

PROCEDURE DI CONTROLLO DI QUALITÀ

I INTRODUZIONE

BBL Lysine Iron Agar (agar al ferro e lisina) è un terreno differenziale usato nell'identificazione di bacilli enterici.

II PROCEDURA DEL TEST

1. Inoculare i campioni rappresentativi con le colture sotto elencate.
 - a. Inoculare i campioni con un ago da inoculo penetrando in profondità e strisciando lo slant. Usare diluizioni 10^{-1} di colture di 18 – 24 h di **Trypticase Soy Broth** dei microrganismi sotto elencati.
 - 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	Fondo	H ₂ S
* <i>Salmonella enterica</i> <i>ssp. arizonae</i> ATCC 13314	Alcalino (porpora)	Alcalina (porpora)	+
* <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8454	Alcalino (porpora)	Acido (giallo)	+ oppure –
* <i>Proteus vulgaris</i> ATCC 9484	Rosso	Acido (giallo)	–

*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. 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 Lysine Iron Agar** è usato per la differenziazione di microrganismi enterici in base alla capacità di decarbossilare o deaminare la lisina e formare acido solfidrico.

V SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Edwards e Fife concepirono l'agar al ferro e lisina per la rilevazione di colture di *Arizona* (ora *Salmonella enterica ssp. arizonae*), soprattutto quelle caratterizzate da fermentazione rapida del lattosio.¹ Questo sviluppo seguì di poco la compilazione, da parte di Ewing ed Edwards, di uno schema tassonomico per le *Enterobacteriaceae*, che comprendeva la definizione della principale divisione e i gruppi all'interno di questa famiglia, nonché la descrizione delle procedure di differenziazione.² I vari criteri di identificazione delle colture vennero riassunti da Edwards ed Ewing nel loro trattato sulle *Enterobacteriaceae*.³ Negli ultimi anni, la tassonomia delle *Enterobacteriaceae* è tuttavia cambiata in modo significativo.⁴⁻⁶

Johnson et al. hanno utilizzato l'agar al ferro e lisina e l'agar al ferro Kligler per la differenziazione primaria di gruppi all'interno della famiglia delle *Enterobacteriaceae* e una combinazione dell'agar al ferro e lisina con l'agar al ferro e tre zuccheri per l'identificazione di ceppi di *Salmonella*, *Shigella* e *Arizona* spp. dalle feci.⁷

Il terreno **BBL Lysine Iron Agar** facilita la differenziazione di bacilli enterici in base alla capacità di decarbossilare e deaminare la lisina e produrre acido solfidrico, ed è concepito per l'uso con altri terreni (es. agar al ferro e tre zuccheri) in procedure di identificazione appropriate.

VI PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Il destrosio funge da fonte di carboidrato fermentabile. L'indicatore di pH, porpora di bromocresolo, vira al giallo a pH pari o inferiore a 5,2 ed è porpora a pH pari o superiore a 6,8.⁸ Il citrato ferrico di ammonio e il tiosolfato di sodio sono indicatori della formazione di acido solfidrico. La lisina è il substrato usato nella rilevazione degli enzimi, lisina decarbossilasi e lisina deaminasi.

Le colture di bacilli enterici che producono acido solfidrico provocano l'annerimento del terreno a causa della formazione di solfuri ferrosi. I microrganismi che producono lisina decarbossilasi sviluppano una reazione alcalina (color porpora) o neutra nel fondo del terreno, mentre quelli che deaminano la lisina causano lo sviluppo di una colorazione rossa nello slant su fondo acido. È possibile che vi sia sviluppo di gas, sebbene tale fenomeno sia spesso irregolare o soppresso.

VII REAGENTI

Lysine Iron Agar

Formula approssimativa* per L di acqua purificata

Digerito pancreatico di gelatina	5,0	g
Estratto di lievito	3,0	g
Destrosio	1,0	g
L-lisina	10,0	g
Citrato ferrico di ammonio	0,5	g
Tiosolfato di sodio	0,04	g
Porpora di bromocresolo	0,02	g
Agar	13,5	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 aseptiche e seguire le precauzioni standard contro i rischi microbiologici. Prima dello smaltimento, sterilizzare in autoclave le provette preparate, i contenitori dei campioni e gli altri materiali contaminati.

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.^{9,10} Raccogliere i campioni prima della somministrazione di antibiotici. Predisporre una consegna tempestiva al laboratorio.

IX PROCEDURA

Materiale fornito

Lysine 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 aseptiche.

Usando un ago da inoculo, penetrare in profondità due volte, quindi strisciare lo slant con la crescita da una coltura pura. Incubare le provette – con i tappi non completamente avvitati – a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, per 18 – 48 h, in aerobiosi.

Inoculare gli agar slant al ferro e tre zuccheri in parallelo, a meno che non si siano già ottenuti i risultati di questo terreno per differenziare – per esempio – i coliformi da Shigella.

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.

X RISULTATI

La decarbossilazione della lisina è evidenziata nel fondo da una reazione alcalina (porpora). La deaminazione della lisina è rilevata dalla colorazione rossa dello slant. La produzione di acido solfidrico è rilevata dalla formazione di precipitato nero. Una reazione negativa (slant porpora e fondo giallo) indica la fermentazione del solo destrosio.⁸

È possibile che l'acido solfidrico non venga rilevato in questo terreno dai microrganismi negativi per l'attività della lisina decarbossilasi poiché la produzione dell'acido nel fondo ne può sopprimere la formazione.⁸ È per questa ragione che le specie *Proteus* produttrici di H_2S non anneriscono questo terreno.⁸

Reazioni tipiche dei membri della famiglia delle *Enterobacteriaceae*.

	Slant	Fondo	H_2S
Gruppo <i>Arizona</i>	Alcalina.....	Alcalina.....	+
		o Neutra	
<i>Salmonella enterica</i>	Alcalina.....	Acida.....	–
<i>ssp. enterica</i>			
sierotipo Paratyphi A			
Altre salmonella	Alcalina.....	Alcalina.....	+
<i>Shigella</i>	Alcalina	Acida.....	–
<i>Citrobacter</i>	Alcalina	Acida.....	+ oppure–
<i>Klebsiella</i>	Alcalina.....	Alcalina.....	–
	o Neutra	o Neutra	
<i>Escherichia</i>	Alcalina.....	Alcalina.....	–
		o Neutra*	
<i>Proteus</i>	Rosso.....	Acida.....	–
<i>Providencia</i>	Rosso.....	Acida.....	–

Legenda: Alcalina = color porpora • Acida = colore giallo • Neutra = color azzurrognolo-grigio

*Una reazione alcalina o neutra indica decarbossilazione.

XI LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

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.^{5,9,10}

XII PERFORMANCE

Prima della spedizione, vengono testate le performance di tutti i lotti di slant Lysine Iron Agar. Campioni rappresentativi del lotto vengono testati con colture in **Trypticase** Soy Broth o **Trypticase** Soy Broth diluite 10^{-1} di *Salmonella arizonae* (ATCC 13314), *Proteus vulgaris* (ATCC 9484) e *Citrobacter freundii* (ATCC 8454), penetrando in profondità e strisciando lo slant 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. *S. arizonae* decarbossila la lisina, come indicato dallo sviluppo di una reazione alcalina (color porpora) nello slant e nel fondo ed è positiva per la produzione di acido solfidrico, evidenziata dall'annerimento del terreno.

P. vulgaris deamina la lisina, come indicato da una reazione di colore rosso nello slant e acida nel fondo (colore giallo) ed è negativa per la produzione di acido solfidrico. *C. freundii* è negativa sia per la deaminazione che per la decarbossilazione della lisina, con conseguente reazione alcalina

nello slant e acida nel fondo (colore giallo), a indicare la fermentazione del destrosio e può produrre o meno acido solfidrico.

XIII DISPONIBILITÀ

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

220952	BD BBL Lysine Iron Agar Slants, confezione da 10 provette di misura K
220953	BD BBL Lysine Iron Agar Slants, cartone da 100 provette di misura K
297700	BD BBL Lysine Iron Agar Slants, cartone da 100 provette di misura D

XIV BIBLIOGRAFIA

1. Edwards, P.R., and M.A. Fife. 1961. Lysine-Iron Agar in the detection of *Arizona* cultures. *Appl. Microbiol.* 9:478-480.
2. Ewing, W.H., and P.R. Edwards. 1960. The principal divisions and groups of *Enterobacteriaceae* and their differentiation. *Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon.* 10:1-12.
3. Edwards, P.R., and W.H. Ewing. 1962. Identification of *Enterobacteriaceae*, Burgess Publishing Co., Minneapolis.
4. Ewing, W.H. 1986. Edwards and Ewing's identification of *Enterobacteriaceae*, 4th ed. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.
5. 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.
6. Farmer, J.J., III. 1999. *Enterobacteriaceae*: introduction and identification, p. 442-458. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
7. Johnson, J.G., L.J. Kunz, W. Barron, and W.H. Ewing. 1966. Biochemical differentiation of the *Enterobacteriaceae* with the aid of Lysine-Iron-Agar. *Appl. Microbiol.* 14:212-217.
8. MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation- identification-maintenance of medical bacteria, vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore.
9. 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.
10. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.

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.