

ISTRUZIONI PER L'USO

LYSINE IRON AGAR

Terreno di coltura in polvere



Lysine Iron Agar- da sinistra: provetta non inoculata, *S. flexneri*, *S. arizonae*, *P. mirabilis*, *E. coli*

1 - DESTINAZIONE D'USO

Diagnostico *in vitro*. Per la differenziazione di alcuni membri della famiglia delle *Enterobacteriaceae*, soprattutto *Salmonella*, isolati da campioni clinici e da altri materiali.

2 - COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA (PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA)*

Peptone	5,00 g
Estratto di lievito	3,00 g
Glucosio	1,00 g
L-lisina	10,00 g
Fe-ammonio citrato	0,50 g
Sodio tiosolfato	0,04 g
Porpora di bromo cresolo	0,02 g
Agar	15,00 g

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Edwards e Fife¹ nel 1961 svilupparono un terreno differenziale, il Lysine Iron Agar (LIA) per risolvere il problema delle false identificazioni dei ceppi di Arizona (ora *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*) fermentanti il lattosio che non producevano annerimento delle provette di TSI o KIA. Johnson et al.² nel 1965 descrissero un metodo basato sulla differenziazione primaria di vari gruppi di batteri mediante l'impiego di KIA e LIA e per l'identificazione di *Salmonella*, *Shigella* e *Arizona* isolate dalle feci.

Lysine Iron Agar (LIA), preparato secondo la formula proposta da Edwards e Fife¹, è un ausilio per differenziazione di alcuni membri delle *Enterobacteriaceae*, in particolare *S. arizonae* fermentante il lattosio, isolati da campioni clinici e non clinici, mediante i test di deaminazione o decarbossilazione di lisina e della produzione di idrogeno solforato.³ Il terreno è incluso negli schemi FDA-BAM⁴ insieme ad altri test biochimici, per l'identificazione delle *Salmonelle* isolate dagli alimenti.

Lysine Iron Agar contiene lisina, peptoni, una piccola quantità di glucosio, un indicatore di pH, ferro ammonio citrato e tiosolfato di sodio. Il peptone e l'estratto di lievito forniscono azoto, carbonio, vitamine e oligoelementi per la crescita batterica. Il glucosio è un carboidrato fermentabile. Il porpora di bromocresolo è un indicatore di pH che vira al colore giallo a pH 5,2 o inferiore ed è viola a 6,8 o superiore. Il tiosolfato di sodio e il ferro ammonio citrato consentono il rilevamento dell'idrogeno solforato: i ceppi che producono acido solfidrico causano annerimento del terreno a causa della produzione di ferro solfuro. La lisina è inclusa per la rilevazione degli enzimi decarbossilasi e deaminasi.

La decarbossilazione della lisina è un processo anaerobico che si verifica sul fondo del terreno; la deaminazione della lisina è un processo aerobico che si verifica sul becco del clarino.

La decarbossilazione di lisina rimuove un gruppo COOH dalla lisina per produrre CO₂ e cadaverina, una poliammina alcalina che neutralizza gli acidi organici che si formano durante la fermentazione del glucosio; in questo modo il fondo del terreno in provetta ritorna allo stato alcalino di colore porpora. Nel caso l'enzima decarbossilasi non venga prodotto, il fondo rimane acido (giallo). Se si verifica la deaminazione ossidativa della lisina, si forma acido α-chetocarbossilico che reagisce con gli ioni ferro in prossimità della superficie del terreno, sotto l'influenza dell'ossigeno, formando un composto rosso-arancio; la combinazione di questo composto con il porpora di bromocresolo produce un netto colore rosso sul becco di clarino. Nel caso l'enzima deaminasi non venga prodotto il clarino rimane viola.

All'interno delle *Enterobacteriaceae*, *Salmonella*, con la sola eccezione del ser. Paratyphi A, è il solo genere che decarbossila rapidamente la lisina e che produce idrogeno solforato: su Lysine Iron Agar queste due caratteristiche sono ben evidenziabili sia per i ceppi fermentanti il lattosio che per i ceppi non fermentanti il lattosio.

La deaminazione della lisina è una caratteristica di *Proteus*, *Providencia* e *M. moraganii*, gli unici membri delle *Enterobacteriaceae* che producono l'enzima lisina deaminasi.

4 - METODO DI PREPARAZIONE

Sospendere 34,5 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.

5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	fine granulometria omogenea, grigio-porpora.
Aspetto del terreno in soluzione ed in provetta	porpora, limpido.
pH (20-25°C)	6,7 ± 0,2

6 - MATERIALI FORNITI - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Lysine Iron Agar	Terreno di coltura in polvere	4016362	500 g (14,5 L)





7 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio tarata e controllata, beute e provette con tappo a vite autoclavabili, aghi sterili da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori per l'identificazione completa delle colonie.

8 - CAMPIONI

I campioni sono costituiti da ceppi di batteri isolati da campioni clinici o da altri campioni, purificati su terreno appropriato (ad esempio Tryptic Soy Agar o agar sangue).

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Caricare un ago da batteriologia con la crescita di una colonia pura del microrganismo da identificare. Seminare infiggendo due volte fino sul fondo del terreno in provetta e strisciando abbondantemente sulla superficie del becco di clarino.

Incubare in aerobiosi a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ per 18-24 ore con i tappi allentati.

Dati non pubblicati hanno dimostrato che la lettura alle 48 ore è priva di valore diagnostico.⁴

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare e riportare i colori del becco di clarino, del fondo e la formazione del precipitato nero.

Decarbossilazione della lisina (rilevata nel fondo):

Test positivo: becco porpora / fondo porpora (alcalino), la reazione del fondo può essere mascherata dalla produzione di H_2S .

Test negativo: becco porpora / fondo giallo (acido), solo fermentazione del glucosio.

Deaminazione della lisina (rilevata sul becco):

Test positivo: becco rosso

Test negativo: il becco rimane porpora

Produzione di H_2S :

Test positivo: presenza di precipitato nero

Test negativo: assenza di precipitato nero

Nella tabella sottostante, sono indicate le reazioni caratteristiche attese di alcuni enterobatteri su Lysine Iron Agar.

Microrganismo	Becco	Fondo	H_2S
<i>Escherichia</i>	K	K o N	-
<i>Salmonella spp.</i>	K	K	+
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	K	K o N	+
<i>Salmonella enterica</i> ser. Paratyphi A	K	A	-
<i>Shigella</i>	K	A	-
<i>Citrobacter</i>	K	A	+ o -
<i>Proteus</i>	R	A	-
<i>Providencia</i>	R	A	-
<i>M.morganii</i>	R	A	-
<i>Klebsiella</i>	K	K	-

K = Reazione alcalina, colorazione porpora; A = Reazione acida, colorazione gialla; R = Reazione rossa (deaminazione della lisina); N = Nessuna reazione; + = Carattere presente; - = Carattere assente

11- CONTROLLO QUALITA'

Ciascun lotto del prodotto qui descritto è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. È comunque facoltà dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia, alle regole dell'accreditamento ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Qui di seguito sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.

S. Typhimurium ATCC 14028 crescita, becco e fondo porpora, H_2S +

Proteus mirabilis ATCC 12453 crescita, becco rosso, fondo giallo, H_2S -

S. flexneri ATCC 12022 crescita, becco porpora, fondo giallo, H_2S -

Incubazione con tappi allentati in aerobiosi, a 37°C per 18-24 h.

ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

12 – CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo di tutti i lotti di terreno in polvere Lysine Iron Agar viene testato per le caratteristiche prestazionali specifiche, confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato. Colture pure, coltivate per 18-24 ore su Tryptic Soy Agar, dei ceppi di seguito indicati vengono inoculate nelle provette, per infissione del fondo e per striscio sullo slant: *P. vulgaris* ATCC 9484, *P. mirabilis* ATCC 12453, *P. rettgeri* ATCC 39944, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. arizonae* d'isolamento clinico, *S. flexneri* ATCC 12022, *E. coli* ATCC 25922, *C. freundii* ATCC 8090. Le provette vengono incubate con i tappi allentati a $35-37^\circ\text{C}$ per 18-24 ore. Vengono osservati e registrati i cambiamenti di colore del terreno sul clarino e sul fondo e l'annerimento del terreno. Per tutti i ceppi testati le reazioni sono conformi alle specifiche.

13 - LIMITI DEL METODO

- È necessario inoculare per infissione il terreno senza rompere l'agar; usare aghi da batteriologia e non usare anse.
- Le specie di *Proteus* H_2S positive non sviluppano la colorazione nera su Lysine Iron Agar.³
- Il solfuro di ferro non è prodotto dai batteri che non decarbossilano la lisina poiché l'acidità del fondo può sopprimerne la formazione; per questo motivo e per distinguere i coliformi da *Shigella*, si consiglia di utilizzare LIA insieme ai terreni TSI o KIA.³
- La reazione rossa sul becco di *M. morganii* può essere variabile dopo 24 ore di incubazione; di norma richiede un tempo di incubazione più lungo.³
- Su Lysine Iron Agar, la produzione di gas è di norma irregolare o soppressa, con la sola eccezione di *Citrobacter*.³
- Salmonella enterica* ser. Paratyphi A non decarbossila la lisina e le reazioni sono: K/A, H_2S -
- Il test su Lysine Iron Agar non è sostitutivo della prova di decarbossilazione della lisina su terreno di Moeller.³
- La decarbossilazione/deaminazione della lisina è uno dei test necessari per l'identificazione delle *Enterobacteriaceae*. I risultati su LIA devono essere interpretati insieme ad altri test per una corretta identificazione dei ceppi. Pertanto si raccomanda di eseguire test





biochimici, immunologici, molecolari o di spettrometria di massa sulle colonie in coltura pura, per una loro completa identificazione. Se pertinente, eseguire il test di sensibilità agli antibiotici.

- 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 dei terreni di coltura in piastra, provetta, fialone.
- 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 fialone 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/fialoni) e del metodo di conservazione applicato (temperatura e confezionamento).

16- 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. 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.
3. MacFaddin JF. *Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985
4. U.S. Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 5: Salmonella*. Rev 12/2019

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

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	06/2020
Revisione 6	Modifiche a: "precauzioni ed avvertenze", "conservazione e validità"	02/2022
Revisione 7	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

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

