diagnostico complementare. Deve essere utilizzato da personale di laboratorio adeguatamente formato e qualificato, nel rispetto delle precauzioni relative al rischio biologico e delle tecniche asettiche.
- 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. Si consiglia quindi 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 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.
- Comunicare al Fabbricante (complaint@biolifeitaliana.it) ed alle Autorità competenti qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione all'uso del diagnostico *in vitro*.
- Il Fabbricante non può essere ritenuto responsabile per eventuali perdite o danni derivanti in qualsiasi modo dall'uso del prodotto in modo non conforme alle istruzioni fornite.

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

- 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.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

| | | | | | | |
|--|---|---|---|--|---|---|
|  Codice referenza a catalogo |  Numero di lotto |  Dispositivo medico diagnostico <i>in vitro</i> |  Fabbricante |  Lato superiore |  Non ri-utilizzare |  Marchio CE |
|  Limiti di temperatura |  Contenuto sufficiente per <n> test |  Consultare le Istruzioni per l'Uso |  Utilizzare entro |  Proteggere dalla luce |  Fragile, maneggiare con cura |  Identificativo unico del dispositivo |

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

| Versione | Descrizione delle modifiche | Data |
|-------------|--|---------|
| Revisione 4 | Aggiornamento del contenuto e del layout in accordo a IVDR 2017/746 | 05/2020 |
| Revisione 5 | Modifica al cap.4 (pH in conformità ad ISO 21567:2004) | 12/2020 |
| Revisione 6 | Rimozione della classificazione obsoleta | 03/2023 |
| Revisione 7 | Caratteristiche delle prestazioni, limiti del metodo, precauzioni ed avvertenze, conservazione e validità, tabella simboli applicabili | 11/2025 |

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

