

ISTRUZIONI PER L'USO

LYSINE IRON AGAR

Provette pronte all'uso

 Lysine Iron Agar- da sinistra: provetta non inocolata, *S.flexneri*, *S.arizonae*, *P.mirabilis*, *E.coli*
1 - DESTINAZIONE D'USO

 Dispositivo 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 *

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
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

 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* ed *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 pH 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 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto del terreno in provetta	porpora, limpido
pH (20-25°C)	6,7 ± 0,2

5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Lysine Iron Agar CND: W0104010206; EDMA: 14.01.02.01, RDM: 1513991/R	Provette pronte all'uso	551636	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

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).





8 - 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

9 - 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</i> spp.	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 o N	K o N	-

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

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

<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	crescita, becco e fondo porpora, H_2S +
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	crescita, becco rosso, fondo giallo, H_2S -
<i>S. flexneri</i> 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

11 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di provette pronte all'uso di Lysine Iron Agar e della materia prima impiegata per la produzione (terreno in polvere Lysine Iron Agar REF 401636) sono testati per le caratteristiche prestazionali 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, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. arizonae* d'isolamento clinico, *S. flexneri* ATCC 12022, *E. coli* ATCC 25922, *C. freundii* ATCC 8090. Le provette sono 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.

12 - 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.

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 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.
- 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

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 o REF Numero di catalogo	LOT Numero di lotto	IVD 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 2	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.

