



T.C. Sağlık Bakanlığı
Türkiye Halk Sağlığı
Kurumu

Ulusal Mikrobiyoloji Standartları

SUDA *LEGIONELLA* TÜRLERİNİN TANIMLANMASI

T.C. Sağlık Bakanlığı
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Ankara – 2014

© T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
“Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Suda *Legionella* Türlerinin Tanımlanması”

Bu Rehber; T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı tarafından hazırlanmış ve bastırılmıştır. Her türlü yayın hakkı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'na aittir. Kaynak gösterilmeksizin alıntı yapılamaz. Kısmen dahi olsa alınamaz çoğaltılamaz ve yayımlanamaz. Alıntı yapıldığında kaynak gösterimi “Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Suda *Legionella* Türlerinin Tanımlanması”. T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı Yayın No, Ankara, 2014 şeklinde olmalıdır. Ücretsizdir. Parayla satılamaz.

ISBN: 978-975-590-512-9

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı Yayın No:965

Yayın tarihi: 2014

Baskı sayısı: 200

Basım yeri: Ankara

Basım yılı: 2014

Baskı: Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Baskı Birimi



Ulusal Mikrobiyoloji Standartları

SUDA **LEGIONELLA TÜRLERİNİN** TANIMLANMASI

T.C. Sağlık Bakanlığı
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Referans Laboratuvarı
Ankara – 2014

ÖNEMLİ NOT

Bu Rehber

(Suda *Legionella* Türlerinin Tanımlanması)

Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı tarafından hazırlanmış bir dokümandır. Eş zamanlı olarak THSK web sitesinde (bkz. www.thsk.gov.tr) de kullanıma sunulan Rehber, 3 yılda bir güncellenecektir.

YAZARLAR

EFSUN AKBAŞ
Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı
Ulusal *Legionella* Referans Laboratuvarı Kurucusu ve Sorumlusu (1993-2009)

SELİN NAR ÖTGÜN
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Referans Laboratuvarı Sorumlusu

MERAL TURAN
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Referans Laboratuvarı

TÜRKİYE HALK SAĞLIĞI KURUMU YAYIN KOMİSYONU

HASAN IRMAK
Tüketici ve Çalışan Güvenliği Başkan Yardımcısı

MUSTAFA BAHADIR SUCAKLI
Erken Uyarı-Cevap ve Saha Epidemiyolojisi Daire Başkanı

NAZAN YARDIM
Obezite, Diyabet ve Metabolik Hastalıklar Daire Başkanı

KANUNİ KEKLİK
Toplum Sağlığı Hizmetleri Daire Başkanı

YAYIN KOORDİNATÖRLERİ

SELİN NAR ÖTGÜN
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Referans Laboratuvarı Sorumlusu

MERAL TURAN
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Referans Laboratuvarı

TEŞEKKÜR

T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, bu Rehberin hazırlanmasında görev alan ve emeği geçen herkese teşekkür eder.

İÇİNDEKİLER

1. Giriş	1
2. Genel bilgiler.....	3
3. Su örneklerinin alınması	7
3.1. Gerekli ekipman	7
3.2. Örnek alırken dikkat edilecek hususlar	7
3.3. Örneklerin alınması	8
3.3.1. Sıcak su tanklarından su örneği alınması.	
3.3.2. Lavabo musluklarından eküvyon ile örnek alınması	
3.3.3. Duş başlıklarından eküvyon ile örnek alınması ²	
3.3.4. Musluk veya duş başlığından doğrudan su örneği alınması	
3.3.5. <i>Air-conditioning</i> soğutma kulesinden su örneği alınması	
3.4. Örneklerin laboratuvara gönderilmesi	9
4. Su örneklerinin incelenmesi	11
4.1. Gerekli cihazlar ve sarf malzemesi	11
4.2. Örnek tipleri	12
4.3. Hazırlık	12
4.4. Su örneklerinin besiyerlerine ekilmesi	13
4.4.1. Su tanklarından (soğuk ve sıcak) alınan örneklerin ekilmesi	
4.4.2. <i>Air-conditioning</i> soğutma kulesi su örneğinin ekilmesi	
4.4.3. Musluk ve duşlardan eküvyonla alınan örnekler	
4.4.4. Musluk ve duşlardan şişeye doldurularak alınan örnekler	

4.5. İnkübasyon koşulları	15
4.6. Kuşku kolonilerin tanımlanması	17
4.6.1. Plakların okunmasında pratik öneriler	
4.6.2. Plakların değerlendirilmesi	
4.6.3. Koloni sayımı ve sudaki bakteri miktarının hesaplanması	
4.6.4. Sonraki identifikasyon basamakları	
4.6.5. Sonuçların rapor edilmesi	
4.7. İzolatların Referans Laboratuvara gönderilmesi	20
5. Besiyeri ve reagenlerin hazırlanması	23
5.1. Genel prensipler	23
5.1.1. Saklama	
5.1.2. Besiyeri yapma	
5.2. <i>Legionella</i> besiyerleri	27
5.2.1. <i>Legionella</i> temel besiyeri (BCYE)	
5.2.2. <i>Legionella</i> seçici besiyerleri (DGVP ve CCVC)	
5.3. <i>Legionella</i> besiyerlerinin hazırlanması	29
5.3.1. BCYE'nin hazırlanması	
5.3.2. DGVP'nin hazırlanması	
5.3.3. Antibiyotiklerin hazırlanması	
5.4. Besiyeri kalite kontrol prosedürü	38
5.4.1. Amaç	
5.4.2. Sterilite kontrol	
5.4.3. İnokulum hazırlanması	
5.4.4. Sonuçların kaydedilmesi	
5.5. İzolat saklama prosedürü	39
5.5.1. Saklama besiyerinin hazırlanması	
5.5.2. Suşların saklanması	
5.5.3. Saklanmış izolatın gerektiğinde yeniden pasajlanması	
6. Kaynaklar.....	41
7. Ekler.....	43
Ek-1: Su örnekleri alma formu	43
Ek-2: Su örnekleri çalışma formu.....	44
Ek-3: Besiyeri kalite kontrol kayıt tablosu	45

Kısaltmalar ve Tanımlar

aerosol / belirli bir kuvvet etkisi altında sıvıların (veya katıların) ortam atmosferine damlacıklar halinde dağılması veya saçılması.

AT / asitle muamele

BCYE / buffered charcoal yeast extract agar

BGD / biyogüvenlik düzeyi. mikroorganizmaların risk sınıflaması temelinde dört laboratuvar biyogüvenlik düzeyi tanımlanmıştır; ajanların bulaşma, yayılma potansiyeli ve patojenlik arttıkça laboratuvar korunma düzeyi BGD1'den BGD4'e doğru artar. Klinik mikrobiyolojide karşılaşılan ajanların büyük kısmı BGD2 laboratuvar şartlarının sağlanmasını gerektirmektedir.

BCB / brom cresol purple

BTB / brom tymol blue

bildirimi zorunlu hastalık / yasal bir gereklilik ile uygun yetkide bir mercie (yerel veya merkezi sağlık otoritesi) rapor edilmesi zorunlu olan hastalık.

CCVC / cycloheximide colistine vancomycine cephalothine

D / direkt

DGVP / dye glycine vancomycine polymixine B

FA / filtrasyon asit

Lejyoner hastalığı sürveysi / vaka sürveysi ve çevresel sürveysi olmak üzere iki bölümde yapılır. Çevresel sürveysi her zaman vaka sürveysine esastır; vakaların ve salgınların kaynağının araştırılması için epidemiyolojik amaçlarla yapılır.

MRLDB / Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı (THSK'nın)

nozokomiyal enfeksiyon (hastane-kaynaklı enfeksiyon) / bir hastane ya da tıbbi kuruma başvuru sırasında herhangi bir enfeksiyon belirtisi yokken veya hastalığın inkübasyon süresi içinde olmadığı bilinen bir bireyde hastaneye yatıştan sonra ortaya çıkan enfeksiyon.

rezervuar / bir enfeksiyöz ajanın normal olarak bulunabileceği ve çoğalabileceği (ve diğer konaklar için enfeksiyon kaynağı olabilecek) kişi, hayvan, toprak veya çevredir.

soğuk zincir / biyolojik bir maddenin bir yerden başka bir yere gönderilmesi, taşınması ve geçici süre ile saklanması esnasında tüm aşamalarda aksi belirtilmedikçe 2°-8°C (buzdolabı/buzluk ısı koşulları) ısı aralığı içinde tutulması

sürveys / verilerin sistematik olarak toplanması, biriktirilmesi ve özellikle elde edilen sonuçlara göre harekete geçecek kişiler başta olmak üzere bu sonuçlara ihtiyacı olan birimlere zamanında geri bildirimini sağlayacak şekilde verilerin değerlendirilmesi sürecidir.

THSK / Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (Sağlık Bakanlığının yeniden yapılanması kapsamında, başlıca, eski adı *Refik Saydam Hifzissıhha Merkezi Başkanlığı* olan kurum ile eski adı *Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü* olan birimleri bir çatı altında toplayan yapı)

ulusal referans laboratuvar / bir enfeksiyon etkeninin araştırılmasında tanıya yardımcı tüm teknikleri kullanabilen, söz konusu etken ile ilgili uzun dönemli bilgi ve deneyime sahip, gerektiğinde aynı çalışmalarını yürüten uluslararası laboratuvarlarla işbirliği yapan, gerektiğinde epidemiyolojik araştırmalar için ulusal sağlık otoritesine (sağlık bakanlığı) uygun teknikler ile veri sağlayan, ulusal laboratuvar; THSK bünyesindeki Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Referans Laboratuvarı'dır.

UMS / Ulusal Mikrobiyoloji Standardı

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

1. GİRİŞ

Lejyoner hastalığı, *Legionella pneumophila* ve daha az sıklıkla diğer *Legionella* türü bakterilerin yol açtığı ağır seyirli sistemik bir enfeksiyondur. Lejyoner hastalığı özellikle çevresel bir kaynaktan yayılarak salgın yapma potansiyeli nedeniyle halk sağlığı önemine sahiptir. Özellikle seyahat-ilişkili ve nozokomiyal Lejyoner hastalığı formları dünyanın pek çok ülkesinde sürveyans sistemlerince izlenirler. Ülkemizde de Lejyoner hastalığı bildirim zorunlu hastalıklar arasında yer almakta olup hastalığın kontrolü amacıyla özel bir program yürütülmektedir. Bununla birlikte uluslararası bildirim zorunlu bir hastalık olarak ta dikkat çekmektedir (1-4).

Lejyoner hastalığının sürveyansı ve kontrolünde doğru, güvenilir ve zamanında veri toplanması son derece önemlidir. Mikrobiyoloji laboratuvarları sürveyans sistemine veri sağlayan temel yapılardan biridir. Lejyoner hastalığının sürveyansı ve kontrolüne yönelik çalışmalar mevzuat ile düzenlenmiş olup sistemin kanıta dayalı işlemesi esas alınmıştır. Bu da tanı kapasitesinin geliştirilmesi gereğini beraberinde getirmektedir (1-4).

Lejyoner hastalığı kontrol programı kapsamında bir vaka saptandığında, bu vakanın bakteriyi aldığı kaynağın, başka insanlar için de potansiyel hastalık odağı olabileceği bilinmektedir. Bu nedenle bir an önce epidemiyolojik araştırmaların başlatılması, kaynak olduğundan şüphelenilen suyun *Legionella* varlığı açısından incelenmesi büyük önem taşır (1-5).

Rehberin amacı

Bu Rehber, suda *Legionella* türlerinin tanımlanmasında geçerli yöntemlerin kullanımının yaygınlaştırılması ve *Legionella* tanı kapasitesinin geliştirilmesi amacıyla oluşturulmuştur.

Rehberin, laboratuvarlararası tanı standardizasyonu sağlaması da hedeflenmektedir. Bununla birlikte "Lejyoner Hastalığı Kontrol Programı" na doğru ve güvenilir veri sunulması sayesinde, etkin kontrol önlemlerinin geliştirilmesi mümkün olabilecektir. Rehberin aynı zamanda kurumlar ve sektörler arası iletişim ve işbirliğinin güçlenmesine de katkı sağlayacağı umut edilmektedir.

Rehberin hedef kitleleri

Rehberin başlıca dört farklı hedef gruba hizmet edeceği düşünülmektedir.

- 1 Öncelikle sahada mikrobiyoloji laboratuvarlarında nihai karar sorumluluğu olan profesyonellere - tanıda standart yaklaşımları sunan bir kaynak olarak;
- 2 Hekimlere - laboratuvar hizmetlerinin standardı ve uygun testlerin seçimi / talep edilmesi hakkında bilgi sağlayan bir kaynak olarak;

- 3 Halk sağlığı otoritelerine – özellikle halk sağlığını yakından ilgilendiren durumların ya da salgınların araştırılmasında, bir yandan olması gereken asgari laboratuvar kapasitesi hakkında bir yandan da tanıya ulaşılması süreç ve süreleri hakkında bilgi sağlayan bir kaynak olarak;
- 4 Ödeme kurumlarına – mikrobiyolojik tanıda asgari standart mikrobiyolojik işlem paketleri hakkında bilgi sağlayan ve ücretlendirmelerin rasyonel bir çerçevede yapılmamasına destek verecek bir kaynak olarak.

Rehberin kapsamı

Bu Rehber, *Legionella* türlerinin tanımlanmasına yönelik çevresel örneklerin nasıl alınacağına dair bilgi verir. Aynı zamanda bu örneklerin laboratuvara ulaştırılmasında dikkat edilmesi gereken hususları belirtir. Bununla birlikte örneklerin laboratuvar incelemesinde gerekli cihazlar, sarf malzemeler, besiyeri ve reagen hazırlama prensipleri, besiyeri kalite kontrol uygulamaları, kültür için ön hazırlık işlemleri, ekim yöntemleri, inkübasyon koşulları, kuşkulu kolonilerin tanımlanması aşamaları hakkında bilgi vermektedir.

Rehberin kullanımı

Yayına hazır hale getirilen Rehber bu haliyle bir TASLAK dokümandır. Rehber, ilgili kurum ve kuruluşların, ve sahadaki kullanıcıların görüşlerine açılmış bulunmaktadır. Alınacak geri bildirimlere göre son şeklinin verilmesi ve 2014 sonu itibarıyla de onaylanmış belge olarak yayınlanması hedeflenmektedir.

Rehberin basılı materyal olarak yayınlanması ve THSK web sitesinde de yayınlanarak güncellemelerin paylaşılması hedeflenmektedir.

usyprl@saglik.gov.tr adresinden bize ulaşabilir; içerik ve diğer hususlarla ilgili her türlü önerinizi ve eleştirinizi ileterek veya uygulamada karşılaştığınız sorunları paylaşarak Rehberin geliştirilmesine katkı sağlayabilirsiniz.

2. GENEL BİLGİLER

Mikrobiyal ekoloji

Legionella'lar doğada normalde bulunan mikroorganizmalardır. Bununla birlikte doğadaki ve yapay su sistemlerindeki biyofilm katmalarında yerleşme ve çoğalma özelliğine sahiptirler. Muhtemelen doğal suların, şehir şebekesine verilmek üzere geçirdiği klorlama ve benzeri dezenfeksiyon işlemleri ile tam olarak yok edilemezler. Böylece çok düşük konsantrasyonlarda olsa bile bina su tesisatlarına ulaşırlar; uygun şartları bulduklarında da yerleşir ve çoğalırlar (5-8).

Özellikle binaların sıcak ve soğuk su sistemleri, soğutma kuleleri, kaplıcalar, sıcak havuzlar, sulama havuzları, balık yetiştirme havuzları, dekoratif amaçlı havuz ve fiskiyeler, hastanelerdeki solunum terapi ekipmanları, dış ünitelerinin su boruları, göz yıkama musluk ve duşları, "fiskiye" tipi yangın söndürme sistemlerinin içinde kalan durgun suda oluşan sedimentte ve biyofilm tabakası ile ölü boşluklarda dış etkenlerden korunarak çoğalmaya başlarlar (5,6,9,10).

Bulaşma yolu

Legionella türlerinin insana bulaşmasında hemen her zaman *çevre* bir rezervuarın rolü olduğundan, hastalık çevresel enfeksiyon olarak da tanımlanır. Eğer kontamine bir su kaynağı yoksa Lejyoner hastalığı gelişmez (4-6,11).

Lejyoner hastalığına yakalanma olasılığı, su kaynağının kolonizasyon düzeyi, maruz kalan kişinin duyarlılığı ve kontamine suya maruziyetin yoğunluğu ile ilgilidir. Bakterinin bireye bulaşması ve akciğerlere ulaşmasında iki temel yol vardır. Yaygın olarak kabul gören yol; solunum havasına çevresel kaynaklardan yayılan ve *Legionella* içeren su aerosollerinin solunmasıdır. Suyun bir kuvvet etkisi altında (soğutma-kulelerinin fanları, jakuzi ve duş başlıkları, sprey nemlendirme cihazları, dekoratif fiskiyeler...) aerosoller halinde havaya saçıldığı, *Legionella* içeren 5µm'den küçük aerosollerin solunum yolu ile alınarak alveollere ulaştıkları düşünülmektedir. Diğer önemli bulaşma yolu; *Legionella* içeren suyun aspirasyonu ya da orofarinkse yerleşmiş bakterinin solunum yollarına geçmesidir (4-6,11).

Bugüne kadar insandan insana bulaşma gösterilememiştir (4-6,11).

Risk faktörleri

Konak tarafından alınan bakteri her zaman hastalık yapmaz. Hastalığın ortaya çıkması için bireyin bazı risk faktörleri taşıyor olması gerekir. En sık karşılaşılan risk faktörleri arasında ileri yaş (>50 yaş), erkek hasta, kronik akciğer hastalığı, sigara ve alkol kullanımı, immün sistemi baskılayan herhangi bir hastalığın olması veya immünyüpresyona neden olacak ilaç kullanılması (organ transplantasyonu, kortikosteroid ve benzeri ilaçların kullanımı, maligniteler, diabetes mellitus vb), hastanelerde cerrahi işlemler sırasında uygulanan genel anestezi ve endotrakeal entübasyonlar yer almaktadır (5,6,11-13).

Sürveyans özellikleri

Teorik olarak her bina su sistemi *Legionella* türleri ile kolonize olabilir. Öte yandan; bir bina su sistemi *Legionella*'larla kolonize olsa bile o binada bulunan bireylerin hiç birinde hastalık ortaya çıkmayabilir. Bu nedenle seyahat ilişkili Lejyoner hastalığı sürveyansı esas olarak "vaka sürveyansı" üzerine kurulmuştur. Bu kapsamda bina suyunun incelenmesi, yalnızca bina ile ilişkili olabileceği düşünülen bir vaka varlığında epidemiyolojik amaçlar için önerilir. Seyahat ilişkili Lejyoner hastalığı kontrol programları kapsamında; bildirilmiş bir vaka ile ilişkili olmadığı halde, bina su sistemlerinin *Legionella* varlığı açısından incelenmesi, epidemiyolojik açıdan değer taşımayan gereksiz bir maliyet ve zaman kaybıdır. Ancak hastane kaynaklı Lejyoner hastalığının kontrol programları, seyahat ilişkili Lejyoner hastalığı kontrol programlarından farklılık gösterir. En önemli fark, vaka olmasa bile hastane su sistemlerinin düzenli aralıklarla *Legionella* kolonizasyonu açısından incelenmesi olup, amacı hastanelerdeki rutin koruyucu önlemlerin etkinliğinin değerlendirilmesidir (3-6,10,14-16).

Laboratuvar güvenliği

Legionella türü bakteriler, risk grubu 2 mikroorganizmalardır. Risk Grubu 2 mikroorganizmalarla ilgili işlemler Biyogüvenlik Düzeyi 2 şartlarına uygun dizayn edilmiş laboratuvarlarda yürütülür.

Bütün kültürler ve klinik örnekler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima standart önlemler uygulanmalıdır. Önlemler risk değerlendirmesi ile desteklenmelidir (*bkz.* "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi"). Solunum yolu örneklerinin kültüre veya diğer işlemlere hazırlanması başta olmak üzere aerosol oluşturması muhtemel tüm laboratuvar çalışmaları bir biyogüvenlik kabini içinde yapılmalıdır (17).

Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Örneklerin kabul edilmesinden sonucun raporlanmasına kadarki adımlarda görev alan tüm personel; (i) tekniklerin uygulanmasından önce amaçlanan bütün kullanımlar ile ilgili tam bir eğitim almış olmalı; (ii) kullanılan tekniklere tüm yönleriyle aşina olmalı; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Güvenlik önlemlerine uyumun sağlanmasından, tekniklerin standart prosedürlere uygun gerçekleştirilmesinden ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

Suda *Legionella* türlerinin tanımlanmasında laboratuvar incelemenin önemi

Sularda *Legionella* bakterisinin aranmasına yönelik laboratuvar incelemeleri; Lejyoner Hastalığı Kontrol Programı'na entegre bir şekilde yürütülmektedir (1,3). Suda *Legionella*

bakterisinin araştırılması; örnek alma aşamasından itibaren dikkatli bir çalışma gerektiren karmaşık bir işlemler toplamıdır (5,18,19).

Su örnekleme, doğru ve uygun yapılması gereken en önemli adımdır. Amaç bakterinin su sistemindeki potansiyel riskli noktalarda yerleşmiş olup olmadığını göstermek olduğu için; örnekleme yapılacak yerler bu dökümanda verilen prensipler göz önüne alınarak dikkatlice seçilmelidir (5,14,18,19).

Bakterinin sudan izolasyon ve identifikasyonu ise laboratuvar alt yapısının uygun bir şekilde kurulması, besiyerlerinin hep aynı standartta hazırlanması, koloni özelliklerinin iyi değerlendirilmesi ve sonraki basamaklarda validasyonu yapılmış uygun kitlerin kullanılması ile sağlanabilir (5,14,18-22).

İzolat saklama ve transportu ile ilgili prosedürler ise her laboratuvar tarafından bilinmesi gereken kurallara göre yapılır. İyi bir mikrobiyoloji laboratuvarı minimum saklama alt yapısına (-20°C derin dondurucu) sahip olmalı ve elde ettiği bakteri izolatlarını arşivleyebilmelidir (23).

Suda *Legionella* bakterisi araştıran laboratuvarlar, sonuçların doğruluğu ve güvenilirliği açısından tartışma konusu olmaya yatkın laboratuvarlardır. Çalışmanın her aşamasında iç kalite kontrol tekniklerinin kullanılması, özellikle besiyeri kalite kontrolü büyük önem taşır. Ayrıca laboratuvar belli aralıklarla dış kalite değerlendirme programlarına katılmalıdır. Her gün düzenli olarak etüv ve buzdolabı ısıları harici termometrelerle ölçülüp kaydedilmeli, standart solusyonlarla haftada bir pH metre kalibre edilmeli, diğer ölçüm cihazlarının (hassas terazi v.b.) ve otomatik pipetlerin kalibrasyonları da belli aralıklarla yaptırılmalıdır (18).

Mikrobiyoloji laboratuvarında çalışmanın en önemli esaslarından biri kayıt tutmaktır. Çalışmadan kaynaklanan herhangi bir sorun söz konusu olduğunda; sorunun çözümü tutulan kayıtların incelenmesi ile mümkün olabilmektedir. Laboratuvar performansının olumlu veya olumsuz yönde gelişmesi de yine bu kayıtlardan takip edilebilmektedir. Laboratuvarın ihtiyaç duyacağı başlıca kayıt formları bu dökümanda verilmiştir (18).

Suda *Legionella* türlerinin tanımlanması; bu dökümanda su örneklerinin alınmasından itibaren adım adım verilecektir. Her bölümde gerekli ekipman ve sarf malzemesi de belirtilmiştir. Ayrıca gerekli formlar ve tablolar "Ekler" kısmında sunulmuştur.

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

3. SU ÖRNEKLERİNİN ALINMASI

3.1 GEREKLİ EKİPMAN

- steril, burgu kapaklı 100 ml'lik şişe veya örnek alma kapları
- steril, burgu kapaklı tüpler (15X160mm), tüp sporu
- steril pamuklu çubuklar (önceden tüp içinde steril edilmiş çift eküvyon)
- etiket,
- cam kalemi
- örnek kayıt formu (Ek-1)
- taşıma kabı

3.2 ÖRNEK ALIRKEN DİKKAT EDİLECEK HUSUSLAR

- Su şişelerinin ve tüplerin üzeri önceden etiketlenmeli, yalnızca numara değil, örneklerin alındığı yerin adı da yazılmalıdır. Böylece olası karışıklıklar önlenir. Laboratuvara aynı anda başka kurumlardan da su örneği gelmiş olabileceği hatırlanmalıdır.
- Alınacak örnek sayısına karar verirken binanın büyüklüğü göz önüne alınmalıdır. Bir formül vermek gerekirse; yatak kapasitesi 500'ün altında olan kurumlarda en az 10 su örneği, yatak kapasitesi 500'ün üzerinde olan kurumlarda ise her 100 yatak için en az iki örnek olacak şekilde örnek sayısı belirlenmelidir.
- Su örneklerinin tüm binayı temsil etmesine özen gösterilmelidir. Aşağıda sıralanan noktalardan örnek alınması sağlanmalıdır;

- | | |
|---|---|
| • Sıcak su tanklarının tümü | • Her katın en az bir odasının lavabo musluğu |
| • Soğuk su tanklarının tümü | • Buz makinesi (<i>varsa</i>) |
| • <i>Air-conditioning</i> sistem soğutma kuleleri | • Türk hamamı (<i>varsa</i>) |
| • <i>Air-conditioning</i> sistem kondansörleri | • Termal havuz (<i>varsa</i>) |
| • Binaya giren şebeke suyunun deposu | • Artezyen kuyusu (<i>varsa</i>) |
| • Her katın en az bir odasının duş başlığı | • Artezyen suyu deposu (<i>varsa</i>) |

3.3 ÖRNEKLERİN ALINMASI¹

3.3.1 Sıcak su tanklarından su örneği alınması

- Tahliye musluğu açıldığında hemen 100 ml'lik bir şişe doldurulur ve üzerindeki etikete su tankının adı ile birlikte "1.örnek" ibaresi yazılır.
 - Su, 45 saniye-1 dakika kadar tahliye musluğundan tazyikli olarak akmaya bırakılır.
 - Aynı musluktan ikinci bir 100 ml'lik örnek daha alınır ve üzerine su tankının adı ile birlikte "2.örnek" ibaresi yazılır.
 - Mümkünse örneklerin ölçülen ısı dereceleri veya tankın ısı göstergesinden okunan sıcaklık *su örnekleri alma formuna* (Ek-1) kaydedilmelidir.
-

3.3.2 Lavabo musluklarından eküvyon ile örnek alınması¹

- Musluk hafifce açılarak birkaç damla su akıtılır ve musluk ağzının ıslanması sağlanır.
 - Steril, bir çift eküvyonun pamuklu uçları musluk ağzından içeri olabildiğince sokulur.
 - Eküvyonlar musluk ağzında 4 kez çepeçevre ve hafifce bir kuvvet uygulayarak çevrilir.
 - Daha sonra musluk yine hafifce açılarak 1-2 ml su steril burgu kapaklı tüp içine akıtılır ve eküvyonlar bu tüpün içine daldırılır, tüpün kapağı kapatılır.
-

3.3.3 Duş başlıklarından eküvyon ile örnek alınması²

- Duş musluğu hafifce açılarak duş başlığından birkaç damla su akıtılır ve başlığın ıslanması sağlanır.
 - Bir çift eküvyon duş başlığının tüm yüzeyine, hafif bir kuvvet uygulayarak ve çevrilerek sürtülür.
 - Daha sonra musluk yine hafifce açılarak duş başlığından akıtılan 1-2 ml su burgu kapaklı tüp içine konulur ve eküvyonlar bu tüpün içine daldırılır, tüpün kapağı kapatılır.
 - Takiben musluk tazyikli olarak açılmalı; sıcak suyun yeterince akması sağlandıktan sonra duş başlığında suyun ulaştığı ısı derecesi ölçülmeli ve *su örnekleri alma formuna* (Ek-1) kaydedilmelidir.
-

¹ Burada örnek alınması özellik arzeden durumlardan bahsedilmektedir. Laboratuvar çalışması, örneklerin alınış yöntemi ile doğrudan ilişkili olduğundan dikkatlice okunmalıdır.

² Gerektiğinde musluk/duş başlığı örnekleri 100 ml.lik örnek şişesinin doldurulması ile de alınabilir. Ancak çalışmalar *Legionella* varlığının saptanması açısından; eküvyon yönteminin, musluk veya duş suyu incelemesinden daha yüksek duyarlılıkta olduğunu göstermiştir.

3.3.4 Musluk veya duş başlığında doğrudan su örneği alınması

- a. Musluk veya duş başlıklarından örnekleme için eküvyon sürtme yöntemi ile yapılması önerilir. Bununla birlikte, eküvyon bulunmaması v.b. durumlarda musluk veya duş başlıklarından örnekleme suyun doğrudan şişeye doldurulması ile de yapılabilir.
 - b. Musluk veya duş başlığında su örneği alınması için musluk hafifçe açılmalı ve beklemeksizin su şişeye doldurulmalıdır.
 - c. 100 ml su örneği alınması yeterlidir.
 - d. Birden fazla soğutma kulesi olan binalarda her kuleden ayrı ayrı örnekleme yapılmalı ve şişelerin üzerindeki etiketlere kulelerin adları veya numaraları kaydedilmelidir.
 - e. Her örnek ayrıca *su örnekleri alma formuna* (Ek-1) kaydedilmelidir.
-

3.3.5 *Air-conditioning* soğutma kulesinden su örneği alınması

- a. Soğutma kulesinden su örneği alınması için bina teknik servis elemanından yardım istenmelidir.
 - b. Örnek soğutma kulesinin içine şişenin daldırılması yoluyla alınır.
 - c. 100 ml su örneği alınması yeterlidir.
 - d. Birden fazla soğutma kulesi olan binalarda her kuleden ayrı ayrı örnekleme yapılmalı ve şişelerin üzerindeki etiketlere kulelerin adları veya numaraları kaydedilmelidir.
 - e. Her örnek ayrıca *su örnekleri alma formuna* (Ek-1) kaydedilmelidir.
-

3.4 ÖRNEKLERİN LABORATUVARA GÖNDERİLMESİ

- a. Su örneklerinin laboratuvara gönderilmesinde 24-48 saat için soğuk zincir gerekli değildir. Bununla birlikte örnekler mümkün olan en kısa sürede laboratuvara iletilmeli, laboratuvarda hemen incelenemeyecekse bir haftaya kadar buzdolabında saklanmalıdır.
 - b. Örnekler uygun bir taşıma kabına düzgünce yerleştirilmeli, şişe veya cam tüplerin kırılmaması ve dökülmemesi için gerekli önlem alınmalıdır.
-

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

4. SU ÖRNEKLERİNİN İNCELENMESİ

4.1 GEREKLİ CİHAZLAR ve SARF MALZEMESİ

- 37°C inkübatör (tepsileri ayarlanabilen)
 - 15x120mm, steril, ağzı burgu kapaklı cam tüpler
 - 15x160mm, steril, ağzı burgu kapaklı cam tüpler (örnek almak için çift eküvyonlu hazırlanmış)
 - 25x160mm, steril, ağzı burgu kapaklı pyrex tüpler
 - Besiyerleri (*Legionella* besiyerleri ve %5 kanlı agar)
 - Bunzen beki
 - Buzdolabı
 - Cam "L" su yayma baleti
 - Cam kalemi ve etiketleme malzemesi
 - Derin dondurucu (-20°C)
 - Derin dondurucu tüp saklama kutuları
 - Hassas terazi
 - Koloni mikroskopu (stereo-mikroskop)
 - *Legionella* spesifik lateks agglutinasyon kiti (*L.pneumophila* SG1, SG2-14 polivalan ve *Legionella sp* polivalan aglütinan serumları içermeli)
 - Manyetik karıştırıcı ve manyetik balıklar
 - Membran filtre (sellüloz asetat; 0.2µm por size, Ø47-50mm)
 - Otoklav bandı
 - pH metre (kalibrasyon solüsyonları ile birlikte)
 - Pipetler (steril; 1ml, 2ml, 5ml, 10ml ve 25ml.lik)
 - Mekanik pipetaj cihazı
 - Steril disposable özeler (nikel-krom öze ve bunzen beki alevinde özenin yakılması biyogüvenlik gerekçesiyle önerilmez)
 - Steril HCl-KCl pH 2.2 asit solüsyonu (bkz. Besiyeri ve Reajenler)
 - Steril şişeler (50-1000ml. arası, otoklava dayanıklı burgu kapaklı, Pyrex)
 - Steril, dıştan burgu kapaklı, 1.8-2ml.lik derin dondurucu tüpleri
 - Su filtrasyon cihazı (süzme çapı Ø50mm, 100ml'lik 3'lü holder)
 - Vakum pompası
 - Vorteks cihazı (tüp vorteks ataçmanlı)
 - Zaman alarmı (timer)
-

4.2 ÖRNEK TİPLERİ

- a. Su tankları (soğuk ve sıcak)
 - b. *Air-conditioning* sistem soğutma kulesi su örneği
 - c. Musluk ve duşlardan eküvyonla alınan örnekler
 - d. Musluk ve duşlardan şişeye doldurarak alınan örnekler¹
-

4.3 HAZIRLIK

- a. Örnek sayısına göre yeterli sayıda besiyeri plağı buzdolabından çıkarılır.
 - b. Besiyeri plakları önceden içeriğine göre (BCYE, DGVP gibi) etiketlenmiş olmalıdır; aksi halde ciddi karışıklık yaşanır (bkz. Besiyeri ve Reajenlerin hazırlanması).
 - c. Örnekler öncelikle *Su Örnekleri Çalışma Formu*na (Ek-2) ve laboratuvar 'Protokol Defteri'ne kaydedilir.
 - d. Takiben su örneklerinin üzerine defter protokol numaraları yazılır.
 - e. Örneklerin niteliğine göre her örnek için kullanılacak besiyerlerinin üzeri etiketlenmiş olmalıdır.
 - f. Bu etiket üzerine örneğin defter protokol numarası ve kısaca uygulanan işlem yazılır (FA=filtrasyon-asit işlemi, AT= asitle işlem, D= direkt ekildi... gibi).
 - g. İlgili besiyeri plakları sularla yanyana gelecek şekilde çalışma masasına dizilir.
 - h. Filtre edilecek suların filtrelerini vortekslemek için 25x160mm kapaklı tüpler hazır bulundurulur ve üzerleri defter protokol numarasına göre numaralandırılır. Bu tüplere 5 ml. steril su tevzi edilir.
 - i. Kısa (15x120mm) burgu kapaklı cam tüplere HCl-KCl asit solusyonundan (pH 2.2) 2'şer ml. tevzi edilir.
 - j. Bir beher içinde alkol, cam "L" öze ve bunzen beki hazırda bulundurulur.²
 - k. Yeterli sayıda steril 1ml, 2ml ve 5 ml pipet hazırda bulundurulur.
-

¹ Su örneklerinin musluk veya duş başlığından şişenin doldurulması yoluyla alınması, *Legionella* izolasyon şansı daha düşük olduğu için önerilmez. Ancak bazı durumlarda suyun bu şekilde alınması kaçınılmaz olabilir. Bu nedenle bu tür örneklerin kültürünün nasıl yapılacağı da bu bölümde anlatılmıştır.

² Varsa disposable L öze kullanılmasında fayda vardır. Bu durumda alkole ve bunzen beki alevine gerek yoktur. Laboratuvar çalışması açısından da daha güvenlidir.

4.4 SU ÖRNEKLERİNİN BESİYERLERİNE EKİLMESİ¹

4.4.1 Su tanklarından (soğuk ve sıcak) alınan örneklerin ekilmesi

a. Direkt ekim yapılacak (D)

Su şişesi vortekslenir veya el ile çalkalanır.

BCYE ve DGVP besiyerlerine 0.1'er ml konur.

Besiyerlerine L-öze ile yayılır.

b. Filtre edildikten sonra asit ile muamele edilecek (FA)

Filtrasyon için;

Su örneğinin 50 ml.si filtrasyon cihazında filtre edilir

Filtre; ucu alevden geçirilen penset ile dikkatlice sarılarak alınır ve 5 ml steril su içeren tüpe (25X160 mm) konur.

Tüp 30 sn vortekslenir.

Asitle muamele için;²

Vortekslenmiş filtre içeren tüpten 2 ml örnek, 2 ml HCl-KCl (pH2.2) asit çözeltisi içeren tüpe aktarılır.

Tüp vortekslenir ve 3 dakikaya ayarlanmış timer'a basılır.

3 dakika dolduğunda tüp tekrar vortekslenir.

Tüpten 0.1'er ml örnek BCYE ve DGVP besiyerlerine konur.

Besiyerlerine L-öze ile yayılır.

¹ Değişik su örneklerinin kültür vasatlarına ekilmesi işlemi ayrıca Şekil 4.1'de özetlenmiştir.

² Asitle muamele toplam 5 dakika içinde tamamlanmış olmalıdır. Bu işlem her örnek için ayrı zaman tutarak yapılır. Eş zamanlı yapılmamalıdır; aksi halde karışıklıklar ve örneklerin asite uzun süreli maruz kalması söz konusu olur.

4.4.2 *Air-conditioning* soğutma kulesi su örneğinin ekilmesi

a. Direkt ekim yapılacak (D)

Su şişesi vortekslenir veya el ile çalkalanır.
BCYE ve DGVP besiyerlerine 0.1'er ml konur
Besiyerlerine L-öze ile yayılır.

b. Asit ile muamele edilecek (AT)

2 ml su örneği, 2 ml. HCl-KCl (pH2.2) asit çözeltisi içeren tüpe ilave edilir;
tüp vortekslenir ve 3 dakikaya ayarlanmış timer'a basılır.
3 dakika dolduğunda tüp tekrar vortekslenir.
Tüpten 0.1'er ml örnek BCYE ve DGVP besiyerlerine konur.
Besiyerlerine L-öze ile yayılır.

4.4.3 Musluk ve duşlardan EKÜVYONLA alınan örnekler

a. Asit ile muamele edilecek (AT)

Eküvyon çubukları HCl-KCl (pH2.2) asit çözeltisi içeren tüpe daldırılır.
Pamuklu uç kuvvetlice tüp içindeki asitle karıştırılır.
Eküvyon çubukları tüp kenarından süzdürülerek çıkarılır ve disposable atık kutusuna atılır.
Tüp vortekslenir ve hemen 3 dakikaya ayarlanmış timer'a basılır.
3 dakika dolduğunda tüp tekrar vortekslenir.
Tüpten 0.1'er ml örnek BCYE ve DGVP besiyerlerine konur.
Besiyerlerine L-öze ile yayılır.

4.4.4 Musluk ve duşlardan ŞİŞEYE DOLDURULARAK alınan örnekler

a. Filtre edildikten sonra asit ile muamele edilecek (FA)

Filtrasyon için;

Su örneğinin 50 ml.si filtrasyon cihazında filtre edilir.

Filtre; ucu alevden geçirilen penset ile dikkatlice sarılarak alınır ve 5ml steril su içeren tüpe (25X160mm) konur.

Tüp 30 sn vortekslenir.

Asitle muamele için;

Vortekslenmiş filtre içeren tüpten 2 ml örnek, 2 ml HCl-KCl (pH2.2) asit çözeltisi içeren tüpe aktarılır.

Tüp vortekslenir ve 3 dakikaya ayarlanmış timer'a basılır.

3 dakika dolduğunda tüp tekrar vortekslenir.

Tüpten 0.1'er ml örnek BCYE ve DGVP besiyerlerine konur.

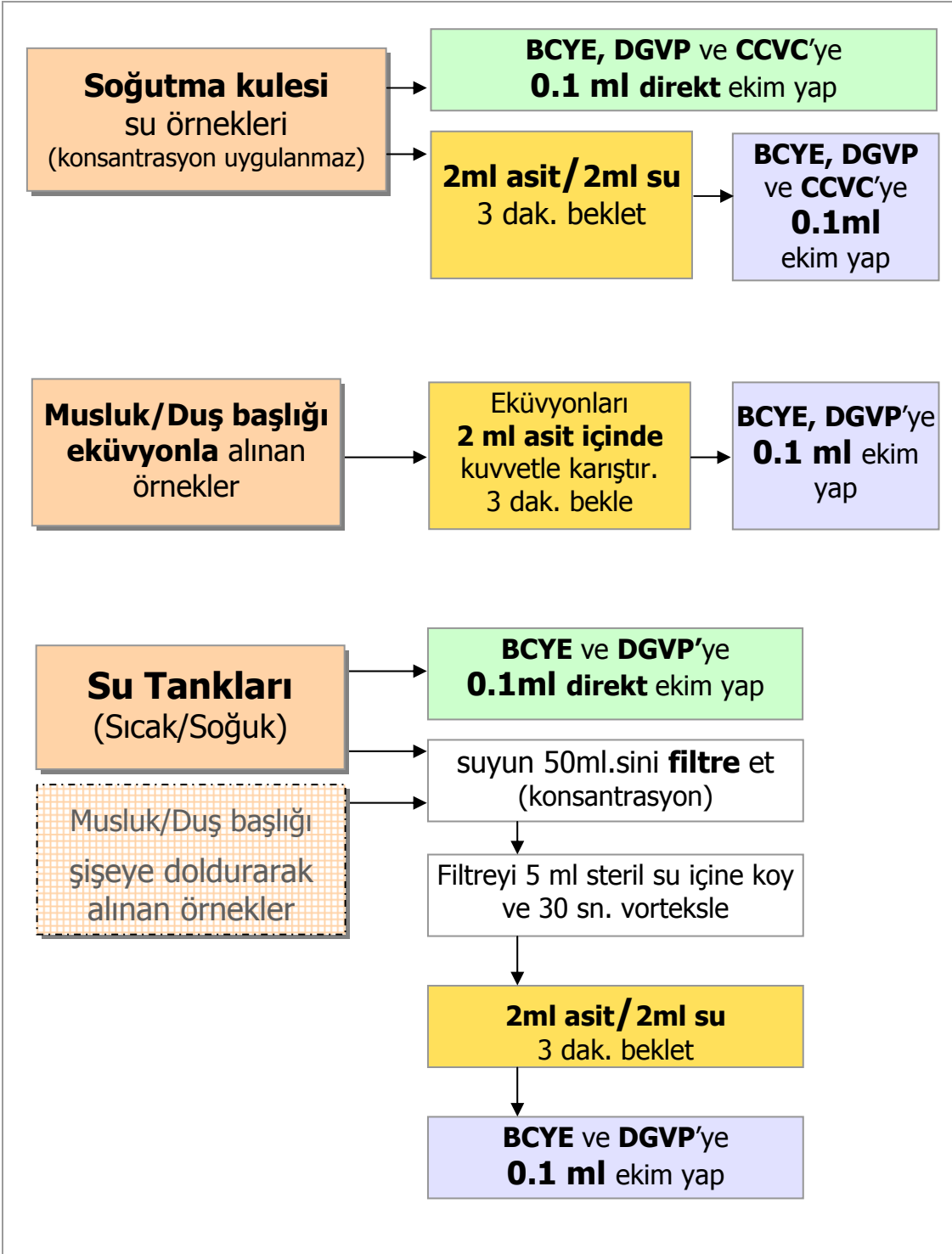
Besiyerlerine L-öze ile yayılır.

4.5 İNKÜBASYON KOŞULLARI

- Ekilen plaklar, kapakları üste gelecek şekilde etüv tepsisine dizilir,
 - Plaklar oda ısısında, yüzeyleri kuruyuncaya kadar bekletilir¹
 - Daha sonra plaklar ters çevrilir.
 - Bir miktar otoklav bandı üzerine su örneklerinin alındığı işletmenin/binanın adı ve o günün tarihi yazılır ve tepsinin görünen kenarına yapıştırılır.
 - Tepsi 36.5±0.5°C etüve konur.
 - Aerob koşullarda inkübe edilir (%5 CO₂ veya mumlu jar gerekli değildir).
 - Etüv ısı kontrol edilir.
 - Nem sağlamak için kullanılan suyun miktarı kontrol edilir²
 - Bu şekilde 5 gün süresince plaklar inkübe edilir.
-

¹ yüzeyi kurumadan etüve kaldırılan plaklarda yayılarak üreme olur ve koloniler tek tek ayırd edilemez.

² *Legionella* türlerinin üremesi için kültür ortamının %95 relatif nem içermesi gerekir. Bunun için etüvün tabanına geniş ve düz bir kaptaki her zaman bol distile su konmalıdır; etüv içinin kuru kalmasına asla izin verilmemelidir.



Şekil 4.1. Farklı noktalardan alınmış örnekler için laboratuvarında uygulanan ön işlemler ve kültür besiyerlerine ekim için akış şeması¹

¹ **ÖNEMLİ NOT:** Kalan su örnekleri sonuçlar çıkıncaya kadar buzdolabında saklanmalıdır!
Sayfa 16 / 48

4.6 KUŞKULU KOLONİLERİN TANIMLANMASI

4.6.1 Plakların okunmasında pratik öneriler

L.pneumophila ve diğer pek çok tür için üreme süresi 72 saatten 5 güne kadar değişir. Plaklar 3. günden itibaren okunmaya ve değerlendirilmeye başlanabilir. Ancak örnek sayısı ve akışının yüksek ise pratik olarak ekimlerden 5 gün sonra okunması karışıklıkların ortaya çıkmasını önler. Bu nedenle her örnek grubu ekildikten sonra 5. günde değerlendirilir.

Eğer su örnekleri, vaka ihbarı yapılmış bir otelden alınmışsa ilk okuma 3. günde yapılmalı ve 10. güne kadar takip edilmelidir.

Ayrıca bazı su sistemlerinde *Legionella* türü bakterilerin bulunacağından kuvvetle kuşkulaniyorsa; özellikle mavi-beyaz floresan veren kolonilerin¹ (mavi-beyaz) varlığı ve en erken bir haftada üreyebildikleri gözönüne alınarak üreme süreleri 10. güne kadar uzatılabilir.

4.6.2 Plakların değerlendirilmesi

Plakların okunması esnasında "Su Örnekleri Çalışma Formu" (Ek-2) kullanılır ve elde edilen her bilgi bu formda ilgili yerlere kayıt edilir.

Hiç üreme olmayan plaklar "üreme yok" anlamına gelen bir kısaltma ile (örn; ÜY) forma not edilmelidir.

Plaklar koloni mikroskopu altında incelenir; *Legionella sp* ile uyumlu, yüzeyleri düzgün, hafif bombeli, gri-beyaz, 1-3mm çaplı, mikroskop altında kenarları pembe, mor, yeşil veya mavi buzlu-cam görünümü veren koloniler 'muhtemel *Legionella* kolonileri' olarak ayırdedilir (Şekil 4.2).

Bir plakta bazan üç-dört farklı koloni görünümü bir arada bulunabilir; bunlar aynı türün farklı serogrupları veya farklı türler olabilirler. Her ayrı görünümlü koloni bir ileri basamakta ayrı ayrı çalışılır.

Plaktaki kuşkulu *Legionella* kolonileri mutlaka sayılır ve çalışma formuna bu sayı kaydedilir (bkz. 4.6.3).

Eğer incelenen plakta *Legionella* kuşkulu koloni yoksa, diğer tür koloniler "non-leg" olarak kaydedilmeli ve kabaca koloni sayıları yazılmalıdır.

Bazan suyun kirli olması nedeniyle incelenen plaklarda diğer mikroorganizmaların aşırı ürediği (over-growth: OG) görülür. Böyle durumlarda bu plaklar *Legionella* varlığı yönünden değerlendirilemez; çalışma formuna "OG" olarak kaydedilir. Bu örnekler için kalan su numunelerinden dilüsyon (1/10 ve 1/100) yapılarak ekimler tekrarlanır. Eküvyonla alınmış örneklerde testin tekrarlanması mümkün olmadığından eğer vaka ihbar edilmiş bir bina ise, bu noktalardan yeniden örnek alınması ve dilüsyon yapılarak ekilmesi sağlanmalıdır.

¹ Bazı *Legionella* türleri (*L.bozemanii*, *L.gormanii*, *L.dumoffii*, *L.anisa*) uzun dalga boylu (362 nm) ultraviyole lamba ışığı altında mavi-beyaz floresan verirler. Bu özellik bu türlerin tanısında bir ön basamak olarak kullanılır.

4.6.3 Koloni sayımı ve sudaki bakteri miktarının hesaplanması

Su örneğinde *Legionella*'ların hangi konsantrasyonda bulunduğunu rapor etmek bazı durumlarda önem kazanır. Koloni görünümünden ayırdedilebilen *Legionella*'lar ilk okuma esnasında henüz kesin identifikasyonları yapılmamış olsa da sayılmalı ve bir plakta kaç adet saptanıyorsa çalışma formuna kaydedilmelidir.

Bazan koloni görünümünden farklı serogruplar veya türler olabileceği düşünülen legionellalar aynı plakta karşımıza çıkabilir. Bunların her biri ayrı ayrı sayılmalı ve kaydedilmelidir. Sonraki identifikasyon basamaklarında seçilmiş bu kolonilerin tanıları kesinleştğinde, incelenen su örneğinde hangi konsantrasyonda [colony forming unit (cfu)/ml; 1ml.de koloni oluşturan bakteri sayısı] *Legionella* olduğunun hesaplanmasına geçilecektir.

Hesaplama; dilusyon veya konsantrasyon faktörleri gözönüne alınarak yapılır. Örneğin; direkt ekimde (D) suyun 0.1 ml.si ekildiği için plakta okunan *Legionella* koloni sayısı 10 ile çarpılınca o su örneğinin 1ml.sindeki *Legionella* sayısı bulunur. Tablo 4.1'de; plakta okunan *Legionella* sayısına karşılık gelen konsantrasyonun hesaplanması için formüller verilmiştir. Aynı su örneğinin farklı besiyerlerinde (BCYE ve DGVP) görülen koloni sayıları farklı ise; önce uygulanan işleme göre (D, FA v.b.) hesap yapılır, ardından her iki rakamın ortalaması alınır. Hesap ile bulunan değer çalışma formuna (Ek-2) kaydedilir, rapora da yazılır.

Tablo 4.1: Uygulanan işleme göre suda bulunan koloni sayısının hesaplanması

	Direkt ekim (D)	Filtrasyon+Asit (FA)	Asitle muamele (AT)
1 ml suda <i>Legionella</i> sayısı (cfu/ml) =	sayılan koloni X 10	sayılan koloni X 2	sayılan koloni X 20

4.6.4 Sonraki identifikasyon basamakları

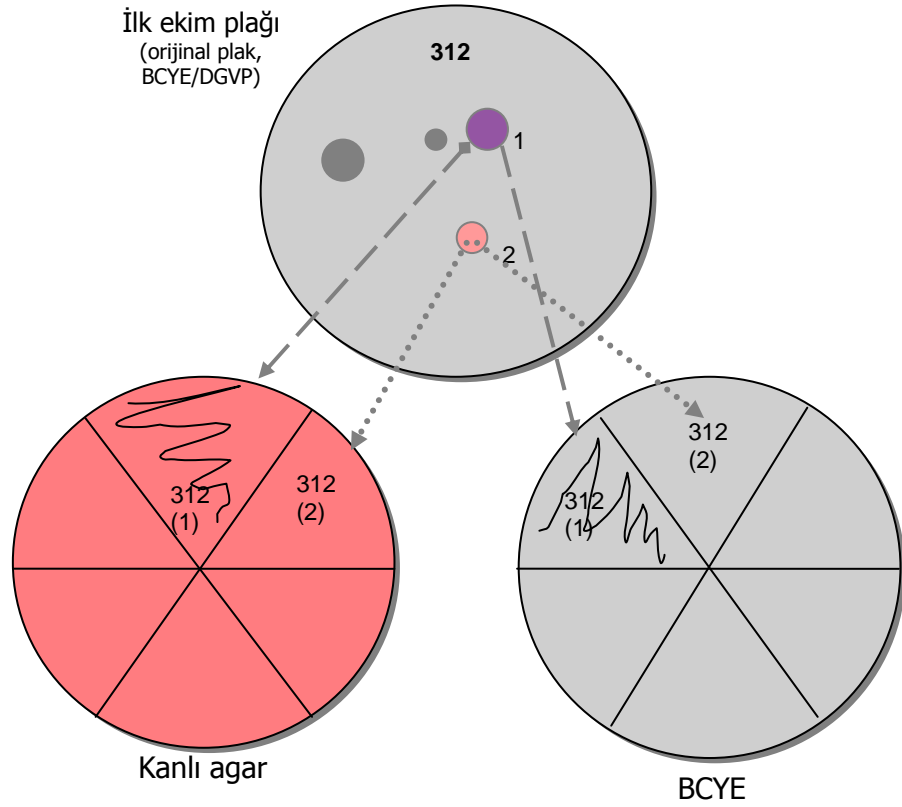
Legionella kuşkulu kolonilerin görüldüğü her plaktan bir veya daha fazla koloni seçilir. Bu seçim şöyle yapılır; bir plaktaki tüm koloniler aynı görünümde ise bir koloni seçilir, farklı iseler her birini temsilen birer koloni seçilir. Seçilen her koloni 1,2,3... gibi numaralandırılır (Şekil 4.2).

İdentifikasyon çalışmasının ilk basamağı, *Legionella*'ların %5 kanlı agarda *üreyemediğinin* gösterilmesi prensibine dayanır. Bu nedenle kanlı agara ve BCYE besiyerine seçilen her koloniden paralel pasaj yapılır. Kanlı agar ve BCYE besiyerleri cam kalemi ile 6'ya bölünür. Her bölme bir koloni içindir. Koloninin ait olduğu su örneği numarası, alındığı besiyerinin adı, gördüğü işlem (AT, FA, D.. gibi) ve koloni numarası her iki besiyerine de kaydedilir (Şekil 4.3).

Koloni alınır; hem kanlı hem de BCYE'de kendisi için ayrılmış yere ekilir (Şekil 4.2). Seçilen bütün kolonilere bu işlem uygulanır. Bu şekilde pasajlanan paralel ekim plakları etüve kaldırılır. 24-48 saat sonra değerlendirilir. Genellikle üremeler için 24 saat yeterlidir. Kanlı plaklarda üreme olmamış iken, BCYE'de üremesi olan koloniler yüksek olasılıkla *Legionella*'dır. Bu bulgular çalışma formuna kaydedilir.



Şekil 4.2. Koloni mikroskopunda *Legionella* kolonisinin görünümü



Şekil 4.3. Orijinal plaktaki kuşuklu kolonilerin kanlı agar ve BCYE'ye paralel pasajı

4.6.5 Sonuçların rapor edilmesi

Raporda; mutlaka su örneklerinin alındığı binanın adı/özelliği/adresi, örneklerin laboratuvara geliş tarihi, gönderen kurum, örnek sayısı, inceleme nedeni (rutin veya vaka ihbarı dolayısı ile v.b.) belirtilmelidir.

Su örneklerinin tümü protokol numaraları ile birlikte rapora işlenmelidir.

Örneklerin (eğer kaydedilmiş ise) ısı dereceleri ve klor düzeyleri belirtilmelidir.

Sonuç kolonunda; üreme olmayanlar için sonuç "negatif" şeklinde ifade edilmelidir.

Legionella üremesi tespit edilen örnekler ise sonuç kolonunda; üreme gösteren *Legionella*'nın tür adı ve serogrupu ile birlikte ifade edilmelidir (örneğin "*Legionella pneumophila* SG1 üredi"). Yanında mutlaka koloni sayısı cfu/ml olarak belirtilir. Yoğun üreme (OG) nedeniyle değerlendirilmeyen örnekler de raporda belirtilmeli ve gerekli açıklama yapılmalıdır.

Hiçbir su örneğinde üreme saptanmamış olsa da tüm örnekler rapora kaydedilerek karşılıklarına "negatif" yazılmalıdır.

Bazı durumlarda laboratuvar uzmanı gözlemlediği veya elde ettiği diğer laboratuvar bulgularını da raporun alt kısmında "Düşünceler:" başlığı altında açıklayabilir; örneğin "..... No.lu su örneklerinde aşırı kirlilik bulgusu -over growth- saptandığından *Legionella* varlığı değerlendirilememiştir; örneklerin tekrar alınması uygundur" v.b. gibi...

4.7 İZOLATLARIN REFERANS LABORATUVARA GÖNDERİLMESİ

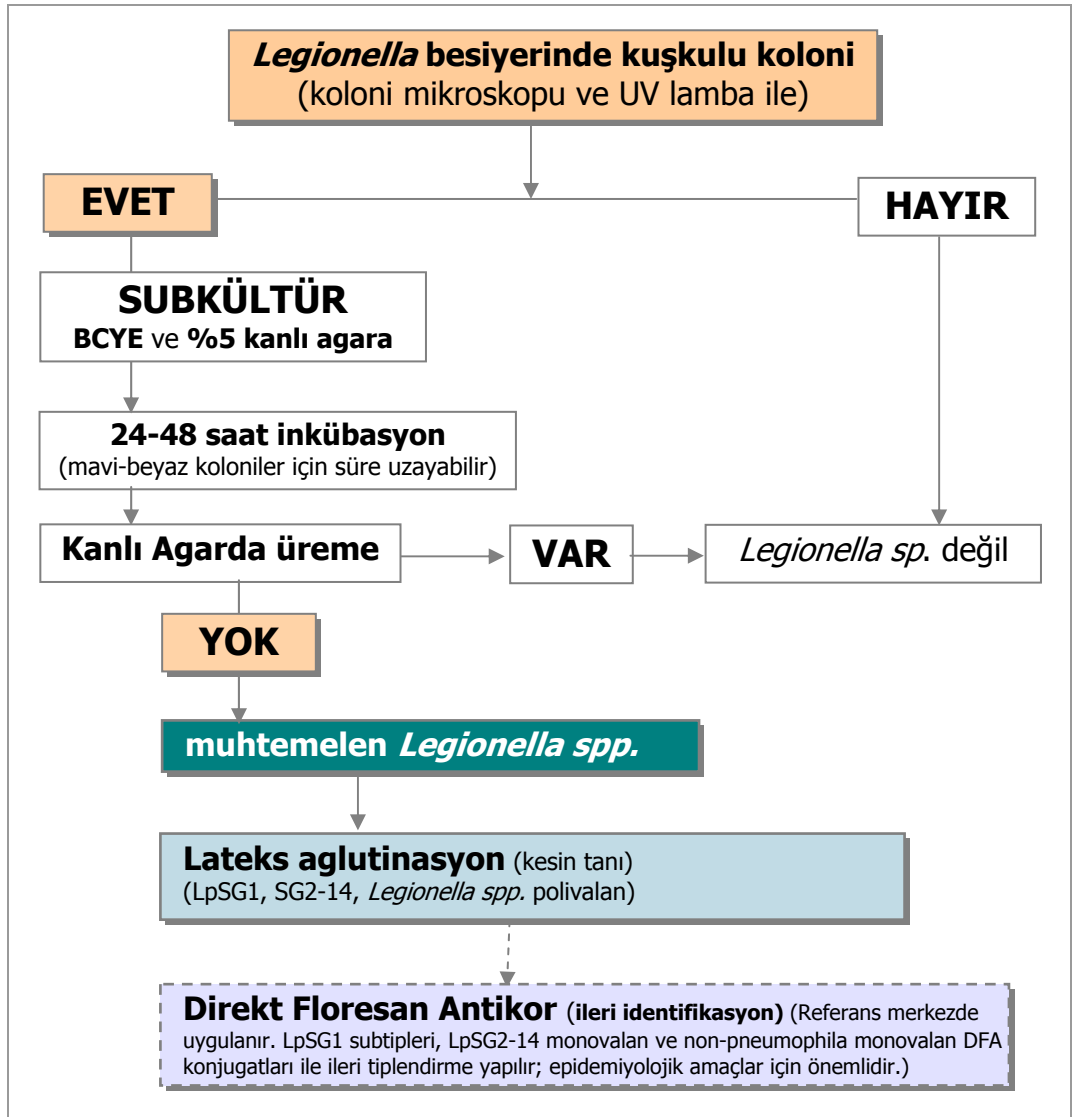
Özellikle vaka bildirilmiş otellerden elde edilen izolatlar ile hastanelerden elde edilen izolatlar, ilerde epidemiyolojik amaçlarla kullanılabileceği düşünülerek saklanmalı ve gerektiğinde Ulusal Referans Laboratuvara gönderilmelidir. Bu amaçla her farklı serogrup ve türü temsilen birer koloni seçilir ve her biri "izolat saklama prosedürü"nde verildiği gibi saklamaya alınır (bkz. 5.5).

İzolatlar, Ulusal Referans Laboratuvarına gönderilecekse BCYE pasajı ile yeniden canlandırılmalıdır. Daha sonra, göndermek için 4 veya 6'ya bölünmüş BCYE agar pasajları kullanılabileceği gibi, %16'lık gliserol buyyon içeren derin dondurucu tüplerine yoğun inokülasyon da yapılabilir.

İster tüp ister plak besiyeri olsun Ulusal Referans Laboratuvara gönderilecek örnekler "biyolojik materyal transportu" kuralları uygulanır ve sızdırmazlık sağlamak üzere gerekli bütün tedbirler alınır (24,25).

İzolatlar 48-72 saat için oda ısısında transfer edilebilir. Bu durumlarda önceden Ulusal Referans Laboratuvar ile iletişim kurulmalıdır.

BCYE'deki üremelerden lateks aglutinasyon testi çalışılır. Hangi antiserum ile (SG1, SG2-14 veya non-pneumophila) aglutinasyon saptanıyorsa çalışma formuna kaydedilir. Aglutinasyon pozitif bulunan örneklerin toplam koloni sayıları hesaplanır ve sonuçlar koloni sayıları ile birlikte rapor edilir (bkz.4.6.3 ve 4.6.5)



Şekil 4.4. Plak değerlendirme akış diyagramı

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

5. BESİYERİ ve REAJENLERİN HAZIRLANMASI

5.1 GENEL PRENSİPLER

5.1.1 Saklama

Kuru-Toz Besiyerleri

1. Kuru-toz besiyeri (ticari form) laboratuvarın ihtiyacı kadar ve tahmini son kullanma tarihi göz önünde bulundurularak satın alınmalıdır.
2. Kutu üzerinde yazılı son kullanma tarihi zaman zaman kontrol edilmeli ve depoda saklama esnasında üründe herhangi bir değişiklik olup olmadığına bakılmalıdır.
3. Üzerinde son kullanma tarihi yazılı olmayan kuru-toz besiyerlerinin kutusuna alındığı tarihten itibaren 3 yıl sonrasına 'son kullanma tarihi' yazılmalıdır.
4. Her kuru-toz besiyeri kutusunun üzerine direkt olarak veya bir etiketle; laboratuvara giriş tarihi, kapağının ilk açıldığı tarih ve (üzerinde yazılı olsun olmasın) son kullanma tarihi yazılmalıdır.
5. Açılmış kuru-toz besiyerlerine açıldığı tarihten itibaren 1 yıl sonrasına son kullanma tarihi verilmelidir.

Hazırlanmış Besiyerleri

1. Besiyeri laboratuvarında hazırlanıp döküldüğünde, her plağın üzerine besiyerinin adı ve hazırlanma tarihi yazılır.
2. Plaklar naylon torbaların içinde paketlenildikten sonra, torbaların da üzerlerine besiyerinin adı, hazırlama tarihi ve 2 ay sonrasına olacak şekilde son kullanma tarihi yazılır.
3. Etiket büyükçe, kolayca görülecek şekilde olmalıdır. **Örneğin;** 01.07.2013 tarihinde dökülmüş BCYE besiyeri paketinin üzerine yandaki kutucukta gösterildiği gibi yazılır.
4. Ticari olarak hazır plak ve tüp besiyerlerinin laboratuvarında az sayıda bulundurulmasına özen gösterilmelidir. Buzdolabında saklama esnasında kolay görülmesi için ticari ambalajının üzerindeki son kullanma tarihi paketin üzerine büyükçe bir etikete yazılmalıdır.

BCYE	Hız Tar: 01.05.14
	SKT : 01.07.14

Kimyasal Reajenler ve Solusyonlar

1. Kimyasal reajenler de laboratuvarın ihtiyacı kadar ve tahmini son kullanma tarihleri gözönünde bulundurularak satın alınmalıdır.
2. Bütün kimyasallar yeterli purifikasyona sahip, "reajen-grade" olmalıdır.
3. Üretici firmanın verdiği, ambalaj üzerinde yazılı son kullanma tarihi, ambalajın açılmadığı süre için geçerlidir.

4. Eğer kimyasal madde ambalajı üzerinde son kullanma tarihi yazılı değilse bu ürüne alındığı tarihten itibaren 5 yıl sonrasına son kullanma tarihi verilmelidir.
5. Her reajen kutusunun üzerine direkt olarak veya bir etiketle; laboratuvara girdiği tarih, kapağının ilk açıldığı tarih ve (üzerinde yazılı olsun olmasın) son kullanma tarihi yazılmalıdır.
6. Açılmış kimyasal reajen kutusu üzerine açıldığı tarihten itibaren 2 yıl sonrasına son kullanma tarihi verilmelidir.
7. Günlük rutinde kullanılmak üzere laboratuvarında hazırlanan her türlü reajen ise hazırlandığı günden itibaren 3 ay sonrasına son kullanma tarihi verilerek etiketlenmelidir.
8. Etiket üzerinde reajen veya solusyonun adı, konsantrasyonu (N, M, %...) gibi bilgiler mutlaka bulunmalı; yandaki örneğe göre yazılmalıdır.

1N KOH
Hız Tar: 01.05.14
SKT : 01.08.14
9. Bütün reajenler; hazırladıktan sonra burgu kapaklı şişelerde saklanır. Gün ışığından da korunması gerekiyorsa kahverengi –amber renkli- şişede saklanmalıdır. [ÖNEMLİ NOT: Ağız pamuk v.b. tıkaç ile kapatılmış reajen şişelerinde bekleme esnasında buharlaşma olur ve konsantrasyon değişir. Bu nedenle reajenler asla ağız pamuk v.b. tıkaçlı şişeye konmamalı, bu tür şişede beklemiş reajen çalışmada kullanılmamalıdır!]
10. Eğer kimyasal reajen veya solusyon steril olarak hazırlanmışsa özelliğine göre 6 ay veya 1 yıl sonrasına son kullanma tarihi verilir (NOT: sterilitenin bozulduğu düşünüldüğünde SKT'nin dolması beklenmeden atılır).
11. Bazı durumlarda kimyasal reajen veya solusyon 5 veya 10 kat konsantre olarak hazırlanır. Bu tür solusyonlar X5, X10 stok solusyon olarak saklanır ve kullanılmadan önce X1 çalışma solusyonu hazırlamak üzere 5 veya 10 kat dilusyonu yapılır.
12. Eğer kimyasal reajen veya solusyon X10 v.b. formulasyonla hazırlanmış ise 1 yıl sonrasına son kullanma tarihi verilir.

5.1.2 Besiyeri yapma

Ticari kuru-toz besiyerinin veya malzemesi tek tek tartılarak yapılacak rutin besiyerlerinin hazırlanmasında bazı kurallar her zaman uygulanmalıdır. Bu kurallar besiyerlerinin her zaman aynı standartta ve güvenilir olmasını sağlayacaktır.

Hazırlık Aşaması

1. Laboratuvar temiz tutulmalıdır.
2. Besiyeri dökmek için gerekli cam malzeme (yeterli büyüklüklerde erlen, beher, mezür, pipet v.b.) temiz ve kuru olarak hazırda bulundurulmalıdır.
3. Besiyeri yapmak için kullanılacak kap (erlen veya balon) her zaman hazırlanacak miktardan daha büyük olmalıdır (örneğin 1 L besiyeri için 2 L'lik erlen seçilmelidir).

Tartım ve Sterilizasyona Hazırlama

1. Tüm malzemenin doğru tartılmasına özen gösterilir. Ticari toz besiyeri kullanılıyorsa ambalaj üzerinde belirtilen miktarda tartım yapılır. Tartılan miktarın ne kadar besiyeri için olduğuna mutlaka dikkat edilir.
2. Uygun büyüklükte temiz ve kuru bir erlen seçilir; üzerine hemen otoklav bandı yapıştırılır ve hazırlanacak besiyerinin adı okunaklı harflerle yazılır.
3. Erlenin içine uygun büyüklükte bir manyetik balık konur.
4. Tartım yapıldıktan sonra besiyeri maddesi erlene aktararak uygun miktarda distile su ile besiyeri sulandırılır.
5. Besiyerinin manyetik karıştırıcı üzerinde bir süre karışması sağlanır.
6. Besiyeri pH'sının önemli olduğu durumlarda (*Legionella* besiyeri gibi) mutlaka pH ölçülmelidir. Bunun için karıştırılmış besiyerinden pipet ile 2-3ml küçük bir tüpe aktarılır ve pH metre ile pH'sı ölçülür. Ölçülen değer erlen üzerindeki etikete kaydedilir.
7. Tartımı yapan kişi besiyerinde herhangi bir karbonhidrat olup olmadığına (glukoz, sukroz v.b.) dikkat etmeli, varsa yine etikete şeker (+) ya da KH (+) şeklinde mutlaka not etmelidir (*bkz.* Otoklavda sterilizasyon).

Otoklavda Sterilizasyon

1. Tartılıp sulandırılarak hazırlanan besiyeri, özel olarak önerilen başka bir yöntem bulunmadıkça, otoklavlanarak steril edilir.
2. Agar içeren besiyerlerinin otoklav öncesinde kaynar su banyosuna konmasına gerek yoktur. Otoklav ısıları ve süreleri sterilizasyon esnasında agarın erimesi için de yeterli olur. Bu yöntem vakit kaybını önler ve besiyerinin uzun süre ısıya maruz kalmasını engeller.
3. Otoklava koymadan önce besiyeri erleninin ağzı sıkıca bağlanmalıdır. Bunun için gazlı bezden erlen ağzının genişliğine uygun ve yeterince sıkı bir tampon hazırlanır ve ağzına tıkanır. (ÖNEMLİ NOT: Bu amaçla asla pamuk kullanılmaz. Pamuk tıkaç, erlen ağzına yapışma v.b. nedenlerle besiyeri dökerken istenmeyen parçacıkların vasata geçmesine ve kontaminasyona neden olabilir).
4. Geniş bir paket kağıdı veya alüminyum folyo 2-3 kat katlanır ve erlenin ağzı, gaz tamponun üzerinden, bununla sarılır. Daha sonra büyükçe kesilmiş otoklav bandı ile uygun bir şekilde bağlanır.
5. Sterilizasyon süresi otoklava konan besiyeri miktarına göre değişir. 500 ml.ye kadar 121°C'da 15 dak. yeterli iken; 1-2 litre besiyeri için 20 dak., 2 litreden fazla besiyerleri için 121°C'da 30 dak. gereklidir.
6. Besiyeri içeriğinde şeker varsa bu tür bir besiyeri otoklava diğerleri ile eş zamanlı konamaz; otoklav ısı ve süresi farklı uygulanır. Böyle besiyerleri 115°C'da maksimum 15 dak. tutulmalıdır.

Besiyeri Dökme

1. Öncelikle besiyeri dökülecek oda masasının üzerine steril disposable petripler besiyeri miktarına göre çıkarılır, etiketlenerek hazırlanır. [NOT: naylon torbalar gelişigüzel açılmamalıdır, çünkü besiyerini ambalajlamak için tekrar kullanılacaktır.]
2. Besiyerinin döküleceği tahmin edilen saatten 30-45 dak. önce besiyeri odasının ultraviolet (UV) lambası yakılır. Bu süre boyunca oda kapısının üzerine "Dikkat! UV lamba açıktır!" şeklinde uyarı yazısı asılır.
3. Besiyeri dökmek üzere odaya girildiğinde UV lamba söndürülmelidir.
4. Otoklavdan çıkmış besiyerine eğer kan veya supplement ilave edilecekse; besiyerinin uygun sıcaklığa getirilmesi (55°C) gerekir. Bunun için besiyeri önceden sıcaklığı 55°C'a ayarlanmış sıcak su banyosuna bırakılır.
5. Uygun sıcaklığa gelen besiyerine gerekli kan veya supplement ilave edilir. Kısa bir süre manyetik karıştırıcıda eklenenlerin karışması sağlanır.
6. Son bir kez, steril şartlarda pH ölçümü yapılır: (a) steril bir pipet ile 2-3ml besiyeri geniş ağızlı küçük bir tüpe aktarılır, soğutulur ve içine pH metre probu daldırılarak ölçüm yapılır, (b) istenen pH'da değilse, steril 1N KOH veya steril 1N HCl ile ayarlanır.
7. Ellere pudrasız eldiven giyilir, ağıza maske takılır ve besiyeri dökme esnasında konuşulmamasına özen gösterilir.
8. Ardından dikkatli bir şekilde, önceden hazırlanmış steril petrilere dökülür.

Dökülmüş Besiyerlerinin Saklanması

1. Dökülen besiyeri düzgün zeminde, dökme işleminin yapıldığı masa üzerinde ertesi günün sabahına kadar dinlenmeye bırakılır. Bu süre boyunca üzerine koruyucu bir örtü serilir (havlu, naylon v.b).
2. Ertesi gün plaklar, kapakları ters çevrilerek naylon torbalarına konur (*varsa* torba içine aşırı nemlenmeyi önlemek için silica-gel paketi konur). Bir kısım plak besiyeri kalite kontrol için ayrılmalıdır (bkz. Besiyeri kalite kontrol).
3. Naylon torbanın ağzı otoklav bandı ile bantlanır. Bu bandın üzerine mutlaka besiyerinin adı, hazırlama ve son kullanma tarihleri (SKT 2 ay sonrasına olacak şekilde) yazılır.
4. Bu şekilde ambalajlanmış besiyerleri buzdolabına kaldırılır.
5. Kullanıcı ambalajın içinden ihtiyacı kadar plak besiyeri aldıktan sonra kalanını, (torbanın ağzını yine üzerindeki etiketle kapatarak) buzdolabına kaldırmalıdır.

5.2 LEGIONELLA BESİYERLERİ

5.2.1 *Legionella* Temel Besiyeri (BCYE)

Legionella türü bakteriler için temel üreme ortamını sağlayan besiyeri BCYE (buffered charcoal yeast extract) agardır.

Suda *Legionella sp.* inceleme prosedüründen de anlaşıldığı üzere; BCYE agar, hem primer izolasyon hem de identifikasyon adımlarında mutlaka yer alır. Aynı zamanda *Legionella* izolasyonunda kullanılan diğer seçici vasatların (DGVP, CCVC, PAC, PAV..) temelini de BCYE oluşturmaktadır.

BCYE agar; ACES buffer, L-sistein, ferrik pirofosfat ve α -ketoglutarat içeren tamponlu, aktif kömürlü, maya özütü bir besiyeridir. Bilindiği gibi tampon sistemler ortam pH'sında meydana gelen değişiklikleri düzenlerler. *Legionella* türleri üreme esnasında oluşan asit ürünlere duyarlı olduklarından ortamda uygun bir tampon sistemin bulunması zorunludur. ACES buffer bu amaçla kullanılır. Aktif kömür ise üreme ve ışığa maruz kalma ile oluşan toksik oksijen radikallerini nötralize eder.

In-house teknik ile BCYE agar yapmak için formülasyondaki tüm maddelerin ayrı ayrı tartılması ve belli bir sıra içinde katılması gerekir.

Tablo 5.1'de 1 litre besiyeri için gerekli malzemenin tartım miktarları ve besiyerine katma sırası diğer işlemlerle birlikte (karıştırma, pH ölçümü v.b.) özetlenmiştir. Ayrıca, laboratuvar elemanı tüm işlemler süresince, Bölüm 5.1.1 ve 5.1.2'de verilen *Genel Prensiplere* uygun çalışmalıdır.

Hem BCYE agarda ve hem de diğer *Legionella* besiyerlerinde en kritik özellik besiyerinin pH'sıdır. Son ölçümde pH mutlaka 6.93 ± 0.3 olmalıdır. Besiyeri pH'sı uygun değilse *Legionella* bakterisi üremez. Bu nedenle ölçüm için doğru kalibre edilmiş dijital bir pH metre tercih edilir. Kağıt pH stripleri, *Legionella* besiyerlerinin pH'sının ölçülmesinde uygun değildir ve asla kullanılmazlar.

5.2.2 *Legionella* Seçici Besiyerleri (DGVP ve CCVC)

DGVP (dye-glycine-vancomycine-polymyxine B) besiyeri; adını içerdiği maddelerden alan seçici bir besiyeridir. Temel besiyeri BCYE'ye (aktif kömür miktarındaki küçük bir değişiklikte birlikte) bu maddelerin ilavesi ile DGVP elde edilir.

DGVP besiyeri başlıca, su örneklerinden *Legionella* izolasyonunda tercih edilen bir seçici besiyeridir. Klinik örnekler üzerine uygulanması tavsiye edilmez. İçeriğindeki glisin ve antibiyotikler suda yaygın bulunan bakterilerin üremesini engeller. Boyalar (brom timol mavisi ve brom krezol moru) ise özellikle *L.micdadei* kolonisinin primer izolasyonda mavi renk oluşturması ile diğer legionellalardan ayırmasına izin verir.

CCVC (cycloheximide-colistine-vancomycine-cephalothine) besiyeri de seçici bir *Legionella* besiyeridir. Temel besiyeri yine BCYE'dir. İçerdiği antifungal madde – cycloheximide- dolayısı ile özellikle küf mantarı üreme olasılığı olan suların kültüründe tercih edilir. Küf sporları atmosferde yaygındır ve doğaya açık su kaynaklarını (*air-cond.* soğutma kuleleri, üstü açık su deposu v.b.) kontamine edebilirler.

Açık hava ile teması olan su örnekleri CCVC besiyerine ekilmezlerse BCYE veya DGVP'de görülebilecek aşırı küf üremesi *Legionella* izolasyonuna engel olabilir. Ancak; anlaşılacağı üzere, laboratuvara gelen su örneklerinin çoğu binanın kapalı sisteminde dolaşan sudan alınan örneklerden oluştuğu için, CCVC sık kullanılan bir besiyeri değildir. Hazırlanan bir besiyerinin 2 aylık raf ömrü içinde tüketilmesi gerektiği hatırlanırsa; CCVC, *ya* az miktarda yapıp kullanılmalı *ya da* prosedürden çıkarılmalıdır.

5.3 LEGIONELLA BESİYERLERİNİN HAZIRLANMASI

Tablo 5.1: *Legionella* spesifik besiyerlerinin hazırlanması¹

		1000 ml besiyeri yapmak için*		
		BCYE	DGVP	CCVC
1. aşama	Yeast Extract	10.0 g	10.0 g	10.0 g
	Bacto Agar	17.0 g	17.0 g	17.0 g
	Charcoal	2.0 g	1.5 g	2.0 g
	ACES ²	10.0 g	10.0 g	10.0 g
	alpha-Ketoglutaric acid	1.0 g	1.0 g	1.0 g
	KOH	2.4 g	2.4 g	2.4 g
	Glycine	-	3.0 g	-
	Distile su	985 ml	975 ml	980 ml
Manyetik karıştırıcıda karıştır → pH ölç, kaydet (pH 6.90-6.97 olmalı) → Otoklavla (121°C'da 15 dak). → Isısı ayarlanmış benmaride 55°C'a soğut.				
2. aşama	L(+) Cystein ³	(0.4 g) 4 ml	(1.0 g) 10 ml	(0.4 g) 4 ml
	Ferric pyrophosphate ⁴	(0.25 g) 10 ml	(0.25 g) 10 ml	(0.25 g) 10 ml
	Bromo cresol purple ⁵	-	(10 mg) 1 ml	-
	Bromo thymol blue ⁵	-	(10 mg) 1 ml	-
	Vancomycin HCl ⁶	-	(1 mg) 1 ml	(1 mg) 1 ml
	Polymyxin B ⁶	-	(50.000U) 1 ml	-
	Cycloheximide ⁶	-	-	(80 mg) 1 ml
	Colistin (Polymyxin E) ⁶	-	-	(16 U) 1 ml
Cephalotin ⁶	-	-	(4 mg) 1 ml	

55°C'a soğutulmuş erleni hafif ısıtılmış manyetik karıştırıcıya oturt → Maddeleri hazırla ve aseptik şartlarda besiyerine ekle → Manyetik karıştırıcıda karıştır → pH ölç; gerekiyorsa steril 1N KOH veya 1N HCl ile pH 6.9'a ayarla → 90 mm çaplı steril petrilere dök.

* Daha ayrıntılı bilgi için "BCYE hazırlanması" ve "DGVP hazırlanması" başlıkları altında verilen bölümleri inceleyiniz. "CCVC hazırlanması" bu prosedürde yer almayacak, bir sonraki versiyonda ilave edilecektir.

¹ bu prosedürde *in-house* formülasyon verilmektedir.

² ACES, 900 ml distile su içinde manyetik karıştırıcıda, 50°C'da eriyinceye kadar karıştırılır. Daha sonra diğer maddeler ve KOH ilave edilir. Sıvı halde eklenen veya eklenecek her şey hesaplanarak toplam volüm 1000 ml'ye tamamlanır.

³ L(+) Cystein 1g/10ml (w/v) tartılır, küçük bir erlene konur ve oda ısısında erimeye bırakılır. Takiben steril bir tüpün içine 0.2µ'luk filtreden süzülerek steril edilir ve 55°C'a soğutulmuş besiyerine gerekli miktarda ilave edilir.

⁴ Ferric pyrophosphate 0.25g/10ml (w/v) tartılır, küçük bir erlene konur ve oda ısısında erimeye bırakılır. Takiben steril bir tüpün içine 0.2µ'luk filtreden süzülerek steril edilir ve 55°C'a soğutulmuş besiyerine tamamı ilave edilir.

⁵ BTB ve BCP önceden 10 mg/ml olacak şekilde hazırlanır, etiketlenir, buzdolabında 1 yıl saklanır

5.3.1 BCYE'nin hazırlanması

1 litre besiyeri için gerekli malzeme

10.0 g	Yeast Extract
17.0 g	Bacto-Agar
2.0 g	Active Charcoal (Aktif kömür)
1.0 g	Alpha-Ketoglutaric Acid, Potasyum tuzu
10.0 g	ACES Buffer (Sigma #A9758) (N-[2 Acetamido]-2-Aminoethane Sulfonate)
0.4 g	L-Cysteine Monohydrochloride (anhydrous)
0.25 g	Ferric Pyrophosphate
40-45 ml	1N KOH (veya bir litre besiyeri için ~2.4 g KOH)

- 2 L.lik bir erlen "BCYE agar" yazılarak etiketlenir, içine 900 ml distile su konur, bir manyetik balık atılır ve 50°C'a ayarlı manyetik karıştırıcı üzerine oturtulur.
- ACES buffer tartılır ve erlendeki suya ilave edilir. Hafifce ısıtarak karıştırılır ve tamamen eriyene kadar beklenir.
- Sonra yeast extract, agar, kömür ve α -ketoglutaric acid yukarıda verilen miktarlarda tartılır ve erlene ilave edilir; karıştırılır.
- Besiyerine 45ml 1N KOH (veya 2.4g KOH) yavaş yavaş ilave edilir. 5 dak. tamamen karışması sağlanır. Ardından pH ölçülür; eğer pH 6.9-6.95'in altında ise yine yavaş yavaş (her seferinde 1-2 ml) 1N KOH ilave ederek ayarlanır.
- Bu ana kadar ulaşılan toplam volüm hesaplanır ve üzerine, 985 ml.ye tamamlamak üzere, gerekli miktarda distile su ilave edilir.
- Erlenin ağzı kapatılarak otoklava konur ve 121°C'da 20 dak. steril edilir.
- Besiyeri hazırlanırken bir yandan da iki ayrı küçük erlen (25ml.lik) alınır; birine 1g L-cysteine ve diğerine 0.25g ferric pyrophosphate tartılır. Her birine 10ml distile su konur. Oda ısısında erimeye bırakılırlar (~1 sa). Erime tamamlanınca her biri enjektör tipi membran filtrelerden (0.2 μ m) geçirilerek steril tüplere aktarılırlar.
- Otoklavdan çıkarılan besiyeri önceden 55°C'a ısıtılmış su banyosuna konur, soğuması beklenir (besiyeri miktarına göre 30-60 dak. sürer).
- Daha sonra besiyeri hafif ısıtılmış manyetik karıştırıcı üzerine alınır; kabarcık oluşturmadan karıştırılırken L-cysteine'den 4 ml ve ferric pyrophosphate solüsyonunun tamamı (10 ml) besiyerine ilave edilir.
- Son olarak pH kontrolü yapılır (aseptik şartlarda 3 ml besiyeri küçük bir tüpe alınır, donması beklenir ve pH ölçülür; pH 6.90-6.95 aralığının altında ise steril 1N KOH, üstünde ise 1N HCl kullanılarak ayarlanır.)
- Önceden UV lambası yakılarak hazırlanmış odada besiyeri dökme işlemine geçilir (bkz.5.1.2)

5.3.2 DGVP'nin hazırlanması

1 litre besiyeri için gerekli malzeme

10.0 g	Yeast Extract
17.0 g	Bacto-Agar
1.5 g	Active Charcoal (Aktif kömür)
1.0 g	Alpha-Ketoglutaric Acid, Potasyum tuzu
10.0 g	ACES Buffer (Sigma #A9758) (N-[2 Acetamido]-2-Aminoethane Sulfonate)
1.0 g	L-Cysteine Monohydrochloride (anhydrous)
0.25 g	Ferric Pyrophosphate
3.0 g	Glycine (free-base)
40-45 ml	1N KOH (<i>veya</i> bir litre besiyeri için ~2.4 g KOH)
10 mg	Bromothymol blue (BTB)
10 mg	Bromocresol purple (BCP)
1 mg	Vancomycin HCl
50.000 U	Polymyxin B

- 2 L.lik bir erlen "DGVP agar" yazılarak etiketlenir, içine 900 ml distile su konur, bir manyetik balık atılır ve 50°C'a ayarlı manyetik karıştırıcı üzerine oturtulur.
- ACES buffer tartılır ve erlendeki suya ilave edilir. Hafifce ısıtarak karıştırılır ve tamamen eriyene kadar beklenir.
- Sonra yeast extract, agar, kömür ve α -ketoglutaric acid yukarıda verilen miktarlarda tartılır ve erlene ilave edilir; karıştırılır.
- Besiyerine 45ml 1N KOH (*veya* 2.4g KOH) yavaş yavaş ilave edilir. 5 dak. tamamen karışması sağlanır. Ardından pH ölçülür; eğer pH 6.9-6.95'in altında ise yine *yavaş yavaş* (her seferinde 1-2 ml) 1N KOH ilave ederek ayarlanır.
- Bu ana kadar *ulaşılın* toplam volüm hesaplanır ve üzerine, 975 ml.ye tamamlamak üzere, gerekli miktarda distile su ilave edilir.
- Erlenin ağzı kapatılarak otoklava konur ve 121°C'da 20 dak. steril edilir.
- Besiyeri hazırlanırken bir yandan da iki ayrı küçük erlen (25ml.lik) alınır; birine 1g L-cysteine ve diğerine 0.25g ferric pyrophosphate tartılır. Her birine 10ml distile su konur. Oda ısısında erimeye bırakılırlar (~1 saat). Erime tamamlanınca her biri enjektör tipi membran filtrelerden (0.2 μ m) geçirilerek steril tüplere aktarılırlar.
- Otoklavdan çıkarılan besiyeri önceden 55°C'a ısıtılmış su banyosuna konur, soğuması beklenir (besiyeri miktarına göre 30-60 dak. sürer).
- Daha sonra besiyeri hafif ısıtılmış manyetik karıştırıcı üzerine alınır; kabarcık oluşturmadan karıştırılırken L-cysteine ve ferric pyrophosphate solüsyonlarının tamamı (10'ar ml) besiyerine ilave edilirler.

10. Önceden hazırlanmış ve buzdolabında saklanan boyalardan (stok BTB ve BCP) 1'er ml besiyerine konur (*bkz.*Boyalardan Hazırlanması)
11. Önceden hazırlanmış ve -20°C derin dondurucuda saklanan antibiyotikler (vancomycin HCl ve polymyxin B) oda ısısında eritilir ve 1'er ml besiyerine konur (*bkz.*5.3.3)
12. Son olarak pH kontrolü yapılır. Bunun için; aseptik şartlarda 3 ml besiyeri küçük bir tüpe alınır, donması beklenir ve pH ölçülür; pH 6.90-6.95 aralığının altında ise steril 1N KOH, üstünde ise 1N HCl kullanılarak ayarlanır (*bkz.*5.3.4).
13. Önceden UV lambası yakılarak hazırlanmış odada besiyeri dökme işlemine geçilir (*bkz.* 5.1.2).
14. Besiyeri; önceden adı ve hazırlama tarihi yazılarak etiketlenmiş plaklara dökülür. Plaklar bir gece oda ısısında üzeri bir örtü ile kapatılarak bekletilir.
15. Ertesi gün plaklar ters çevrilerek (kapaklar alta gelecek şekilde) naylon torbalara kaldırılır ve torba üzeri etiketlenerek hazırlama ve son kullanma tarihleri yazılır; buzdolabında saklamaya alınır.
16. Hazırlanan her besiyeri serisinden kalite kontrol yapılır (*bkz.* Kalite Kontrol).

5.3.3 Antibiyotiklerin hazırlanması

GENEL BİLGİ

1. Seçici bir besiyeri yapmak istediğimizde; besiyerine, üremesini istediğimiz bakterinin dirençli, diğerlerinin ise duyarlı olduğu antibiyotikleri koyarız.
2. Antibiyotik konsantrasyonu da kritik öneme sahiptir. Konsantrasyon arttıkça izole edilmek istenen bakteri üzerindeki inhibitör etki de artabilir. Konsantrasyon düşük kaldığında ise istenmeyen flora bakterilerinin üremesi artar. Bu nedenle antibiyotik tartımında maksimum hassasiyet gösterilir.
3. Besiyerlerine konulacak antibiyotikler besiyerinin 1 litresinde bulunması gereken miktarın 1mL içinde sulandırılması prensibine göre hazırlanır.
4. Bu şekilde (stok solusyon olarak) hazırlanan antibiyotik, -20°C derin dondurucuda saklanabilir.
5. Tartım için aşağıdaki formül kullanılır:

$$\frac{\text{Tartılacak miktar (mg)} \times \text{Aktivite } (\mu\text{g/mg})}{\text{Volüm}} = \text{İstenen konsantrasyon } (\mu\text{g/mL})$$

6. Tartılacak miktar terazinin hassasiyet kapasitesine göre kararlaştırılır.
7. Kullanılacak hassas terazi en az "0.000g" hassasiyette olmalıdır.
8. Böyle bir hassas terazide bir kerede güvenli olarak tartılabilecek en küçük miktar ~20mg'dır. Daha düşük ağırlıkta tartımdan kaçınılmalıdır. Bu durumda;
örneğin 1mg/mL olacak şekilde antibiyotik stok solusyon yapmak için:
en az 20mg tartım yapmak gerektiği göz önüne alındığında -aktivite de ($\mu\text{g/mg}$) hesaba katılınca- *en az* 20mL diluent ile sulandırım yapılacağı hesaplanır. Bu miktar hemen hemen 20 litrelik besiyeri içindir. 1 litre besiyerine yetecek miktar 1ml olduğundan elde edilen solusyon 1'er mL'lik alikotlara bölünerek saklanır.
9. Antibiyotik stok solusyonu dilüenti ile (çoğu kez dilüent 'su'dur; ancak antibiyotiğe göre değişebileceği hatırlanmalıdır) sulandırıldıktan sonra 0.2 μm por çaplı filtre ile steril edilir.
10. Önceden etiketlenip hazırlanmış steril burgu kapaklı tüplere, her 1 litre besiyeri için 1.1mL olacak şekilde tevzi edilir.
11. Bu şekilde hazırlanmış antibiyotik solusyonu derin dondurucuda 2 yıl saklanabilir.

ÖRNEK ANTİBİYOTİK HAZIRLAMA PROSEDÜRLERİ

Vancomycin HCl

Antibiyotik	: Vancomycin HCl (Sigma Cat#V-2002)
Aktivite	: 1037 μ g/mg (ambalaj üstünde belirtilen)
Ambalajın açıldığı tarih	: __/__/201__

- Hazırlık:**
1. Biyogüvenlik kabinini* en az 10 dak. önceden aç, çalıştır.
 2. Çalışma yüzeyini alkolle temizle. Gerekli malzemeyi (suporlar, tüpler, enjektör ve filtreler...) çalışma alanına koy.
 3. Tartım miktarına göre (~20 adet) burgu kapaklı, steril derin dondurucu tüplerinden al, üzerlerini etiketle, hazırla.
 4. Etiketlin üzerine şu bilgileri yaz:

Vancomycin HCl 1mg/mL	StokSol: 1.1mL
HzrT: 20.02.2014	SKT : 20.02.2016

- Tartım:**
1. Yapılacak tartım miktarına karar ver. [Aktivite değeri " μ g/mg" cinsinden olan antibiyotikler için tartılacak miktara önceden karar verilir ve "sulandırım volümü" hesaplanır.]
 2. Besiyerinde vancomycine son konsantrasyon= 1μ g/mL olduğuna göre Stok Vancomycine HCl= 1000μ g/mL (=1mg/mL) olacak şekilde hazırla.
 3. Tartım miktarına karar verilmiş ise (örneğin 20mg) formülü uygula:

$$\frac{20\text{mg} \times 1037\mu\text{g/mg}}{\text{Volüm}} = 1000\mu\text{g/mL} \quad \text{Volüm} = 20.74\text{mL hesaplanır.}$$

4. Toz antibiyotikten 20mg tart ve dikkatli bir şekilde 50mL.lik bir temiz erlene koy.
 5. Üzerine 20.74mL deiyonize su ilave et. Bu esnada tartım kabını da suya tut ve üzerinde hiç madde kalmamasını sağla.
- Eritme-saklama**
1. Antibiyotik tümü ile eriyene kadar yavaş yavaş karıştır.
 2. Antibiyotik solusyonunu enjektöre al.
 3. 0.2 μ m.lik membran filtre ile steril bir Falcon tüpe süz.
 4. Burgu kapaklı derin dondurucu tüplerine 1.1mL olacak şekilde tevzi et. Supor ile derin dondurucuya kaldır, -20⁰C'da dondur.
 5. Donduktan sonra tüpleri (fazla yer kaplamaması için) üzeri etiketlenmiş kapaklı bir kaba veya kutuya aktar. -20⁰C'da sakla.

* Çalışma mümkünse Biyogüvenlik Kabininde (Class I veya IIA) yapılmalıdır. Eğer mümkün değilse çalışma öncesinde odanın UV lambası 30 dak. açık bırakılmalı; daha sonra UV kapatılıp odaya girilmeli, dikkatli bir şekilde, gerekmedikçe konuşmaksızın antibiyotik tevzi edilmelidir.

Polymyxin B

Antibiyotik : Polymyxin B (Sigma Cat#P-1004)

Aktivite : 7.826 U/mg (ambalaj üstünde belirtilen)

Ambalajın açıldığı tarih : __/__/200__

- Hazırlık:**
1. Biyogüvenlik kabinini* en az 10 dak. önceden aç, çalıştır.
 2. Çalışma yüzeyini alkolle temizle. Gerekli malzemeyi (suporlar, tüpler, enjektör ve filtreler...) çalışma alanına koy.
 3. Tartım miktarına göre (~20 adet) burgu kapaklı, steril derin dondurucu tüplerinden al, üzerlerini etiketle, hazırla.
 4. Etiketın üzerine şu bilgileri yaz:

Polymyxin B 50.000 U/mL	StokSol: 1.1 mL
HzrT: 20.02.2014	SKT: 20.02.2016

- Tartım:**
1. Yapılacak stok solusyonun volümüne karar ver [Aktivitesi "ünite" cinsinden olan antibiyotikler için diluent volümüne önceden karar verilir ve "tartılacak miktar" hesaplanır.]
 2. Besiyerinde polymyxine B son konsantrasyonu=50U/mL olduğuna göre Stok Polymyxine B=50.000U/mL olacak şekilde hazırla.
 3. Sulandırım miktarına (volüm'e) karar verilmiş ise (*örneğin* 22ml) formülü uygula:

$$\frac{\text{tartılacak miktar (mg)} \times 7.826\text{U/mg}}{22\text{ml}} = 50.000\text{U/mL}$$

tartılacak miktar= 140.55mg hesaplanır

4. Toz antibiyotikten 140.55mg tart ve dikkatli bir şekilde 50mL.lik bir temiz erlene koy.
 5. Üzerine 22mL deiyonize su ilave et. Bu esnada tartım kabını da suya tut ve üzerinde hiç madde kalmamasını sağla.
- Eritme-saklama**
1. Antibiyotik tümü ile eriyene kadar yavaş yavaş karıştır.
 2. Antibiyotik solusyonunu enjektöre al.
 3. 0.2µm.lik membran filtre ile steril bir Falcon tüpe süz.
 4. Burgu kapaklı derin dondurucu tüplerine 1.1mL olacak şekilde tevzi et. Supor ile derin dondurucuya kaldır, -20°C'da dondur.
 5. Donduktan sonra tüpleri (fazla yer kaplamaması için) üzeri etiketlenmiş kapaklı bir kaba veya kutuya aktar. -20°C'da sakla.

* Çalışma mümkünse Biyogüvenlik Kabininde (Class I veya IIA) yapılmalıdır. Eğer mümkün değilse çalışma öncesinde odanın UV lambası 30 dak. açık bırakılmalı; daha sonra UV kapatılıp odaya girilmeli, dikkatli bir şekilde, gerekmedikçe konuşmaksızın antibiyotik tevzi edilmelidir.

5.3.4 Reajenlerin hazırlanması¹

1N KOH HAZIRLANMASI²

KOH molekül ağırlığı (MW)=56.1g.

- 1000ml 1N KOH hazırlamak için; KOH..... 56.1 gr tart
Distile su..... 1000ml ilave et
 - KOH'ın suda erimesi sağlanır.
 - Hazırlanan çözelti iki veya daha fazla şişeye bölünür.
 - Besiyerine sterilizasyon öncesi ilave edilecek KOH'ın steril olmasına gerek yoktur; yalnızca etiketlenir, hazırlama tarihi ve SKT (6 ay sonrası) yazılır.
 - Besiyerine, sterilizasyon sonrası pH ayarlaması için ilave edilecek KOH'ın steril olması gerekir. Şişenin üzeri etiketlenir; etikete çözeltinin adı, hazırlama tarihi ve SKT (1 yıl sonrası) yazılır.
 - Otoklavda steril edilir (121°C, 15 dak.)
 - Oda ısısında saklanır.
-

1N HCl HAZIRLANMASI³

HCl molekül ağırlığı (MW)=36.5g

HCl ticari ambalajında %37'lik (10N) konsantre solusyondur. Buna göre;

- 1000ml 1N HCl hazırlamak için; Distile su 900ml. bir erlene koy
%37'lik HCl 100ml. yavaş ilave et.

[ÖNEMLİ UYARI! Çözelti; konsantre asit suya yavaş yavaş ilave edilerek hazırlanır. Asla su, asitin üzerine dökülmemelidir. Asit-su karşılaşması esnasında ısı veren bir reaksiyon meydana geldiğinden patlama ve yanma olabilir. Benzer tüm çalışmalarda azami dikkat gösterilmelidir.]

- Hazırlanan çözelti iki veya daha fazla şişeye bölünür.
 - Bir kısım HCl steril edilmeden saklanır; etiketlenir, hazırlama tarihi ve SKT (6 ay sonrası) yazılır.
 - Besiyerine sterilizasyon sonrası pH ayarlaması için ilave edilecek HCl'in steril olması gerekir. Şişenin üzeri etiketlenir; hazırlama tarihi ve SKT (1 yıl sonrası) yazılır.
 - Filtrasyonla veya otoklavda steril edilir (121°C, 15 dak.)
 - Oda ısısında saklanır.
-

¹ Bütün reajenleri hazırladıktan sonra ağız burğu kapaklı şişelerde saklayınız. (bkz.5.1.1)

² Hazırlama esnasında *Legionella* besiyerleri genellikle asit reaksiyondadır. pH'ını ayarlamak için bu durumda baz olarak 1N KOH kullanılır. Sodyum *Legionella* bakterisi üzerinde inhibitör olduğu için **asla** NaOH kullanılmaz!

³ Bazan besiyeri pH ayarı için asit çözelti kullanılması gerekir. Bu nedenle 1N HCl laboratuvarında hazır bulundurulmalıdır.

5.4 BESİYERİ KALİTE KONTROL PROSEDÜRÜ

5.4.1 Amaç

Laboratuvarda hazırlanan *Legionella* besiyerlerinde kalite kontrolü yapmanın amacı;

- sterilite için gerekli koşullara uyulup uyulmadığının (sterilite kontrol),
- Legionella* üremesini destekleyip desteklemediğinin (üreme kontrol), ve
- diğer mikroorganizmaların üremesini inhibe edip etmediğinin (inhibitör performans kontrol), araştırılmasıdır.

Besiyerlerinin test edilmesi için aşağıda verilen prosedürler kullanılır. Bu prosedürler yalnız *Legionella* spesifik besiyerleri içindir.

5.4.2 Sterilite kontrol

Her ½ litre besiyeri için rastgele seçilmiş 2 plak 37°C'da inkübasyona kaldırılır. 3 gün sonra incelenir.

5.4.3 İnokulum hazırlanması

Saklama besiyerinden (BCYE veya diğer m.o.lar için uygun vasat) pasajlanmış 1-2 günlük agar kültüründen 2 ml steril deiyonize suda, 0.5 MacFarland'a göre bakteri süspansiyonu hazırlanır.

1µl.lik steril öze ile bir öze dolusu, test edilecek besiyerine ekilir.

Plaklar 37°C'da inkübe edilir.

Üremeler ertesi günden itibaren kontrol edilir. *Legionella* spesifik üreme için 3 gün sonunda karar verilir.

<u>STOK İZOLAT</u>	<u>Standart #</u>	<u>SAKLAMA BESİYERİ</u>
<i>Legionella pneumophila</i>	ATCC43111	BCYE (<i>yatık</i>)
<i>Legionella micdadei</i>	VAMC594	BCYE (<i>yatık</i>)
<i>Legionella bozemanii</i>	VAMC14	BCYE (<i>yatık</i>)
<i>Escherichia coli</i>	ATCC25922	TSA veya kanlı agar
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC25923	TSA veya kanlı agar

5.4.4 Sonuçların kaydedilmesi

"*Legionella* Besiyeri Kalite Kontrol Tablosu"na (Ek-3) besiyerinin adı, Lot No, miktarı, kalite kontrol tarihi v.b. besiyeri bilgileri kaydedilir.

Tablonun sağ üst köşesinde verilen parametreler baz alınarak plaklar okunur ve kabul edilen değerler "+" ile, kabul edilmeyenler "-" ile tabloya işaretlenir.

İncelenen besiyeri kabul edilen parametreler ile uyuşmadığında kullanım dışı bırakılır ve "*Legionella* Besiyeri Kalite Kontrol Tablosu"nun "değerlendirme" kısmına kaydedilir.

5.5 İZOLAT SAKLAMA PROSEDÜRÜ

5.5.1 Saklama Besiyerinin Hazırlanması

%16 Glycerol'ü Buyyon

-
- 250 ml.lik temiz bir erlen alınır. İçine bir adet manyetik bar konulur.

Nutrient Broth (Difco).....	1.0 g
Glycerol (kullanmadan önce ısıtılır).....	20.1 g
Distile su.....	100.0 ml
 - Manyetik karıştırıcıda karıştırılır, eritilir, pH ölçülür ve 7.2±0.5'e ayarlanır.
 - 3-4 adet, 25 veya 50ml.lik burgu kapaklı Pyrex şişelerden alınır ve hazırlanan buyyon bölünür.
 - 115°C'da 10 dakika otoklavlanır. Buzdolabında 6 ay saklanır.
-

5.5.2 Suşların Saklanması

Gerekli Materyal

-
- İki adet burgu kapaklı, steril, plastik derin dondurucu tüpü
 - %16'lık glycerol buyyon.
 - İki adet BCYE (veya diğer bakteriler için kanlı agar, çukolata agar...)
 - Steril disposable öze
 - Biyogüvenlik kabini (Class I veya II) (yoksa; bunzen beki başında çalış)
 - Solvent rezistan cam kalem veya etiket (deepfreez'e konulacak tüpler, solvent rezistan cam kalem ya da etiket ile adlandırılmalıdır.)
 - Saklama (koleksiyon) kayıt defteri
-

İzolatin Hazırlanması

Öncelikle saklanacak suşun saf kültürü elde edilmiş olmalıdır. Ardından;

- İki adet kanlı agar plağı (veya *Legionella* için BCYE) alınır.
 - Plakların üzerine izolata ait bilgiler (adı, Prot.No.su) ve tarih yazılır.
 - İzolatin saf kültüründen, birer öze dolusu olacak şekilde her iki plağa da yoğun ekim yapılır.
 - 24-48 saat inkübe edilir (bakterinin üreme özelliğine göre süre değişir; ancak, mümkün olduğunca daha yaşlı kültürleri saklamaktan kaçınılmalıdır.)
-

Saklama (Kültür Koleksiyonu)

- a. İnkübasyon sonunda plaklarda yoğun üreme görülmelidir.
 - b. İki adet derin dondurucu tüpüne %16'lık glycerol buyyondan 1.2-1.5ml konur.
 - c. Bir öze yardımıyla her *bir plaktaki* üremenin tamamı *bir tüpe* olacak şekilde bakteri toplanır (toplama işlemi steril dacron eküvyon çubuğu kullanılarak da yapılabilir).
 - d. Toplanan bakteri tüp içindeki buyyonda homojenize edilir. Ağız kapatılır ve vortekslenir.
 - e. Koleksiyon kayıt defterine suşun kimlik bilgileri ve tarih işlenir.
 - f. Tüplerden biri -20°C'a (1-2 yıl için) diğeri -80°C'a (en az 8-10 yıl için) kaldırılır (karışıklığı önlemek için izolatların *belirli bir kodlama düzeninde* saklama kutularına ve derin dondurucuya yerleştirilmesi gerektiği unutulmamalıdır).
-

5.5.3 Saklanmış izolatın gereğinde yeniden pasajlanması

Genellikle 6 ay-1 yıl içinde rutin amaçlarla pasajı gereken izolatlar için -20°C' da saklanan tüplerin kullanılması, 5-10 yıl önceki izolatlardan yararlanmak gerektiğinde ise -80°C'da saklanan tüplere başvurulması önerilir.

Bu nedenle -20°C'a kaldırılan tüplerin en geç iki yılda bir yenilenmesinde fayda vardır.

- a. Pasaj için BCYE agar hazırda bulundurulur.
 - b. *Veya* bakterinin özelliğine göre kanlı agar, çukulata agar veya spesifik inhibitörsüz zengin bir agar besiyeri alınır.
 - c. Pasajlanacak izolat derin dondurucudan çıkarılır. Bir buz kabının içine konur.
 - d. Tüp içeriğinin erimesi beklenmeden üst kısmından bir steril öze ile kazıma yapılarak alınan öze dolusu bakteri besiyerine ekilir.
 - e. Tüp tekrar ve hemen derin dondurucuya, alındığı kutuya kaldırılır.
-

6. KAYNAKLAR

1. Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı 2004, Ankara.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurveLabReh.pdf> (son erişim tarihi: 06.01.2014).
2. Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014).
3. Seyahat İlişkili Lejyoner Hastalığı Kontrol Programı Genelgesi. Sağlık Bakanlığı, TSHGM, 01/05/2001-34.
4. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi. Lejyoner Hastalığının Mikrobiyolojik Tanısı, UMS-B-MT-06. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 934, Ankara, 2014
5. World Health Organization. *Legionella* and the prevention of legionellosis. WHO. Geneva, 2007.
6. Akbaş E. Nozokomiyal *Legionella* Enfeksiyonları. Doğanay M, Ünal S, Çetinkaya Şardan Y (editörler). Hastane İnfeksiyonları 2013. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2013, sayfa.401-435
7. Edelstein PH. *Legionella*. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 770-785
8. Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:506-526.
9. Stout JE, Yu VL, Best MG. Ecology of *Legionella pneumophila* within water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* 1985;49:221-8.
10. Akbaş E. Lejyoner hastalığının önlenmesi ve kontrolünde hastane su sistemlerinin yönetimi. Günaydın M, Öztürk R, Ulusoy S, Gültekin M (editörler). 5. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi Kitabı, 4-8 Nisan 2007, Antalya: 2007; 334-351.
11. European Centre for Disease Prevention and Control. European Legionnaires' Disease Surveillance Network (ELDSNet): Operating procedures. Stockholm: ECDC; 2012. <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/publications/1202-ted-eldsnet-operating-procedures.pdf> (son erişim tarihi: 06.01.2014).
12. Stout JE, Yu VL. Current concepts: Legionellosis. *N Engl J Med* 1997;337:682-7
13. Tablan OC, Anderson LJ, Besser R, Bridges C, Hajjeh R. Guidelines for preventing health-care-associated pneumonia, 2003: recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. *MMWR Recomm Rep*. 2004; 26:(53) (RR-3):1 <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5303a1.htm>. (son erişim tarihi: 06.01.2014).
14. Akbaş E. Hastane su sistemlerinde *Legionella* araştırılmasında temel prensipler. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2013; 43(1):1-13.
15. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Bulaşıcı Hastalıkların Araştırılmasında Sahada Çalışan Hekimler İçin Laboratuvar Rehberi. Lejyoner Hastalığı. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara, 2014
16. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Bulaşıcı Hastalıkların Araştırılmasında Sahada Çalışan Hekimler İçin Laboratuvar Rehberi. Sulardan *Legionella* sp İncelemesi - Lejyoner Hastalığında Çevresel Sürveyans için Suyun Mikrobiyolojik Analizi. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara, 2014.
17. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Laboratuvar Güvenliği Rehberi. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 937, Ankara, 2014.
18. *Legionella* Çalışmasında Genel Amaçlar için Standart Laboratuvar Prosedürleri.

- Legionella* Referans Laboratuvarı Uygulama Kitapçığı-1. Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Ankara, 2005.
19. Procedures for the recovery of *Legionella* from the environment. U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta, GA: Center for Diseases Control and Prevention (CDC), 1994.
 20. Stout JE. Culture methodology for *Legionella* species. Fallbrook CA: HC Special Report, 1998.
 21. Wadowsky RM, Yee RB. Glycine-containing selective medium for isolation of *Legionellaceae* from environmental specimens. *Appl Environ Microbiol* 1981; 4:768-72.
 22. Ta AC, Stout JE, Yu VL, Wagener MM. Comparison of culture methods for monitoring *Legionella* species in hospital potable water systems and recommendations for standardization of such methods. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2118-23.
 23. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi. Suş Saklama Prosedürü, UMS-B-TP-01. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 934, Ankara, 2014.
 24. Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.
 25. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi. Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi GEN-ÖY-01. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 934, Ankara, 2014

Legionella Bölge Laboratuvarı
SU ÖRNEKLERİ ÇALIŞMA FORMU

Otel/Hastane: _____ Sayfada _____

Örnekleme tarihi: _____ Ekim T: _____ Plak okuma T: _____

Örnek Lab.Protokol No	Bilgisi/ Direkt FA veya AT ¹	Besiyeri	Koloni sayısı	Subkültür		SAT ³			Sonuç
				BCYE	BAP ²	Lp SG1	Lp SG 14	2- non- pneum	
		BCYE							
		DGVP							
		BCYE							
		DGVP							
		BCYE							
		DGVP							
		BCYE							
		DGVP							
		BCYE							
		DGVP							

¹AT: asit treatment, FA: Filtrasyon+Asit²BAP: blood agar plate³SAT : slide aglütinasyon test

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

BAĞLANTI ADRESİ:

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Referans Laboratuvarı
E Blok 2. Kat 06100 Sıhhiye-ANKARA
Tel: 0(312) 565 5505 Faks: 0(312) 565 5455
e-posta: usyprl@saglik.gov.tr