

ISTRUZIONI PER L'USO

KLIGLER IRON AGAR

Terreno di coltura in polvere


 Kligler Iron Agar:
da sinistra, terreno non inoculato, *E.coli*, *S.Typhimurium*.

1 - DESTINAZIONE D'USO

 Diagnostico *in vitro*. Terreno per la differenziazione dei membri della famiglia delle *Enterobacteriaceae*, per mezzo dei test della fermentazione degli zuccheri e della produzione di idrogeno solforato.

2 - FORMULA TIPICA

(PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA)*

Estratto di carne	3,000 g
Estratto di lievito	3,000 g
Peptocomplex	20,000 g
Lattosio	10,000 g
Glucosio	1,000 g
Ferro ammonio citrato	0,500 g
Sodio tiosolfato	0,300 g
Sodio cloruro	5,000 g
Rosso fenolo	0,025 g
Agar	11,700 g

* Il terreno può essere compensato e/o corretto per adeguare le sue prestazioni alle specifiche

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

La formulazione del Kligler Iron agar si basa sui tentativi di numerosi microbiologi agli inizi del '900 di sviluppare un terreno per l'identificazione dei bacilli enterici Gram-negativi. Nel 1911, Russell¹ descrisse un terreno con due zuccheri per la differenziazione dei bacilli tifoidi isolati da urina e feci. nel 1917 Kligler² riportò l'uso dell'acetato di piombo per rilevare la produzione di idrogeno solforato. Nel 1918 Kligler³ combinò l'uso dell'acetato di piombo con l'agar al doppio zucchero di Russel per la differenziazione simultanea di bacilli tifoidi, dissenterici e bacilli similari. Bailey e Lacy⁴ semplificarono la formula, usando il rosso fenolo come indicatore di pH anziché l'indicatore Andrade. L'attuale formulazione di Kligler Iron Agar combina le caratteristiche dei terreni differenziali sopra descritti.

Kligler Iron Agar (KIA) è impiegato per la differenziazione delle colonie delle *Enterobacteriaceae*, per mezzo dei test della fermentazione del glucosio e del lattosio e della produzione di idrogeno solforato. La fermentazione degli zuccheri presenti può avvenire sia sulla superficie del becco di clarino sia in profondità con o senza presenza di gas (CO₂ + H₂).

Per quanto riguarda la fermentazione degli zuccheri su KIA si possono registrare tre modelli di reazione:

1-fermentazione del glucosio, 2-fermentazione del glucosio e del lattosio, 3-nessuna fermentazione

Nel primo caso dopo 18-24 ore di incubazione si osserva una reazione alcalina sullo slant e una reazione acida in profondità. L'utilizzazione completa del glucosio, presente alla concentrazione dello 0,1%, in superficie dove esistono condizioni aerobiche, dopo 18-24 ore induce un attacco catabolico dei peptoni da parte dei microrganismi con produzione di ione ammonio, alcalinità e viraggio del rosso fenolo verso il rosso (reversione della reazione da acida ad alcalina). In profondità, invece, dove esistono condizioni anaerobiche si registra unicamente una fermentazione del glucosio a prodotti acidi stabili con conseguente viraggio dell'indicatore verso il giallo (pH acido). Nel secondo caso, quando siano presenti microrganismi che fermentano entrambi i carboidrati, si registra dopo 18-24 ore di incubazione una reazione acida in superficie ed in profondità. Ciò è dovuto alla elevata concentrazione del lattosio: dopo 18-24 ore non è ancora terminata in superficie la sua degradazione e quindi non si ha alcun attacco dei peptoni e quindi nessuna reversione della reazione. Nel terzo modello si registra una reazione alcalina sia in superficie che in profondità. Questo comportamento non è tipico delle *Enterobacteriaceae* ma di alcuni batteri Gram-negativi non enterici presenti nell'intestino che non fermentano né il glucosio né il lattosio ma possono degradare i peptoni (*Alcaligenes faecalis*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*). Se la degradazione dei peptoni è anaerobica si ha un viraggio dell' indicatore verso il rosso (pH alcalino) sia in superficie che in profondità, se la degradazione è aerobica, in profondità non c'è alcun cambiamento di colore del terreno. Su KIA si può osservare anche la produzione di acido solfidrico a partire dal sodio tiosolfato quando l'ambiente sia acido. Esso è evidenziato da un apposito indicatore, il ferro solfato, che in presenza di H₂S precipita sotto forma di ferro solfuro nero.

4 – METODO DI PREPARAZIONE

Sospendere 54,5 g di polvere in 1000 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione, distribuire in provette ed autoclavare a 121°C per 15 minuti. Lasciar solidificare a becco di clarino in modo da ottenere un fondo alto e un becco corto.

5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere

Fine granulometria omogenea, rosata.

Aspetto del terreno in soluzione ed in provetta

Rosso limpido.

pH (20-25°C)

7,4 ± 0,2

6 - MATERIALI FORNITI - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Kligler Iron Agar	Terreno in polvere	4015602	500 g (9,2 L)





13 - LIMITI DEL METODO

- È necessario inoculare per infissione il terreno con un ago da microbiologia senza rompere l'agar (non usare anse).
- È essenziale eseguire la lettura tra le 18 e le 24 ore di incubazione; letture precoci possono indurre falsi risultati di acidità del tipo A/A oppure non vi è tempo sufficiente per la fermentazione degli zuccheri con conseguente viraggio dell'indicatore; letture ritardate possono dare falsi risultati K/K a causa dell'utilizzo dei peptoni e conseguente viraggio alcalino del terreno.⁷
- La produzione di H₂S può mascherare la reazione acida sul fondo, tuttavia la produzione di H₂S richiede condizioni acide quindi il fondo si deve considerare acido quando vi è annerimento.
- Il terreno non contiene inibitori quindi una grande varietà di microrganismi può coltivare su di esso; per questa ragione prima della semina assicurarsi che la colonia sia catalasi positiva e si sia in presenza di bacilli Gram negativi.⁷
- Assicurarsi che le colonie da sottoporre al test siano pure; la procedura migliore è una subcoltura dal terreno d'isolamento su Tryptic Soy Agar e l'esecuzione del test sulle colonie coltivate su quest'ultimo terreno. Nel caso la coltura non fosse pura si ottengono risultati irregolari.⁷
- Le specie del gruppo *Klebsiella-Enterobacter* producono una tale quantità di gas per cui il terreno è spinto verso il tappo della provetta; in questi casi porre molta attenzione nei successivi ri-trapianti per evitare contaminazioni.
- È essenziale che i tappi siano allentati durante l'incubazione poiché per un corretto svolgimento della reazione alcalina sul becco del clarino vi deve essere passaggio d'aria nella provetta. Nel caso i tappi siano troppo chiusi si realizza una reazione acida sul becco anche in presenza della sola fermentazione del glucosio.⁷
- Nel caso non si osservi alcuna reazione né sul becco né sul fondo, assicurarsi che il terreno sia stato correttamente inoculato e che vi sia crescita microbica. Se la crescita è presente procedere con altri sistemi di identificazione batterica.⁷
- Il viraggio al giallo sul becco del clarino e nessun cambiamento di colore del fondo può avere due cause: la semina di una colonia Gram positiva fermentante solo il lattosio oppure l'assenza di infissione in profondità.⁷
- Il terreno qui descritto è da intendersi come un ausilio alla diagnosi delle infezioni microbiche. L'interpretazione dei risultati deve essere fatta considerando la storia clinica del paziente, l'origine del campione ed i risultati dei test microscopici e/o di altri test diagnostici.
- L'identificazione completa dei microrganismi coltivati sul terreno deve essere effettuata con tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa, dopo purificazione delle colonie con subcoltura su terreno appropriato.

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno qui descritto è un diagnostico *in vitro* di tipo qualitativo, per uso professionale e deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- I terreni in polvere devono essere manipolati con adeguate protezioni. Prima dell'uso consultare la scheda di sicurezza.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materiali di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione delle materie prime non possono garantire in maniera assoluta che questo prodotto non contenga nessun agente patogeno trasmissibile; per queste ragioni si consiglia di manipolare il prodotto con le precauzioni di sicurezza specifiche per i materiali potenzialmente infettivi (non ingerire, non inalare, evitare il contatto con la pelle, gli occhi, le mucose). Scaricare dal sito web www.biolifeitaliana.it il documento TSE Statement, con le misure messe in atto da Biolife Italiana S.r.l. per il contenimento del rischio legato alle patologie animali trasmissibili.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione in Laboratorio dei terreni di coltura.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti come terreno di coltura o agenti microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno non utilizzato ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzato, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare il prodotto qui descritto come principio attivo per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.
- Comunicare a Biolife Italiana Srl (complaint@biolifeitaliana.it) ed alle Autorità competenti qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione all'uso del diagnostico *in vitro*.
- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego del prodotto, ma senza impegno o responsabilità. L'utilizzatore finale deve in ogni caso, rispettare le leggi, i regolamenti e le procedure standard locali per l'esame dei campioni raccolti dai diversi distretti organici umani ed animali, dei campioni ambientali e dei prodotti destinati al consumo umano o animale. Le nostre informazioni non esonerano l'utilizzatore finale dalla sua responsabilità di controllare l'idoneità dei nostri prodotti allo scopo previsto.

15 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ








Conservare a +10°C /+30°C al riparo della luce e dell'umidità. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Evitare di aprire il flacone in ambienti umidi. Una volta aperto, conservare il prodotto mantenendo il tappo del contenitore ben chiuso. Eliminare il prodotto nel caso il contenitore e/o il tappo fossero danneggiati, nel caso i contenitori non fossero ben chiusi o in caso di evidente deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi). L'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione e di controllo del terreno e della definizione del periodo di validità del prodotto finito, in funzione della tipologia (piastre/provette/flaconi) e del metodo di conservazione applicato (temperatura e confezionamento).

16 - BIBLIOGRAFIA

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.



**TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI**

REF Numero di catalogo	o REF Numero di catalogo	LOT Numero di lotto	IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	 Fabbricante	 Utilizzare entro
 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> saggi	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Proteggere dalla luce	 Proteggere dall'umidità	

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 5	Aggiornamento del contenuto e del layout	05/2020
Revisione 6	Modifiche a: "precauzioni ed avvertenze", "conservazione e validità"	02/2022
Revisione 7	Adeguamento formula	10/2022
Revisione 8	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

Nota: lievi modifiche tipografiche, grammaticali e di formattazione non sono incluse nella cronologia delle revisioni.

