

PROCEDURY KONTROLI JAKOŚCI**I WPROWADZENIE**

Podłoże Kligler Iron Agar (Agar Kliglera z żelazem) jest pomocne w różnicowaniu pałeczek jelitowych na podstawie ich zdolności do wywoływania fermentacji dekstrozy i laktozy oraz wytwarzania siarczków.

II PROCEDURA TESTU

1. Zaszczepić reprezentatywne próbki podłoża hodowlami wymienionych poniżej szczepów.
 - a. Używając hodowli drobnoustrojów hodowanych 18 – 24 h na podłożu skośnym **Trypticase Soy Agar**, zaszczepić próbówki igłą do posiewów poprzez przebicie słupka oraz wykonanie pasmowego posiewu tam i z powrotem wzdłuż powierzchni skosu.
 - b. Inkubować próbówki z poluzowanymi nakrętkami w temperaturze $35 \pm 2^\circ\text{C}$ w atmosferze tlenowej.
2. Zbadać próbówki po upływie 18–24 h pod względem wzrostu i wyników reakcji.
3. Oczekiwane wyniki

Mikroorganizmy	ATCC	Skos	Słupek	Gaz	H ₂ S
* <i>Escherichia coli</i>	25922	Kwaśny	Kwaśny	+	–
* <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotyp Typhimurium	14028	Zasadowy	Kwaśny	+/-	+
* <i>Shigella flexneri</i>	12022	Zasadowy	Kwaśny	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	Zasadowy	Zasadowy	–	–

*Szczep zalecany do przeprowadzania kontroli jakości przez użytkownika.

III DODATKOWA KONTROLA JAKOŚCI

1. Ocenić próbówki według opisu w punkcie „Pogorszenie jakości produktu”.
2. Wzrokowo ocenić reprezentatywne próbówki, aby upewnić się, że żadne istniejące wady fizyczne nie będą przeszkadzały w ich użytkowaniu.
3. Określić potencjometrycznie wartość pH w temperaturze pokojowej, aby upewnić się, że odczyn jest zgodny ze specyfikacją i wynosi $7,4 \pm 0,2$.
4. Inkubować reprezentatywne próbówki bez wysianych drobnoustrojów w temperaturze 20 – 25°C i 30 – 35°C i ocenić po 7 dniach pod względem zanieczyszczenia drobnoustrojami.

INFORMACJA O PRODUKCIE**IV PRZEZNACZENIE**

Podłoże Kligler Iron Agar służy do różnicowania przedstawicieli rodziny *Enterobacteriaceae* na podstawie ich zdolności do wywoływania fermentacji dekstrozy i laktozy oraz wytwarzania siarczków.

V STRESZCZENIE I OBJAŚNIENIE

W 1911 roku Russell opisał nowe dwucukrowe podłoże w próbówce, służące do izolacji pałeczek duru brzuszego z próbek moczu i kału.¹ Sześć lat później Kligler opracował proste podłoże z octanem ołowiu, służące do różnicowania grupy pałeczek duru-paraduru.² Następnie Kligler badał podłoża hodowlane, stosowane do izolowania i różnicowania pałeczek duru brzuszego, czerwinki oraz pałeczek pokrewnych i zaakceptował podłoże Russella.³ Bailey i Lacey zastąpili czerwienią fenolową wskaźnik Andrade, używany dawniej jako wskaźnik pH.⁴

Obecny skład podłoża Kligler Iron Agar łączy cechy podłoża Kliglera z octanem ołowiu oraz dwucukrowego podłoża agarowego Russella.

VI ZASADY PROCEDURY

Podłoże Kligler Iron Agar, oprócz peptonów kazeinowych i mięsnych, zawiera laktozę i dekstrozę, co umożliwia różnicowanie gatunków pałeczek jelitowych na podstawie zmian zabarwienia wskaźnika pH w postaci czerwieni fenolowej w odpowiedzi na odczyn kwaśny powstały podczas fermentacji tych cukrów. Stężenie dekstrozy stanowi jedynie 10% stężenia laktozy. Połączenie cytrynianu amonu żelaza i tiosiarcznanu sodu umożliwia wykrywanie wytwarzanego siarkowodoru.

Drobnoustroje niewywołujące fermentacji laktozy (np. *Salmonella* i *Shigella*) początkowo wywołują żółte zabarwienie skosu wskutek wytwarzania kwasu w reakcji fermentacji niewielkich ilości dekstrozy. Po wyczerpaniu się zapasu dekstrozy w środowisku tlenowym skosu reakcja zmienia odczyn podłoża na zasadowy (skos czerwony) wskutek utleniania kwasów. Wspomniane odwrócenie nie zachodzi w beztlenowym środowisku słupka, w którym nadal utrzymuje się odczyn kwaśny (słupek żółty). Drobnoustroje zdolne do fermentacji laktozy powodują powstanie żółtego zabarwienia skosu i słupka, ponieważ w obrębie skosu wytwarzana jest dostateczna ilość kwasu, aby w warunkach tlenowych utrzymać pH w granicach odczynu kwaśnego. Drobnoustroje niezdolne do fermentacji żadnego z obu węglowodanów powodują powstanie czerwonego zabarwienia skosu i słupka.

Oznaką wytwarzania siarkowodoru jest zabarwienie czarne, widoczne albo w całym słupku, albo w postaci pierścienia w pobliżu górnej części słupka. Wytwarzanie gazu (reakcja aerogeniczna) jest wykrywana na podstawie pojedynczych pęcherzyków lub rozdzielenia bądź przemieszczenia podłoża agarowego.

VII ODCZYNNIKI

Kligler Iron Agar

Przybliżony skład* w przeliczeniu na 1 litr wody oczyszczonej

Trzustkowy hydrolizat kazeiny	10,0 g	Cytrynian amonowo-żelazowy	0,5 g
Hydrolizat pepsynowy tkanki zwierzęcej	10,0 g	Tiosiarczan sodu	0,5 g
Laktoza	10,0 g	Agar	15,0 g
Dekstroza	1,0 g	Czerwień fenolowa	0,025 g
Chlorek sodu	5,0 g		

*Skorygowany lub uzupełniony zgodnie z wymaganiami kryteriów działania.

Ostrzeżenia i środki ostrożności: Do stosowania w diagnostyce *in vitro*.

Probówki z ciasno dokręconymi nakrętkami należy otwierać ostrożnie, aby uniknąć obrażeń spowodowanych pęknięciem szkła.

Podczas wykonywania wszystkich procedur należy przestrzegać zasad aseptyki i obowiązujących środków ostrożności, dotyczących zagrożenia mikrobiologicznego. Po wykorzystaniu gotowe probówki, pojemniki na próbki oraz inne materiały skażone należy przed wyrzuceniem poddać sterylizacji w autoklawie.

Instrukcje dotyczące przechowywania: Otrzymane probówki umieścić i przechowywać w zaciemnionym miejscu, w temperaturze 2 – 8°C. Unikać zamrażania i przegrzewania. Otwierać dopiero bezpośrednio przed użyciem. Ograniczać do minimum ekspozycję na światło. W podłożach przechowywanych do momentu użycia w probówkach, zgodnie z instrukcjami podanymi na etykiecie, można wykonywać posiewy do dnia określonego terminem ważności, a następnie prowadzić inkubację przez zalecany czas. Przed posiewem ogrzać podłoże do temperatury pokojowej.

Pogorszenie jakości produktu: Nie używać probówek, jeżeli są widoczne oznaki skażenia mikrobiologicznego, zmiana zabarwienia, wysychanie lub inne, świadczące o pogorszeniu jakości.

VIII POBIERANIE PRÓBEK I POSTĘPOWANIE Z NIMI

Dostępne są różne techniki postępowania z próbkami umożliwiającymi uzyskanie hodowli. Szczegółowe informacje można znaleźć w odpowiednich pozycjach piśmiennictwa.^{5,6} Probki należy pobrać przed podaniem środków przeciwbakteryjnych. Konieczne jest zapewnienie szybkiej dostawy do laboratorium.

IX PROCEDURA

Dostarczane materiały: Kligler Iron Agar Slants

Materiały wymagane, ale niedostarczane: Pomocnicze pożywki hodowlane, odczynniki, drobnoustroje do kontroli jakości i wyposażenie laboratoryjne zgodnie z wymaganiami.

Procedura testowa: Stosować techniki aseptyczne.

Aby zaszczerpić podłoże, ostrożnie dotknąć chłodną, jałową igłą jedynie środka izolowanej kolonii na podłożu płytkowym do hodowli bakterii jelitowych, przebić igłą podłoże w obrębie słupka w probówce, a następnie posiać pasmowo próbkę, rozpraszając ją tam i z powrotem po powierzchni skosu. Należy zbadać oddzielnie kilka kolonii z każdej płytki z hodowlą po izolacji pierwotnej, ponieważ mogą zdarzać się zakażenia mieszane.

Inkubować probówki z poluzowanymi nakrętkami przez 18 – 24 h w temperaturze 35 ± 2°C, w atmosferze tlenowej.

Aby wzmocnić odczyn zasadowy w obrębie skosu, należy umożliwić swobodną wymianę powietrza poprzez luźne zamknięcie probówki. Jeżeli probówka zostanie szczelnie zamknięta, reakcja z wytwarzaniem kwasu (spowodowana wyłącznie fermentacją dekstrozy) obejmie również skos.

Kontrola jakości przez użytkownika: Patrz „Procedury kontroli jakości”.

Należy postępować zgodnie z obowiązującymi wymogami kontroli jakości, wynikającymi z przepisów miejscowych, krajowych lub federalnych, wymogami akredytacji i rutynowymi procedurami kontroli jakości w danym laboratorium.

Zaleca się, aby użytkownik stosował się do odpowiednich wytycznych CLSI (dawniej NCCLS) i przepisów CLIA, dotyczących sposobów kontroli jakości.

Aby określić pH podłoża próbki metodą potencjometryczną, należy wykorzystać pojedynczą elektrodę o odpowiednio niewielkich rozmiarach dopasowanych do probówek. Końcówkę elektrody należy umieścić w centralnej części masy agaru w stałym podłożu.

X WYNIKI

Po inkubacji odnotować wyniki reakcji w obrębie skosu i słupka, zwracając uwagę na tworzenie się gazu i wytwarzanie siarkowodoru.

Typowe wyniki reakcji przedstawicieli rodziny *Enterobacteriaceae* (większości gatunków określonego rodzaju):⁷

	Skos	Słupka	Gaz	H ₂ S
<i>Citrobacter</i>	Zasadowy	Kwaśny	+	+ lub –
<i>Edwardsiella</i>	Zasadowy	Kwaśny	+	+
<i>Escherichia coli</i>	Kwaśny	Kwaśny	+	–
<i>Enterobacter</i>	Kwaśny*	Kwaśny	+	–
<i>Morganella</i>	Zasadowy	Kwaśny	±	–
<i>Proteus</i>	Zasadowy lub kwaśny	Kwaśny	+	+
<i>Providencia</i>	Zasadowy	Kwaśny	±	–
<i>Salmonella</i>	Zasadowy	Kwaśny	+	+
<i>Shigella</i>	Zasadowy	Kwaśny	–	–

*Możliwe odwrócenie wyniku do zasadowego mimo fermentacji laktozy (*E. aerogenes*).

Dodatkowe informacje znajdują się w odpowiednich pozycjach piśmiennictwa.⁵⁻¹⁰

XI OGRANICZENIA PROCEDURY

Drobnoustroje wytwarzające siarkowodor mogą powodować powstawanie tak dużych ilości czarnego osadu siarczku żelaza, że całkowicie maskuje to kwaśny odczyn w obrębie słupka. Jednak gdyby ilość H₂S została zredukowana, odczyn kwaśny byłby obecny w słupku, nawet jeśli nie można go zaobserwować, zatem taki wynik reakcji należy odnotować.⁸

Do identyfikacji niezbędne są czyste kultury drobnoustrojów. W celu ostatecznej identyfikacji należy przeprowadzić badania morfologiczne, biochemiczne i/lub serologiczne. W celu uzyskania szczegółowych informacji oraz zalecanych procedur należy zapoznać się z odpowiednimi pozycjami piśmiennictwa.⁵⁻¹⁰

XII CHARAKTERYSTYKA WYDAJNOŚCIOWA

Przed dopuszczeniem do obrotu wszystkie partie podłoża Kligler Iron Agar sprawdza się pod kątem ich skuteczności. Reprezentatywne próbki z danej partii są testowane z użyciem hodowanych na podłożu **Trypticase** Soy Agar szczepów *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) i *Shigella flexneri* (ATCC 12022); zaszczepia się je poprzez posiew pasmowy skosu oraz przebicie słupka igłą do posiewów. Probówki z poluzowanymi nakrętkami inkubuje się w temperaturze 35 ± 2°C, a po upływie 18 – 24 h dokonuje odczytu wzrostu i wyników reakcji. Wszystkie drobnoustroje wykazują wzrost umiarkowany lub silny. Skos próbki zaszczepionej *E. coli* wykazuje reakcję kwasową, natomiast we wszystkich pozostałych zaszczepionych probówkach skos jest zasadowy. *S. flexneri* wywołuje kwasowy wynik reakcji w słupku, *P. aeruginosa* — reakcję zasadową. *E. coli* wytwarza odczyn kwaśny oraz gaz w obrębie słupka. *Salmonella* Typhimurium powoduje kwasowy wynik reakcji w słupku łącznie z czarnym zabarwieniem podłoża; gaz może być lub nie być obecny.

XIII DOSTĘPNOŚĆ

Nr kat.	Opis
220896	BD BBL Kligler Iron Agar Slants, opakowanie zawierające 10 probówek w rozmiarze K
220897	BD BBL Kligler Iron Agar Slants, karton zawierający 100 probówek w rozmiarze K

XIV PIŚMIENICTWO

- 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.
- Kligler, I.J. 1917. A simple medium for the differentiation of members of the typhoid-paratyphoid group. Am. J. Public Health. 7:1042-1044.
- 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.
- 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. Tenegold. 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.

Dział Obsługi Technicznej firmy BD Diagnostics: należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem BD lub odwiedzić stronę 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.