



Hektoen Enteric Agar

Selective and differential medium for detection of pathogenic intestinal bacteria from clinical and nonclinical specimens.

INTENDED PURPOSE

Selective medium for the isolation and presumptive identification of *Salmonella* and *Shigella* spp. from clinical and nonclinical specimens. This medium is intended as an aid in the diagnosis, requiring further identification tests to complete the diagnostic results.

DESCRIPTION

Hektoen Enteric (HE) Agar is a moderately selective medium used for the isolation and cultivation of Gram-negative enteric microorganisms, especially *Salmonella* and *Shigella*, from faeces, rectal swabs, food, animal feed and environmental materials.

This medium complies to ISO 21567 and FDA-BAM for detection of *Shigella* and *Salmonella*, respectively.

TYPICAL FORMULA*

	(g/litre)
Enzymatic Digest of Meat	12.0
Yeast Extract	3.0
Lactose	12.0
Saccharose	12.0
Salicin	2.0
Bile Salts No. 3	9.0
Sodium Chloride	5.0
Sodium Thiosulfate	5.0
Ammonium Ferric Citrate	1.5
Acid Fuchsin	0.1
Bromthymol Blue	0.065
Agar	15.0
Final pH 7.5 ± 0.2 at 25°C	

*Adjusted and/or supplemented as required to meet performance specifications.

METHOD PRINCIPLE

Enzymatic digest of meat provides amino acids, nitrogen, carbon, vitamins and minerals for organisms growth. Yeast extract is a source of vitamins, particularly of B-group. Lactose, saccharose and salicin are fermentable carbohydrates. Bile salts and acid fuchsin inhibit Gram-positive organisms. Sodium chloride maintains the osmotic balance of the medium. Ammonium ferric citrate and sodium thiosulfate enable the detection of hydrogen sulfide production. Bromothymol blue together with acid fuchsin act are the pH indicator system. Agar is the solidifying agent.

PREPARATION

Dehydrated medium

Suspend 76 g of the powder in 1 liter of distilled or deionized water. Mix well. Heat to boil shaking frequently until completely dissolved. DO NOT AUTOCLAVE.

Medium in bottles

Melt the content of the bottle in a water bath at 100°C (loosing the cap partially removed) until completely dissolved. Then screw the cap and check the homogeneity of the dissolved medium, if it is the case turning the bottle upside down. Cool at 45-50°C, mix well avoiding foam formation and aseptically distribute into Petri dishes.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Standard microbiological supplies and equipment such as: Autoclave, water bath, sterile Petri plates, test tubes, inoculating loops, swabs, incubator, quality control organisms.

SPECIMENS

Faecal specimens should be sampled at the acute stage, before antimicrobial therapy (where possible) and examined as soon as possible after collection. Ensure that specimen is placed in appropriate package (clean,

leak-proof container) and, in case the laboratory processing is delayed (>1 h), use a suitable transport medium, such as Cary-Blair for transportation/storage. Refer to specific guidelines for more information about specimen collection and preparation.

TEST PROCEDURE

Inoculate the plates by directly streaking the specimen on the agar surface or spread the sample from an enrichment culture to obtain well-isolated colonies.

Incubate aerobically at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for 18-24 h.

For more details, consult appropriate guidances.

INTERPRETING RESULTS

Shigella and *Providencia* spp, form green, moist colonies.

Salmonella and *Proteus* spp, grow as blue-green colonies, with or without black center due to H_2S production.

Coliforms, which are mostly rapid lactose-saccharose-salicin fermenters, develop red-salmon colonies surrounded by a zone of bile precipitate.

Enterococci, Staphylococci and other Gram-positive bacteria are partially or completely inhibited.

Note: further testing should be conducted to confirm the presumptive identification of organisms isolated on this medium.

STORAGE

The powder is very hygroscopic, store the powder at $10-30^\circ\text{C}$, in a dry environment, in its original container tightly closed. Store bottles and prepared plates at $10-25^\circ\text{C}$ away from light. Do not use the product beyond its expiry date on the label or if product shows any evidence of contamination or any sign of deterioration.

SHELF LIFE

Dehydrated medium: 4 years.

Medium in bottles: 2 years.

Ready-to-use plates: 6 months.

QUALITY CONTROL

Appearance of Dehydrated Medium: Free-flowing, homogeneous, light beige.

Appearance of Prepared Medium: Slightly opalescent, greenish to brownish.

Expected Cultural Response:

Control strain	Inoculum	Incubation	Criteria	Specification
<i>Salmonella</i> Typhimurium	WDCM 00031 (ATCC® 14028; NCTC 12023)	50-100 CFU	Good growth ($P_R \geq 0.5$)	Blue-green colonies with black centre
<i>Shigella flexneri</i>	WDCM 00126 (ATCC® 12022; NCTC 12698)			Green colonies
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC® 12453	10^3-10^4 CFU	Weak to good growth	Blue-green colonies with black centre
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WDCM 00097 (ATCC® 13883; NCTC 9633)			Red-salmon colonies with zone of bile precipitate
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00012 (ATCC® 8739; NCTC 12923)			Red-salmon colonies with or without zone of bile precipitate
<i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00087 (ATCC® 29212; NCTC 12697)	10^4-10^6 CFU	None or poor growth	—

A productivity ratio (P_R) of 0.5 is equivalent to a recovery rate of 50%.

Please refer to the actual batch related Certificate of Analysis (CoA).

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Performance testing of HE agar was carried out using the QC strains listed above. The results obtained met the established criteria.

LIMITATIONS

Invalid results can be caused by poor specimen quality, improper sample collection, improper transportation, improper laboratory processing, or a limitation of the testing technology. The operator should understand the principles of the procedures, including its performance limitations, in advance of operation to avoid potential mistakes.

Due to nutritional variation, some strains may result in poor growth or fail to grow on this medium. Additional agar media, such as MacConkey agar, should be used alongside the HE agar for primary isolation.

Colonies of *Proteus* may resemble *Salmonella* or *Shigella*. Rare strains of *Salmonella* and *Shigella* are capable of lactose fermentation, producing red-salmon colonies which may resemble coliforms.

HE agar is intended as an aid in the diagnosis of infectious diseases, requiring further tests to complete the diagnostic results. All identification tests should ideally be performed from non-selective agar.

WARNING AND PRECAUTIONS

- 1) **For *in vitro* diagnostic use (IVD).**
- 2) **For laboratory professional use only.**
- 3) Operators must be trained and have certain experience. Please read the instructions carefully before using the product. Reliability of assay results cannot be guaranteed if there are any deviations from the instructions in this document.
- 4) Consult the Safety Data Sheet (SDS) for information regarding hazards and safe handling practices.
- 5) Do not use if the product or packaging appears to be damaged.
- 6) Follow standard precautions. All patient specimens should be considered potentially infectious and handled accordingly.
- 7) Handle all specimens as if infectious using safe laboratory procedures. Dispose of hazardous or biologically contaminated materials according to the practices of your institution.
- 8) Avoid cross-contamination of samples by using disposable tips and changing them after each sample.
- 9) Do not mix reagents of different batches. Please use the product within the validity period.
- 10) Do not eat, drink, smoke, apply cosmetics or handle contact lenses in areas where reagents and human specimens are handled
- 11) Results should be interpreted by a trained professional in conjunction with the patient's history and clinical signs and symptoms, and epidemiological risk factors.
- 12) Ensure laboratory equipment is calibrated and maintained in accordance with the laboratory's procedure.
- 13) When test results are transmitted from the laboratory to an informatics centre, attention has to be done to avoid erroneous data transfer.

DISPOSAL OF WASTE

Disposal of waste must be carried out according to national and local regulations in force.

BIBLIOGRAPHY

See the references at the end of this document.

TABLE OF SYMBOLS

See the table of symbols at the end of this document.

The product is available in the various configurations listed below. There may be additional product ref. numbers as well. For an updated listing of available products, visit liofilchem.com

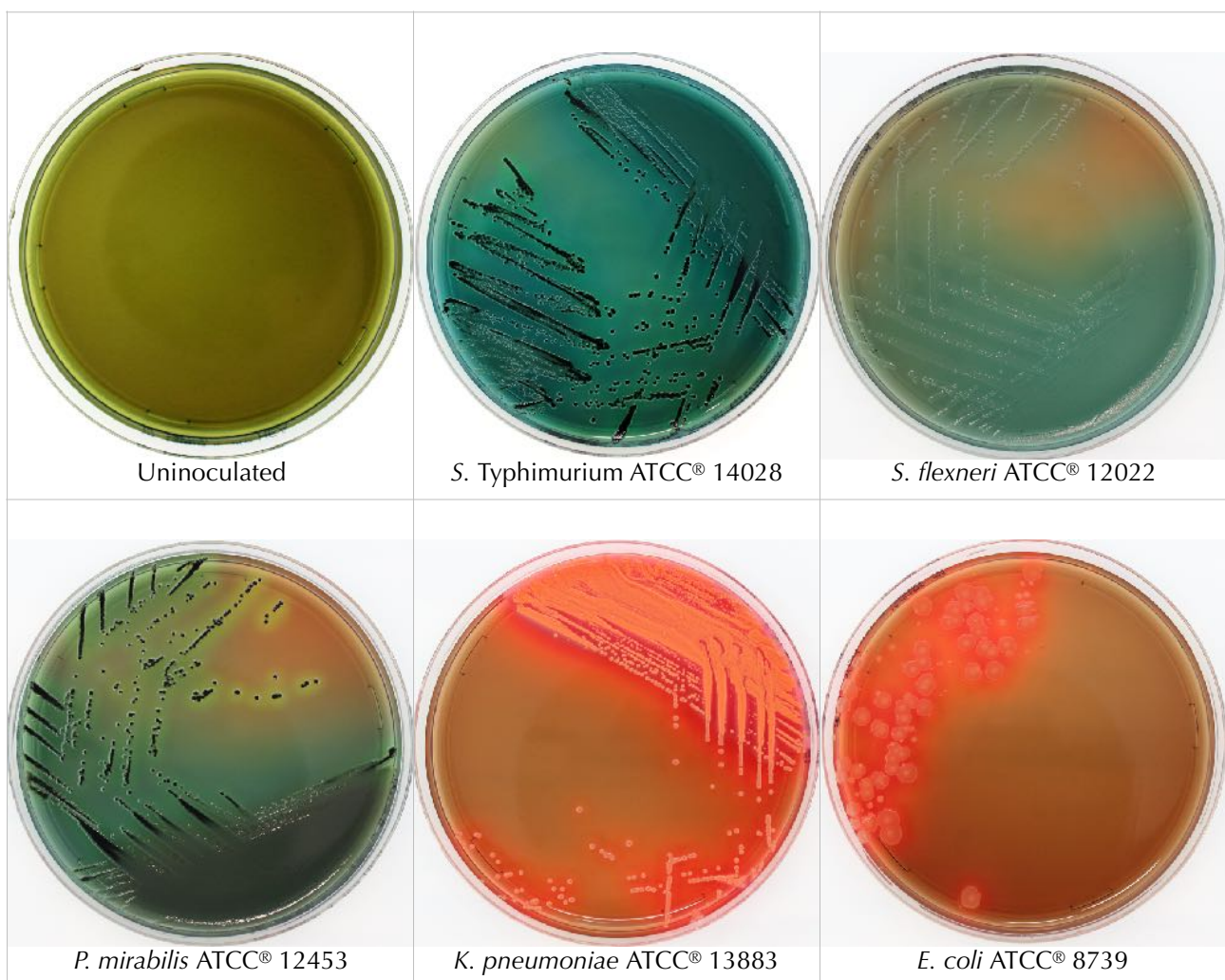
Product	Format	Packaging	Ref.
Hektoen Enteric Agar	Plate 90 mm	20 plates	10043
		100 plates	10043*
	Bottle	6 x 100 ml	402230
		6 x 200 ml	412230
	Dehydrated media	100 g	620021
		500 g	610021
		5 kg	6100215

Significant changes from previous version (rev.0, 2015-08-04):

Document	Release Date	Change Summary
10043_IFU-1	2022-05-16	Updated: Layout and content in compliance with IVDR 2017/746 Added: Example photographs

This IFU document and the SDS are available from the online Support Center:

liofilchem.com/ifu-sds





Hektoen Enteric Agar

Terreno selettivo e differenziale per la ricerca di batteri intestinali patogeni da campioni clinici e non clinici.

USO PREVISTO

Terreno selettivo per l'isolamento e l'identificazione presuntiva di *Salmonella* and *Shigella* spp. da campioni clinici e non clinici. Questo terreno è inteso come ausilio alla diagnosi e si necessita di ulteriori test di identificazione per completare i risultati diagnostici.

DESCRIZIONE

Hektoen Enteric (HE) Agar è un terreno moderatamente selettivo utilizzato per l'isolamento e la coltivazione di microorganismi enterici Gram-negativi, soprattutto *Salmonella* e *Shigella*, da feci, tamponi rettali, alimenti, mangimi e campioni ambientali.

Questo terreno è conforme alla ISO 21567 e FDA-BAM per la ricerca di *Shigella* e *Salmonella*, rispettivamente.

FORMULA TIPICA*

	(g/litro)
Digerito Enzimatico di Carne	12.0
Estratto di Lievito	3.0
Lattosio	12.0
Saccarosio	12.0
Salicina	2.0
Sali di Bile N. 3	9.0
Sodio Cloruro	5.0
Sodio Tiosolfato	5.0
Ammonio Citrato Ferrico	1.5
Fucsina Acida	0.1
Blu di Bromotimolo	0.065
Agar	15.0

pH Finale 7.5 ± 0.2 a 25°C

*Adattata e/o integrata per soddisfare le specifiche di performance richieste.

PRINCIPIO DEL METODO

Il digerito enzimatico di carne fornisce aminoacidi, azoto, carbonio, vitamine e minerali per la crescita dei microrganismi. L'estratto di lievito è una fonte di vitamine, soprattutto del gruppo B. Lattosio, saccarosio e salicina sono i carboidrati fermentabili. Sali di bile e fucsina acida inibiscono i batteri Gram positivi. Il sodio cloruro mantiene il bilancio osmotico del terreno. Ammonio citrato ferrico e sodio tiosolfato permettono la determinazione della produzione di solfuro di idrogeno. Il blu di bromotimolo insieme con la fucsina acida costituiscono il sistema indicatore di pH. L'agar è l'agente solidificante.

PREPARATION

Terreno disidratato

Sospendere 76 g di polvere in 1 litro di acqua distillata o deionizzata sterile. Mescolare bene. Riscaldare agitando di frequente e bollire per ottenere la completa dissoluzione. NON AUTOCLAVARE.

Terreno in flaconi

Sciogliere il contenuto di un flacone in bagnomaria a 100°C (con il tappo leggermente svitato) fino a completa dissoluzione del terreno. Verificare, una volta fuso, la buona omogeneità del terreno capovolgendo il flacone dopo averne avvitato il tappo. Raffreddare a 45-50°C, mescolare bene senza formazione di bolle. Versare in piastre Petri in condizioni di asepsi.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

Forniture e apparecchiature microbiologiche standard come: autoclave, bagnomaria, piastre Petri sterili, provette, anse da inoculo, tamponi, incubatore, microrganismi per il controllo qualità.

CAMPIONI CLINICI

I campioni fecali devono essere campionati nella fase acuta, prima della terapia antibiotica (ove possibile) ed esaminati il prima possibile dopo il prelievo. Assicurarsi che il campione sia collocato in una confezione adeguata (contenitore pulito e a tenuta stagna) e, nel caso il processamento in laboratorio sia ritardato (>1 ora), utilizzare un terreno di trasporto adatto, come Cary-Blair per il trasporto/stoccaggio. Fare riferimento alle linee guida specifiche per maggiori informazioni sulla raccolta e la preparazione dei campioni.

PROCEDURA DEL TEST

Inoculare le piastre strisciando direttamente il campione sulla superficie dell'agar o eseguire la semina da una coltura di arricchimento cercando di ottenere colonie ben isolate.

Incubare in aerobiosi a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ per 18-24 h.

Per maggiori dettagli, consultare le guide appropriate.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Shigella e *Providencia* spp, formano colonie umide verdi.

Salmonella e *Proteus* spp, crescono come colonie blu-verdi, con o senza un centro nero dovuto alla produzione di H_2S .

I coliformi, che per la maggior parte fermentano rapidamente lattosio, saccarosio e salicina, sviluppano colonie salmone-rosse circondate da un alone di precipitati di bile.

Enterococchi, Stafilococchi ed altri batteri Gram-positivi sono parzialmente o completamente inibiti.

Nota: Sono necessari ulteriori test per confermare l'identificazione presunta dei microrganismi isolati su questo terreno.

CONSERVAZIONE

La polvere è fortemente igroscopica, conservare la polvere a $10-30^\circ\text{C}$, in un ambiente asciutto, nel suo contenitore originale ben chiuso. Conservare i flaconi e le piastre preparate a $10-25^\circ\text{C}$ al riparo dalla luce. Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza indicata in etichetta o se il prodotto presenta segni di contaminazione o di deterioramento.

VALIDITÀ

Terreno disidratato: 4 anni.

Terreno in flaconi: 2 anni.

Piastre pronte all'uso: 6 mesi.

CONTROLLO QUALITÀ

Aspetto del Terreno Disidratato: Ganulometria fine, omogeneo, beige chiaro.

Aspetto del Terreno Preparato: Leggermente opalescente, verdastro tendente al marrone.

Risultati Attesi dei Test Colturali:

Ceppi di controllo		Inoculo	Incubazione	Criteri	Specifiche
<i>Salmonella</i> Typhimurium	WDCM 00031 (ATCC® 14028; NCTC 12023)	50-100 UFC	18-24 h / 35 ± 2°C	Crescita buona (P _R ≥ 0.5)	Colonie blu-verdi con centro nero
<i>Shigella flexneri</i>	WDCM 00126 (ATCC® 12022; NCTC 12698)				Colonie verdi
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC® 12453	10 ³ -10 ⁴ UFC		Crescita debole o buona	Colonie blu-verdi con centro nero
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WDCM 00097 (ATCC® 13883; NCTC 9633)				Colonie salmone-rosse con aloni di precipitati di bile
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00012 (ATCC® 8739; NCTC 12923)				Colonie salmone-rosse con o senza aloni di precipitati di bile
<i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00087 (ATCC® 29212; NCTC 12697)	10 ⁴ -10 ⁶ UFC		Crescita assente o scarsa	—

Un rapporto di produttività (P_R) di 0.5 è equivalente ad un tasso di recupero del 50%.

Fare riferimento al certificato di analisi (CoA) relativo al lotto effettivo.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

I test di performance per HE agar sono stati effettuati utilizzando i ceppi CQ sopra elencati. I risultati ottenuti hanno soddisfatto i criteri stabiliti.

LIMITAZIONI

Risultati non validi possono essere causati da una scarsa qualità del campione, da una raccolta impropria del campione, da un trasporto improprio, da un processamento improprio in laboratorio o da una limitazione della tecnologia di analisi. L'operatore deve comprendere i principi delle procedure, compresi i limiti nelle prestazioni, prima delle singole operazioni per evitare potenziali errori.

A causa della diverse esigenze nutrizionali, alcuni ceppi possono risultare in una crescita scarsa o non crescere affatto su questo terreno. Altri terreni solidi, come il MacConkey agar, devono essere utilizzati insieme all'HE agar per l'isolamento primario.

Le colonie di *Proteus* possono assomigliare a *Salmonella* o *Shigella*. Alcuni ceppi di *Salmonella* e *Shigella* sono in grado di fermentare il lattosio producendo colonie rosso-salmone che possono assomigliare a coliformi.

L'HE agar è inteso come ausilio nella diagnosi di malattie infettive, richiedendo ulteriori test per completare i risultati diagnostici. Tutti i test di identificazione dovrebbero idealmente essere eseguiti da un agar non selettivo.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- 1) **Per uso diagnostico in vitro (IVD).**
- 2) **Solo per uso professionale di laboratorio.**
- 3) Gli operatori devono essere formati e avere una certa esperienza. Si prega di leggere attentamente le istruzioni prima di utilizzare il prodotto. L'affidabilità dei risultati del test non può essere garantita in caso di deviazioni dalle istruzioni contenute in questo documento.
- 4) Consultare la scheda di sicurezza (SDS) per informazioni sui pericoli e sulle pratiche di manipolazione sicure.
- 5) Non utilizzare se il prodotto o la confezione sembrano danneggiati.
- 6) Seguire le precauzioni standard. Tutti i campioni dei pazienti devono essere considerati potenzialmente infetti e maneggiati di conseguenza.
- 7) Maneggiare tutti i campioni come infetti utilizzando procedure di laboratorio sicure. Smaltire materiali pericolosi o biologicamente contaminati secondo le pratiche del proprio istituto.
- 8) Evitare la contaminazione incrociata dei campioni utilizzando puntali monouso e sostituendole dopo ogni campione.
- 9) Non mescolare reagenti di lotti diversi. Si prega di utilizzare il prodotto entro il periodo di validità.
- 10) Non mangiare, bere, fumare, applicare cosmetici o maneggiare lenti a contatto nelle aree in cui vengono manipolati reagenti e campioni umani.
- 11) I risultati devono essere interpretati da un professionista qualificato insieme alla storia del paziente, ai segni e sintomi clinici e ai fattori di rischio epidemiologici.
- 12) Assicurarsi che le apparecchiature di laboratorio siano calibrate e mantenute in conformità con la procedura del laboratorio.
- 13) Quando i risultati dei test vengono trasmessi dal laboratorio a un centro informatico, è necessario prestare attenzione per evitare trasferimenti di dati errati.

SMALTIMENTO DEI RIFIUTI

Lo smaltimento dei rifiuti deve essere effettuato in conformità alle normative nazionali e locali in vigore.

BIBLIOGRAFIA

Vedere i riferimenti alla fine di questo documento.

TABELLA DEI SIMBOLI

Vedere la tabella dei simboli alla fine di questo documento.

Il prodotto è disponibile in diverse configurazioni. Vedere l'elenco nella lingua inglese.

Questo documento IFU e la SDS sono disponibili dal Support Center online:

[liofilchem.com/ifu-sds](https://www.liofilchem.com/ifu-sds)

References / Riferimenti

1. US Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 5: Salmonella. Rev 2022-03-18.
2. Public Health England (2022) UK SMI ID 20 issue 4: identification of *Shigella* species. <https://www.gov.uk/government/publications/smi-id-20-identification-of-shigella-species/uk-smi-id-20-issue-4-april-2022-identification-of-shigella-species>.
3. Public Health England (2021) UK SMI ID 24 issue 4: identification of *Salmonella* species. https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/969498/ID_24i4.pdf
4. EN ISO 11133:2014+Amd1:2018+Amd2:2020. Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media.
5. Public Health England (2017) Inoculation of culture media for bacteriology. UK Standards for Microbiology Investigations. Q 5 Issue 2. <https://www.gov.uk/guidance/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>
6. BAM Media M61: Hektoen Enteric (HE) Agar. 2017-10-17.
7. ASM (2016) Hektoen Enteric Agar Protocol. American Society for Microbiology.
8. APHA (2015): Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 5th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
9. ISO 21567:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection of *Shigella* spp.
10. Perez J.M., P. Cavalli, C. Roure, R. Renac, Y. Gille, and A. M. Freydiere (2003) Comparison of Four Chromogenic Media and Hektoen Agar for Detection and Presumptive Identification of *Salmonella* Strains in Human Stools. J Clin Microbiol; 41(3):1130–1134.
11. Bisciello N.B. jr. and Schrader J.(1974) Evaluation of Hektoen Enteric Agar for the detection of *Salmonella* in foods and feeds. - Journ of AOAC; 57: 992-996.

Table of Symbols / Tabella dei Simboli

	Batch code / Codice del lotto
	Catalogue number / Numero di catalogo
	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device / Dispositivo Medico Diagnostico <i>in vitro</i>
	Manufacturer / Fabbricante
	Use by / Utilizzare entro
	Fragile, handle with care / Fragile, maneggiare con cura
	Temperature limitation / Limiti di temperatura
	Contains sufficient for <n> tests / Contenuto sufficiente per <n> saggi
	Consult instructions for use // Consultare le istruzioni per l'uso
	Do not reuse / Non riutilizzare
	Keep away from sunlight / Tenere al riparo dalla luce solare



Liofilchem® s.r.l.

Via Scozia, 64026 Roseto degli Abruzzi (TE) Italy
Tel. +39 0858930745 Fax +39 0858930330

www.liofilchem.com

liofilchem@liofilchem.com

