A. HEDEF MİKROORGANİZMALAR

Microgen™ GN-ID A oksidaz negatif, nitratı indirgeyebilen ve glukoz fermentasyonu yapabilen çoğunluğunu *Enterobacteriaceae* familyası üyelerinin oluşturduğu Gram negatif mikroorganizmaların identifikasyonuna yönelik geliştirilmiş 12 substrat içeren bir test stribidir. Microgen™ GN-ID A, Microgen™ GN-ID B ile (12 ilave substrattan oluşan test stribi) kombine olarak kullanıldığında oksidaz negatif ve oksidaz pozitif birçok Gram negatif bakterinin identifikasyonu için kullanılabilir. Bu kombinasyon ile *Enterobacteriaceae* familyasının tüm cinsleri identifiye edilebilir.

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 stripleri **2-8°C**'da muhafaza edilmelidir. Ambalajı açılmış stripler **2-8°C**'da **14 güne kadar** muhafaza edilebilir.

B1. İnokulumun hazırlanması

1. **18-24 saat** inkübasyon sonrasında katı besiyeri üzerindeki taze kültürler kullanılmalıdır.
2. İnokulumun hazırlanmasından **önce oksidaz testi** gerçekleştirilmelidir. **Oksidaz pozitif** izolatların identifikasyonu için **GN-ID A** ve **GN-ID B** test stripleri **birlikte** kullanılmalıdır
3. Besiyerinden öze ile **bir koloni** alınır ve oda sıcaklığındaki **3 mL steril fizyolojik tuzlu su** içinde karıştırılarak emülsifiye edilir. Bu amaçla vorteks kullanılabilir. GN-ID A ve GN-ID B test stripleri **birlikte kullanılacak ise** bir koloni **3-5 mL** steril fizyolojik tuzlu su içinde emülsifiye edilmelidir.
4. ***Actinobacillus*** ve ***Pasteurella*** türlerinin identifikasyonunda inokulum hazırlanmasında kullanılan fizyolojik tuzlu su içine **1 damla/mL steril inaktive at serumu** ilave edilmesi önerilir.
5. İnokulum saflığını kontrol amacıyla test striplerinin inokülasyonu öncesinde 1 damla inokulum selektif olmayan bir katı besiyerine inoküle edilir ve test ile eş zamanlı olarak 35-37°C'da 18-24 saat inkübe edilir.

B2. Test striplerinin inokülasyonu

1. Strip(ler) üzerindeki yapışkan band kaldırılır. Bu band tekrar kullanacağı için **atılmamalıdır.**
2. Her bir kuyucuğa **steril pastör pipeti ile 3-4 damla (100 µL) inokulum** ilave edilir.
3. İnokülasyon sonrasında **GN-ID A** test stribi üzerindeki **1,2,3 ve 9 numaralı** kuyucuklara ve **GN-ID B** test stribi üzerindeki **20 ve 24 numaralı** kuyucuklara **3-4 damla mineral yağ** ilave edilmelidir. Test stripleri üzerinde mineral yağ ilave edilmesi gereken kuyucuklar **siyah halkasal çerçeve** ile belirtilmiştir. Şayet izolat **oksidaz pozitif** ise **20 numaralı** kuyucuğa (Siyah halkasal çerçeve kesikli çizgilerden oluşmaktadır) mineral yağ ilave **edilmemelidir.**

B3. Test striplerinin inkübasyonu

1. İnokülasyon sonrasında yapışkan band stripler üzerine tekrar yapıştırılır. Bu aşamada **band üzerindeki deliklerin GN-ID A** test stribi üzerindeki **7,11 ve 12 numaralı** kuyucukların ve **GN-ID B** test stribi üzerindeki **14 numaralı** kuyucuğun **üzerinde olmasına** dikkat edilmelidir.
2. Stripler **35-37°C' da 18-24 saat** inkübe edilmelidir. Oksidaz pozitif izolatlar için inkübasyon süresi 48 saat olmalıdır. İdentifikasyona tabi tutulan mikroorganizmanın ***Pseudomonas fluorescens*** olduğundan şüphelenildiği takdirde test stripleri **25°C'da** inkübe edilmelidir.

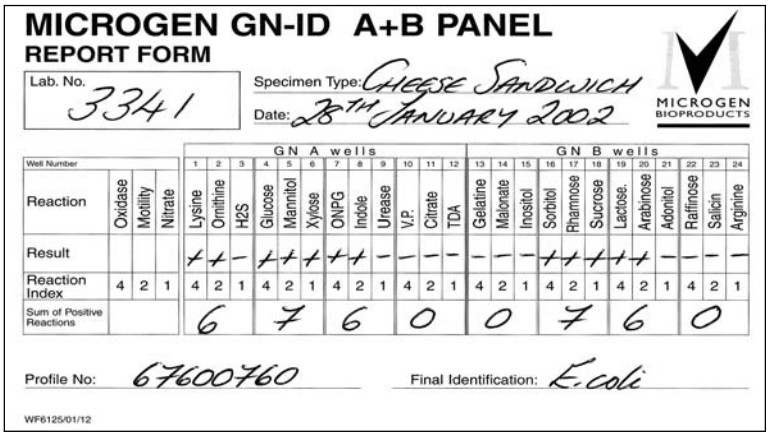
B4. Sonuçların değerlendirilmesi

1. İnkübasyon sonrasında stripler üzerindeki yapışkan band kaldırılır ve kuyucuklarda gözlenen **renkler renk kartı (Ek 2)** ile karşılaştırılarak **rapor formu (Şekil 1)** doldurulur.
2. GN-ID B test stribi üzerindeki 13 numaralı kuyucuktaki **jelatinin** sıvılaşarak **kuyucuk içine yayılması** pozitif sonuç olarak kabul edilir.
3. **Yeşil halkasal çerçeve** ile belirtilmiş kuyucuklardaki sonuçlar **ancak ayıraç ilavesi** sonrasında değerlendirilebilir;
   a) **8 numaralı** kuyucuğa iki damla **Kovac's** ayıracı damlatılır. **Bir dakika sonra** gözlenen **kırmızı** renk **pozitif** sonuç olarak kabul edilir.
   b) **10 numaralı** kuyucuğa bir damla **VP I** ve bir damla **VP II** ayıraçları damlatılır. **15-30 dakika sonra** gözlenen **koyu pembe/kırmızı** renk **pozitif** sonuç olarak kabul edilir.
   c) **12 numaralı** kuyucuğa bir damla **TDA** ayıracı **damlatılır**. **Bir dakika sonra** gözlenen **kırmızı** renk **pozitif** sonuç olarak kabul edilir.
   d) **Oksidaz pozitif izolatlar için 7 numaralı** kuyucukta **ONPG test sonucu kaydedildikten sonra nitrat indirgenme testi gerçekleştirilir**. Kuyucuğa bir damla **Nitrate A** ve bir damla **Nitrate B** ayıraçları damlatılır. Gözlenen **kırmızı** renk **pozitif** sonuç olarak kabul edilir. Şayet ayıraçlar damlatıldıktan sonra kuyucukta **renk oluşmaz ise** veya **sarı renk gözlenirse** kuyucuğa **bir miktar çinko tozu** ilave edilir. Çinko tozu ilavesi sonrasında **renk değişimi olmaz** ise sonuç **pozitif**, **kırmızı renk** gözlenirse sonuç **negatif** 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. Böylece **yalnızca GN-ID A** test stribi kullanıldığında **4 haneli**, **GN-ID A** ve **GN-ID B test stripleri birlikte** kullanıldığında **8 haneli**, **oksidaz pozitif** izolatlar için **GN-ID A** ve **GN-ID B test stripleri birlikte** kullanıldığında ise **9 haneli** bir **oktal kod** elde edilir.
2. Elde edilen oktal kod **Microgen Identification System (MID-60)** yazılımına girildiğinde **veri tabanında** test sonuçlarına göre **en yüksek olasılıkta** mikroorganizmalar listelenecektir.

Şekil 1. Rapor formu



MICROGEN GN-ID A+B PANEL

REPORT FORM

Lab. No. 3341

Specimen Type: CHEESE SANDWICH

Date: 28TH JANUARY 2002

MICROGEN BIOPRODUCTS

Well Number				GN A wells											GN B wells											
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H2S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P.	Citrate	TDA	Gelatine	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose.	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
Result				+	+	−	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	−	−	−	−
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions				6			7			6			0			0			7			6			0		

Profile No: 67600760

Final Identification: E.coli

WF6125/01/12

EK 1 Substrat Referans Tablosu

Kuyucuk	Reaksiyon	Tanım	Pozitif	Negatif
1	Lisin	Lisin dekarboksilaz	Yeşil/mavi	Sarı
2	Ornitin	Ornitin dekarboksilaz	Mavi	Sarı/yeşil
3	H_2S	H_2S oluşturma	Kahverengi /siyah	Açık sarı
4	Glukoz	Fermentasyon	Sarı	Mavi/yeşil
5	Mannitol			
6	Ksiloz			
7	ONPG	ONPG' nin B-galactosidaz ile hidrolizi	Sarı	Renksiz
7a	NİTRAT (oksidaz pozitifler için)	Nitratın Nitrite indirgenmesi	Kırmızı	Renksiz/sarı
7b	NiTRAT (oksidaz pozitifler için)	Nitratın azota kadar indirgenmesi	Renksiz/sarı	Kırmızı
8	İndol	İndol	Kırmızı/ pembe	Renksiz
9	Üreaz	Ürenin hidrolizi	Koyu pembe	Açık sarı/pembe
10	VP	Glukozdan aseton oluşturma	Koyu pembe/kırmızı	Renksiz/soluk pembe
11	Sitrat	Karbon kaynağı olarak yalnızca sitartın kullanımı	Mavi	Sarı/ açık yeşil
12	TDA	Triptofondan indolepurivik asit oluşturma	Kırmızı	Açık sarı
13	Jelatin	Jelatinin proteolitik enzimler ile sıvılaştırılması	Siyah	Renksiz
14	Malonat	Karbon kaynağı olarak yalnızca sodyum malonat kullanıldığında süksinik asidin fumarik aside çevriminin inhibisyonu	Mavi	Sarı
15	Inositol	Fermentasyon	Sarı	Mavi
16	Sorbitol			
17	Ramnoz			
18	Sukroz			
19	Laktoz			
20	Arabinoz			
21	Adonitol			
22	Rafinoz			
23	Salisin			
24	Arjinin	Arjininin ornitin, amonyak ve CO_2'ye çevrimi	Yeşil/ mavi yeşil	Sarı Sarı/yeşil

EK 2 Renk Kartı

Microgen™ GN A ID

Kuyucuk	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	7
Reaksiyon	Lysine	Ornithine	H2S	Glucose	Mannitol	Xylose	O.N.P.G.	Indole	Urease	V.P.	Citrate	T.D.A.	Nitrate
Negatif													
Pozitif													

Microgen™ GN B ID

Kuyucuk	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	24
Reaksiyon	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine 24 s	Arginine 48 s
Negatif													
Pozitif													

Ek 3 Akış Şeması

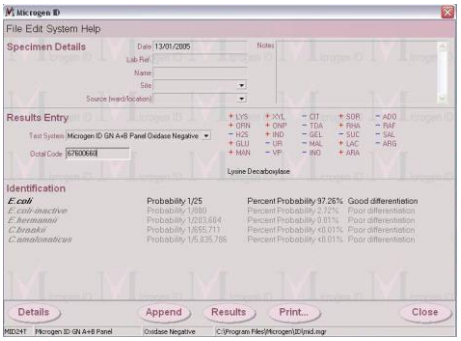
Hedef koloninin seçimi ve öze ile alınması

İnkübasyon sonrası ayıraçların ilavesi

İnokulumun hazırlanması

Sonuçların değerlendirilmesi

Kuyucuklara inokulumun ilavesi



Microgen Identification System (MID-60) ile identifikasyon

Anaerobik testler için mineral yağ ilavesi