

PROCEDIMENTOS DE CONTROLO DE QUALIDADE

I INTRODUÇÃO

O Ágar de ferro de Kligler ajuda na diferenciação de bacilos entéricos Gram-negativos com base na sua capacidade de fermentação da dextrose e lactose e produção de sulfuretos.

II PROCEDIMENTO DO TESTE DE DESEMPENHO

1. Inocule as amostras representativas com as culturas listadas abaixo.
 - a. Utilizando uma agulha de inoculação, inocule os tubos, fazendo riscas na superfície do ágar inclinado, para trás e para a frente, e perfurando o fundo do ágar, com culturas em **Trypticase Soy Agar** inclinado com 18 a 24 h.
 - b. Incube os tubos com as tampas desapertadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, numa atmosfera aeróbia.
2. Examine os tubos após 18 a 24 h, verificando se existe crescimento e se ocorreram reacções.
3. Resultados esperados

	Superfície inclinada do ágar	Fundo do ágar	Gás	H ₂ S
* <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Ácida	Ácida	+	–
* <i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>enterica</i> serótipo Typhimurium ATCC 14028	Alcalina	Ácida	+/-	+
* <i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	Alcalina	Ácida	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Alcalina	Alcalina	–	–

*Estirpe do microrganismo recomendada para o controlo de qualidade do utilizador.

III CONTROLO DE QUALIDADE ADICIONAL

1. Examine os tubos, conforme descrito na secção "Deterioração do produto".
2. Examine visualmente os tubos representativos, para assegurar que eventuais defeitos físicos não irão interferir com a utilização.
3. Determine o pH, através de potenciometria, à temperatura ambiente, para cumprimento da especificação de pH de $7,4 \pm 0,2$.
4. Incube os tubos representativos não inoculados entre 20 a 25°C e 30 a 35°C, e examine-os após 7 dias, verificando se existe contaminação microbiana.

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO

IV UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O Ágar de ferro de Kligler ajuda na diferenciação de membros da família *Enterobacteriaceae* com base na sua capacidade para fermentar a dextrose e a lactose e produzir sulfuretos.

V RESUMO E EXPLICAÇÃO

Em 1911, Russell descreveu um novo meio em tubo com dois açúcares para isolamento de bacilos tifóides na urina e fezes.¹ Seis anos mais tarde, Kligler desenvolveu um meio de acetato de chumbo simples para diferenciação entre os grupos tifóide e paratifóide.² Subsequentemente, Kligler avaliou os meios de cultura utilizados para isolamento e diferenciação de bacilos tifóides, da disenteria e de outros bacilos semelhantes, tendo aprovado o meio de Russell.³ Bailey e Lacey substituíram o vermelho de fenol pelo indicador Andrade, previamente utilizado como indicador de pH.⁴

A formulação actual do Ágar de ferro Kligler combina as características do meio de acetato de chumbo de Kligler com o ágar com dois açúcares de Russell.

VI PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O Ágar de ferro de Kligler, além da caseína e das peptonas de carne, contém lactose e dextrose que permitem diferenciar as espécies de bacilos entéricos devido às alterações de cor do indicador de pH vermelho de fenol em resposta ao ácido produzido durante a fermentação destes açúcares. A concentração da dextrose corresponde a apenas 10% da concentração de lactose. A combinação do citrato de amónio férrico com tiosulfato de sódio permite detectar a produção de ácido sulfídrico.

As bactérias não fermentadoras de lactose (p. ex., *Salmonella* e *Shigella*) produzem inicialmente uma cor amarela na superfície do ágar inclinado pela fermentação da pequena quantidade de dextrose. Quando a dextrose se esgota no ambiente aeróbio da superfície inclinada do ágar, a reacção reverte para alcalina (superfície inclinada vermelha) devido à oxidação dos ácidos. Esta reversão não ocorre no ambiente anaeróbio do fundo do ágar, que permanece ácido (amarelo). As bactérias fermentadoras de lactose produzem uma cor amarela na superfície inclinada e no fundo do ágar, uma vez que na superfície é produzida uma quantidade de ácido suficiente para manter um pH ácido em condições de aerobiose. No caso de microrganismos que não consigam fermentar qualquer um dos hidratos de carbono, todo o meio fica vermelho.

A produção de ácido sulfídrico é evidenciada por uma cor preta no fundo do ágar ou pela formação de um anel mais acima. A produção de gás (reacção aerogénica) é detectada por bolhas individuais ou pela divisão ou deslocamento do ágar.

VII REAGENTES

Kligler Iron Agar

Fórmula* aproximada por litro de água purificada

Digerido pancreático de caseína	10,0	g
Digerido péptico de tecidos animais	10,0	g
Lactose	10,0	g
Dextrose	1,0	g
Cloreto de sódio	5,0	g
Citrato de amónio férrico	0,5	g
Tiosulfato de sódio	0,5	g
Ágar	15,0	g
Vermelho de fenol	0,025	g

*Ajustada e/ou suplementada conforme necessário para cumprir os critérios do desempenho.

Advertências e Precauções

Para diagnóstico *in vitro*.

Os tubos com tampas apertadas devem ser abertos com cuidado, para evitar lesões devido a quebra do vidro.

Utilizar técnicas assépticas e cumprir as precauções estabelecidas contra perigos microbiológicos em todos os procedimentos. Após a utilização e antes de serem eliminados, esterilize em autoclave os tubos preparados, recipientes de amostras e outros materiais contaminados.

Instruções de armazenamento

Após a recepção, armazenar os tubos em local escuro entre 2 e 8°C. Evitar congelar ou aquecer excessivamente. Abrir apenas quando estiver pronto a utilizar. Minimizar a exposição à luz. Os tubos com meio que forem armazenados conforme indicado no rótulo até ao momento imediatamente anterior à sua utilização, podem ser inoculados até ao fim do prazo de validade e incubados durante os períodos de incubação recomendados. Antes da inoculação, deixar o meio aquecer até à temperatura ambiente.

Deterioração do produto

Não utilizar tubos que apresentem sinais de contaminação microbiana, descoloração, secagem ou outros sinais de deterioração.

VIII COLHEITA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

As amostras adequadas para cultura podem ser preparadas utilizando várias técnicas. Para obter informações pormenorizadas, consulte os textos apropriados.^{5,6} As amostras devem ser obtidas antes de serem administrados agentes antimicrobianos. Devem tomar-se as providências necessárias para a entrega imediata no laboratório.

IX PROCEDIMENTO

Material fornecido

Kligler Iron Agar Slants

Material necessário mas não fornecido

Meios de cultura auxiliares, reagentes, microrganismos de controlo da qualidade e equipamento laboratorial, conforme necessário.

Procedimento do teste

Utilize técnicas assépticas.

Para inocular, toque com cuidado apenas no centro de uma colónia isolada num meio em placa para bactérias entéricas com uma agulha fria estéril; perfure o fundo do ágar e, em seguida, faça riscas, para a frente e para trás, na superfície inclinada do ágar. Em cada uma das placas primárias devem ser estudadas em separado várias colónias, uma vez que poderão ocorrer infecções mistas.

Incube os tubos com as tampas desapertadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 18 a 24 h, numa atmosfera aeróbia.

Para aumentar a alcalinidade da superfície inclinada do ágar, a livre circulação de ar deverá ser permitida, não apertando totalmente a tampa dos frascos. Se a tampa do tubo estiver muito apertada, ocorrerá também uma reacção ácida na superfície inclinada do ágar (causada unicamente pela fermentação da dextrose).

Controlo de qualidade pelo utilizador

Consulte "Procedimentos do controlo de qualidade".

Os requisitos do controlo de qualidade devem ser efectuados de acordo com os regulamentos ou requisitos de acreditação europeus e/ou nacionais aplicáveis e com os procedimentos padrão de controlo de qualidade do seu laboratório. É recomendado que o utilizador consulte as normas do CLSI e os regulamentos da CLIA que dizem respeito a este assunto, para obter orientações sobre práticas de controlo de qualidade apropriadas.

Deverá ser utilizado um único eléctrodo de tamanho suficientemente pequeno que caiba nos tubos para determinar o pH, através de potenciometria, dos meios em tubo. A ponta do eléctrodo deve estar posicionada na zona central da superfície do ágar num meio sólido.

X RESULTADOS

Após a incubação, registe a reacção ocorrida na superfície inclinada e no fundo do ágar, verificando se ocorreu formação de gás e produção de ácido sulfídrico.

Reacções típicas produzidas por membros da família *Enterobacteriaceae* (maioria das espécies no género particular):⁷

	Superfície inclinada do ágar	Fundo do ágar	Gás	H ₂ S
<i>Citrobacter</i>	Alcalina	Ácida	+	+ ou -
<i>Edwardsiella</i>	Alcalina	Ácida	+	+
<i>Escherichia coli</i>	Ácida	Ácida	+	-
<i>Enterobacter</i>	Ácida*	Ácida	+	-
<i>Morganella</i>	Alcalina	Ácida	±	-
<i>Proteus</i>	Alcalina ou ácida	Ácida	+	+
<i>Providencia</i>	Alcalina	Ácida	±	-
<i>Salmonella</i>	Alcalina	Ácida	+	+
<i>Shigella</i>	Alcalina	Ácida	-	-

*Poderá reverter para alcalina, mesmo através da fermentação da lactose (*E. aerogenes*).

Consulte os textos apropriados para obter mais informações.⁵⁻¹⁰

XI LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Os microrganismos produtores de ácido sulfídrico podem produzir uma quantidade tão elevada de precipitado negro, sulfureto ferroso, ao ponto de a acidez produzida no fundo do ágar ser completamente mascarada. No entanto, se o H₂S for reduzido, ocorrerá uma reacção ácida no fundo do ágar, mesmo que não seja observável, e deve ser registada como tal.⁸

Para a identificação, os microrganismos devem ser uma cultura pura. Para uma identificação final, devem ser efectuados testes morfológicos, bioquímicos e/ou serológicos. Para obter informações pormenorizadas e sobre os procedimentos recomendados, consulte os textos apropriados.⁵⁻¹⁰

XII CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

Antes de serem comercializados, todos os lotes de Kligler Iron Agar Slants são testados relativamente às características do desempenho. As amostras representativas do lote são testadas através da inoculação, fazendo riscas sobre o ágar inclinado e perfurando o fundo com uma agulha de inoculação, com culturas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) e *Shigella flexneri* (ATCC 12022) em **Trypticase Soy Agar**. Os tubos são incubados com as tampas desapertadas a 35 ± 2 °C, e devem ser lidos após 18 a 24 h, verificando se existe crescimento e se ocorreram reacções. O crescimento de todos os microrganismos é moderado a intenso. A superfície inclinada do ágar do tubo inoculado com *E. coli* mostra uma reacção ácida, enquanto que as superfícies de todos os outros tubos inclinados são alcalinas. O *S. flexneri* produz uma reacção ácida no fundo do ágar, mas a *P. aeruginosa* produz uma reacção alcalina. A *E. coli* produz uma reacção ácida e gás no fundo do ágar. A *Salmonella* Typhimurium produz uma reacção ácida no fundo do ágar associada ao escurecimento do meio; o gás poderá ou não estar presente.

XIII APRESENTAÇÃO

N.º de cat.	Descrição
220896	BD BBL Kligler Iron Agar Slants, emb. com 10 tubos K
220897	BD BBL Kligler Iron Agar Slants, caixa com 100 tubos 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. 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.

Assistência Técnica e Suporte da BD Diagnostics: contacte o representante local da BD ou visite 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.