

KALİTE KONTROLÜ PROSEDÜRLERİ

I GİRİŞ

Kligler Iron Agar (Kligler Demir Agar), gram negatif enterik basilleri, dekstrozu ve laktozu fermente etme ve sülfid üretme yetenekleri temelinde ayırt etmeye yardım eder.

II PERFORMANS TESTİ PROSEDÜRÜ

- Aşağıda listelenen kültürler ile temsili örnekleri inoküle edin.
 - 18 ila 24 saatlik **Trypticase** Soy Agar slant kültürleri kullanarak, tüpleri bir inokülasyon iğnesi ile uç kısmı delip slant yüzeyi boyunca ileri geri sürerek inoküle edin.
 - Tüpleri kapakları gevşek bir halde 35 ± 2 °C'de aerobik atmosferde inkübe edin.
- 18 ila 24 s sonra tüpleri gelişme ve reaksiyonlar açısından inceleyin.
- Beklenen Sonuçlar

Organizmalar	ATCC	Slant	Uç	Gaz	H ₂ S
* <i>Escherichia coli</i>	25922	Asit	Asit	+	-
* <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotip Typhimurium	14028	Bazik	Asit	+/-	+
* <i>Shigella flexneri</i>	12022	Bazik	Asit	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	Bazik	Bazik	-	-

*Kullanıcı Tarafından Kalite Kontrolü için tavsiye edilen organizma.

III EK KALİTE KONTROLÜ

- Tüpleri "Ürünün Bozulması" altında tanımlandığı şekilde inceleyin.
- Mevcut olan herhangi bir fiziksel bozukluğun kullanımı etkilemeyeceğinden emin olmak için temsili tüpleri görsel olarak inceleyin.
- $7,4 \pm 0,2$ spesifikasyonuna uyması için pH değerini oda sıcaklığında potansiyometrik olarak belirleyin.
- Inoküle edilmemiş temsili tüpleri 20 ila 25 °C ve 30 ila 35 °C'de inkübe edin ve 7 gün sonra mikrobiyal kontaminasyon açısından inceleyin.

ÜRÜN BİLGİLERİ

IV KULLANIM AMACI

Kligler Iron Agar, *Enterobacteriaceae* üyelerini, dekstrozu ve laktozu fermente etme ve sülfid üretme yetenekleri temelinde ayırt etmekte kullanılır.

V ÖZET VE AÇIKLAMA

1911'de Russell, idrar ve dışkıdan tifo basillerinin izolasyonu için yeni bir çift şekerli tüp tanımlamıştır.¹ Altı yıl sonra Kligler, tifo.-paratifo grubunun ayırt edilmesi için basit bir kurşun asetat besiyeri geliştirmiştir.² Daha sonra Kligler, tifo, dizanteri ve benzer basillerin izolasyonu ve ayırt edilmesinde kullanılan kültür besiyerini değerlendirmiş ve Russell'in besiyerini uygun bulmuştur.³ Bailey ve Lacey daha önceden pH göstergesi olarak kullanılan Andrade göstergesi için fenol kırmızısını değiştirmiştir.⁴

Kligler Iron Agar'ın mevcut formülasyonu, Kligler'in kurşun asetat besiyerinin özelliklerini Russell'in çift şeker agarının özellikleri ile birleştirir.

VI PROSEDÜR İLKELERİ

Kligler Iron Agar, kazein ve et peptonlarına ek olarak, bu şekerlerin fermentasyonu sırasında üretilen aside yanıt olarak fenol kırmızısı pH göstergesinin renk değişimlerine bağlı olarak enterik basil türlerinin ayırt edilmesini mümkün kılan laktozu ve dekstrozu içerir. Dekstroz konsantrasyonu laktoz konsantrasyonunun yalnızca %10'dur. Ferrik amonyum sitrat ve sodyum tiyosülfat kombinasyonu, hidrojen sülfid üretiminin saptanmasını mümkün kılar.

Laktozu fermente etmeyenler (örn., *Salmonella* ve *Shigella*), az miktarda dekstrozun fermentasyonu ile üretilen asit sebebiyle başlangıçta sarı bir slant oluştururlar. Slantın aerobik ortamında dekstroz stoku bittiğinde, reaksiyon asitlerin oksidasyonu sebebiyle baziğe döner (kırmızı slant). Bu dönüşüm, asidik kalan uçtaki (sarı uç) anaerobik çevrede oluşmaz. Laktoz fermenterleri, sarı slantlar ve uçlar oluştururlar çünkü slantta aerobik koşullar altında asidik bir pH değerini korumaya yetecek kadar asit üretilir. Karbonhidratı da fermente etme yeteneğinde olmayan organizmalar kırmızı slantlar ve uçlar oluştururlar.

Hidrojen sülfid üretimi uç boyunca siyah bir renk veya ucun üst kısmının yakınında bir halka oluşumu ile kanıtlanır. Gaz üretimi (aerojenik reaksiyon), ayrı ayrı baloncuklar veya agarın bölünmesi veya yerinden çıkması ile saptanır.

VII REAKTİFLER

Kligler Iron Agar

1 Litre Saf Su için Yaklaşık Formül*

Kazeinin Pankreatik Dijesti	10,0 g	Ferrik Amonyum Sitrat	0,5 g
Hayvan Dokularının Peptik Dijesti	10,0 g	Sodyum Tiyosülfat	0,5 g
Laktoz	10,0 g	Agar	15,0 g
Dekstroz	1,0 g	Fenol Kırmızısı	0,025 g
Sodyum Klorür	5,0 g		

*Performans kriterlerini karşılamak üzere gereken şekilde ayarlanmış ve/veya desteklenmiştir.

Uyarılar ve Önlemler: *In vitro* Diyagnostik Kullanım içindir.

Sıkılmış kapaklı tüpler, camın kırılmasına bağlı yaralanmaları önlemek için dikkatli bir şekilde açılmalıdır.

Tüm prosedürler boyunca mikrobiyolojik tehlikelere karşı uygun aseptik teknikleri ve belirlenen önlemleri uygulayın. Kullanımdan sonra, hazırlanan tüpler, örnek kapları ve diğer kontamine olmuş malzemeler atılmadan önce otoklavlanarak sterilize edilmelidir.

Saklama Talimatları: Alındıktan sonra, tüpleri karanlıkta 2 ila 8 °C'de saklayın. Dondurmaktan ve fazla ısıtmaktan kaçının. Kullanıma hazır olana kadar açmayın. Işığa maruz kalmamasını sağlayın. Kullanım öncesine kadar etikette belirtildiği şekilde saklanan tüp besiyeri son kullanma tarihine kadar inoküle edilebilir ve önerilen inkübasyon sürelerinde inkübe edilebilir. Besiyerinin inokülasyon öncesinde oda sıcaklığına gelmesini bekleyin.

Ürünün Bozulması: Mikrobiyal kontaminasyon belirtileri, renk değişimi, kuruma veya diğer bozulma belirtilerini görmeniz halinde tüpleri kullanmayın.

VIII ÖRNEK TOPLAMA VE İŞLEME

Kültür için uygun örnekler çeşitli teknikler kullanılarak işlenebilir. Ayrıntılı bilgi için ilgili metinlere bakın.^{5,6} Örnekler, antimikrobiyal ajanlar verilmeden önce alınmalıdır. Örneklerin laboratuvara hızlı bir şekilde ulaştırılması için gerekli düzenlemeler yapılmalıdır.

IX PROSEDÜR

Sağlanan malzemeler: Kligler Iron Agar Slantları

Gerekli fakat sağlanmamış malzemeler: Yardımcı kültür besiyeri, reaktifler, kalite kontrol organizmaları ve gerekli laboratuvar ekipmanı.

Test Prosedürü: Aseptik teknikleri uygulayın.

İnoküle etmek için, enterik plak besiyerinde izole bir koloninin yalnızca merkezine soğuk steril bir iğne ile dikkatlice dokunun, tüpün ucundaki besiyerine batırın ve ardından slantın yüzeyi boyunca ileri geri sürün. Karışık enfeksiyonlar oluşabileceğinden, her birincil plaktan birkaç koloni ayrı ayrı çalışılmalıdır.

Tüpleri, kapakları gevşek bir halde, 35 ± 2 °C'de aerobik atmosferde 18 ila 24 s inkübe edin.

Slanttaki bazik koşulları arttırmak için, gevşek kapak kullanmak suretiyle serbest hava değişimine izin verilmelidir.

Tüp sıkı kapatılmışsa, slantta asidik bir reaksiyon da oluşacaktır (yalnızca dekstroz fermantasyonunun neden olduğu).

Kullanıcı tarafından Kalite Kontrolü: "Kalite Kontrolü Prosedürleri"ne bakın.

Gerekli kalite kontrolleri ilgili yerel, resmi ve/veya federal düzenlemelere veya akreditasyon gerekliliklerine ya da laboratuvarınızın standart Kalite Kontrolü prosedürlerine uygun olarak gerçekleştirilmelidir. Kullanıcının, uygun Kalite Kontrolü uygulamaları için ilgili CLSI (eski adı NCCLS) yönergelerine ve CLIA düzenlemelerine uyması önerilir.

Tüpe koyulmuş besiyerinin pH değerini potansiyometrik olarak belirlemek için tüplere oturacak şekilde yeterince küçük boyutta tek bir elektrot kullanılmalıdır. Elektrotun ucu katı besiyerinde agarın merkezi kısmına konumlanmalıdır.

X SONUÇLAR

İnkübasyondan sonra, gaz oluşumu ve hidrojen sülfid üretimini not ederek, slant ve uçtaki reaksiyonu kaydedin. *Enterobacteriaceae* üyeleri (belirli bir cinsteki türlerin çoğunluğu) tarafından oluşturulan tipik reaksiyonlar.⁷

	Slant	Uç	Gaz	H ₂ S
<i>Citrobacter</i>	Bazik	Asit	+	+ veya -
<i>Edwardsiella</i>	Bazik	Asit	+	+
<i>Escherichia coli</i>	Asit	Asit	+	-
<i>Enterobacter</i>	Asit*	Asit	+	-
<i>Morganella</i>	Bazik	Asit	±	-
<i>Proteus</i>	Bazik veya Asit	Asit	+	+
<i>Providencia</i>	Bazik	Asit	±	-
<i>Salmonella</i>	Bazik	Asit	+	+
<i>Shigella</i>	Bazik	Asit	-	-

*Laktoz fermente edilmesine rağmen bazıya dönüşebilir (*E. aerogenes*).

Daha fazla bilgi için ilgili referanslara bakın.⁵⁻¹⁰

XI PROSEDÜRÜN KISITLI OLDUĞU ALANLAR

Hidrojen sülfid üreten organizmalar öyle çok siyah çökelti, ferröz sülfid üretebilir ki, uçta oluşturulan asitlik tamamen maskelenir. Bununla birlikte, H₂S indirgenirse, gözlenemez olsa bile uçta asidik bir koşul oluşur ve bu şekilde kaydedilmelidir.⁸

Teşhis için, organizma saf kültürde bulunmalıdır. Nihai teşhis için morfolojik, biyokimyasal ve/veya serolojik testler gerçekleştirilmelidir. Detaylı bilgiler ve tavsiye edilen prosedürler için ilgili metinlere bakın.⁵⁻¹⁰

XII PERFORMANS ÖZELLİKLERİ

Piyasaya sürülmeden önce tüm Kligler Iron Agar slantları performans özellikleri açısından test edilir. Slanta sürme yöntemi ile ekim yapılarak ve uç kısmı bir inokülasyon iğnesi ile delinerek, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) ve *Shigella flexneri* (ATCC 12022) **Trypticase** Soy Agar kültürleri ile temsili lot örnekleri test edilir. Tüpler, kapakları gevşek bir halde 35 ± 2 °C'de inkübe edilir ve 18 ila 24 s sonra gelişme ve reaksiyonlar açısından okunur. Bütün organizmaların gelişimi orta ila yoğundur. *E. coli* ile inoküle edilen tüpün slantı asit reaksiyonu gösterirken, diğer tüm inoküle edilen tüplerin slantları baziktir. *S. flexneri* uçta bir asit reaksiyonu, *P. aeruginosa* bir baz reaksiyonu oluşturur. *E. coli* uçta asit ve gaz üretir. *Salmonella* Typhimurium besiyerini karartmanın yanı sıra uçta asit reaksiyonu oluşturur; gaz bulunabilir veya bulunmayabilir.

XIII TİCARİ TAKDİM ŞEKLİ

Kat. No.	Açıklama
220896	BD BBL Kligler Iron Agar Slants, 10'lu boyut K tüp paketi
220897	BD BBL Kligler Iron Agar Slants, 100'lü boyut K tüp kutusu

XIV REFERANSLAR

1. 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.
2. Kligler, I.J. 1917. A simple medium for the differentiation of members of the typhoid-paratyphoid group. Am. J. Public Health. 7:1042-1044.
3. 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.
4. Bailey, S.F., and N.I. Lacy. 1927. A modification of the Kligler lead acetate medium. J. Bacteriol. 13:183-189.
5. 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.
6. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
7. Ewing, W.H. 1986. Edwards and Ewing's identification of the *Enterobacteriaceae*, 4th ed. Elsevier Science Publishing Co., Inc. New York.
8. MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore.
9. Baron, E.J., L.R. Peterson, and S.M. Finegold. 1994. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 9th ed. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis.
10. 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.

BD Diagnostics Teknik Desteği: yerel BD temsilcinizle temasa geçin veya www.bd.com/ds adresine başvurun.



 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.