

PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD

I INTRODUCCION

Kligler Iron Agar (agar Kligler hierro) favorece la diferenciación de los bacilos entéricos gram negativos sobre la base de su capacidad de fermentar dextrosa y lactosa y producir sulfuro.

II REALIZACION DEL PROCEDIMIENTO DE ANALISIS

1. Inocular muestras representativas con los cultivos enumerados a continuación.
 - a. Inocular en los tubos cultivos de agar inclinado de soja **Trypticase** de 18 a 24 h, con una aguja de inoculación insertada en la base y extendiendo la muestra en ambas direcciones por la superficie del agar inclinado.
 - b. Incubar los tubos con las tapas flojas a 35 ± 2 °C en una atmósfera aerobia.
2. Examinar si los tubos después de 18 – 24 h muestran indicios de crecimiento y reacciones.
3. Resultados previstos

	Agar inclinado	Base	Gas	H ₂ S
* <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Ácida	Ácida	+	–
* <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Typhimurium ATCC 14028	Alcalino	Ácida	+/-	+
* <i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	Alcalino	Ácida	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Alcalino	Alcalina	–	–

*Cepa de organismo recomendada para control de calidad del usuario.

III CONTROL DE CALIDAD ADICIONAL

1. Examinar los tubos como se describe en la sección “Deterioro del producto”.
2. Examinar visualmente los tubos representativos para asegurarse de que los defectos físicos existentes no interfieran con el uso.
3. Determinar el pH potenciométricamente a temperatura ambiente para verificar el cumplimiento de la especificación de $7,4 \pm 0,2$.
4. Incubar tubos representativos sin inocular a una temperatura de 20 – 25 °C y 30 – 35 °C y examinar después de 7 días en busca de contaminación microbiana.

INFORMACION DEL PRODUCTO

IV USO PREVISTO

Kligler Iron Agar se utiliza para la diferenciación de los miembros de la especie *Enterobacteriaceae* sobre la base de su capacidad de fermentar dextrosa y lactosa y para producir sulfuro.

V RESUMEN Y EXPLICACION

En 1911, Russell describió un nuevo medio en tubo de azúcar doble para el aislamiento de bacilos tifoideos de muestras de orina y heces¹. Seis años más tarde, Kligler desarrolló un medio de acetato de plomo sencillo para la diferenciación del grupo de tifoidea-paratifoidea.² Posteriormente, Kligler evaluó el medio de cultivo utilizado para el aislamiento y diferenciación de la tifoidea, disentería y bacilos afines y respaldó el medio de Russell³. Bailey y Lacey sustituyeron el rojo fenol por el indicador Andrade anteriormente utilizado como indicador de pH⁴.

La fórmula actual de Kligler Iron Agar combina las características del medio de acetato de plomo de Kligler con las del agar de azúcar doble de Russell.

VI PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Kligler Iron Agar, además de caseína y peptonas de carne, contiene lactosa y dextrosa, que permiten la diferenciación de las especies de bacilos entéricos según el cambio de color del indicador de pH rojo fenol como respuesta al ácido producido durante la fermentación de estos azúcares. La concentración de dextrosa es de sólo el 10% de la concentración de lactosa. La combinación de citrato férrico amónico y tiosulfato sódico permite detectar la producción de ácido sulfhídrico.

Los organismos no fermentadores de lactosa (por ejemplo, *Salmonella* y *Shigella*) al principio producen un agar inclinado de color amarillo debido al ácido producido por la fermentación de la pequeña cantidad de dextrosa. Cuando el suministro de dextrosa se agota en el entorno aerobio del agar inclinado, la reacción vuelve a ser alcalina (agar inclinado de color rojo) debido a la oxidación de los ácidos. Dicho cambio no ocurre en el entorno anaerobio en la base, que sigue siendo ácido (base de color amarillo). La fermentación de lactosa produce agares inclinados y bases de color amarillo porque se produce suficiente ácido en el agar inclinado para mantener un pH ácido en condiciones aerobias. Los organismos incapaces de fermentar ninguno de los carbohidratos producen agares inclinados y bases de color rojo.

La producción de ácido sulfhídrico se demuestra por un color negro por todo la base, o en la formación de un anillo cerca de la parte superior de la base. La producción de gas (reacción aerogénica) se detecta en forma de burbujas individuales o mediante la división o desplazamiento del agar.

VII REACTIVOS

Kligler Iron Agar

Fórmula aproximada* por litro de agua purificada

Digerido pancreático de caseína	10,0	g
Digerido péptico de tejido animal	10,0	g
Lactose	10,0	g
Dextrosa	1,0	g
Cloruro sódico	5,0	g
Citrato férrico de amonio	0,5	g
Tiosulfato sódico	0,5	g
Agar	15,0	g
Rojo fenol	0,025	g

*Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Los tubos con tapas ajustadas deben abrirse con cuidado para evitar lesiones por la rotura del vidrio.

Emplear una técnica aséptica y seguir las precauciones habituales contra riesgos microbiológicos durante todo el proceso. Después de su utilización, los tubos preparados, los recipientes de muestras y otros materiales contaminados deben esterilizarse en autoclave antes de ser desechados.

Instrucciones para el almacenamiento

Al recibir los tubos, almacenarlos en un lugar oscuro a 2 – 8 °C. No congelar ni sobrecalentar. No abrir hasta que vayan a utilizarse. Reducir al mínimo la exposición a la luz. Los medios en tubos almacenados como se indica en sus etiquetas hasta momentos antes de su utilización pueden ser inoculados hasta la fecha de caducidad e incubados durante los períodos recomendados de incubación. Dejar que el medio se caliente a temperatura ambiente antes de la inoculación.

Deterioro del producto

No utilizar los tubos si muestran evidencia de contaminación microbiana, decoloración, deshidratación o cualquier otro signo de deterioro.

VIII RECOGIDA Y MANIPULACION DE LAS MUESTRAS

Las muestras adecuadas para cultivo pueden manipularse mediante diversas técnicas. Para obtener información detallada, consultar los textos correspondientes^{5,6}. Las muestras deben obtenerse antes de que se hayan administrado los agentes antimicrobianos. Deben adoptarse las medidas necesarias para un transporte inmediato al laboratorio.

IX PROCEDIMIENTO

Material suministrado

Kligler Iron Agar Slants

Materiales necesarios pero no suministrados

Medios de cultivo auxiliar, reactivos, organismos para el control de calidad y el equipo de laboratorio que se requiera.

Procedimiento de análisis

Emplear técnicas asépticas.

Para inocular, tocar con cuidado sólo el centro de una colonia aislada en un medio en placa entérico con una aguja estéril fría, insertarla en el medio en la base del tubo y luego extender la muestra en ambas direcciones por la superficie del agar inclinado. Se deben estudiar por separado varias colonias de cada placa primaria, dado que pueden ocurrir infecciones mixtas.

Incubar los tubos con las tapas flojas durante 18 – 24 h a 35 ± 2 °C en una atmósfera aerobia.

Para aumentar la alcalinidad del agar inclinado, debe permitirse la libre circulación de aire mediante el uso de un cierre flojo. Si el tubo está cerrado herméticamente, una reacción ácida (causada sólo por la fermentación de dextrosa) también afectará al agar inclinado.

Control de calidad del usuario

Véase "Procedimientos de control de calidad".

El control de calidad debe llevarse a cabo conforme a la normativa local y/o nacional, a los requisitos de los organismos de acreditación y a los procedimientos estándar de control de calidad del laboratorio. Se recomienda consultar las instrucciones de CLSI y normativas de CLIA correspondientes para obtener información acerca de las prácticas adecuadas de control de calidad.

Se debería utilizar un electrodo suficientemente pequeño como para entrar en los tubos para determinar el pH potenciométricamente de los medios en tubos. En los medios sólidos, la punta del electrodo debería estar colocada en la parte central de la masa de agar.

X RESULTADOS

Después de la incubación, registrar la reacción en el agar inclinado y la base del tubo, reseñando la formación de gas y producción de ácido sulfhídrico.

Las reacciones habituales producidas por los miembros de *Enterobacteriaceae* (mayoría de las especies en el género determinado):⁷

	Agar inclinado	Base	Gas	H ₂ S
<i>Citrobacter</i>	Alcalino	Ácido	+	+ o –
<i>Edwardsiella</i>	Alcalino	Ácido	+	+
<i>Escherichia coli</i>	Ácido	Ácido	+	–
<i>Enterobacter</i>	Ácido*	Ácido	+	–
<i>Morganella</i>	Alcalino	Ácido	±	–
<i>Proteus</i>	Alcalino o ácido	Ácido	+	+
<i>Providencia</i>	Alcalino	Ácido	±	–
<i>Salmonella</i>	Alcalino	Ácido	+	+
<i>Shigella</i>	Alcalino	Ácido	–	–

*Puede volver a alcalino a pesar de la fermentación de lactosa (*E. aerogenes*).

Para más información, consultar los textos apropiados⁵⁻¹⁰.

XI LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Los organismos que generan ácido sulfhídrico pueden producir tanta precipitación de color negro (sulfuro ferroso) que enmascare la acidez producida en la base del tubo. No obstante, si se reduce el H₂S, una condición ácida existe en la base del tubo, aunque no pueda detectarse visualmente y debe registrarse como tal⁸.

Para su identificación, los organismos deben encontrarse en un cultivo puro. Deben llevarse a cabo pruebas morfológicas, bioquímicas y/o serológicas para lograr una identificación final. Consultar los textos correspondientes para obtener información detallada y procedimientos recomendados⁵⁻¹⁰.

XII CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Antes de su lanzamiento al mercado, todos los lotes de Kligler Iron Agar Slants se someten a prueba para determinar sus características de rendimiento. Se analizan muestras representativas del lote con cultivos de agar de soja **Trypticase** de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028) y *Shigella flexneri* (ATCC 12022) extendiendo la muestra en el agar inclinado e insertando una aguja de inoculación en la base del tubo. Los tubos se incuban con las tapas flojas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ y se efectúa la lectura después de 18 – 24 h para determinar el crecimiento y las reacciones. El crecimiento de todos los organismos es de moderado a denso. El agar inclinado del tubo inoculado con *E. coli* muestra una reacción ácida, mientras que los agares inclinados de todos los demás tubos inoculados son alcalinos. *S. flexneri* produce una reacción ácida en la base del tubo y *P. aeruginosa*, una reacción alcalina. *E. coli* produce ácido y gas en la base del tubo. *Salmonella Typhimurium* produce una reacción ácida en la base del tubo, además de un oscurecimiento del medio; puede o no detectarse la presencia de gas.

XIII DISPONIBILIDAD

Nº de cat.	Descripción
220896	BD BBL Kligler Iron Agar Slants, pqt. de 10 tubos de tamaño K
220897	BD BBL Kligler Iron Agar Slants, caja de 100 tubos de tamaño K

XIV REFERENCIAS

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.

Servicio técnico de BD Diagnostics: póngase en contacto con el representante local de BD o 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.