



PROCEDURES DE CONTROLE DE QUALITE

I INTRODUCTION

La gélose Kligler Iron Agar est utilisée pour différencier les bacilles entériques Gram-négatifs sur la base de leur capacité à faire fermenter le dextrose et le lactose et de produire des sulfures.

II MODE OPERATOIRE DU TEST

1. Ensemencer des échantillons représentatifs avec les cultures répertoriées ci-dessous.
 - a. Utiliser des cultures de gélose inclinée **Trypticase** Soy Agar âgées de 18 à 24 h. Ensemencer les tubes au moyen d'une aiguille à ensemencer en piquant le culot et en striant la surface de la pente par mouvements de va-et-vient.
 - b. Incuber les tubes, bouchons desserrés, en atmosphère aérobie, à une température de 35 ± 2 °C.
2. Examiner les tubes au bout de 18 à 24 h afin de contrôler la croissance et les réactions.
3. Résultats attendus

	Pente	Culot	Gaz	H ₂ S
* <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Acide	Acide	+	–
* <i>Salmonella enterica</i> sous-esp. <i>enterica</i> sérotipe Typhimurium ATCC 14028	Alcalin	Acide	+/-	+
* <i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	Alcalin	Acide	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Alcalin	Alcalin	–	–

*Souche recommandée pour le Contrôle de qualité réalisé par l'utilisateur.

III CONTROLE DE QUALITE SUPPLEMENTAIRE

1. Examiner les tubes comme décrit à la rubrique « Détérioration du produit ».
2. Inspecter visuellement des tubes représentatifs pour s'assurer qu'aucun défaut physique ne peut interférer avec leur utilisation.
3. Déterminer le pH par potentiométrie à température ambiante afin de respecter la spécification de $7,4 \pm 0,2$.
4. Incuber des tubes représentatifs non ensemencés entre 20 et 25 °C et 30 et 35 °C, et les examiner après 7 jours pour déceler une contamination microbienne éventuelle.

INFORMATIONS PRODUIT

IV APPLICATION

La Kligler Iron Agar (gélose de fer Kligler) est utilisée pour différencier les espèces d'*Enterobacteriaceae* sur la base de leur capacité de fermentation du dextrose et du lactose et de production de sulfures.

V RESUME ET EXPLICATION

En 1911, Russell a décrit un nouveau milieu constitué d'un tube de sucre double permettant d'isoler le bacille de la typhoïde de l'urine et des matières fécales.¹ Six ans plus tard, Kligler développait un milieu d'acétate de plomb simple permettant de différencier le groupe typhoïde-paratyphoïde.² Kligler a ensuite évalué les différents milieux de culture utilisés pour isoler et différencier la typhoïde, la dysenterie et les bacilles associés, et a finalement approuvé le milieu de Russell.³ Bailey et Lacey ont remplacé le rouge de phénol par l'indicateur d'Andrade jusque-là utilisé comme indicateur de pH.⁴

La formulation actuelle de la gélose Kligler Iron Agar associe les caractéristiques du milieu à l'acétate de plomb de Kligler et celles de la gélose à sucre double de Russell.

VI PRINCIPES DE LA METHODE

La gélose Kligler Iron Agar contient, outre des peptones de caséine et de viande, du lactose et du dextrose qui permettent de différencier les espèces de bacilles entériques, celles-ci étant mises en évidence par les changements de couleur de l'indicateur de pH au rouge de phénol par réaction à l'acide produit pendant la fermentation de ces sucres. La concentration de dextrose ne correspond qu'à 10 % de celle du lactose. La combinaison de citrate d'ammonium ferrique et de thiosulfate de sodium permet de détecter la production d'acide sulfhydrique.

Les non-fermentants du lactose (*Salmonella* et *Shigella*, par exemple) produisent initialement une pente jaune due à l'acide produit par la fermentation de la petite quantité de dextrose. Lorsque la quantité de dextrose est épuisée dans l'environnement aérobie de la pente, la réaction s'inverse et devient alcaline (pente rouge) en raison de l'oxydation des acides. Cette inversion ne se produit pas dans l'environnement anaérobie du culot, qui reste acide (culot jaune). Les fermentants du lactose produisent des pentes et des culots jaunes car de l'acide est produit en quantité suffisante dans la pente pour maintenir un pH acide dans des conditions aérobies. Les organismes incapables de faire fermenter l'un ou l'autre des glucides produisent des pentes et des culots rouges.

La production d'acide sulfhydrique est mise en évidence par une couleur noire, soit dans l'ensemble du culot, soit sous forme d'anneau apparaissant à proximité du haut de celui-ci. La production de gaz (réaction aéro-gène) est révélée par la formation de bulles séparées ou par la division ou le déplacement de la gélose.

VII REACTIFS

Kligler Iron Agar

Formule approximative* par litre d'eau purifiée

Digestion pancréatique de caséine	10,0	g
Digestion peptique de tissu animal	10,0	g
Lactose	10,0	g
Dextrose	1,0	g
Chlorure de sodium	5,0	g
Citrate d'ammonium ferrique	0,5	g
Thiosulphate de sodium	0,5	g
Gélose	15,0	g
Rouge de phénol	0,025	g

*Ajustée et/ou complémentée en fonction des critères de performances imposés.

Avertissements et précautions

Réservé au diagnostic *in vitro*.

Ouvrir avec précaution les tubes étroitement bouchés pour ne pas risquer d'être blessé par un bris de verre.

Toujours utiliser des techniques aseptiques et prendre les précautions en vigueur contre les dangers microbiologiques. Après utilisation, stériliser à l'autoclave les tubes préparés, les récipients ayant contenu des échantillons et tout autre matériel contaminé avant de les éliminer.

Instructions pour la conservation

Dès réception, conserver les tubes dans l'obscurité, à une température comprise entre 2 et 8 °C. Ne pas les congeler ni les surchauffer. Ne pas ouvrir prématurément. Maintenir à l'abri de la lumière. Les milieux en tube conservés conformément aux instructions jusqu'au moment de leur utilisation peuvent être ensemencés jusqu'à la date de péremption indiquée et incubés pendant les durées recommandées. Laisser le milieu s'équilibrer à température ambiante avant de l'ensemencer.

Détérioration du produit

Ne pas utiliser les tubes s'ils présentent des signes de contamination microbienne, décoloration ou dessiccation, ou d'autres signes de détérioration.

VIII PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les échantillons adaptés à la mise en culture peuvent être manipulés selon différentes techniques. Pour plus d'informations, consulter les publications citées en référence.^{5,6} Prélever les échantillons avant l'administration des agents antimicrobiens. Veiller à les transmettre sans délai au laboratoire.

IX PROCEDURE

Matériaux fournis

Kligler Iron Agar Slants

Matériaux requis mais non fournis

Milieux de culture auxiliaires, réactifs, souches de contrôle de qualité et matériel de laboratoire requis.

Mode opératoire du test

Respecter les techniques d'asepsie.

Lors de l'ensemencement, veiller à ne toucher que le centre d'une colonie isolée dans un milieu en boîte de Pétri avec une aiguille froide et stérile. Piquer le milieu dans le culot du tube, puis strier la surface de la pente par mouvements de va-et-vient. Etudier séparément plusieurs colonies de chaque boîte primaire, car des infections mixtes peuvent survenir.

Incuber les cultures, avec les bouchons desserrés, pendant 18 à 24 h à 35 ± 2 °C en atmosphère aérobie.

Pour favoriser l'état alcalin de la pente, laisser l'air passer librement en ne refermant pas totalement les tubes. Dans un tube hermétiquement clos, une réaction acide (provoquée uniquement par la fermentation du dextrose) affecte aussi la pente.

Contrôle de qualité par l'utilisateur

Voir « Procédures de contrôle de qualité ».

Effectuer les contrôles de qualité conformément à la réglementation nationale et/ou internationale, aux exigences des organismes d'homologation concernés et aux procédures de contrôle de qualité en vigueur dans l'établissement. Il est recommandé à l'utilisateur de consulter les directives CLSI et la réglementation CLIA concernées pour plus d'informations sur les modalités de contrôle de qualité.

Une seule électrode d'une taille suffisamment petite pour pénétrer dans les tubes devrait être utilisée pour déterminer potentiométriquement le pH des milieux en tubes. L'extrémité de l'électrode doit être placée au centre de la masse gélosée dans le milieu solide.

X RESULTATS

Après incubation, consigner la réaction observée sur la pente et dans le culot, et notamment la formation de gaz et la production d'acide sulfhydrique.

Les réactions types des *Enterobacteriaceae* (majorité des espèces du genre) sont les suivantes :⁷

	Pente	Culot	Gaz	H ₂ S
<i>Citrobacter</i>	Alcalin	Acide	+	+ ou –
<i>Edwardsiella</i>	Alcalin	Acide	+	+
<i>Escherichia coli</i>	Acide	Acide	+	–
<i>Enterobacter</i>	Acide*	Acide	+	–
<i>Morganella</i>	Alcalin	Acide	±	–
<i>Proteus</i>	Alcalin ou acide	Acide	+	+
<i>Providencia</i>	Alcalin	Acide	±	–
<i>Salmonella</i>	Alcalin	Acide	+	+
<i>Shigella</i>	Alcalin	Acide	–	–

*Peut redevenir alcalin même après fermentation du lactose (*E. aerogenes*).

Pour plus d'informations, consulter les publications citées en référence.⁵⁻¹⁰

XI LIMITES DE LA PROCEDURE

Le précipité noir (sulfure de fer) généré par les organismes producteurs d'acide sulfhydrique peut être abondant au point de masquer totalement l'acidité produite dans le culot. Cependant, en cas de réduction du H₂S, une condition acide (non nécessairement observable) se produit dans le culot, et doit être consignée comme telle.⁸

Pour procéder à l'identification, les organismes doivent se trouver en culture pure. Des tests morphologiques, biochimiques et/ou sérologiques doivent être effectués pour l'identification finale. Pour plus d'informations, et pour connaître les procédures recommandées, consulter les publications citées en référence.⁵⁻¹⁰

XII CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES

Tous les lots de Kligler Iron Agar Slants sont soumis à des tests en usine permettant d'évaluer les caractéristiques de leurs performances. Des échantillons représentatifs du lot sont testés avec des cultures **Trypticase** Soy Agar d'*Escherichia coli* (ATCC 25922), de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), de *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) et de *Shigella flexneri* (ATCC 12022) par striage de la pente et piqûre du culot à l'aide d'une aiguille à ensemencer. Les tubes sont incubés, avec les bouchons desserrés, à 35 ± 2 °C. La croissance et les réactions sont évaluées au bout de 18 à 24 h d'incubation. Tous les organismes présentent une croissance modérée à forte. La pente du tube ensemencé d'*E. coli* a une réaction acide, tandis que celle de tous les autres tubes ensemencés ont une réaction alcaline. *S. flexneri* produit une réaction acide dans le culot et *P. aeruginosa* une réaction alcaline. *E. coli* produit de l'acide et du gaz dans le culot. *Salmonella* Typhimurium produit une réaction acide dans le culot ainsi qu'un noircissement du milieu. Du gaz peut éventuellement être présent.

XIII CONDITIONNEMENT

N° réf.	Description
---------	-------------

220896	BD BBL Kligler Iron Agar Slants, boîte de 10 tubes de taille K
--------	--

220897	BD BBL Kligler Iron Agar Slants, carton de 100 tubes de taille K
--------	--

XIV REFERENCES

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.

Service et assistance technique de BD Diagnostics : contacter votre représentant local de BD ou consulter le site 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.