

PROCEDURE DI CONTROLLO DI QUALITÀ**I INTRODUZIONE**

Il terreno **BBL Kligler Iron Agar** (agar ferro Kligler **BBL**) facilita la differenziazione di bacilli enterici gram-negativi in base alla capacità di fermentare destrosio e lattosio e produrre solfuri.

II PROCEDURA DEL TEST

1. Inoculare i campioni rappresentativi con le colture sotto elencate.
 - a. Con l'ausilio di un ago da inoculo, inoculare le provette penetrando in profondità e strisciando avanti e indietro lungo la superficie dello slant usando colture slant di 18 – 24 h in **Trypticase Soy Agar**.
 - b. Incubare le provette – con i tappi non completamente avvitati – a 35 ± 2 °C in aerobiosi.
2. Esaminare le provette dopo 18 – 24 h per verificare la crescita e le reazioni.
3. Risultati attesi

	Slant	Cono	Gas	H ₂ S
* <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Acida	Acida	+	–
* <i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sierotipo Typhimurium ATCC 14028	Alcalina	Acida	+/-	+
* <i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	Alcalina	Acida	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Alcalina	Alcalina	–	–

*Ceppo batterico raccomandato per il controllo di qualità a cura dell'utente.

III CONTROLLO DI QUALITÀ SUPPLEMENTARE

1. Esaminare le provette come descritto in "Deterioramento del prodotto".
2. Eseguire un esame visivo delle provette rappresentative per garantire che l'eventuale presenza di difetti fisici non interferisca con l'uso.
3. Determinare il pH mediante potenziometria a temperatura ambiente per verificare che rientri nel range specificato di $7,4 \pm 0,2$.
4. Incubare a 20 – 25 °C e a 30 – 35 °C le provette rappresentative non inoculate ed esaminarle dopo 7 giorni per verificare la contaminazione microbica.

INFORMAZIONI SUL PRODOTTO**IV USO PREVISTO**

Il terreno **BBL Kligler Iron Agar** è usato per la differenziazione di membri della famiglia delle *Enterobacteriaceae* in base alla capacità di fermentare destrosio e lattosio e produrre solfuri.

V SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Nel 1911, Russell descrisse un nuovo terreno in provetta a due zuccheri per l'isolamento di bacilli tifici da feci e urine.¹ Sei anni dopo, Kligler sviluppò un semplice terreno acetato di piombo per la differenziazione del gruppo tifico-paratifico.² Successivamente, Kligler valutò i terreni di coltura usati nell'isolamento e nella differenziazione di bacilli tifici, della dissenteria bacillare e correlati e adottò il terreno di Russell.³ Bailey e Lacey sostituirono il rosso fenolo con l'indicatore di Andrade precedentemente usato come indicatore di pH.⁴

La formulazione attuale del terreno **BBL Kligler Iron Agar** combina caratteristiche del terreno acetato di piombo di Kligler con quelle dell'agar a due zuccheri di Russell.

VI PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Il terreno **BBL Kligler Iron Agar**, oltre a caseina e peptoni di carne, contiene lattosio e destrosio che consentono la differenziazione delle specie di bacilli enterici grazie ai viraggi dell'indicatore di pH

rosso fenolo in risposta all'acido prodotto durante la fermentazione di questi zuccheri. La concentrazione di destrosio è soltanto il 10% di quella del lattosio. La combinazione di citrato ferrico di ammonio con tiosolfato di sodio consente la rilevazione della produzione di acido solfidrico.

I microrganismi non fermentanti il lattosio (es. *Salmonella* e *Shigella*) producono inizialmente uno slant giallo a causa dell'acido generato dalla fermentazione della piccola quantità di destrosio. Una volta esaurito l'apporto di destrosio nell'ambiente aerobico dello slant, la reazione ridiventa alcalina (slant rosso) a causa dell'ossidazione degli acidi. Questa inversione non si verifica nell'ambiente anaerobico sul fondo, che resta acido (fondo giallo). I microrganismi fermentanti il lattosio producono slant e fondi gialli perché nello slant viene generata una quantità di acido sufficiente a mantenere un pH acido in aerobiosi. I microrganismi non in grado di fermentare i suddetti carboidrati, producono slant e fondi rossi.

La produzione di acido solfidrico è evidenziata dalla colorazione nera in tutto il fondo o dalla formazione di un anello in prossimità della parte superiore del fondo. La produzione di gas (reazione aerogena) è evidenziata da singole bolle o dalla scomposizione o spostamento dell'agar.

VII REAGENTI

BBL Kligler Iron Agar

Formula approssimata* per L di acqua purificata

Digerito pancreatico di caseina	10,0	g
Digerito peptico di tessuto animale	10,0	g
Lattosio	10,0	g
Destrosio	1,0	g
Cloruro di sodio	5,0	g
Citrato ferrico di ammonio	0,5	g
Tiosolfato di sodio	0,5	g
Agar	15,0	g
Rosso fenolo	0,025	g

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

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico *in vitro*.

Aprire con estrema cautela le provette con i tappi serrati allo scopo di evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.

Durante tutte le procedure, adottare tecniche asettiche e seguire le precauzioni standard contro i rischi microbiologici. Dopo l'uso, le provette preparate, i contenitori dei campioni e gli altri materiali contaminati devono essere sterilizzati in autoclave prima dello smaltimento.

Istruzioni per la conservazione

Al ricevimento, conservare le provette al buio a 2 – 8 °C. Evitare congelamento e surriscaldamento. Aprire soltanto al momento dell'uso. Ridurre al minimo l'esposizione alla luce. I terreni in provetta conservati come indicato sull'etichetta sino al momento dell'uso, possono essere inoculati fino alla data di scadenza e incubati per i tempi di incubazione raccomandati. Prima dell'inoculo, attendere che il terreno si porti a temperatura ambiente.

Deterioramento del prodotto

Non usare le provette se presentano tracce di contaminazione microbica, alterazione di colore, essiccamento o altri segni di deterioramento.

VIII RACCOLTA E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

I campioni idonei per coltura possono essere manipolati con varie tecniche. Per informazioni dettagliate, consultare la documentazione appropriata.^{5,6} Raccogliere i campioni prima della somministrazione di antibiotici. Predisporre una consegna tempestiva al laboratorio.

IX PROCEDURA

Materiale fornito

BBL Kligler Iron Agar Slants

Materiali necessari ma non forniti

Terreni di coltura accessori, reagenti, microrganismi per controllo di qualità e apparecchiature di laboratorio necessarie.

Procedura del test

Adottare tecniche asettiche.

Per inoculare, toccare con attenzione soltanto il centro di una colonia isolata su un terreno enterico in piastra, usando un ago freddo sterile, penetrare quindi nel terreno sul fondo della provetta e poi strisciare avanti e indietro lungo la superficie dello slant. Studiare separatamente numerose colonie da ogni piastra primaria, in quanto si possono verificare infezioni miste.

Incubare le provette – con i tappi non completamente avvitati – a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, per 18 – 24 h, in aerobiosi.

Per migliorare la condizione alcalina nello slant, consentire il libero scambio di aria non chiudendo completamente la provetta. Se la provetta viene perfettamente sigillata, la reazione acida (causata soltanto dalla fermentazione del destrosio) interesserà anche lo slant.

Controllo di qualità a cura dell'utente

Vedere "Procedure di controllo di qualità".

Le procedure prescritte per il controllo di qualità devono essere effettuate in conformità alle norme vigenti o ai requisiti di accreditazione e alla prassi di controllo di qualità in uso nel laboratorio. Per una guida alla prassi di controllo di qualità appropriata, si consiglia di consultare le norme CLIA e la documentazione CLSI in merito.

Per determinare fotometricamente il pH dei terreni in provetta, usare un singolo elettrodo di dimensioni sufficientemente ridotte da permetterne l'inserimento nelle provette. Posizionare la punta dell'elettrodo nella porzione centrale della superficie di agar nel terreno solido.

X RISULTATI

Dopo l'incubazione, annotare la reazione nello slant e nel fondo, indicando la formazione di gas e la produzione di acido solfidrico.

Reazioni tipiche prodotte dai membri della famiglia delle *Enterobacteriaceae* (maggior parte delle specie nel genere particolare)⁷:

	Slant	Cono	Gas	H ₂ S
<i>Citrobacter</i>	Alcalina	Acida	+	+ oppure –
<i>Edwardsiella</i>	Alcalina	Acida	+	+
<i>Escherichia coli</i>	Acida	Acida	+	–
<i>Enterobacter</i>	Acida*	Acida	+	–
<i>Morganella</i>	Alcalina	Acida	±	–
<i>Proteus</i>	Alcalina o acida	Acida	+	+
<i>Providencia</i>	Alcalina	Acida	±	–
<i>Salmonella</i>	Alcalina	Acida	+	+
<i>Shigella</i>	Alcalina	Acida	–	–

*Può ridiventare alcalina anche nell'eventualità di fermentazione del lattosio (*E. aerogenes*).

Per ulteriori informazioni, consultare la documentazione appropriata.⁵⁻¹⁰

XI LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

I microrganismi produttori di acido solfidrico possono generare una quantità di precipitato nero, solfuro ferroso, tale da mascherare completamente l'acidità generata nel fondo. Se l'H₂S viene ridotto, esiste tuttavia una condizione acida nel fondo, anche se non osservabile e deve essere registrata come tale.⁸

Ai fini dell'identificazione, i microrganismi devono essere in coltura pura. Per l'identificazione finale, è necessario eseguire test morfologici, biochimici e/o sierologici. Per informazioni dettagliate e procedure raccomandate, consultare la documentazione appropriata.⁵⁻¹⁰

XII PERFORMANCE

Prima della spedizione, vengono testate le performance di tutti i lotti di slant Kligler Iron Agar. Campioni rappresentativi del lotto vengono testati con colture in **Trypticase** Soy Agar di *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) e *Shigella flexneri* (ATCC 12022), strisciando lo slant e penetrando in profondità con un ago da inoculo. Le provette vengono incubate con i tappi non completamente avvitati a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ ed esaminate dopo 18 – 24 h per verificare la crescita e le reazioni. La crescita di tutti i microrganismi è moderata – intensa. Lo slant della provetta inoculata con *E. coli* presenta una

reazione acida, mentre gli slant di tutte le altre provette inoculate sono alcalini. *S. flexneri* produce una reazione acida nel fondo e *P. aeruginosa* una reazione alcalina. *E. coli* produce a sua volta acido e gas nel fondo.

Salmonella Typhimurium produce una reazione acida nel fondo con annerimento del terreno; può essere presente gas.

XIII DISPONIBILITÀ

N. di cat.	Descrizione
------------	-------------

220896	BD BBL Kligler Iron Agar Slants, confezione da 10 provette di misura K
--------	--

220897	BD BBL Kligler Iron Agar Slants, cartone da 100 provette di misura K
--------	--

XIV BIBLIOGRAFIA

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. Tenover. 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.

Assistenza e supporto tecnico BD Diagnostics: rivolgersi al rappresentante locale BD o visitare il sito 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.