

## 1. AMAÇ ve KAPSAM

Mikrobiyal kontaminasyon testlerinde, üreyen mikroorganizmaların teşhis edilmesini sağlamak.

## 2. SORUMLULUKLAR

Talimatın uygulanmasından; laboratuvar şefi, laboratuvar sorumlusu,analist, analist yardımcısı, sorumludur.

## 3. TANIMLAR ve KISALTMALAR

İMVİC testi :

- ( İ ) İndol oluşum testi
- ( MK) Metil kırmızısı testi
- ( VP) Voges- Proskauer testi
- ( C) Sitrat kullanımı testi
- (KH) Aerobik,anaerobik yıkımını ayırt eden tesler.

## 4. GÜVENLİK ÖNLEMLERİ

4.1.Herbir grup test yapılırken, bakteri ekilmemiş kontrol tüpleri de kullanılmalıdır.Bu kontrol tüplerinde reaksiyon olursa testler tekrarlanmalıdır.Ayrıca her çalışmada pozitif ve negatif reaksiyon verdiği bilinen bakterilerin ekimleri de yapılarak, hep birlikte değerlendirilmelidir.

4.2. Biyokimyasal testlerde kullanılacak kolonin ilk olarak selektif olmayan besiyerlerine ekilmesi önerilmektedir.Daha sonra izole edilen koloni selektif bir besi yerine ekilmelidir.

## 5. EKİPMANLAR

Tüp, öze, mikroskop, lam, otoklav, pastör fırını, etüv.

## 6. MATERYAL

### 6.1. Metil kırmızısı indikatörü :

0,1 g metil kırmızısı % 95 lik 300 ml etil alkol içinde eritilip, üzerine 200 ml distile su ilave edilir.

### 6.2. Glikoz fosfat pepton besiyeri : (MK-VP sıvı besiyeri)

Polipepton 7 g.  
Glikoz 5 g  
(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 5 g  
Distile su 1000 ml

pH : 6.9 Tüplere 5 ml tevzi edilerek otoklavlanır.

### 6.2. Alfa – naftol ( renk yoğunlaştırıcı )

Alfa-naftol 5 g  
Saf etil alkol 100 ml

### 6.3. % 40 KOH ( okside edici )

HAZIRLAYAN

ONAYLAYAN

KOH : 40 g  
Distile su : 100 ml

#### 6.4. Triptofan besiyeri

Pepton ya da triptikaz (kazein pankreatik digest) 2 g  
Na Cl 0,5 g  
Distile su 100 ml

Besiyeri steril edildikten sonra tüplere 5 ml tevzi edilir.

#### 6.5. Ehrlich's ayracı:

P-dimetil amino benzaldehit 2 g  
Saf etil alkol 190 ml  
Konsantre HCl 40 ml

#### 6.6. Kovaks ayracı

Saf amilalkol ya da izoamil alkol 150 ml  
p- dimetil amino benzaldehit 10 g  
Konsantre HCl 50 ml

#### 6.7. Simmons sitrat besiyeri

Amonyum dihidrojen fosfat 1 g  
Dipotasyum fosfat 1 g  
NaCl 5 g  
Sodyum sitrat 2 g  
Magnezyum sülfat 0.20 g  
Agar 15 g  
Brom timol mavisini 0.08 g  
Distile su 1000 ml  
PH : 6.9

Tüplere 5 ml tevzi edilip, steril edilir, yatık dondurulur.

#### 6.8. Oksidaz test ayıraçları

6.8.1. Tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorit ( % 1 = kovac's ayracı)

6.8.2. Dimetil-p- fenilendiamin dihidroklorit ( %1= Gordon ve McLeod's ayracı)

### 7. UYGULAMA

#### 7.1. İndol testi

Triptofanaz enzimine sahip bakteri, triptofanı hidrolize ve deamine ederek indol, püvik asit ve amonyak oluşturur. İndol oluşturmak pek çok mikroorganizma türünün identifikasyonunda önemli bir karakteristiktir. Özellikle E.colinin ( indol pozitif) Klebsiella Enterobacter, Serratia (indol negative) üyelerinden ayırımında faydalıdır. Test edilecek mikroorganizma triptofan sıvı besiyeri içine inokule edilir . 35 °C de 18-24 saat inkübe edilir. Bu süre sonunda 0.5 ml veya 15 damla ayıraç tüp duvarından sızdırılarak damlatılır. ( Ehrlich ayracı kullanılacak ise önce 1 ml ksilen

HAZIRLAYAN

ONAYLAYAN

eklendikten sonra damlatılır.Kovaks için bu gerekli değildir). Besiyeri üzerinde ayıraç eklenmesinden sonra parlak kırmızı bir halka oluşursa test (+) dir.E.coli varlığını gösterir.Halka oluşmazsa test (-) dir..

### 7.2. Metil kırmızısı testi ( MK)

KH fermantasyonu sonucu oluşan mikst asit miktarlarını kantitatif olarak gösteren bir testtir. Metil kırmızısı pH 6.0 ( sarı ) – pH 4.4 ( kırmızı) arasında çalışan bir pH indikatörüdür.MK kullanılan ortamda eğer kırmızı renk oluşursa KH kullanımına bağlı çok milyarda asit oluşuyor demektir.

Bu test pozitif reaksiyon için mikroorganizmanın glikozdan mikst asit fermantasyonu yolu ile kuvvetli asitler oluşturmasını gerektiren kantitatif bir testtir.

Test edilecek mikroorganizmanın saf kültürü MK- VP Broth içine inoküle edilir. 35 ° C de 48-72 saat inoküle edilir.Süre sonunda 5 damla metil kırmızısı damlatılır.Yüzeyde kırmızı renk oluşumu bakterinin pH yı 4.4 veya altına indirecek kadar asit oluşturduğunu ve testin (+) olduğunu ( E.coli) varlığını gösterir.Zayıf asidik ürün oluşumunda sarı kırmızı arasında portakal rengi bir renk oluşumu (+) olarak değerlendirilmemelidir.Besiyerinin sarı rengi değişmezse testin (-) olduğunu ( Enterobacter aerogenes) varlığını gösterir.

### 7.3. Voges- Proskauer testi ( VP)

Bazı bakteriler glikozu fermente ederek çok miktarda Asetil metal karbinol,2-3 Bütülen glikol ve diasetil gibi nötral maddeler oluşturmaktadır.Bunlarda diasetil guanido grup ile reaksiyon verir ve eosin bir renk alır.Guanido grup tüm proteinlerde bulunan arginin yada besiyerine koyulan kreatininde bulunur.Kültüre alkali ( % 40 KOH) eklenmesi atmosferik oksidasyonu hızlandırır. 2-3 Bütülen glikol ve setil metal karbinol ( Asetoin) bileşiklerini diasetile çevirir.Alfa-naftol rengin koyulaşmasına yardım eder, duyarlılık ve hızı artırır.Glikozun fermantatif yıkımında prüvik asit önemli bir ana yıkım ürünüdür.Çeşitli bakterilerin içerdiği enzim sistemlerine bağlı olarak prüvik asit çeşitli metobolik yollara girerek parçalanır.Bunlardan birisi de asetoin gibi nötral bir son ürün oluşumudur.Klebsiella Enterobacter Serratia grubuna dahil organizmalar glikozun metabolizmasında ana son ürün olarak Asetoin üretirler.Oluşan miks asitler oldukça azdır.% 40 KOH eklendiğinde asetoin diasetile çevrilir, alfanaftol eklenmesi ile kırmızı kompleksler görülür. Test edilecek mikroorganizmanın saf kültüründen besiyeri içine inoküle edilir.35 0C de 24 saat inkübe edilir.Üzerine 0.6 ml % 5 alfa-naftol eklenir.Bunu takiben 0.2 ml % 40 KOH eklenir.Sonra tüp çalkalanır oksijen ile besiyerinin teması sağlanır.10-15 dakika tüp sarsılmadan bekletilir.Kırmızı renk oluşumu diasetil varlığının sonucudur. Kırmızı renk oluşumu testin (+) olduğunu Enterobacter.aerogenes varlığını gösterir.

### 7.4. Sitrat kullanımı testi

Bazı bakteriler karbon kaynağı olarak KH lar yerine sitratı kullanabilir.Test edilecek bakterinin sitrat kullanımı sitrat besi yerinde alkali ürünler oluşumu sayesinde saptanabilir.Sitrat besiyeri sodyum sitratı anyon olarak karbon kaynağı olarak kullanır.Amonyum fosfat ise nitrat kaynağıdır.Sitratı kullanabilen bakteri aynı zamanda amonyum tuzlarından amonyak (NH<sub>3</sub>) üretimiyle nitrojen açığa çıkarabilir.Bu da ortamda amonyum hidroksit dönüşümü sonucunda alkalizasyona neden olur.Brom timol mavisi pH indikatörü olarak kullanılır.pH 6.0 altında sarı, pH 7.6 üzerinde mavidir.

Test edilecek mikroorganizma sitrat besiyerinin yatık yüzeyine çizilerek ekilir.35 ° C de 24-48 saat inkübe edilir.Koyu mavi renk testin (+) olduğunu Enterobacter aerogenes varlığını gösterir.

### 7.5. Koagülaz testi

S.aureus idendifikasyonunda ve diğer staphilococlardan ayrımında kullanılan bir testtir.Fibrinojeni fibrine çevirir.Bu da uygun test ortamında görülebilir bir pıhtı oluşturur.

HAZIRLAYAN

ONAYLAYAN

0.5 ml koagulaz plasma tüpe konur.Üzerine test edilecek bakterinin kolonisi ( kültür sıvı besiyerinden 0.5 ml) alınarak çalkalanır.Tüp 35 ° C de 4 saat inkübe edilir.Pıhtı oluşumu tüp hafifçe sallanarak kontrol edilir.Süre sonunda pıhtı oluşmaz ise oda ısısında 18 saat inkübe edildikten sonra tekrar değerlendirilir. Tüpte herhangi bir pıhtılaşma izlenirse testin (+) olduğunu S. aureus varlığını gösterir.

#### 7.6. Oksidaz testi

Sitokrom oksidaz demir içeren bir hemoproteindir.Aerobik solunumda solunum zincirinde oksijene elektron trasverinde son halkayı oluşturur.Sitokram sistemi zorunlu anaeroplarda bulunmaz.Bu nedenle bunların tanımında önemlidir.Oksidaz negative olan Enterobacteriaceaeların oksidaz pozitif olan aeromonas,Pseudomonas,Neisseriae, Campylobacter den ayırımında kullanımı önemlidir.Oksijen için artifisiyel bir elektron akseptörü olan Dimetil p- fenilendiamin dihidroklorit kullanılır.

Petri plağında geliştirilmiş test edilecek mikroorganizmanın üzerini kaplayacak şekilde ayıraçtan dökülür.1-2 dakika içinde oksidaz enzimi taşıyan koloniler pembe renk verir.10-30 dakika içinde bu renk organizmaların ölmesinde dolayı koyu kırmızı ve siyah renge dönüşür.Bu deneyde Pseudomonasların diğer gram (-) çomak bakterilerinden ayrılmasından yararlanılmaktadır.

## 8.RAPORLANDIRMA

### 9. İLGİLİ DOKÜMANLAR

9.1.Döküman hazırlama ve kontrol prosedürü Kod no:PR:01/KYB

9.2.Kayıtların kontrolü prosedürü Kod no PR:02/KYB

9.3. Mikrobiyal kontaminasyon test çalışma talimatı ÇT007 / İKM-16

### 10.REFERANSLAR

10.1.Mikrobiyoloji laboratuvar yöntemleri kitabı

10.2.Avrupa farmakopesi

10.3. Diagnostic Microbiology Sixth Edition

### 11. KAYITLAR

11.1.Protokol defteri

11.2. Mikrobiyoloji Laboratuvarında yapılan kontroller sonucu ortaya çıkan tüm kayıtlar laboratuvar şefi ve laboratuvar sorumlusu kontrolünde Kayıtların Kontrolü Prosedürüne göre laboratuvarda 5 yıl süre ile saklanır.

HAZIRLAYAN

ONAYLAYAN