

**ISTRUZIONI PER L'USO****KLIGLER IRON AGAR**

Provette pronte all'uso



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

**1 - DESTINAZIONE D'USO**

Dispositivo 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 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA \***

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
Acqua purificata	1000 mL

\*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, Russell<sup>1</sup> descrisse un terreno con due zuccheri per la differenziazione dei bacilli tifoidei isolati da urina e feci. Nel 1917 Kligler<sup>2</sup> riportò l'uso dell'acetato di piombo per rilevare la produzione di idrogeno solforato. Nel 1918 Kligler<sup>3</sup> combinò l'uso dell'acetato di piombo con l'agar al doppio zucchero di Russel per la differenziazione simultanea di bacilli tifoidei, dissenterici e bacilli similari. Bailey e Lacy<sup>4</sup> 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 (CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>).

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 H<sub>2</sub>S precipita sotto forma di ferro solfuro nero.

**4 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO**

Aspetto del terreno in provetta  
pH (20-25°C)

Rosso limpido  
7,4 ± 0,2

**5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE**

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Kligler Iron Agar CND: W0104010206; EDMA: 14.01.02.01, RDM: 1513956/R	Provette pronte all'uso	551560	20 provette di vetro 17x125 mm, con fondo piatto e tappo a vite; terreno a becco di clarino. Confezionamento in scatola di cartone.

**6 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI**

Aghi da microbiologia, termostato e strumentazione di laboratorio, terreni di coltura accessori e reagenti per l'identificazione delle colonie.

**7 - CAMPIONI**

Kligler Iron Agar non è adatto alla semina diretta dei campioni. Il terreno deve essere inculato con colture pure di enterobatteri isolati da campioni clinici o altri materiali.





**8 - PROCEDURA DELL'ANALISI**

Caricare un ago da batteriologia con la crescita di una colonia pura del microrganismo da identificare. Sotoporre ad esame numerose colonie coltivate sulla piastra d'isolamento primario. Se si ritiene che le colonie non siano pure ritrapiantarle su Tryptic Soy Agar e con esse seminare le provette di KIA.

Seminare infiggendo fino sul fondo del terreno e strisciando abbondantemente sulla superficie del becco di clarino. Incubare a 37°C per 18-24 ore con i tappi allentati.

**9 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

Sul terreno si possono osservare tre tipi di reazione.<sup>6</sup>

**Fermentazioni degli zuccheri**

Fondo acido (giallo), becco alcalino (rosso): fermentazione del glucosio, nessuna fermentazione del lattosio.

Fondo acido (giallo), becco acido (giallo): fermentazione del glucosio e del lattosio.

Fondo alcalino (rosso), becco alcalino (rosso): nessuna fermentazione dei tre zuccheri

**Produzione di gas**

Presenza di bolle nel contesto del terreno. Con grandi quantità di gas, l'agar può essere incrinato e spostato verso l'alto.

**Produzione di idrogeno solforato**

La produzione di idrogeno solforato dal tiosolfato è indicata da un annerimento del fondo a seguito della reazione di H<sub>2</sub>S con gli ioni ferro per formare ferro solfuro nero. La formazione di H<sub>2</sub>S richiede un ambiente acido; a volte il fondo può risultare interamente nero tale da mascherarne il colore giallo; in tal caso, si deduce che il fondo sia acido.

Su Kligler Iron Agar possono essere osservate tutte le combinazioni delle reazioni sopra descritte, quindi è importante prendere nota dell'espressione delle tre reazioni (fermentazione degli zuccheri, produzione di gas, produzione di H<sub>2</sub>S).

Nella tabella che segue, tratta da Mac Faddin<sup>7</sup> sono riportati i modelli di reazione di alcune *Enterobacteriaceae*

Microrganismo	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>Proteus rettgeri</i>	-	A	V <sup>+</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	-

**Note**

Lac: fermentazione del lattosio; Glu: fermentazione del glucosio; A: reazione acida; V: variabile; V<sup>-</sup>: variabile, di solito positivo; V<sup>+</sup>: variabile, di solito negativo. 1: la reazione può essere ritardata; 2: *S. flexneri* ser. 6 positiva alla produzione di gas in piccola quantità; 3: di solito negativo con l'eccezione di *S. sonnei* (la reazione acida può essere ritardata); 4: anche se rare vi sono varianti lattosio positive di *S. Typhi*; 5: *S. Typhi* può mostrare un anello di annerimento ma la sua presenza non è di valore diagnostico, per *S. Paratyphi A* H<sub>2</sub>S+, la reazione positiva è ritardata; 6: *E. agglomerans* è variabile alla produzione di gas; 7: nel caso fosse prodotto gas, esso è in piccole quantità.

**10 - CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE**

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 responsabilità 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:

- E. coli* ATCC 25922                                crescita, becco giallo, fondo giallo, gas +, H<sub>2</sub>S -
  - S. Typhimurium* ATCC 14028                    crescita, becco rosso, fondo giallo, gas +, H<sub>2</sub>S +
- Incubazione con tappi allentati in aerobiosi, a 37°C per 18-24 h.

ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

**11 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI**

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di provette pronte all'uso di Kligler Iron Agar e della materia prima impiegata per la produzione (terreno in polvere Kligler Iron Agar REF 401560) sono testati per le caratteristiche prestazionali confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato. Colonie pure coltivate su Tryptic Soy Agar di 8 ceppi di *Enterobacteriaceae* sono inoculate nelle provette: *E. coli* ATCC 25922, *E. aerogenes* ATCC 13048, *M. morganii* CB 118, *C. freundii* ATCC 8090, *S. Enteritidis* NCTC 5188, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. flexneri* ATCC 12022. Dopo l'incubazione in aerobiosi a 35-37°C per 18-24 ore, vengono registrati i cambiamenti di colore del terreno sul becco di clarino e nel fondo, la presenza di gas e di annerimento. Tutti i ceppi mostrano delle reattività in accordo alle specifiche.

**12 - 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.<sup>7</sup>
- La produzione di H<sub>2</sub>S può mascherare la reazione acida sul fondo, tuttavia la produzione di H<sub>2</sub>S 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.<sup>7</sup>



- 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.<sup>7</sup>
- 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 delle reazioni alcaline 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.<sup>7</sup>
- 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.<sup>7</sup>
- 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.<sup>7</sup>
- 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.

**13 - 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.
- Il prodotto qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione europea vigente.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materie prime di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione dei materiali 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 d'uso specifiche per i prodotti potenzialmente infettivi (non ingerire, non inalare, evitare il contatto con la pelle, gli occhi, le mucose). Scaricare dal sito web [www.biolifeitaliana.it](http://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.
- Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il terreno e con gli agenti microbici.
- La singola provetta del prodotto qui descritto è monouso.
- Fare attenzione quando si aprono le provette con tappo a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.
- Il prodotto qui descritto è soggetto a sterilizzazione terminale in autoclave a vapore.
- Sterilizzare le provette dopo l'uso e prima della loro eliminazione. Smaltire le provette non utilizzate e le provette seminate con i campioni o con i ceppi di controllo in accordo alla legislazione vigente in materia.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito [www.biolifeitaliana.it](http://www.biolifeitaliana.it).
- 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.

**14 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ**

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a 2-8°C al riparo dalla luce diretta. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare le provette oltre la data di scadenza. Dopo l'apertura della scatola, le provette possono essere utilizzate fino alla data di scadenza. Le provette aperte devono essere utilizzate immediatamente. Prima dell'uso verificare la chiusura e l'integrità del tappo a vite. Non utilizzare le provette se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione microbica, colore alterato).

**15 - BIBLIOGRAFIA**

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

**TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI**

<b>REF</b> Numero di catalogo	o <b>REF</b>	<b>LOT</b> Numero di lotto	<b>IVD</b> Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	Fabbricante	Non riutilizzare	Imballaggio riciclabile Lato superiore
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Utilizzare entro	Fragile maneggiare con cura	Proteggere dalla luce diretta	

**CRONOLOGIA DELLE REVISIONI**

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 3	Aggiornamento del contenuto e del layout in accordo a IVDR 2017/746	06/2021

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

