A. HEDEF MİKROORGANİZMALAR

Liofilchem® Anaerobe System klinik öneme sahip anaerobik mikroorganizmaların identifikasyonuna yönelik geliştirilmiş 24 substrat **(Ek 1)** içeren bir test panelidir. Kurutulmuş substrat içeren kuyucuklar bir bakteri süspansiyonu ile inoküle edilir. İnkübasyon sırasında kuyucuklarda meydana gelen reaksiyonlar Değerlendirme Tablosuna **(Ek 1)** göre değerlendirilir ve mikroorganizmanın sayısal profili belirlenir. Bu sayısal profil ile Liofilchem İdentifikasyon Yazılımı kullanılarak identifikasyon sonucu elde edilir.

B. PROSEDÜR

⚠ **Uygun olmayan inkübasyon şartları**, **kuyucukların yetersiz doldurulması** veya **inokulum yoğunluğunun yetersiz olması yanlış sonuçlara** neden olabilir.

Potansiyel patojen mikroorganizmalar ile yapılan çalışmalarda gerekli **biyogüvenlik önlemleri** alınmalıdır.

Test panelleri ve Anaerobe Broth vialleri **2-8°C**'da muhafaza edilmelidir. Aşırı sıcaklık değişimlerine maruz bırakmayınız.

Anaerob System ile tanımlanacak mikroorganizma önce standart mikrobiyolojik tekniklere göre uygun bir kültür ortamında izole edilmelidir. **Öncelikle** mikroorganizmanın **Gram boyama** ve **mikroskobik inceleme** ile

- **Spor** oluşturan veya oluşturmayan
- **Gram pozitif** veya **Gram negatif**
- **Kok** veya **basil**

olduğu belirlenmelidir.

B1. İnokulumun hazırlanması

1. **18-24 saat** inkübasyon sonrasında katı besiyeri üzerindeki (ideal olarak kanlı agar) taze kültürler kullanılmalıdır. 48 saatten eski kültürler ile elde edilen identifikasyon sonuçları güvenilir değildir.
2. Besiyerinden öze veya bir swab ile **koloniler** alınır ve paneller ile birlikte sağlanan oda sıcaklığına getirilmiş **Anaerobe Broth** içinde karıştırılarak emülsifiye edilir. Hazırlanan süspansiyonun yoğunluğu **1 McFarland** bulanıklık standardına ayarlanmalıdır ve hazırlandıktan sonra vakit kaybetmeksizin test panelinin inokülasyonu için kullanılmalıdır.

B2. Test panellerinin inokülasyonu

1. Panel(ler) ambalajından çıkartılır ve **oda sıcaklığını** gelmeleri için beklenir.
2. Örnek bilgileri panel üzerindeki örnek alanına kaydedilir.
3. Her bir kuyucuğa **steril bir pipet ile 200 µL inokulum** ilave edilir.
4. İnokülasyon sonrasında panel üzerindeki **20 numaralı** kuyucuğa **1 damla vazelin yağı** ilave edilmelidir.

B3. Test panellerinin inkübasyonu

1. İnokülasyon sonrasında panellerin kapakları kapatılır.

2. Paneller **35-37°C'da 24-48 saat anaerobik** ortamda inkübe edilmelidir. Birçok anaerobik mikroorganizmanın identifikasyon sonucu için 24 saat inkübasyon yeterlidir. Ancak bazı suşlar için 48 saat inkübasyon gerekebilir.

B4. Sonuçların değerlendirilmesi

1. İnkübasyon sonrasında kuyucuklarda gözlenen **Değerlendirme Tablosu (Ek 1)** ile karşılaştırılarak **rapor formu (Şekil 1)** doldurulur. Bazı kuyucuklardaki reaksiyonlar **ayıraç ilavesi** sonrasında gözlemlenmelidir;

   a) **22 numaralı** kuyucuğa bir damla **Kovac's** ayıracı damlatılır. **Birkaç dakika sonra** gözlenen **kırmızı halka** varlığı **pozitif** sonuç olarak kabul edilir.

   b) **23 numaralı** kuyucuğa iki damla **Katalaz** ayıracı damlatılır. Ayıracı eklemeden önce panelin yaklaşık 30 dakika normal atmosfere maruz kalması gereklidir. Ayıraç ilavesi ile kuyucukta **gaz baloncukları gözlenmesi** pozitif sonuç olarak kabul edilir.

   c) **24 numaralı** kuyucuğa bir damla **Sülfanilik asit** ve bir damla **Naftilamin** damlatılır. Birkaç dakika sonra gözlenen **turuncu-kırmızı renk** pozitif sonuç olarak kabul edilir.

B5. İdentifikasyon

1. Rapor formu **(Şekil 1)** 3 test sonucu için pozitif sonuçlara karşılık gelen rakamların (1,2 veya 4) toplamı ile bir rakam elde edilecek şekilde düzenlenmiştir. Spor **(SPOR)** oluşturma, Gram boyama **(GRAM)** ve kok şeklinde **(COCC)** mikroskobik gözlem sonuçları da kullanılarak **9 haneli** bir **nümerik kod** elde edilir.

2. Elde edilen nümerik kod **Liofilchem Identification Software** yazılımına girildiğinde **veri tabanında** test sonuçlarına göre **en yüksek olasılıkta** mikroorganizmalar listelenecektir.

Şekil 1. Rapor formu

	Group 1			Group 2			Group 3			Group 4			Group 5			Group 6			Group 7			Group 8			Group 9		
Test	GLU	MAN	LAC	SAC	MAL	SAL	XYL	ARA	CEL	MNN	MLZ	RAF	SOR	RAM	TRE	FRU	GAL	NAG	GLY	URE	ESC	IND	CAT	NIT	SPOR	GRAM	COCC
Value	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
Result	+	−	+	+	+	−	+	−	+	+	−	+	−	−	−	+	+	+	−	−	+	−	+	−	−	−	−
Sum of values	5			3			5			5			0			7			4			2			0		
NUMERICAL CODE: 535507420 IDENTIFICATION: *Bacteroides fragilis*																											

EK 1 Değerlendirme Tablosu

Kuyucuk	Reaksiyon	Pozitif	Negatif
1-GLU	Glukoz	Sarı	Mor
2-MAN	Mannitol	Sarı	Mor
3-LAC	Laktoz	Sarı	Mor
4-SAC	Sakkaroz	Sarı	Mor
5-MAL	Maltoz	Sarı	Mor
6-SAL	Salisin	Sarı	Mor
7-XYL	Ksiloz	Sarı	Mor
8-ARA	Arabinoz	Sarı	Mor
9-CEL	Sellebioz	Sarı	Mor
10-MNN	Mannitol	Sarı	Mor
11-MLZ	Maltoz	Sarı	Mor
12-RAF	Rafinoz	Sarı	Mor
13-SOR	Sorbitol	Sarı	Mor
14-RAM	Ramnoz	Sarı	Mor
15-TRE	Trehaloz	Sarı	Mor
16-FRU	Fruktoz	Sarı	Mor
17-GAL	Galaktaz	Sarı	Mor
18-NAG	N asetil beta glukozamidaz	Sarı	Mor
19-GLY	Gliserol	Sarı	Mor
20-URE	Üreaz	Pembe-fuşya	Sarı
21-ESC	Eskülin	Siyah	Renksiz
22-IND	İndol (Kovac's ayıracı ilavesi gereklidir.)	Kırmızı halka	Sarı
23-CAT	Katalaz (Katalaz ayıracı ilavesi gereklidir.)	Gaz baloncukları var	Gaz baloncukları yok
24-NIT	Nitrat (Sülfanilik asit ve naftilamin ilavesi gereklidir.)	Turuncu-kırmızı	Sarı

EK 2 Akış Diyagramı

