



BD DCLS Agar, Modified / Hektoen Enteric Agar (Biplate)

USO PREVISTO

BD DCLS Agar, Modified / Hektoen Enteric Agar (Biplate) (agar DCLS modificato / agar enterico Hektoen, su piastra doppia) è utilizzato per l'isolamento di *Salmonella* e *Shigella* da campioni di feci umane.

PRINCIPI E SPIEGAZIONE DELLA PROCEDURA

Metodo microbiologico.

Agar DCLS modificato è una versione modificata dei terreni con agar al citrato desossicolato descritti da Leifson,¹ in grado di inibire gli organismi coliformi che fermentano lattosio o saccarosio e sopprimere i batteri Gram-positivi. Studiando i patogeni enterici su terreno Endo, Holt-Harris e Tague hanno usato lattosio e saccarosio per preparare un agar nutriente con blu di metilene ed eosina. Alcuni coliformi fermentano il saccarosio più rapidamente del lattosio.² Aggiungendo saccarosio, gli organismi non patogeni fermentanti il saccarosio producono colonie di colore rosato rosso (rosa) facilmente riconoscibili, riducendo il numero di reazioni false positive.

La formula originaria dell'agar DCLS ha subito numerose modifiche.^{3,4} Il terreno contiene più lattosio e saccarosio e meno citrato e quindi è in grado di alimentare meglio la crescita di *Shigella* rispetto al tradizionale agar DCLS, oltre a consentire l'identificazione di *Yersinia enterocolitica*.

Nell'agar DCLS modificato, l'estratto di carne e il peptone forniscono l'azoto, mentre le vitamine provengono dall'estratto di lievito. Lattosio e saccarosio sono carboidrati fermentabili che vengono usati da numerosi bacilli Gram-negativi non patogeni, come *Escherichia coli*, ma non da *Salmonella* e *Shigella*. Citrato di sodio, tiosolfato di sodio e desossicolato di sodio sono agenti selettivi. L'indicatore di pH è il rosso neutro.

L'agar enterico Hektoen (HEA) è stato elaborato nel 1967 da King e Metzger del Hektoen Institute per migliorare l'isolamento di *Shigella* e *Salmonella* rispetto agli altri terreni largamente usati a quel tempo.⁵ Il terreno è considerato moderatamente selettivo ed è particolarmente utile per l'isolamento di *Shigella* spp. La formula attuale differisce da quella originaria in quanto è stato eliminato il sodio desossicolato, è stata ridotta la concentrazione di sali biliari ed è stata aumentata la concentrazione di peptone per compensare l'effetto inibente dei sali biliari.³ I sali biliari rendono il terreno selettivo, inibendo gli organismi Gram-positivi e riducendo la crescita di alcuni batteri Gram-negativi diversi da *Salmonella* e *Shigella*. Lattosio, saccarosio e salicina sono aggiunti per migliorare la differenziazione in base al colore delle colonie e del terreno circostante. *Salmonella* e *Shigella* non fermentano questi composti del carbonio e quindi non fanno virare di colore il sistema di indicatori del pH, mentre gli organismi che fermentano uno o più di questi composti in acidi, ad es. *E. coli*, causano il viraggio al giallo, arancione o rosa salmone. Il citrato di ammonio ferrico e il tiosolfato di sodio contenuti nel terreno permettono di rilevare il solfuro di idrogeno prodotto dalla *Salmonella*. Il sistema di indicatori del pH è costituito da fucsina acida e blu bromotimolo. Questo preparato è uno dei numerosi terreni su piastra consigliati per la coltura di *Enterobacteriaceae* da campioni di feci.⁶⁻⁸

BD DCLS Agar, Modified / Hektoen Enteric Agar (Biplate) è una combinazione di due terreni differenziali selettivi per l'isolamento di *Salmonella* e *Shigella* da feci umane.

REAGENTI

BD DCLS Agar, Modified / Hektoen Enteric Agar (Biplate)

Formule* per litro di acqua purificata

Agar DCLS, modificato		Agar enterico Hektoen	
Peptone di carne (pancreatico)	5,0 g	Digerito peptico di tessuto animale	12,0 g
Estratto di lievito	2,5	Estratto di lievito	3,0
Estratto di carne	2,5	Sali biliari	9,0
Lattosio	10,0	Lattosio	12,0
Saccarosio	10,0	Saccarosio	12,0
Citrato ferrico di ammonio	1,0	Salicina	2,0
Desossicolato di sodio	2,5	Cloruro di sodio	5,0
Tiosolfato di sodio	5,0	Tiosolfato di sodio	5,0
Citrato di sodio	1,0	Citrato ferrico di ammonio	1,5
Rosso neutro	0,02	Blu bromotimolo	0,064
Agar	10,0	Fucsina acida	0,1
pH 7,5 ± 0,2		Agar	13,5
		pH 7,6 ± 0,2	

*Compensata e/o corretta per soddisfare i criteri di rendimento.

PRECAUZIONI

IVD

. Solo per uso professionale.

Non usare le piastre se presentano tracce di contaminazione microbica, alterazioni cromatiche, essiccamento, fessurazioni o altri segni di deterioramento.

Per maneggiare i prodotti in condizioni asettiche, riconoscere i rischi biologici e smaltire i prodotti usati, consultare le **ISTRUZIONI GENERALI PER L'USO**.

CONSERVAZIONE E VITA UTILE

Alla consegna, conservare le piastre al buio a 2 – 8 °C nella confezione originaria fino a immediatamente prima dell'uso. Evitare congelamento e surriscaldamento. Le piastre possono essere inoculate sino alla data di scadenza (v. l'etichetta sulla confezione) e incubate per i tempi di incubazione raccomandati.

Le piastre prelevate dalle confezioni da 10 già aperte possono essere usate per una settimana se conservate in luogo pulito a 2 – 8 °C.

CONTROLLO DI QUALITÀ A CURA DELL'UTENTE

Inoculare i campioni rappresentativi con i seguenti ceppi (per informazioni più dettagliate, v.

ISTRUZIONI GENERALI PER L'USO). Incubare le piastre a 35 ± 2 °C in atmosfera aerobica. In alcuni casi, *Shigella* spp. possono richiedere 42 – 48 h di incubazione.

Esaminare le piastre dopo 18 – 24 h e 42 – 48 h per verificare entità di crescita, dimensioni delle colonie, pigmentazione e selettività.

Ceppi	Agar DCLS, modificato	Agar enterico Hektoen
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Crescita da assente a discreta, colonie rosse rosate (rosa), eventualmente circondate da precipitati	Inibizione da parziale a completa, colonie gialle arancioni, eventualmente circondate da precipitati, con alone da rosa salmone ad arancione
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Inibizione completa	Inibizione da parziale a completa, minuscole colonie gialle, con alone da rosa salmone ad arancione
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	Colonie rosse arancioni, crescita da discreta a buona	Da verdazzurre a blu con centro nero
<i>Salmonella</i> Abony DSM 4224	Colonie da rosse arancioni a gialle, crescita da buona a eccellente	Crescita da buona a eccellente, colonie da verdi a verdazzurre con centro nero
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Colonie da rosse arancioni a gialle, crescita da buona a eccellente	Crescita da buona a eccellente, colonie da verdi a verdazzurre con centro nero
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	Colonie da rosse arancioni a gialle, crescita da discreta a eccellente	Crescita da discreta a eccellente, colonie color verde chiaro
Non inoculate	Rosse arancioni, lievemente opalescenti	Verdi, quasi trasparenti

PROCEDURA

Materiali forniti

BD DCLS Agar, Modified / Hektoen Enteric Agar (piastre doppie **Stacker** da 90 mm). Microbiologicamente controllate.

Materiali non forniti

Terreni di coltura accessori, reagenti e apparecchiature di laboratorio necessarie.

Tipi di campioni

Il terreno viene usato per campioni di feci di pazienti presumibilmente affetti da infezione enterobatterica e per materiali simili, ad es. tamponi rettali (v. anche **PRESTAZIONI**

METODOLOGICHE E LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA).^{7,8}

Procedura del test

Strisciare il campione su entrambi i terreni della piastra doppia non appena viene consegnato in laboratorio. La piastra strisciata è usata principalmente per isolare colture pure da campioni contenenti flora mista. In alternativa, se il materiale viene posto in coltura direttamente da un tampone, passare il tampone su una piccola area dei bordi e strisciare dalla zona inoculata per isolare le colonie.

Inoculare anche un terreno meno selettivo, ad es. **BD MacConkey II Agar**, e un liquido di arricchimento selettivo come il brodo Selenite-F per aumentare le possibilità di isolamento quando la popolazione di organismi Gram-negativi è ridotta e per raccogliere delle indicazioni sugli altri organismi presenti nel campione. Per una disamina esaustiva sull'isolamento e l'identificazione dei patogeni enterici dai campioni clinici, consultare le procedure descritte nelle relative voci della bibliografia.⁶⁻⁸

BD DCLS Agar, Modified / Hektoen Enteric Agar (Biplate) può essere usato come terreno per trasferire le subcolture dal brodo Selenite-F.

Incubare le piastre, al riparo dalla luce, a 35 ± 2 °C per 18 – 24 h. Se il risultato è negativo, incubare nuovamente per 18 – 24 h.

Risultati

La crescita su **BD DCLS Agar, Modified / Hektoen Enteric Agar (Biplate)** assume il seguente aspetto:

Organismi	Agar DCLS, modificato	Agar enterico Hektoen
<i>E. coli</i>	Grandi, piatte, da rosa a rosse, con una zona di precipitati di bile	Grandi, da gialle a rosa salmone, alcuni ceppi possono essere inibiti
<i>Enterobacter/Klebsiella</i>	Grandi, mucoidi, rosa	Grandi, da gialle a rosa salmone
<i>Proteus</i>	Da incolore a rosse	Variabili, da verdazzurre a blu o rosa salmone, la maggior parte dei ceppi con centro nero
<i>Salmonella</i>	Da incolore a rosa pallido	Da verdazzurre a blu, la maggior parte dei ceppi con centro nero
<i>Shigella</i>	Da incolore a rosa pallido	Verdi e umide, sollevate
<i>Pseudomonas</i>	Da incolore a marroni o verdi	Irregolari, da verdi a marroni
Gram-positivi	Nessuna crescita	Crescita da assente a lieve

PRESTAZIONI METODOLOGICHE E LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

DCLS Agar, Modified / Hektoen Enteric Agar (Biplate) è utilizzato per l'isolamento di *Salmonella* e *Shigella* da campioni di feci umane e tamponi rettali.^{3,6-9}

Se i patogeni nel campione sono presenti in numero ridotto, possono sfuggire all'osservazione nei terreni altamente selettivi. È opportuno aggiungere un terreno con un livello inferiore di selettività, come **BD MacConkey II Agar**, e/o un liquido per l'arricchimento selettivo.⁶⁻⁸

Su questi terreni, le colonie di *Proteus mirabilis* possono apparire simili alla *Salmonella*.

Alcuni ceppi di *Shigella* possono richiedere un'incubazione di 42 – 48 h.

Benché alcuni test diagnostici possano essere eseguiti direttamente sui terreni, per completare l'identificazione sono necessari test biochimici e, all'occorrenza, immunologici usando colture pure.

Se si sospetta la presenza di *Salmonella* o *Shigella*, eseguire i test sierologici per confermare e identificare le colonie.⁶

Il fabbisogno nutritivo degli organismi varia, per cui alcuni ceppi potrebbero svilupparsi con difficoltà o non crescere affatto su questi terreni.

BIBLIOGRAFIA

1. Leifson, E. 1935. New culture media based on sodium desoxycholate for the isolation of intestinal pathogens and for the enumeration of colon bacilli in milk and water. *J. Pathol. Bacteriol.* 40:581-599.
2. Holt-Harris, J. E., and O. Teague. 1916. A new culture medium for the isolation of *Bacillus typhosus* from stools. *J. Infect. Dis.* 18:596-601.
3. MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation- identification-maintenance of medical bacteria. vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore.
4. Hajna, A. A., and S. R. Damon. 1956. New enrichment and plating medium for the isolation of *Salmonella* and *Shigella* organisms. *Appl. Microbiol.* 4: 341.
5. King, S., and W.I. Metzger. 1968. A new plating medium for the isolation of enteric pathogens. I. Hektoen enteric agar. *Appl. Microbiol.* 16:577-578.
6. Bopp, C.A., Brenner, F.W., Fields, P.I., Wells, J.G., and N.A. Strockbine. 2003. *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
7. Isenberg, H. D. (ed.). 1992. *Clinical microbiology procedures handbook*, vol.1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
8. Thomson, R.B., and J.M. Miller. 2003. Specimen collection, transport, and processing: bacteriology. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
9. Kist, M., et al. 2000. Infektionen des Darmes. In: Mauch, H., Lüttiken, R., and S. Gatermann (eds.): *MiQ - Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik*, vol. 9. Urban & Fischer, Munich, Germany.

CONFEZIONE/DISPONIBILITÀ

BD DCLS Agar, Modified / Hektoen Enteric Agar (Biplate)

N. di cat. 254553

Terreni su piastra pronti all'uso, confezioni da 20

ULTERIORI INFORMAZIONI

Per ulteriori informazioni, rivolgersi al rappresentante BD di zona.



BD Diagnostic Systems

Tullastrasse 8 – 12

D-69126 Heidelberg/Germany

Phone: +49-62 21-30 50 Fax: +49-62 21-30 52 16

Reception_Germany@europe.bd.com

BD Diagnostic Systems Europe

Becton Dickinson France SA

11 rue Aristide Bergès

38800 Le Pont de Claix/France

Tel: +33-476 68 3636 Fax: +33-476 68 3292 <http://www.bd.com>

BD, BD logo and Stacker are trademarks of Becton, Dickinson and Company.

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.

© 2003 Becton, Dickinson and Company.