

MASSNAHMEN ZUR QUALITÄTSKONTROLLE

I EINFÜHRUNG

Kligler-Eisen-Agar unterstützt die Differenzierung von gramnegativen Enterobazillen auf der Grundlage von deren Fähigkeiten zur Fermentierung von Dextrose und Lactose sowie zur Bildung von Sulfiden.

II LEISTUNGSPRÜFUNG

1. Repräsentative Proben mit den nachstehend aufgeführten Kulturen inokulieren.
 - a. Unter Verwendung von 18 bis 24 h alten Kulturen auf **Trypticase-Soja-Schrägagar** die Röhrrchen mit einer Inokulationsnadel inokulieren; die Nadel bis zum Röhrrchenboden eintauchen und auf der Schrägseite wiederholt ausstreichen.
 - b. Die Röhrrchen mit gelösten Verschlüssen in einer aeroben Atmosphäre bei $35 \pm 2 \text{ °C}$ inkubieren.
2. Röhrrchen nach 18 bis 24 h auf Wachstum und Reaktionen überprüfen.
3. Zu erwartende Ergebnisse

	Schrägseite	Röhrrchenboden	Gasbildung	H ₂ S
* <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Sauer	Sauer	+	–
* <i>Salmonella enterica</i> Subspezies <i>enterica</i> Serotyp Typhimurium ATCC 14028	Alkalisch	Sauer	+/-	+
* <i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	Alkalisch	Sauer	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Alkalisch	Alkalisch	–	–

* Empfohlener Organismusstamm für die Qualitätssicherung durch den Anwender.

III ZUSÄTZLICHE QUALITÄTSKONTROLLE

1. Röhrrchen wie unter „Haltbarkeit des Produkts“ beschrieben begutachten.
2. Die repräsentativen Röhrrchen auf sichtbare Beschädigungen prüfen, durch die ihre Verwendung beeinträchtigt werden könnte.
3. Den pH-Wert potentiometrisch bei Raumtemperatur bestimmen. Er sollte bei $7,4 \pm 0,2$ liegen.
4. Nicht inokulierte repräsentative Röhrrchen bei $20 - 25 \text{ °C}$ und bei $30 - 35 \text{ °C}$ inkubieren und nach 7 Tagen auf mikrobielle Kontamination untersuchen.

PRODUKTFORMATIONEN

IV VERWENDUNGSZWECK

Kligler-Eisen-Agar wird zur Differenzierung von Mitgliedern der *Enterobacteriaceae* eingesetzt und basiert auf deren Fähigkeit zur Fermentierung von Dextrose und Lactose sowie zur Bildung von Sulfiden.

V ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

1911 wurde von Russell erstmals ein neues Disaccharid-Röhrrchenmedium zur Isolierung des Typhusbazillus aus Urin und Stuhl beschrieben.¹ Sechs Jahre später entwickelte Kligler ein einfaches Bleiazetatmedium zur Differenzierung der Typhus-Paratyphus-Gruppe.² Im Anschluss daran führte Kligler eine Bewertung des bei der Isolierung und Differenzierung von Typhus-, Ruhr- und ähnlichen Bazillen verwendeten Kulturmediums durch und unterstützte das von Russell entwickelte Medium.³ Bailey und Lacey ersetzten Phenolrot durch den Andrade-Indikator, der zuvor als pH-Indikator eingesetzt wurde.⁴

Die aktuelle Zusammensetzung von Kligler-Eisen-Agar kombiniert Charakteristika von Kligler's Bleiazetatmedium mit denen des von Russell verwendeten Disaccharid-Agars.

VI VERFAHRENSGRUNDLAGEN

Kligler-Eisen-Agar enthält außer Casein und Fleischpeptonen Lactose und Dextrose, welche die Differenzierung von Enterobazillen-Spezies auf Grund des Farbumschlags des pH-Indikators Phenolrot als Reaktion auf die während der Fermentierung dieser Zucker produzierte Säure ermöglichen. Die Dextrosekonzentration beträgt nur 10 % der Lactosekonzentration. Die Kombination von Ammonium Eisen(III)-Citrat und Natriumthiosulfat ermöglicht den Nachweis des gebildeten Schwefelwasserstoffes.

Lactose nicht fermentierende Bakterien (z.B. *Salmonella* und *Shigella*) bilden anfänglich auf Grund der durch die Fermentierung der geringen Dextrosemenge gebildeten Säure eine gelbe Schrägkultur. Ist die Dextrosemenge in der aeroben Umgebung der Schrägkultur aufgebraucht, kehrt die Reaktion auf Grund der Säureoxidation in den alkalischen Bereich (rote Schrägkultur) zurück. In der anaeroben Umgebung des Röhrchenbodens findet diese Umkehrung nicht statt, und der Röhrchenboden bleibt sauer (gelb). Lactose-Fermenter produzieren gelbe Schrägkulturen und Röhrchenböden, da bei aeroben Bedingungen an der Schrägseite genügend Säure produziert wird, damit ein saurer pH beibehalten bleibt. Organismen, die keines der beiden Kohlenhydrate fermentieren können, produzieren rote Schrägseiten und Röhrchenböden.

Die Schwefelwasserstoffproduktion wird durch eine Schwarzfärbung des gesamten Röhrchenbodens oder durch eine schwarze Ringbildung im oberen Bereich des Röhrchenbodens angezeigt. Die Gasproduktion (aerogene Reaktion) zeigt sich in Form einzelner Bläschen bzw. durch eine Teilung oder Verschiebung des Agar.

VII REAGENZIEN

Kligler-Eisenagar

Ungefähre Zusammensetzung* pro L destilliertem Wasser

Pankreatisch abgebautes Casein	10,0	g
Peptisch abgebautes Tiergewebe	10,0	g
Lactose	10,0	g
Dextrose	1,0	g
Natriumchlorid	5,0	g
Ammonium Eisen (III)-Citrat	0,5	g
Natriumthiosulfat	0,5	g
Agar	15,0	g
Phenolrot	0,025	g

*Nach Bedarf abgestimmt und/oder ergänzt auf die geforderten Testkriterien.

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

In-vitro-Diagnostikum.

Fest verschlossene Röhrchen sollten vorsichtig geöffnet werden, um Verletzungen durch Glasbruch zu vermeiden.

Der Umgang mit mikrobiologischem Material sollte bei allen Verfahren unter Einhaltung der allgemein üblichen Vorsichtsmaßnahmen und Anwendung aseptischer Techniken erfolgen. Präparierte Röhrchen, Probenbehälter und sonstige kontaminierte Materialien nach Verwendung im Autoklaven sterilisieren und erst dann entsorgen.

Aufbewahrung

Röhrchen nach Erhalt bei 2 – 8 °C im Dunkeln aufbewahren. Nicht einfrieren oder überhitzen. Erst unmittelbar vor Gebrauch öffnen. Vor Lichteinwirkung schützen. Medien in Röhrchen, die vor Gebrauch gemäß der Anleitung auf dem Etikett gelagert werden, können bis zum Verfallsdatum inokuliert und entsprechend den empfohlenen Inkubationszeiten inkubiert werden. Das Medium vor der Inokulation auf Raumtemperatur erwärmen lassen.

Haltbarkeit des Produkts

Röhrchen bei Anzeichen von mikrobieller Kontamination, Verfärbung, Eintrocknen oder sonstigen Anzeichen von Produktverfall nicht verwenden.

VIII PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

Die Handhabung der für die Kultivierung geeigneten Proben kann auf verschiedene Arten geschehen. Detaillierte Informationen enthält die entsprechende Fachliteratur.^{5,6} Die Proben

sollten vor der Verabreichung von Antibiotika entnommen werden. Es müssen Vorkehrungen für eine umgehende Einlieferung ins Labor getroffen werden.

IX VERFAHREN

Mitgeliefertes Arbeitsmaterial

Kligler Iron Agar Slants

Benötigtes, jedoch nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial

Zusätzliche Kulturmedien, Reagenzien, Qualitätskontrollorganismen und Laborgeräte nach Bedarf.

Testverfahren

Aseptische Kautelen beachten.

Für die Inokulation vorsichtig nur die Mitte einer isolierten Kolonie auf einem Entero-Plattenmedium mit einer kühlen sterilen Nadel berühren, die Nadel im Medium bis zum Röhrchenboden eintauchen und anschließend auf der Oberfläche des Schrägagars ausstreichen. Von jeder primären Platte sollten mehrere Kolonien einzeln untersucht werden, da Mischinfektionen auftreten können.

Die Röhrchen mit gelösten Verschlüssen 18 bis 24 h in einer aeroben Atmosphäre bei $35 \pm 2^\circ\text{C}$ inkubieren.

Um die alkalischen Bedingungen des Schrägagars zu erhöhen, die Verschlüsse nur lose aufsetzen, um einen ungehinderten Luftaustausch zu gewährleisten. Bei fest geschlossenen Verschlüssen kann eine Säurereaktion (allein durch Dextrosefermentierung verursacht) bis zur Schrägseite fortschreiten.

Qualitätskontrolle durch den Anwender

Siehe „Massnahmen zur Qualitätskontrolle“.

Die Qualitätskontrollen müssen unter Einhaltung der örtlich, landesweit und/oder bundesweit geltenden Bestimmungen oder der Auflagen der Akkreditierungsorganisationen sowie den Standard-Qualitätskontrollverfahren Ihres Labors erfolgen. Benutzer sollten die relevanten CLSI-Dokumente und CLIA-Vorschriften über geeignete Testverfahren zur Qualitätskontrolle einsehen.

Eine Einzelelektrode, deren Durchmesser klein genug für die Röhrchen ist, sollte verwendet werden, um den pH-Wert von Medien in Röhrchen potentiometrisch zu ermitteln. Die Elektrodenspitze sollte mittig in der Agarmasse (festes Medium) positioniert werden.

X ERGEBNISSE

Nach der Inkubation die Reaktion an der Schrägseite und am Röhrchenboden aufzeichnen; Gasbildung und Schwefelwasserstoffbildung notieren.

Typische, von Mitgliedern der *Enterobacteriaceae* gebildete Reaktionen (Mehrheit der Spezies im bestimmten Genus):⁷

	Schrägseite	Röhrchenboden	Gasbildung	H ₂ S
<i>Citrobacter</i>	Alkalisch	Sauer	+	+ oder –
<i>Edwardsiella</i>	Alkalisch	Sauer	+	+
<i>Escherichia coli</i>	Sauer	Sauer	+	–
<i>Enterobacter</i>	Sauer*	Sauer	+	–
<i>Morganella</i>	Alkalisch	Sauer	±	–
<i>Proteus</i>	Alkalisch oder sauer	Sauer	+	+
<i>Providencia</i>	Alkalisch	Sauer	±	–
<i>Salmonella</i>	Alkalisch	Sauer	+	+
<i>Shigella</i>	Alkalisch	Sauer	–	–

*Kann trotz fermentierter Lactose in den alkalischen Zustand zurückkehren (*E. aerogenes*).

Weitere Informationen dazu gibt die entsprechende Literatur.⁵⁻¹⁰

XI VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

Schwefelwasserstoff produzierende Organismen können u.U. soviel schwarzen Niederschlag (Eisensulfide) bilden, dass die am Röhrchenboden produzierte Säure nicht sichtbar ist. Bei Reduzierung der H₂S-Konzentration liegen am Röhrchenboden jedoch saure Bedingungen vor (wenn auch nicht sichtbar) und sollten als solche aufgezeichnet werden.⁸

Zur Identifizierung müssen die Mikroorganismen in Reinkultur vorliegen. Für die endgültige Identifizierung sollten morphologische, biochemische und/oder serologische Tests durchgeführt werden. Detaillierte Informationen und empfohlene Verfahren sind der einschlägigen Fachliteratur zu entnehmen.⁵⁻¹⁰

XII LEISTUNGSMERKMALE

Vor der Freigabe werden alle Chargen von Kligler-Eisen-Schrägagar auf ihre Leistungsmerkmale getestet. Repräsentative Proben der Charge werden mit Kulturen von *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) und *Shigella flexneri* (ATCC 12022) auf **Trypticase-Soja-Agar** getestet, indem die Kultur auf dem Schrägagar ausgestrichen wird und die Inokulationsnadel bis zum Röhrchenboden eingetaucht wird. Die Röhrchen werden mit gelösten Verschlüssen bei 35 ± 2 °C inkubiert und nach 18 bis 24 h auf Wachstum und Reaktionen untersucht. Das Wachstum aller Organismen fällt mittel bis stark aus. Die Schrägeite des mit *E. coli* inokulierten Röhrchens weist eine saure Reaktion auf, während die Schrägeiten aller anderen inokulierten Röhrchen alkalische Bedingungen zeigen. *S. flexneri* produziert eine saure Reaktion am Röhrchenboden, *P. aeruginosa* eine alkalische Reaktion. *E. coli* produziert Säure und Gas am Röhrchenboden. *Salmonella* Typhimurium produziert eine saure Reaktion am Röhrchenboden zusammen mit einer Schwarzfärbung des Mediums; dabei kann u.U. auch Gas gebildet werden.

XIII LIEFERBARE PRODUKTE

Best.- Nr.	Beschreibung
220896	BD BBL Kligler Iron Agar Slants, Packung mit 10 Röhrchen der Größe K
220897	BD BBL Kligler Iron Agar Slants, Karton mit 100 Röhrchen der Größe K

XIV LITERATUR

1. Russell, F.F. 1911. The isolation of typhoid bacilli from urine and feces with the description of a new double sugar tube medium. J. Med. Res. 25:217-229.
2. Kligler, I.J. 1917. A simple medium for the differentiation of members of the typhoid-paratyphoid group. Am. J. Public Health. 7:1042-1044.
3. Kligler, I.J. 1918. Modifications of culture media used in the isolation and differentiation of typhoid, dysentery and allied bacilli. J. Exp. Med. 28:319-322.
4. Bailey, S.F., and N.I. Lacy. 1927. A modification of the Kligler lead acetate medium. J. Bacteriol. 13:183-189.
5. Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller and R.H. Tenover (ed.). 2003. Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
6. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
7. Ewing, W.H. 1986. Edwards and Ewing's identification of the *Enterobacteriaceae*, 4th ed. Elsevier Science Publishing Co., Inc. New York.
8. MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore.
9. Baron, E.J., L.R. Peterson, and S.M. Finegold. 1994. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 9th ed. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis.
10. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams (ed.). 1994. Bergey's Manual™ of determinative bacteriology, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

BD Diagnostics Technischer Kundendienst: setzen Sie sich mit Ihrer zuständigen BD-Vertretung oder www.bd.com/ds.



Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152 USA



Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire
Co. Dublin, Ireland

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.

BD, BD Logo, BBL, GasPak and Trypticase are trademarks of Becton, Dickinson and Company. ©2014 BD.