
POSTUPCI KONTROLE KVALITETE**I UVOD**

Kligler Iron Agar (Agar željeza Kligler) pomaže u diferencijaciji gram negativnih enterobacila na temelju njihove sposobnosti da fermentiraju dekstrozu i laktozu i stvaraju sulfide.

II POSTUPAK ISPITIVANJA UČINKOVITOSTI

1. Inokulirajte reprezentativne uzorke s dolje navedenim kulturama.
 - a. Pomoću kultura kosog sojinog agara **Trypticase** starih 18 – 24 h inokulirajte epruvete inokulacijskom iglom tako da ubodete kraj epruvete i razmažete cijelu površinu kosog agara.
 - b. Inkubirajte epruvete s malo odvjanim čepovima na 35 ± 2 °C u aerobnoj atmosferi.
2. Pregledajte epruvete nakon 18 – 24 h i potražite rast i reakcije.
3. Očekivani rezultati

Organizmi	ATCC	Kosi agar	Kraj	Plin	H ₂ S
* <i>Escherichia coli</i>	25922	Kiseo	Kiseo	+	–
* <i>Salmonella enterica</i> podvrst. <i>enterica</i> serotip Typhimurium	14028	Lužnat	Kiseo	+/-	+
* <i>Shigella flexneri</i>	12022	Lužnat	Kiseo	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	Lužnat	Lužnat	–	–

*Preporučeni soj organizama za korisničku kontrolu kvalitete.

III DODATNA KONTROLE KVALITETE

1. Pregledajte epruvete prema objašnjenju iz poglavlja „Pogoršanje kvalitete proizvoda“.
2. Vizualno pregledajte reprezentativne epruvete kako biste utvrdili da nemaju fizičkih oštećenja koja mogu utjecati na upotrebu.
3. Odredite potencijetrom pH vrijednost na sobnoj temperaturi kako biste provjerili odgovara li propisanim vrijednostima $7,4 \pm 0,2$.
4. Inkubirajte neinokulirane reprezentativne epruvete na 20 – 25 °C i 30 – 35 °C te nakon 7 dana potražite kontaminaciju mikrobima.

INFORMACIJE O PROIZVODU**IV NAMJENA**

Kligler Iron Agar (Agar željeza Kligler) pomaže u diferencijaciji članova vrste *Enterobacteriaceae* na temelju njihove sposobnosti da fermentiraju dekstrozu i laktozu i stvaraju sulfide.

V SAŽETAK I OBJAŠNENJE

Godine 1911. Russell je opisao novu podlogu s dvije vrste šećera u epruveti za izolaciju tifoidnih bacila iz urina i stolice.¹ Šest godina kasnije Kligler je razvio jednostavnu acetatnu podlogu za diferencijaciju tifoidne-paratifoidne grupe.² Nakon toga Kligler je ocijenio hranjivu podlogu korištenu za izolaciju i diferencijaciju tifoidnih, dizenterijskih i drugih srodnih bacila i podržao je Russellovu podlogu.³ Bailey i Lacey zamijenili su fenol crvenu indikatorom Andrade ranije korištenim kao indikator pH vrijednosti.⁴

Sadašnja formula agara željeza Kligler kombinira karakteristike Kliglerove acetatne podloge i karakteristike Russellovog agara s dvije vrste šećera.

VI NAČELA POSTUPKA

Agar željeza Kligler, uz dodatak kazeina i peptona mesa sadrži laktozu i dekstrozu koje omogućuju diferencijaciju vrsta enterobacila zbog promjene boje fenol crvenog indikatora pH vrijednosti kao odgovor na kiselinu stvorenu uslijed fermentacije tih šećera. Koncentracija dekstroze samo je 10% koncentracije laktoze. Kombinacija željezo amonijevog citrata i natrijevog tiosulfata omogućuje otkrivanje stvaranja hidrogen sulfida.

Organizmi koji ne fermentiraju laktozu (npr., *Salmonella* i *Shigella*) inicijalno stvaraju žuti kosi agar zbog kiseline koja nastaje fermentacijom male količine dekstroze. Kada se dekstroza potroši u aerobnom okruženju kosog agara reakcija postaje lužnata (crveni kosi agar) uslijed oksidacije kiselina. Do reverzije ne dolazi u anaerobnom okruženju na kraju epruvete koji ostaje kiseo (žuti kraj). Organizmi koji fermentiraju laktozu stvaraju žute kose agare i krajeve epruveta jer se

u kosom agaru stvara dovoljno kiseline da se zadrži kisela pH vrijednost u aerobnim uvjetima. Organizmi koji ne mogu fermentirati ugljikohidrate stvaraju crvene kose agare i krajeve.

Stvaranje hidrogen sulfida vidljivo je crnom bojom na kraju epruvete ili stvaranjem prstena oko vrha. Stvaranje plina (aerogena reakcija) otkriva se pojedinačnim mjehurićima ili razdvajanjem ili pomicanjem agara.

VII REAGENSI

Kligler Iron Agar

Približna formula* po litri pročišćene vode

Pankreatična digestija kazeina	10,0 g	Željezo amonijev citrat	0,5 g
Peptična digestija životinjskog tkiva	10,0 g	Natrijev tiosulfat	0,5 g
Laktoza	10,0 g	Agar	15,0 g
Dekstroza	1,0 g	Fenol crveni	0,025 g
Natrijev klorid	5,0 g		

*Prilagođeno i/ili dodano prema potrebi kako bi se udovoljilo kriterijima učinkovitosti.

Upozorenja i mjere opreza: Za *in vitro* dijagnostiku.

Epruvete sa zategnutim čepovima treba oprezno otvarati kako ne bi došlo do ozljeda pri pucanju stakla.

Primjenjujte aseptične tehnike i utvrđene mjere opreza protiv mikrobioloških opasnosti tijekom svih postupaka. Nakon upotrebe, pripremljene epruvete, spremnici za uzorke i ostali kontaminirani materijali moraju se sterilizirati u autoklavu prije odlaganja.

Upute za čuvanje: Epruvete po primitku čuvajte na tamnom mjestu na temperaturi od 2 – 8 °C. Pazite da ne dođe do smrzavanja i pregrijavanja. Otvorite neposredno prije upotrebe. Smanjite izlaganje svjetlosti na najmanju moguću mjeru. Podloge u epruvetama koje se čuvaju prema uputama na naljepnici prije same upotrebe mogu se inokulirati sve do isteka roka valjanosti i inkubirati tijekom preporučenih rokova inkubacije. Prije inokulacije pričekajte da se podloga zagrije do sobne temperature.

Pogoršanje kvalitete proizvoda: Ne upotrebljavajte epruvete ako imaju vidljive znakove kontaminacije mikrobima, promjene boje, sušenja ili ostale znakove pogoršanja kvalitete.

VIII PRIKUPLJANJE UZORAKA I RUKOVANJE

Uzorci pogodni za podlogu mogu se obraditi raznim tehnikama. Detaljne informacije potražite u odgovarajućim tekstovima.^{5,6} Uzorke treba uzeti prije dodavanja protumikrobnih agensa. Potrebno je izraditi propise za brzu dostavu u laboratorij.

IX POSTUPAK

Priloženi materijal: Kligler Iron Agar Slants

Potreban materijal koji se nabavlja zasebno: Dodatne hranjive podloge, reagensi, organizmi za kontrolu kvalitete i laboratorijska oprema prema potrebi.

Postupak ispitivanja: Primjenjujte aseptične tehnike.

Za inokulaciju pažljivo dotaknite samo središte izolirane kolonije na enteričnoj pločastoj podlozi s hladnom, sterilnom iglom, ubodite podlogu na kraju epruvete i zatim razmažite preko cijele površine kosog agara. Nekoliko kolonija sa svake primarne pločice treba ispitati odvojeno jer može doći do mješovitih infekcija.

Inkubirajte epruvete s popuštenim čepovima 18 – 24 h na 35 ± 2 °C u aerobnoj atmosferi.

Za pojačanje lužnatih uvjeta u kosom agaru mora se omogućiti razmjena zraka pomoću popušenog čepa. Ako se epruveta čvrsto stegne, doći će do kisele reakcije i u kosom agaru (uzrokovana samo fermentacijom dekstroze).

Korisnička kontrola kvalitete: Pogledajte poglavlje „Postupci kontrole kvalitete.“

Zahtjevi kontrole kvalitete moraju biti ispunjeni u skladu s važećim lokalnim, državnim i/ili saveznim propisima ili uvjetima akreditiranja i postupcima standardne kontrole kvalitete vašeg laboratorija. Preporučuje se da korisnik konzultira relevantne smjernice CLSI-ja (prethodno NCCLS-a) i propise CLIA kako bi se upoznao s odgovarajućim postupcima kontrole kvalitete.

Za određivanje pH vrijednosti podloge u epruveti potencijetrom treba koristiti jednu elektrodu dovoljno male veličine da stane u epruvetu. Vrh elektrode mora se postaviti u središnji dio mase agara u čvrstoj podlozi.

X REZULTATI

Nakon inkubacije zabilježite reakciju u kosom agaru i na kraju epruvete, bilježeći stvaranje plina i proizvodnju hidrogen sulfida.

Članovi vrste *Enterobacteriaceae* stvaraju tipične reakcije (većina vrsta određenog roda):⁷

	Kosi agar	Kraj	Plin	H ₂ S
<i>Citrobacter</i>	Lužnat	Kiseo	+	+ ili –
<i>Edwardsiella</i>	Lužnat	Kiseo	+	+
<i>Escherichia coli</i>	Kiseo	Kiseo	+	–
<i>Enterobacter</i>	Kiseo*	Kiseo	+	–
<i>Morganella</i>	Lužnat	Kiseo	±	–
<i>Proteus</i>	Lužnat ili kiseo	Kiseo	+	+
<i>Providencia</i>	Lužnat	Kiseo	±	–
<i>Salmonella</i>	Lužnat	Kiseo	+	+
<i>Shigella</i>	Lužnat	Kiseo	–	–

*Može postati lužnat usprkos fermentaciji laktoze (*E. aerogenes*).

Dodatne informacije potražite u odgovarajućim tekstovima.⁵⁻¹⁰

XI OGRANIČENJA POSTUPKA

Organizmi koji stvaraju vodikov sulfid mogu proizvesti toliko crnog taloga željezo sulfida tako da kiselost na kraju epruvete ostane u potpunosti prikrivena. Međutim, ako se H₂S reducira, kiseli uvjeti postoje na kraju epruvete čak i ako nisu vidljivi i moraju se kao takvi zabilježiti.⁸

Za identifikaciju organizmi moraju biti u čistoj kulturi. Za konačnu identifikaciju potrebno je provesti morfološka, biokemijska i/ili serološka ispitivanja. U odgovarajućim poglavljima potražite detaljne informacije i preporučene postupke.⁵⁻¹⁰

XII RADNA SVOJSTVA

Prije izdavanja ispitana su radna svojstva svih pakiranja kosih agara željeza Kligler. Reprezentativni uzorci pakiranja ispituju se kulturama sojinog agara **Trypticase** vrsta *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) i *Shigella flexneri* (ATCC 12022) tako da se razmaže kosi agar i ubode kraj epruvete odgovarajućom iglom. Epruvete se inkubiraju s lagano odvojenim čepovima na 35 ± 2 °C i očitavaju nakon 18–24 h kako bi se otkrio rast i reakcije. Rast svih organizama je umjeren do jak. Kosi agar u epruveti inokuliran s *E. coli* pokazuje kiselu reakciju dok su kosi agari u svim drugim inokuliranim epruvetama lužnati. *S. flexneri* proizvodi kiselu reakciju na kraju epruvete, *P. aeruginosa* lužnatu reakciju. *E. coli* proizvodi kiselinu i plin na kraju epruvete. *Salmonella* Typhimurium proizvodi kiselu reakciju na kraju epruvete te zacrnjuje podlogu, plin može i ne mora biti prisutan.

XIII DOSTUPNOST


Kat. br.	Opis
220896	BD BBL Kligler Iron Agar Slants, pakiranje od 10 epruveta veličine K
220897	BD BBL Kligler Iron Agar Slants, pakiranje od 100 epruveta veličine K


XIV REFERENCE

- Russell, F.F. 1911. The isolation of typhoid bacilli from urine and feces with the description of a new double sugar tube medium. *J. Med. Res.* 25:217-229.
- Kligler, I.J. 1917. A simple medium for the differentiation of members of the typhoid-paratyphoid group. *Am. J. Public Health.* 7:1042-1044.
- Kligler, I.J. 1918. Modifications of culture media used in the isolation and differentiation of typhoid, dysentery and allied bacilli. *J. Exp. Med.* 28:319-322.
- Bailey, S.F., and N.I. Lacy. 1927. A modification of the Kligler lead acetate medium. *J. Bacteriol.* 13:183-189.
- Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller and R.H. Tenover (ed.). 2003. *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
- Ewing, W.H. 1986. *Edwards and Ewing's identification of the Enterobacteriaceae*, 4th ed. Elsevier Science Publishing Co., Inc. New York.
- MacFaddin, J.F. 1985. *Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria*, vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Baron, E.J., L.R. Peterson, and S.M. Finegold. 1994. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 9th ed. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams (ed.). 1994. *Bergey's Manual™ of determinative bacteriology*, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

Tehnički servis i podrška na BD Diagnostics: obratite se lokalnom predstavniku tvrtke BD ili posjetite www.bd.com/ds.



 Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152 USA

 Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire
Co. Dublin, Ireland

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
BD, BD Logo, BBL, GasPak and Trypticase are trademarks of Becton, Dickinson and Company. ©2014 BD.