



## ANVÄNDNINGSSINSTRUKTIONER

**KLIGLER IRON AGAR**

## Dehydrerat odlingsmedium



Kligler Iron Agar

Från vänster: icke-inokulerat rör, *E. coli*,**1 – AVSEDD ANVÄNDNING**

*In vitro*-diagnostik. För differentiering av *Enterobacteriaceae*, baserat på sockerfermentering och svavelväteproduktion.

**2 – TYPISK SAMMANSÄTTNING \***

(EFTER REKONSTITUERING MED 1 LITER VATTEN)

|                    |          |
|--------------------|----------|
| Nötköttextrakt     | 3,000 g  |
| Jästextrakt        | 3,000 g  |
| Peptokomplex       | 20,000 g |
| Laktos             | 10,000 g |
| Glukos             | 1,000 g  |
| Järnammونیumcitrat | 0,500 g  |
| Natriumtiosulfat   | 0,300 g  |
| Natriumklorid      | 5,000 g  |
| Fenolrött          | 0,025 g  |
| Agar               | 11,700 g |

\*Formeln kan justeras och/eller kompletteras för att uppfylla de erforderliga prestandakriterierna.

**3 – METODENS PRINCIP OCH FÖRKLARING AV FÖRFARANDET**

Formuleringen av Kligler-järnagarmedium baseras på flera mikrobiologers försök att utveckla ett medium som underlättar identifieringen av gramnegativa baciller i tarmen. År 1911 utvecklade Russell<sup>1</sup> ett dubbel sockerrörsmedium för att skilja tyfusbaciller från urin och avföring. År 1917 rapporterade Kligler<sup>2</sup> om användningen av blyacetat för att detektera produktion av vätesulfid. År 1918 kombinerade Kligler<sup>3</sup> användningen av blyacetat med Russells dubbla sockerarag för samtidig differentiering av tyfus, dysenteri och besläktade baciller. Bailey och Lacy<sup>4</sup> förenklade formeln genom att använda fenolrött som pH-indikator istället för Andrade-indikator. Den nuvarande formuleringen av Kligler Iron Agar kombinerar egenskaper från alla de differentiella medier som beskrivs ovan.

Kligler Iron Agar (KIA) är avsett för differentiering av *Enterobacteriaceae*, odlade på primära isoleringsmedier, baserat på fermentering av glukos och laktos med produktion av syror och gas samt produktion av vätesulfid.<sup>5</sup>

Fermenteringen av de två sockerarterna kan ske både på ytan av slanten och i botten med eller utan närvaro av gas (CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>). När det gäller fermenteringen av sockerarter på KIA kan 3 reaktionsmodeller registreras:

1-jäsning av glukos; 2-jäsning av glukos och laktos; 3-ingen jäsning.

I det första fallet observeras efter 18–24 timmars inkubation en alkalisk reaktion på slanten och en sur reaktion i behållaren. Den fullständiga konsumtionen av glukos, som finns i en koncentration på 0,1 % på ytan, där aeroba förhållanden råder, efter 18–24 timmar inducerar oxidativ nedbrytning av peptoner, med produktion av ammoniak, alkalinitet och en röd färgförändring av fenolrött (omvändning av den sura-alkaliska reaktionen). I den anaeroba botten metaboliserar bakterierna dock glukosen och producerar ATP och pyruvat, som omvandlas till stabila sura slutprodukter med en färgförändring av indikatorn till gul (surt pH).

I det andra fallet fermenterar mikroorganismerna glukos och laktos: efter 18–24 timmars inkubation registreras en sur reaktion på skråtan och i botten. Detta beror på den höga koncentrationen av laktos: efter 18–24 timmar är nedbrytningen inte fullständig på ytan och därför sker ingen användning av peptoner och ingen omvändning av reaktionen.

I det tredje fallet registreras en alkalisk reaktion både på slanten och i botten. Detta beteende är inte typiskt för *Enterobacteriaceae* utan för vissa icke-enteriska, icke-fermenterande gramnegativa bakterier som kan utnyttja peptonerna för tillväxt (*Alcaligenes faecalis*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*). Om nedbrytningen av peptonerna är anaerob blir indikatorn röd (alkaliskt pH) både på ytan och i botten, om nedbrytningen är aerob sker ingen färgförändring av fenolrött i botten.

Järnsulfat är en indikator på bildandet av vätesulfid. Organismer som producerar tiosulfatreduktas orsakar frisättning av en sulfidmolekyl från natriumtiosulfat. Vätesulfiden reagerar med järnjoner i mediet och bildar järnsulfid, en svart olöslig fällning.

**4 – ANVISNINGAR FÖR BEREDNING AV MEDIUM**

Lös upp 54,5 g i 1 000 ml kallt renat vatten. Värm till kokpunkt under frekvent omrörning för att lösa upp helt. Fördela i rör med skruvlock och sterilisera genom autoklivering vid 121 °C i 15 minuter. Kyl i lutande läge för att få korta sluttningar och djupa bottenar.

**5 – FYSISKA EGENSKAPER**

Utseende på dehydratiserat medium

rosaaktigt, fint, homogent, fritt flytande pulver

Utseende på lösning och färdiga rör

Röd, klar

Slutligt pH vid 20–25 °C

7,4 ± 0,2

**6 – MEDFÖLJANDE MATERIAL – FÖRPACKNING**

| Produkt           | Typ                      | REF     | Förpackning   |
|-------------------|--------------------------|---------|---------------|
| Kligler Iron Agar | Dehydrerat odlingsmedium | 4015602 | 500 g (9,2 L) |

**7 – MATERIAL SOM KRÄVS MEN INTE TILLHANDAHÅLLS**

Autoklav och vattenbad, sterila nålar, rör med skruvlock, inkubator och laboratorieutrustning efter behov, kompletterande odlingsmedier och reagenser för fullständig identifiering av odlingen.

**8 – PROVER**

Kligler Iron Agar Medium är inte avsett för primär isolering från kliniska prover; det inokuleras med rena kolonier från en odling på fast medium, isolerade från kliniska prover eller annat material.





## 9 – TESTFÖRFARANDE

Med en inokuleringsnål plockar du mitten av en enskild ren koloni, inokulerar slutningen genom att först sticka nålen i botten, drar ut nålen och sedan stryker över slutningens yta. Lossa rörens lock före inkubation. Inkubera aerobt vid 35–37 °C i 18 till 24 timmar.

## 10 – AVLÄSNING OCH TOLKNING

Tre typer av data kan erhållas från reaktionerna.<sup>6</sup>

### Sockerjäsning

Sur (gul) botten, alkalisk (röd) slant: glukos fermenterad, laktos inte fermenterad.

Sur (gul) botten, sur (gul) slant: glukos och laktos fermenterade.

Alkalisk (röd) botten, alkalisk (röd) lutning: varken glukos eller laktos fermenterad.

### Gasproduktion

Förekomst av bubblor i botten. Vid stora mängder gas kan agaren spricka och förskjutas

### Produktion av vätesulfid

Svavelväteproduktion från tiosulfat indikeras av att burken blir svart till följd av reaktionen mellan H<sub>2</sub>S och järnjoner, vilket bildar svart järnsulfid. Bildning av H<sub>2</sub>S kräver en sur miljö; ibland blir burken helt svart; i sådana fall antas det att burkdelen av röret är sur (den gula färgen maskeras av H<sub>2</sub>S-produktionen)

Alla kombinationer av de reaktioner som beskrivs ovan kan observeras på trippelsocker-järnagar, därför är det viktigt att registrera resultaten av alla reaktioner (sockerjäsning, gasproduktion, H<sub>2</sub>S-produktion). Följande tabell, hämtad från MacFaddin<sup>7</sup> visar reaktionsmönstren för vissa *Enterobacteriaceae*.

| Mikroorganism                   | Lac             | Glu | Gas             | H <sub>2</sub> S |
|---------------------------------|-----------------|-----|-----------------|------------------|
| <i>Edwardsiella</i>             | -               | A   | +               | +                |
| <i>Escherichia coli</i>         | A <sup>1</sup>  | A   | V <sup>+</sup>  | -                |
| <i>Shigella</i>                 | V <sup>-3</sup> | A   | V <sup>-2</sup> | -                |
| <i>Klebsiella</i>               | A               | A   | +               | -                |
| <i>Enterobacter</i>             | V               | A   | V <sup>-6</sup> | -                |
| <i>Hafnia</i>                   | V <sup>-</sup>  | A   | V <sup>+</sup>  | -                |
| <i>Serratia</i>                 | V <sup>-</sup>  | A   | V <sup>-</sup>  | -                |
| <i>Morganella</i>               | -               | A   | V <sup>+</sup>  | -                |
| <i>Proteus mirabilis</i>        | -               | A   | +               | +                |
| <i>Proteus vulgaris</i>         | -               | A   | V <sup>7</sup>  | +                |
| <i>Salmonella</i>               | - <sup>4</sup>  | A   | V <sup>+</sup>  | + <sup>5</sup>   |
| <i>Salmonella arizonae</i>      | V <sup>+1</sup> | A   | +               | +                |
| <i>Citrobacter amalonaticus</i> | V               | A   | +               | -                |
| <i>Citrobacter diversus</i>     | V               | A   | +               | -                |
| <i>Citrobacter freundii</i>     | A <sup>1</sup>  | A   | +               | +                |
| <i>Yersinia</i>                 | -               | A   | V               | -                |

#### Anmärkningar

Lac: laktosfermentering; Glu: glukosfermentering; A: sur reaktion; V: variabel; V<sup>+</sup>: variabel, vanligtvis positiv; V<sup>-</sup>: variabel, vanligtvis negativ. 1: reaktionen kan vara fördröjd; 2: *S.flexneri* ser.6 gasproduktion positiv (svag mängd); 3: vanligtvis negativ förutom *S.sonnei* (sur reaktion kan vara fördröjd); 4: även om det är sällsynt finns det laktospositiva varianter av *S.Typhi*; 5: *S.Typhi* kan ha en ring av H<sub>2</sub>S men dess närvaro är inte diagnostisk. *S.Paratyphi A* kan vara svag om den är positiv; 6: *E.agglomerans* gasproduktion variabel; 7: om gas produceras, en liten mängd.

## 11 – ANVÄNDARENS KVALITETSKONTROLL

Alla tillverkade partier av produkterna släpps för försäljning efter att kvalitetskontrollen har utförts för att kontrollera att specifikationerna uppfylls. Slut användaren kan dock utföra sin egen kvalitetskontroll i enlighet med lokala tillämpliga bestämmelser, i enlighet med ackrediteringskrav och laboratoriets erfarenhet. Här nedan listas några teststammar som är användbara för kvalitetskontrollen.

| TESTSTAMMAR                     | INKUBATION (TEMPERATUR/ t / ATM) | FÖRVÄNTADE RESULTAT                                         |
|---------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| <i>E.coli</i> ATCC 25922        | 35–37 °C/18–24 timmar/A          | tillväxt, gul lutning, gul botten, gas + H <sub>2</sub> S - |
| <i>S.Typhimurium</i> ATCC 14028 | 35–37 °C/18–24 h/A               | tillväxt, röd lutning, gul botten, ga + H <sub>2</sub> S +  |

ATCC är ett varumärke som tillhör American Type Culture Collection

## 12 – PRESTANDAEGENSKAPER

Innan produkten släpps ut på marknaden testas ett representativt prov från alla partier av dehydrerad Kligler Iron Agar med avseende på prestandaegenskaper och resultaten jämförs med ett tidigare godkänt referensparti.

Rena kolonier odlade på Tryptone Soy Agar av 8 *Enterobacteriaceae*-stammar inokuleras i rören: *E.coli* ATCC 25922, *E.aerogenes* ATCC 13048, *M.morganii* kliniskt isolat, *C.freundii* ATCC 8090, *S.Enteritidis* NCTC 5188, *S.Typhimurium* ATCC 14028, *S.flexneri* ATCC 12022. Efter aerob inkubation vid 35–37 °C i 18–24 timmar observeras och registreras färgförändringar på slanten och i botten, gas- och H<sub>2</sub>S-produktion. Alla stammar uppvisar reaktivitet enligt specifikationerna för båda testade satserna.

## 13 – METODENS BEGRÄNSNINGAR

- Det är nödvändigt att inokulera mediet med en mikrobiologisk nål utan att bryta agaren (använd inte öglor).
- Utför avläsningen mellan 18 och 24 timmars inkubation; tidiga avläsningar kan ge falska surhetsresultat av typen A/A eller så finns det inte tillräckligt med tid för sockerjäsningen med påföljande färgförändring av indikatorn; försenade avläsningar kan ge falska K/K-resultat på grund av användningen av peptoner och alkalisk förändring av mediet.<sup>7</sup>
- H<sub>2</sub>S-produktion kan dölja den sura reaktionen i tunnan, men produktionen av H<sub>2</sub>S kräver sura förhållanden, därför måste tunnan betraktas som sur när den svartnar.
- Mediet innehåller inga hämmare, vilket innebär att en stor variation av mikroorganismer kan växa på det. Av denna anledning bör man före inokulering säkerställa att organismerna är katalaspositiva, gramnegativa baciller.<sup>7</sup>
- En ren odling är nödvändig vid inokulering av mediet. Om odlingen inte är ren kan oregelbundna resultat erhållas.<sup>7</sup>
- Vissa organismer, såsom *Klebsiella-Enterobacter*-gruppen, producerar så mycket gas att mediet kan trängas undan helt av gasen, vilket leder till att mediet blåses upp i locket. Om detta inträffar, hantera odlingen med försiktighet vid subodling för att undvika kontaminering.





- Se till att locken är lossade under inkubation, eftersom ett fritt luftutbyte är nödvändigt för att mediet ska fungera korrekt. Om locken är för tätt stängda uppstår en sur reaktion på slanten även i närvaro av glukosfermentering.<sup>7</sup>
- Om ingen reaktion observeras på slanten och i botten, kontrollera röret noggrant för att se om det finns tillväxt. Om det inte finns någon tillväxt har röret möjligen inte inokulerats korrekt. Om tillväxt förekommer, fortsätt med andra identifieringssystem för gramnegativa baciller.<sup>7</sup>
- Ibland uppvisar ett KIA-rör en gul slant och ingen färgförändring i botten. Detta kan bero på inokulering av en grampositiv stam eller på att botten inte har punkterats.<sup>7</sup>
- Det rekommenderas att biokemiska, immunologiska, molekylära eller masspektrometriska tester utförs på isolat från ren odling för fullständig identifiering. Om det är relevant, utför test av antimikrobiell känslighet.
- Detta odlingsmedium är avsett som ett hjälpmedel vid diagnos av infektionssjukdomar. Tolkningen av resultaten måste göras med hänsyn till patientens kliniska historia, provets ursprung och resultaten från andra diagnostiska tester.

#### 14 – FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER OCH VARNINGAR

- Det här är en produkt för kvalitativ *in vitro*-diagnostik, endast avsedd för professionellt bruk. Den ska användas av adekvat utbildad och kvalificerad laboratoriepersonal som iakttar godkända försiktighetsåtgärder mot biologiska risker och aseptiska tekniker.
- Uttorkade medier måste hanteras med lämpligt skydd. Konsultera säkerhetsdatabladet före användning.
- Detta odlingsmedium innehåller råmaterial av animaliskt ursprung. Kontroller av djuren *före* och *efter slakt* samt under produktions- och distributionscykeln för råvarorna kan inte helt garantera att denna produkt inte innehåller några överförbara patogener. Det rekommenderas därför att kulturmediet behandlas som potentiellt smittsamt och hanteras med iakttagande av de vanliga särskilda försiktighetsåtgärderna: förtär inte, andas inte in och undvik kontakt med hud, ögon eller slemhinnor. Ladda ner TSE Statement från webbplatsen [www.biolifeitaliana.it](http://www.biolifeitaliana.it), som beskriver de åtgärder som Biolife Italiana har vidtagit för att minska riskerna i samband med smittsamma djursjukdomar.
- Tillämpa god tillverkningssed vid beredningen av rörmedier.
- Alla laboratorieprover ska betraktas som smittsamma.
- Laboratorieområdet måste kontrolleras för att undvika föroreningar som odlingsmedium eller mikrobiella agens.
- Sterilisera allt biologiskt riskavfall innan det kasseras. Kassera det oanvända mediet och de steriliserade plattorna som inokulerats med prover eller mikrobiella stammar i enlighet med gällande lokal lagstiftning.
- Använd inte odlingsmediet som aktiv ingrediens i farmaceutiska preparat eller som produktionsmaterial avsett för konsumtion av människor och djur.
- Analyscertifikaten och säkerhetsdatabladet för produkten finns tillgängliga på webbplatsen [www.biolifeitaliana.it](http://www.biolifeitaliana.it).
- Meddela Biolife Italiana Srl ([complaint@biolifeitaliana.it](mailto:complaint@biolifeitaliana.it)) och berörda myndigheter om allvarliga incidenter som inträffar i samband med användningen av *in vitro*-diagnostiken.
- Informationen i detta dokument har definierats efter bästa kunskap och förmåga och utgör en riktlinje för korrekt användning av produkten men utan förpliktelse eller ansvar. I alla fall måste gällande lokala lagar, förordningar och standardförfaranden följas vid undersökning av prover som tagits från mänskliga och djuriska organ, miljöprover och produkter avsedda för konsumtion av människor eller djur. Vår information befriar inte våra kunder från deras ansvar att kontrollera att våra produkter är lämpliga för det avsedda ändamålet.

#### 15 – FÖRVARINGSFÖRHÅLLANDEN OCH HÅLLBARHET

Förvaras vid +10 °C / +30 °C på en torr plats, skyddad från direkt ljus. Vid korrekt förvaring kan produkten användas fram till utgångsdatum. Använd inte produkten efter detta datum. Undvik att öppna flaskan på fuktiga platser. Efter användning måste behållaren stängas ordentligt. Kassera produkten om behållaren och/eller locket är skadade, eller om behållaren inte är väl tillsluten, eller vid uppenbar försämring av pulvret (färgförändringar, hårdning, stora klumpar). Användaren ansvarar för tillverknings- och kvalitetskontrollprocesserna för beredda medier och för valideringen av de färdiga produkternas hållbarhetstid, i enlighet med den tillämpade förvaringsmetoden (temperatur och förpackning).

#### 16 – REFERENSER

1. Russell FF. The isolation of typhoid bacilli from urine and feces with the description of a new double sugar tube medium. J Med Res 1911; 25:21
2. Kligler IJ. A simple medium for the differentiation of members of the typhoid-paratyphoid group. Am J Public Health 1917; 7:1042-1044
3. Kligler IJ. Modification of culture media used in the isolation and differentiation of typhoid, dysentery, and allied bacilli. J Med Res 1917; 37:225.
4. Bailey Sadie F, Lacey GR. J. Bact. 1927; 13:82-189.
5. Atlas R. Parks LC. Handbook of Microbiological Media. 2nd edition CRC Press, 1997
6. Lehman D. Triple sugar iron agar protocols. American Society for Microbiology 2015.
7. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.

#### TABELL ÖVER TILLÄMPLIGA SYMBOLER

|                                                 |                                   |                                                                      |                                  |                |
|-------------------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------|----------------|
| <b>REF</b><br>ELLER <b>REF</b><br>Kataloanummer | <b>LOT</b><br>Batch-kod           | <b>IVD</b><br>Medicinteknisk produkt för <i>in vitro</i> -diagnostik | Tillverkare                      | Använd senast  |
| Temperaturbegränsning                           | Innehållet räcker till <n> tester | Se bruksanvisningen                                                  | Förvara skyddat från direkt ljus | Förvaras torrt |

#### REVIDERINGSHISTORIK

| Version      | Beskrivning av ändringarna                                                                       | Datum   |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Revidering 1 | Uppdaterad layout och innehåll                                                                   | 2020/06 |
| Revidering 2 | Uppdatering av "försiktighetsåtgärder och varningar" och "förvaringsförhållanden och hållbarhet" | 2022/02 |
| Revidering 3 | Justering av formel                                                                              | 2022/10 |
| Revidering 4 | Borttagning av föråldrad klassificering                                                          | 2023/04 |

Anmärkning: mindre typografiska, grammatiska och formateringsändringar inkluderas inte i granskningshistoriken.

