

## Sunuş

Hayvancılık sektörü bakımından büyük bir potansiyele sahip olan ülkemizde bazı hayvan hastalıklarının mevcudiyeti önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Hastalıklarla mücadelede veteriner teşhis ve analiz laboratuvarlarında hızlı ve güvenilir teşhis yapılması erken tedbir alınması açısından son derece önemlidir.

Bu kapsamda veteriner teşhis ve analiz laboratuvarlarının alt yapıları bütçe imkanları doğrultusunda sürekli iyileştirilmeye çalışılmaktadır. Çalışmalar sonucunda, Avrupa Birliği entegrasyonu içerisinde ulusal referans laboratuvar oluşturulmuş ve Bakanlığımız Teşhis ve Analiz Laboratuvarlarının akreditasyonları gerçekleştirilmiştir.

Son yıllarda dünyada ve ülkemizde yeni hastalıkların görülmeye başlaması ve teknolojik gelişmelere paralel olarak hastalıkların teşhisinde yeni metotlar kullanılmaya başlanmıştır. Gerek ülkemizde kullanılan mevcut metotların gerekse uluslararası kabul görmüş yeni teşhis metotlarının tekrar gözden geçirilerek standart operasyon prosedürlerin güncellenmesi amacıyla Bakanlığımız yetkilileri, Veteriner Fakültesi Öğretim Üyeleri ve Enstitü Uzmanlarının koordineli olarak çalışacakları altı adet komisyon oluşturulmuştur. Oluşturulan komite üyelerinin özverili çalışmaları sonucunda teşhis metodu standart operasyon prosedürlerine son hali verilmiş ve tüm komisyonların çalışmaları bir araya getirilerek "Teşhiste Metot Birliği Kitabı" oluşturulmuştur. Tüm Kamu ve Özel Veteriner Teşhis ve Analiz Laboratuvarları bu kitapta yer alan bilimsel komitenin onayını almış teşhis ve analiz metotlarını kullanacak ve bu suretle teşhiste metot birliği sağlanacaktır.

Gerek Bakanlığımız Laboratuvarlarında ve gerekse Bakanlığımızdan ruhsatlı Veteriner Teşhis ve Analiz Laboratuvarlarında yayımlanmış olan bu metotlar uygulanacak olup, analiz sonuçları ulusal referans laboratuvarlar tarafından doğrulandıktan sonra geçerli olacaktır.

Bilimsel komite üyeleri belli zamanlarda bir araya gelip, gelişmeleri takip ederek bünyelerinde çalışmalarına devam edecek ve yeni geliştirilen metotların mevcut kitaba ilavesiyle kitabın güncellenmesi temin edilecektir. Yeni geliştirilen veya ilk defa kullanılacak bir metodun Standart Operasyon Prosedürü oluşturulup bilimsel komitenin onayından geçtikten sonra kullanılmaya başlanacaktır.

AB müktesebatına uyumlaştırma çalışmalarının aktif olarak yürütüldüğü bu günlerde, Genel Müdürlüğümüz, Veteriner Fakültesi Öğretim Üyeleri ve Enstitü Uzmanlarının gayretli çalışmaları sonucu hazırlanan Teşhiste Metot Birliği kitabının ülkemize yararlı olacağını umuyor ve bu konuda emeği geçenlere teşekkür ediyorum.

**Dr. M. Mehdi EKER**

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanı



Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanı  
Sayın Dr. M. Mehdi EKER'in himayeleri ile

## YÖNETİM KOMİTESİ

Vedat MİRMAHMUTOĞULLARI  
Dr. Nihat PAKDİL  
Prof. Dr. İrfan EROL  
Habib CAN  
Dr. Nahit YAZICIOĞLU

## GÖREV ALANLAR

### VE KATKIDA BULUNANLAR (\*)

*Dr. Funda ALTINÖZ*

*Dr. Erhan AKÇAY*

*Ayşe ATEŞOĞLU*

*Zeynel ARSLAN*

*Yusuf AKPINAR*

*Hasan AYDIN*

*Prof. Dr. Mehmet AKAN*

*Hüseyin ATİK*

*Özlem BAĞCI*

*Halil BAŞARAN*

*Dr. Ayşen BEYAZIT*

*Prof. Dr. Emine BAYDAN*

*Dr. Aysel Ünsal BACA*

*Dr. Yasemin COŞKUN*

*Mustafa COŞAR*

*Hüseyin ÇAKIROĞLU*

*Emine ÇİFTÇİ*

*Dr. Fethiye ÇÖVEN*

*Dr. Ahmet DENİZ*

*Prof. Dr. K. Serdar DİKER*

*Dr. İffet DİNÇ*

*Asiye DAKMAN*

*Dr. Seza ESKİİZMİRLİLER*

*A.Turan ERDOĞDU*

*Dr. Arife ERTÜRK*

*Dr. Mehmet EKİK*

*Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ*

*Prof. Dr. Bahadır GÖNENÇ*

*Elçin GÜNAYDIN*

*Yasin GÜÇLÜ*

*Dr. Ziynet GÜNEN*

*Burak GÜNGÖR*

*Dr. Yasemin GÜREL*

*İrem GÜLAÇTI*

*Mehmet Fahrettin HOCANOĞLU*

*Dr. Uğur KÜÇÜKAYAN*

*Prof. Dr. Osman KUTSAL*

*Doç. Dr. Taner KARAOĞLU*

*Dr. Gülnur KALAYCI*

*Kamile KESLER*

*M. Levent KAYNAR*

*Tülay KURT*

*M. Murat MADEN*

*Prof. Dr. Serpil NALBANTOĞLU*

*Asuman SOYSAL NARIŞAHİN*

*Dr. Taraneh ÖNCEL*

*Ümit ÖZDEMİR*

*Doç Dr. T. Çiğdem OĞUZOĞLU*

*Dr. Buket ÖZYER*

*Dr. Çiğdem PIŞKİN*

*Ünal PARLAK*

*Alper SEZGİN*

*Dr. Beyhan SAREYYÜPOĞLU*

*Doç. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU*

*Dr. M. Melih SELVER*

*Yasin ŞEN*

*Dr. Serra TUNALIGİL*

*Dr. Yavuz ULUSOY*

*Dr. H. Hüseyin ÜNAL*

*Prof. Dr. Sevil ATALAY VURAL*

*Prof. Dr. Hakan YARDIMCI*

*Dr. Öznur YAZICIOĞLU*

*Dr. Funda YÜZBAŞIĞİL*

*Dr. Ayşin BAŞSATAN YORUMAZ*

*Dr. N. Fadime YALÇIN*

(\*) Soyadına göre alfabetik dizin



## Redaksiyon Komitesi Listesi

Parazitoloji Komisyonu	: Dr. Funda ALTINÖZ Özlem BAĞCI
Bakteriyoloji Komisyonu	: Dr. Seza ESKİİZMİRLİLER Dr. Serra TUNALIGİL
Patoloji Komisyonu	: Dr. Öznur YAZICIOĞLU Dr. Ziyet GÜNEN
Farmakoloji ve Toksikoloji Komisyonu	: Dr. Yasemin COŞKUN Dr. H. Hüseyin ÜNAL
Viroloji Komisyonu	: Doç. Dr. T. Çiğdem OĞUZOĞLU Dr. Arife ERTÜRK
Kanatlı Hastalıkları	: Doç. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU Dr. Fethiye ÇÖVEN

## Editör Listesi

Parazitoloji Komisyonu	: Prof. Dr. Serpil NALBANTOĞLU
Bakteriyoloji Komisyonu	: Prof. Dr. K. Serdar DİKER
Patoloji Komisyonu	: Prof. Dr. Sevil ATALAY VURAL
Farmakoloji ve Toksikoloji Komisyonu	: Prof. Dr. Emine BAYDAN
Viroloji Komisyonu	: Doç. Dr. Taner KARAOĞLU
Kanatlı Hastalıkları	: Doç. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU

# İÇİNDEKİLER

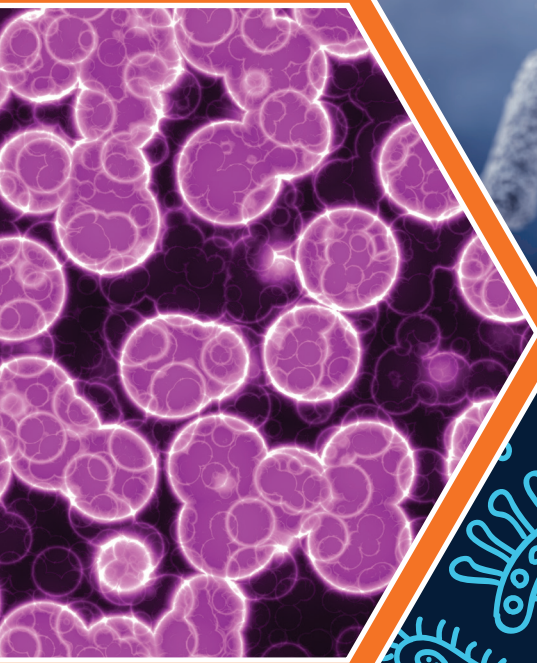
<b>BAKTERİYOLOJİ</b>	<b>9</b>
<b>Çok Türde Görülen Bakteriyel Enfeksiyonlar</b>	<b>11</b>
BRUCELLOSIS'İN TEŞHİSİ	13
BRUCELLOSIS'İN KOMPLEMENT FİKZASYON TEST (CFT) İLE TEŞHİSİ	16
BRUCELLOSIS'İN ROSE BENGAL PLATE TEST (RBPT) İLE TEŞHİSİ	24
BRUCELLOSIS'İN SLOW TUBE AGGLUTINATION TEST (SAT) İLE TEŞHİSİ	27
ANTHRAX'IN TEŞHİSİ	30
COXIELLA BURNETTİ NİN ELISA İLE TEŞHİSİ	35
SIĞIR TÜBERKÜLOZU (BOVINE TUBERCULOSIS)'NUN TEŞHİSİ	39
PARATÜBERKÜLOZ (PARATUBERCULOSIS)'UN ELISA İLE TEŞHİSİ	44
SALMONELLA İZOLASYONU, SEROTİPLENDİRİLMESİ ve ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİĞİNİN TESPİTİ	48
MASTİTİS TEŞHİSİ İÇİN SOMATİK HÜCRE SAYIMI	60
MASTİTİSE NEDEN OLAN MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYON VE İDENTİFİKASYON YÖNTEMLERİ	65
LEPTOSPIROSIS'İN TEŞHİSİ	85
LEPTOSPIROSIS'İN ENZYME-LINKED	

IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) İLE TEŞHİSİ	90
LEPTOSPIROSIS'İN MİKROSKOPİK AGLUTİNASYON TEST (MAT) İLE TEŞHİSİ	95
CLOSTRIDIUM BOTULINUM TOKSİNLERİNİN TESPİTİ	98
CLOSTRIDIUM OEDEMATENS TOKSİNLERİNİN İDENTİFİKASYON TESTİ	102
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS TOKSİNLERİNİN İDENTİFİKASYONU	106
ENTEROTOKSEMİ(ENTEROTOXEMIA)'NİN ELISA İLE TEŞHİSİ	110
YANIKARA HASTALIĞI ETKENİNİN FAT İLE TEŞHİSİ	115
LİSTERİOSİS'İN TEŞHİSİ	118
<b>Sığır Bakteriyel Enfeksiyonları</b>	<b>131</b>
BULAŞICI SIĞIR PLEUROPNEUMONIA (CBPP)'NİN C-ELISA İLE TEŞHİSİ	133
BULAŞICI SIĞIR PLEUROPNEUMONIA (CONTAGIOUS BOVINE PLEUROPNEUMONIAE)'NİN KOMPLEMENT FİKZASYON TEST (CFT) İLE TEŞHİSİ	136
BOVINE GENİTAL CAMPYLOBACTERİOSİS'İN TEŞHİSİ	144
<b>Koyun-Keçi Enfeksiyonları</b>	<b>149</b>
CHLAMYDOPHILA ABORTUS'UN ENZİM LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) İLE TEŞHİSİ	151
BULAŞICI AGALAKSİ (CONTAGIOUS AGALACTIAE)'NİN TEŞHİSİ	155
BULAŞICI AGALAKSİ (CONTAGIOUS AGALACTIAE) 'NİN ELISA İLE TEŞHİSİ	160

BULAŞICI AGALAKSİ (CONTAGIOUS AGALACTIAE)'NİN MOLEKÜLER TEŞHİSİ	163
BULAŞICI KEÇİ CİĞER AĞRISI (CONTAGIOUS CAPRINE PLEUROPNEUMONIAE-CCPP) 'NİN TEŞHİSİ	168
BULAŞICI KEÇİ CİĞER AĞRISI (CONTAGIOUS CAPRINE PLEUROPNEUMONIAE)'NİN KOMPLEMENT FİKZASYON TEST (CFT) İLE TEŞHİSİ	173
BULAŞICI KEÇİ CİĞER AĞRISI (CONTAGIOUS CAPRINE PLEUROPNEUMONIA-CCPP) 'NİN MOLEKÜLER TEŞHİSİ	181
<b>At Enfeksiyonları</b>	<b>187</b>
CONTAGIOUS EQUINE METRİTİS (CEM)'İN TEŞHİSİ	189
<b>Su Hayvanı Enfeksiyonları</b>	<b>195</b>
ALABALIKLARDA GÖRÜLEN BAKTERİYEL BÖBREK HASTALIĞI (BACTERIAL KIDNEY DISEASE)'NİN TEŞHİSİ	197
ALABALIKLARDAN BAKTERİYEL BÖBREK HASTALIĞI'NIN FAT İLE TEŞHİSİ	201
BALIKLARDA GÖRÜLEN STREPTOCOCCOSIS ETKENLERİNİN İZOLASYON VE İDENTİFİKASYONU	204
BALIKLARDA GÖRÜLEN VIBRIOSIS ETKENLERİNİN İZOLASYON VE İDENTİFİKASYONU	209
CRAYFISH PLAGUE (KEREVİT VEBASI)'İN KLASİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TEŞHİSİ	215
DENİZ BALIKLARINDA GÖRÜLEN PASTEURELLOSIS'İN TEŞHİSİ	218
FURUNCULOSIS HASTALIĞI'NİN TEŞHİSİ	222



VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS'UN İZOLASYON VE İDENTİFİKASYONU	226
BALIK NEKROPSİSİ	232
<b>Arı Enfeksiyonları</b>	<b>237</b>
AMERİCAN FOULBROOD OF HONEY BEES (AMERİKAN YAVRU ÇÜRÜKLÜĞÜ)'NÜN TEŞHİSİ	239



## BAKTERİYOLOJİ



# Çok Türde Görülen Bakteriyel Enfeksiyonlar





# BRUCELLOSIS'İN TEŞHİSİ

## 1. AMAÇ

Şüpheli materyallerde, *Brucella* türü mikroorganizmaların bakteriyolojik kültür yöntemi ile izolasyonudur.

## 2. UYGULAMA ALANI

Şüpheli materyallerden *Brucella* spp.'nin teşhisi için uygulanır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeniyle enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışırken dikkatli olunur ve OIE Manual ve WHO Laboratory Biosafety Manual esas alınarak kurallara uyulması sağlanır. Materyalin taze olması ve soğuk zincir koşullarında gönderilmesi gerekir.

## 5. KISALTMALAR/TANIMLAR

***Brucella* spp.:** Gram (-), hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz, 0.6-1.5 X 0.5-0.7 µm boyutlarında kokobasiller olup fagositik hücreler için de yaşayabilme özelliğine sahip fakültatif intraselüler mikroorganizmalardır.

**İç organ :** Bakterinin aranacağı fetal dokular ve plasenta

**Besiyeri :** Bakterinin şüpheli materyalden izolasyonunu sağlayan ya da biyokimyasal özelliklerinin saptanmasına yardımcı olan üreme ortamıdır.

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

Gelen materyallerden (fötusa ait dalak, karaciğer, akciğer, fötüs mide içeriği ve vaginal swap) ikişer adet Serum Dextrose/Farrel/Kanlı agar besiyerlerine ekim yapılır. Ekim yapılan petrilerin yarısı aerobik koşullarda, diğer yarısı % 5-10 CO<sub>2</sub> içeren ortamlarda en az 5 gün süre ile 37°C'de inkübe edilir. 5. günde koloni oluşumu görülmezse tekrar inkübasyona bırakılarak 8-10 gün sonra kontrol edilir. Bu defa da üreme olmazsa muayeneye son verilir.

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1. Materyal

Brucellosis şüpheli büyükbaş ve küçükbaş hayvana ait fetal dokular (dalak, karaciğer, akciğer), fetus mide içeriği ile plasenta (özellikle kotiledonlar), vaginal akıntı ve swap materyal olarak kullanılır.

### 7.2. Kullanılan Ekipman

- İnkübatör 37°C'de (CO<sub>2</sub>'li ve aerobik)
- Işık Mikroskobu
- Öze
- Bunzen Beki
- Buzdolabı

### 7.3. Kullanılan Kimyasallar

- Gram boyama seti

### 7.4. Kullanılan Besiyerleri

- Serum Dextrose Agar/Farrel Medium/Kanlı agar

### 7.5. Numunenin Hazırlanması ve Analiz/Test/Muayene'nin Yapılması

Fetal dokular (dalak, karaciğer, akciğer), fetus mide içeriği ve vaginal swaptan ikişer adet Serum Dextrose Agar/Farrel Medium/Kanlı agar besiyerine ekim yapılır. Ekim yapılan petrilere yarısı aerobik koşullarda, diğer yarısı % 5-10 CO<sub>2</sub> içeren ortamlarda en az 5 gün süre ile 37°C'de inkübe edilir. 5. günde koloni oluşumu görülmezse tekrar inkübasyona bırakılarak 8-10 gün sonra kontrol edilir. Bu defa da üreme olmazsa muayeneye son verilir.

İnkübasyon süresi sonucunda üreyen mikroorganizmaların morfolojilerini değerlendirmek amacı ile Gram Boyama yapılır. Üreyen mikroorganizmaların oluşturduğu kolonilerin yapısı incelenir. Şüpheli koloniler için **Brucella Polivalan (A+M)** antiserumu ile lam aglütinasyon testi yapılır ve aglütinasyon testi sonucuna göre değerlendirme yapılır. *Brucella* spp. olarak tespit edilen koloniler, Ulusal *Brucella* Referans Laboratuvarına biyotiplendirme amacı ile gönderilir.



## 7.6. Sonuçların Değerlendirilmesi

*Brucella spp.* kolonilerinin besiyerindeki görünümü ve özellikleri aşağıdaki gibidir. İnkubasyonun 2. gününde üreme görmek mümkünse de, rutin muayenelerde 4-5'inci günde 2-4 mm çapında yuvarlak, smooth koloniler oluşur. Serum Dextrose agarda; mavimsi-yeşil refle veren koloniler şeklinde görülürken, Farrel Medium'da; sarı bal renginde, parlak ve şeffaf görünümde dirler. Kanlı Agar yüzeyinde üreyen *Brucella* kolonileri ise iğne başı büyüklüğünde, gri-beyaz koloniler şeklinde görülür.

-**Gram Boyama** : Gram (-) kokobasiller gözlenir.

-**Lam Aglutinasyon Testi** : *Brucella* kolonileri, *Brucella* Polivalan (A+M) antiserumu ile aglutine olurlar.

## 8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

1. OIE (2009) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Erişim adresi: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.04.03\\_BOVINE\\_BRUCELL.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.03_BOVINE_BRUCELL.pdf).
2. ARDA M. (2000) Temel Mikrobiyoloji, İkinci Baskı, Medisan Yayınevi Atmaca Sok. 8/3 Dışkapı/ANKARA
3. BISPING Wolfgang and AMTSBERG Gunter (1988), Colour Atlas for the diagnosis of Bacterial Pathogens in animals. 246-259
4. BLOOD, D.C. and RADOSTITS, O.M. (1989), Veterinary Medicine 7 th edition. Bailliere Tindall Ltd. London, 677-697
5. WHO (2004) Laboratory Biosafety Manual - Third Edition, [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_2004\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/).

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

# BRUCellosis'İN KOMPLEMENT FİKZASYON TEST (CFT) İLE TEŞHİSİ

## 1. AMAÇ

Şüpheli kan serumlarında *Brucella* türlerine karşı oluşan antikorların saptanmasıdır.

## 2. UYGULAMA ALANI

Brucellosis'in teşhisi amacıyla serolojik tekniklerin kullanıldığı uygulamaları kapsamaktadır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve "OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual", esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solüsyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

## 5. KISALTMALAR/TANIMLAR

**CFT:** Komplement Fikzasyon Test

**Brucella:** Sığır, koyun, keçi, domuz, koç v.b hayvanlarda özellikle testis, meme, uterus gibi genital organlara yerleşerek yavru atmalara ve infertiliteye neden olan kronik, bulaşıcı ve nekrotik yangısal enfeksiyonlarla ortaya çıkan zoonoz bir hastalıktır.

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

Test; bilinen antijenle, şüpheli kan serumunda olası spesifik antikorun kompleman ile birleşmesi ve hemolitik sistemin ortama katılması ile pozitif vakalarda eritrositin parçalanmadan çökmesi, negatif vakalarda eritrositin parçalanarak hemoliz oluşturması esasına dayanır.

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1 Materyal

Kan serumu. CFT testinde plasma kullanılmaz.

### 7.2. Kullanılan Ekipman

- Su banyosu, 37 °C ve 56°C
- Santrifüj
- Plate okuyucu ayna
- Tek kanallı Mikropipetler 25 µl-50 µl
- Çok kanallı mikropipetler 25 µl-50 µl
- Test tüpler 12\*100 mm ya da benzeri
- Santrifüj tüpleri
- Pipetler 1 ml, 5 ml, 10 ml
- U- tabanlı mikroplate
- Mikropipet uçları
- Plastik yapıştırıcı (mikroplate için)
- Farklı hacimde cam malzeme

### 7.3.Kimyasal Maddeler ve Reagentlar:

- Veronal Buffer (Virion\serion Kat no: 2017-04/ bioMerieux, Ca-Mg-Veronal Buffer KN: 72 171/ Oxoid,Barbitone CFT Diluent Tablets KN: BR0016)
- Distile su
- %10 Sodium sitrat solüsyonu

### Antijen/Kontrol antijen

- Brucella CFT antijeni (Virion/serion Kat no:1297)
- Çalışma dilüsyonu: Etiket üzerinde belirtilen oranda veronal buffer ile dilüe edilir.

### Pozitif ve Negatif kontrol serum (SOR)

- Ulusal Standart anti- Brucella Abortus Serum (USAbS) : 1 ml'sinde 1000 internasyonal Komplement Fikzasyon Ünitesi (ICFTU) ihtiva eder. Liyofilize serum 1 ml distile su ile çözündürülür. Çalışma dilüsyonu: 1/5 oranında veronal buffer ile dilüe edilir. Su banyosunda 56°C de 30 dakika inaktive edilir.



Negatif serum: (Virion/serion Kat no:4297).

### **Komplement**

Komplement: (Virion/serion Kat no:9001)

Çalışma dilüsyonu: Etiket üzerinde belirtilen oranda veya komplementin titrasyonu ile belirlenir.

### **Komplementin Titrasyonu;**

9 tüpten oluşan 3 sıra yapılıdır. Komplementin ön dilüsyonu hazırlanır (tercihen 1/40 dilüsyon hazırlanır, komplement eskidikce bu dilüsyon artırılır ve öndilüsyon 1/30 veya 1/20 olarak hazırlanır.

Dilüsyon aşağıda gösterilmiştir:

TÜP	C 1/40	VBD	VBD
1	0.1 ml	0.4 ml	1.5 ml
2	0.150 µl	0.350 µl	1.5 ml
3	0.200 ml	0.300 ml	1.5 ml
4	0.250 µl	0.250 µl	1.5 ml
5	0.300 ml	0.200 ml	1.5 ml
6	0.350 µl	0.150 µl	1.5 ml
7	0.400 ml	0.100 ml	1.5 ml
8	0.450 µl	0.05 ml	1.5 ml
9	0.5 ml	-	1.5 ml

Tüpler 37°C de su banyosunda 1 saat bekletilir. Bu süre esnasında hemolitik sistem hazırlanır; %2'lik koyun eritrositleri ve çalışma dilüsyonundaki amboseptör ayrı olarak tutulur.

Her tüpe 0.5 ml amboseptör ve 0.5 ml koyun eritrositleri eklenir. Tüpler dikkatlice çalkalanır ve tekrar 30 dakika için su banyosuna konur. Tam hemoliz gösteren ilk tüp komplementin minimum dozu (MHD,C) olarak okunur. Hemen yanındaki tüp full hemolitik dozu gösterir (FHD). Kullanılacak komplement aşağıdaki formülle hesaplanır.

C öndilüsyon oranı / 4 × Fulldoz

Örnek: Üçüncü tüpte MHD varsa, FHD dördüncü tüptedir ve şöyle hesaplanır.

$40 / 4 \times 0,250 = 40$  (1:40 olarak çevrilir)

### **Amboceptor (Hemolizin)**

Hemolytic anti-koyun eritrosit serumu

- bioMerieux, KN: 72 202
- Institute Virion/Serion, KN: 9002
- Fa.Behring, Amboceptor 6000 for CFT KN: ORLC 25

Çalışma dilüsyonu: Etiket üzerinde belirtilen oranda dilüe edilir.

### **Eritrosit süspansiyonu**

Koyun kanı ya hayvanın vena jugularisinden için de (%10) sodium sitrat eriyiğinden, alınacak kan hacminin 1/10 u kadar bulunan ya da içerisinde boncuk olan bir şişeye alınır. Sitratlı kaplarda kan ile sitrat eriyiği karışınca kadar, boncuklu şişede kan defibrine oluncaya kadar çevirme hareketleri ile karıştırılarak pıhtılaşması önlenir.

Koyun eritrositlerinin yıkanması:

Kan steril tüplerine konur. Üzerine veronal buffer dilüent (VBD) konur. Santrifüj edilir. (3000 rpm 'de 10 dakika), üst sıvı dökülür, tortu yeniden VBD ile sulandırılır ve santrifüj edilir. Bu işlem üç kez tekrarlanır. Sonunda tüp dibindeki eritrosit tortusu dereceli pipetle ölçülür, %2 oranında VBD ile sulandırılır.

### **7.4. Örneklerin hazırlanması ve saklanması**

Test serumu, pozitif ve negatif kontrol serumu 12 lik set olarak düzenlenir ve çalışılır. Bütün serumlar 1:5 oranında sulandırılır (0.1 ml serum+0.4 ml VBD) ve 56 °C 'lik su banyosunda 30 dakika inaktive edilir (endojen komplemen inaktivasyonu). Tropikal koşullar altında 56°C'lik normal inaktivasyon derecesi doğal komplemenin anti-komplementer aktivitesini nötralize etmek için yeterli değildir. Bu durumda 60°C'lik bir ısı tercih edilmelidir. Muhtemelen, bir rutin olarak tüm serumlar daha yüksek bir ısıda inaktive edilmelidir. Özellikle at serumu anti- komplementer bir özellik göstermeye yatkındır. Öbür yandan tüm domuz serumları pro-komplementer aktivite gösterirler ve CFT'de kullanılmazlar (İnsan serumları 56°C de, Sığır 58°C de, Koyun 61°C de antikomplementer aktivitesini kaybeder, ancak IgM antikorları 65°C de yıkıma uğrarlar bu yüzden benmarinin derecesi bu ısının üzerine çıkmamalıdır).

### **7.5. Antikomplementer aktivite gösteren serum için prosedür**

Bazı serumlar antikomplementer aktivite gösterebilir ve bu yanlış sonuçlara neden olabilir. Tekrar tekrar dondurulup çözülürmüş serumlar, hemolize olmuş serumlar, kontamine olmuş serumlar kadar, kullanılan ilaçlar ve romatoid faktörler de serumun antikomplementer

aktivite göstermesine sebep olabilir. Serumlar dilüe edilmemiş komplementle ön tedaviden sonra CFT testinde kullanılabilir. Ön tedavi için serum 1:1 oranında komplementle dilüe edilir. Örneğin: 100 µl serum (dilüe edilmemiş) + 100 µl komplement (dilüe edilmemiş) karıştırılır. Bir su banyosunda 37°C de 30 dakika veya oda ısısında 60 dakika inkübe edilir. Sonra 300 µl VBD ilave edilir ve 56°C de 30 dakika su banyosunda bekletilir. Bu şekilde serum 1:5 oranında dilüe edilmiştir ve direkt olarak CFT testinde kullanılabilir.

## 7.6. Testin Yapılışı

### 1.GÜN

U tabanlı mikroplakaların hazırlanması ve protokol sayfasının gösterilmesi

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		serum	serum	serum	serum	serum	serum	serum	serum	serum	+ kontrol	- kontrol	
A	1:5												AC
B	1:10												AC
C	1:20												HS
D	1:40												HS
E	1:80												CC
F	1:160												CC <sub>1</sub>
G	1:320												CC <sub>2</sub>
H		ACA	ACA	ACA	ACA	ACA	ACA	ACA	ACA	ACA	ACA	ACA	CC <sub>3</sub>

Her serum örneği, ve kontroller için testin yapılışı

- B ile G arasındaki sıralara 25 µl VBD ilave edilir.
- A, B, H kuyucuklarına dilüe edilmiş serumlardan (1:5 oranında örnekler ve kontroller) 25 µl konur.
- Serumlar B sırasından başlayarak G sırasına kadar 25 µl dilüe edilir ve G sırasından sonra 25 µl atılır.
- Çalışma dilüsyonundaki antijen A ile G arasındaki kuyulara 25 µl ilave edilir. Antikomplementer aktivitenin kontrolü (ACA) için H sırasına antijen ilave edilmez onun yerine 25 µl VBD ilave edilir.
- Çalışma dilüsyonundaki komplement tüm plate 25 µl olarak ilave edilir.

## Antijen, Hemolitik sistem ve Komplement kontrolün çalışması

USAbS (PC), negatif kontrol (NC), Antijen kontrolü (AC), Hemolitik sistem kontrolün (HS) ve Komplement kontrolü (CC) uygulanan günlük testte sadece bir plate yapılır.

- Test edilen serumun veya pozitif/negatif serumun antikomplementer aktivitesi (ACA): (25 µl serumun 1/5 dilusyonu+ 25 µl VBD+ 25 µl komplement+ 50 µl hemolitik sistem)
- Antijen kontrolü (AC): (25 µl VBD+25 µl antijen+ 25 µl komplement+ 50 µl hemolitik sistem)
- Hemolitik sistem kontrolü (HS): (75 µl VBD+ 50 µl hemolitik sistem)
- 2 ünite komplement kontrolü (CC) (çalışma dilusyonunda komplement)
- 1, 0.5 ve 0.25 komplement ünite kontrolü (CC<sub>1</sub>, CC<sub>2</sub>, CC<sub>3</sub>) (25 µl çalışma dilusyonundaki komplementin 1:2, 1:4 ve 1:8 dilusyonları+ 25 µl antijen+25 µl VBD+ 50 µl hemolitik sistem)
  - CC<sub>1</sub>, CC<sub>2</sub> ve CC<sub>3</sub> deki kuyucuklar içine 25 µl VBD ilave edilir.
  - CC ve CC<sub>1</sub> deki kuyulara çalışma dilüsyonundaki komplementten 25 µl ilave edilir. CC<sub>1</sub> den başlayarak CC<sub>3</sub> e kadar 25µl dilüe edilir. CC<sub>3</sub> den 25 µl dışarı atılır.
  - CC-CC<sub>3</sub> deki kuyucuklara 25µl antijen ve VBD konur.
- Plakalar dikkatli bir şekilde karıştırıldıktan sonra üzeri kapakla kapatılır 2-8 °C de 16-20 saat inkübasyona bırakılır.

## 2. GÜN

### 7.6.1. Hemolitik sistemin hazırlanması

Çalışma dilüsyonundaki amboseptör %2 eritrosit süspansiyonu ile 1:1 oranında karıştırılır. Hemolitik sistemi hazırlamadan önce eritrosit süspansiyonu dikkatli bir şekilde karıştırılarak homojen hale getirilmelidir. Hazırlanan karışım oda ısısında 30 dakika inkübe edilmelidir.

-Hemolitik sistem hazırlanırken plakalar buzdolabından çıkarılarak oda ısısında 30 dakika bekletilir.

- Süre sonunda tüm deliklere 50 µl ilave edilir.
- Plakanın yüzeyi bantla kapatılır ve 37 °C 'lik su banyosunda 30 dakika imkübe edilir.
- Sonuçlar okunmadan önce plakalar yarım saat buzdolabında bekletilir. Böylece lize olmamış hücrelerin çökmesi sağlanmış olur. %50 hemoliz gösteren son kuyucuk titreyi gösterir.

### Okuma:

%100 hemoliz inhibisyonu: 4 (++++) olarak kaydedilir.

%75 hemoliz inhibisyonu: 3 (+++) olarak kaydedilir.

%50 hemoliz inhibisyonu: 2 (++) olarak kaydedilir.

%25 hemoliz inhibisyonu: 1 (+) olarak kaydedilir.

Eser (iz-ufacık bir miktar) hemoliz inhibisyonu +/- =negatif olarak kaydedilir.

Tam hemoliz: 0=negatif olarak kaydedilir.

### Geçerlilik kriterleri

- Negatif kontrol negatif olmalı
- USAbS Pozitif kontrol etiketinde belirtildiği titrede olmalı
- Serum kontrol (ACA) negatif olmalı (tam hemoliz) aksi takdirde antikomplementer aktiviteyi gösterir.
- Komplement kontrol CC<sub>2</sub> ve CC<sub>3</sub> ünitede hemoliz inhibisyonu ve CC ve CC<sub>1</sub> ünitede tam hemoliz göstermeli.

### 7.7. Sonuçların değerlendirilmesi:

Test edilen serum örnekleri titresi, 1 ml sinde 1000 ICFTU ihtiva eden USAbS titresi ile karşılaştırılır.

Test sonucu, test edilen serumun her ml deki ICFTU ni gösterecek şekilde verilir. Elde edilen titrenin ICFTU nin hesaplanmasında kullanılan Faktör (F) titrenin ICFTU e dönüştürülmesi için kullanılır ve aşağıdaki formül ile hesaplanır;

$$F = 1000 \times 1 / T_{USAbS}$$

Test serumunun her ml sindeki internasyonal CFT ünitesinin (ICFTU<sub>TESTSERUM</sub>) hesaplanmasında kullanılan formül;

$$ICFTU_{TESTSERUM} = F \times 1 / T_{USAbS}$$

Örnek: Uygulanan CFT testinde T<sub>USAbS</sub> titresi 1/1280 de pozitif reaksiyon vermiş ve T<sub>TESTSERUM</sub> titresi 1/320 de pozitif vermiş bir serumun ICFTU nin hesaplanması;

$$F = 1000 \times 1 / 1 / 1280 = 1000 \times 0.0078125 = 0.78125$$

$$ICFTU_{TESTSERUM} = 0.78125 \times 320 = 250$$

Örnek serum 250 ICFTU ihtiva eder.

20 ICFTU ve üzeri olarak tespit edilen titreler pozitif olarak kabul edilir.



## 8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

- OIE Manuel web sayfası: [www.oie.int/eng/normes/mmanual/A\\_summry.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_summry.htm)
- Commission Regulation (EC) No.535/2002 of 21 March 2002. Amending Annex C to Council Directive 64/432/EEC and amending Decision 2000/330/EC.
- Ulusal Standart anti-Brucella Abortus Serum (USAbS) prospektüsü.
- WHO (2004) Laboratory Biosafety Manual - Third Edition, [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_2004\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/).

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

# BRUCellosIS'İN ROSE -BENGAL PLATE TEST (RBPT) İLE TEŞHİSİ

## 1. AMAÇ

Şüpheli kan serumlarında *Brucella* türlerine karşı oluşan antikorların Rose Bengal Plate Testi (RBPT) kullanılarak tespitinin bir sisteme bağlı olarak yapılmasıdır.

## 2. UYGULAMA ALANI

Brucellosis'in teşhisi amacıyla serolojik tekniklerin kullanıldığı uygulamaları kapsamaktadır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve "OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual", esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

- Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solüsyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir. Kan serumunun aseptik koşullarda alınmış, taze ve hemolizsiz olması gerekmektedir.
- Antijen +2°C /+8°C'de karanlık ortamda ve dondurulmadan saklanmalıdır.
- Antijen kullanılmadan önce iyice çalkalanmalıdır.
- Bu test sonucunda varlığı tespit edilen antikorların değerlendirmesi yapılırken enfeksiyon veya aşı antikorları olup olmadığının bilinmesi yönünden hayvanın kayıtlarının düzenli ve doğru olarak tutulmuş olması gerekmektedir.
- Çalışma esnasında meydana gelen herhangi bir problem veya aksaklık, derhal Bölüm/ Laboratuvar Şefine ve diğer laboratuvar personeline bildirilmeli ve gerekli önlemler alınmalıdır.
- Kullanılan antijen şişeleri herhangi bir bulaşmayı önlemek amacıyla otoklav edilmeli veya en az 10 dakika su için de kaynatılmalıdır. Muayenesi bitmiş olan serum örnekleri, uygun koşullarda muhafaza edilip, belirlenen usüle uygun imha edilmelidir.

## 5. TANIMLAR/KISALTMALAR

**RBPT:** Rose Bengal Plate Test

**Aglütinasyon:** İmmun (antikor taşıyan) serumların homolog mikroorganizmalarla karşılaştıklarında etkileşime girip bir arada kümelenmesidir.

**RBPT Antijeni :** Aglütinasyon yeteneği, standart anti *Brucella abortus* serumla standardize edilmiş, *B. abortus* S99 suşu ile hazırlanmış, Rose–Bengal ile boyanmış ölü bir süspansiyondur.

**Pozitif Kontrol Serum :** *Brucella abortus* S-19 etkenine karşı oluşmuş spesifik antikorları taşıyan serum (Ulusal Standart anti-*brucella abortus* serumu)

**Negatif Kontrol Serum:** Spesifik antikorları taşımayan serum (SPF kanatlı serumu veya fetal buzağı serumu)

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

Şüpheli serum örneklerinde olması muhtemel *Brucella* antikorlarının, özel olarak üretilip standardize edilmiş Rose Bengal test antijeniyle oluşturacağı reaksiyonu saptamak için yapılan bir tarama testidir. Bu test (RBPT), çok hassas bir testtir. Ama tıpkı diğer serolojik testler gibi aşılama nedeniyle pozitiflik verebilir veya yanlış pozitifler oluşabilir. Bu nedenle pozitif reaksiyonlar, uygun teyit stratejileri ile araştırılmalıdır. Bunlar farklı testler yapılmasını ve epidemiyolojik araştırmayı içerebilir. Yanlış negatifler, nadiren (pro zoning nedeniyle) olabilir. Bu durum serum örneğinin dilue edilmesi ile veya testin tekrarlanması ile giderilebilir. Yine de *Brucella*'dan ari sürülerde enfeksiyonun yokluğunun kesinleştirilmesinde yeterli bir testtir.

## 7. TEST METODUNUN UYGULANIŞI

### 7.1. Materyal

**Kan serumu;** Brucellosis hastalığından şüpheli hayvanlara ait kan serumu.

### 7.2. Kullanılan Ekipman

- Beyaz fayans, seramik, plastik bir plaka
- 50 µl'lik mikropipet ve uçları
- Her damlası 25-30 µl'ye ayarlanmış antijen damlalığı
- Karıştırmak için cam veya metal bir çubuk

### 7.3. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

Serum ve antijen buzdolabından çıkarılarak oda sıcaklığına (22±4°C) gelene kadar bekletilir.

- 25-30 µl şüpheli serum; beyaz fayans, seramik, plastik bir pleyte damlatılır.
- Antijen kullanılmadan önce iyice hafif bir şekilde çalkalanır, her bir serum örneğinin üzerine 25-30 µl antijen damlatılır.
- Pleyt'e son damla antijen eklendikten sonra karışım hemen her test için ayrı olacak şekilde temiz cam veya metal bir çubukla özenli bir şekilde, yaklaşık 2 cm çapında dairesel olarak karıştırılır.
- Pleyt 4 dakika elde, oda ısısında, yavaşça eliptik hareketlerle çevrilerek serum-antijen kompleksinin iyice karışması sağlanır.
- 4 dakikalık süre tamamlanınca reaksiyon aşağıdaki kriterlere göre, hemen değerlendirilir.

(++) **Pozitif;** İri taneli aglütinasyon

(+) **Pozitif;** Hafif ince taneli aglütinasyon (Uluslar arası kabul görüyor)

(-) **Negatif;** Karışımında değişiklik olmaz

Testin geçerliliği için, kullanılan antijen testin her çalışılmasının başlangıcında ve antijen şişesinin ilk açılışında Pozitif ve Negatif Kontrol Serumlarla kontrol edilmelidir.

## 8. İLGİLİ DOKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- 1- OIE. (2009) Bovine brucellosis. OIE manual of Standarts for Diagnostic Tests and Vaccines, Chapter 2.4.3 Available from:[http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.03\\_BOVINE\\_BRUCCELL.pdf](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.03_BOVINE_BRUCCELL.pdf) Accessed:.
- 2- Anonim (2011) Brucella Rose Bengal Pleyt Test (RBPT) Antijeni Prospektüsü
- 3- WHO (2004) Laboratory Biosafety Manual - Third Edition, [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_11/en/).

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

# BRUCELLOSIS'İN SLOW TUBE AGGLUTINATION TEST (SAT) İLE TEŞHİSİ

## 1. AMAÇ

Şüpheli kan serumlarında *Brucella* türlerine karşı oluşan antikorların saptanmasıdır.

## 2. UYGULAMA ALANI

Brucellosis'in teşhisi amacıyla serolojik tekniklerin kullanıldığı uygulamaları kapsamaktadır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve "OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual", esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solüsyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

**SAT:**Serum Tüp Aglütinasyon

**FTS:** Fiziyojik Tuzlu Su

**Brucella:** Sığır, koyun, keçi, domuz, koç v.b hayvanlarda özellikle meme, uterus gibi genital organlara yerleşerek yavru atmalara ve infertiliteye neden olan kronik, bulaşıcı ve nekrotik yangısal infeksiyonlarla ortaya çıkan zoonoz bir hastalıktır.

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1 Materyal

Kan serumu

### 7.2. Kullanılan Ekipman

-Etüv (37°C)

-Makropipet (100µl-1000µl)

- Mikropipet (20µl -200µl)
- Spor (Tüp taşıyıcısı)
- Cam Pipetler (1 ml)
- Aglütinasyon tüpleri (5 adet)
- Tips (10-100 µl, 100-1000 µl)
- Brucella tüp aglütinasyon antijeni.

### 7.3. Kimyasal Maddeler

#### Fizyolojik tuzlu su (FTS)

- Sodyumklorid 8.5 g
- Distile su 1000.0 ml

121°C de 20 dakika otoklav edilmiş olmalıdır.

### 7.4. Numunenin Hazırlanması ve Analiz / Test / Muayenenin Yapılması

Bir tüp taşıyıcısına en az 10 adetlik bir dizi tüp sıralanır. Bunlardan birincisine 0.9, diğerlerine 0.5 ml fizyolojik tuzlu su dağıtılır. Birinci tüpe şüpheli serumdan 0.100 ml konur. Yeni bir pipet ile birkaç kez emilip bırakılarak karıştırıldıktan sonra bu tüpten 0.5 ml ikinci tüpe aktarılır. Aynı pipet kullanılarak bu kez aynı şekilde ikinci tüpten üçüncüye ve bu şekilde sondan bir önceki tüpe kadar tüpten tüpe 0.5'er ml aktarılır. Bu tüpten 0.5 ml dışarı atılır. Son tüpe serum konmaz (antijen kontrol tüpü). Bu şekilde serumun çift sulandırmaları (1:10, 1:20, 1:40,...) elde edilir. Antijen süspansiyonu iyice karıştırıldıktan sonra tüm tüplere (son tüp dahil) 0.5 er ml antijen dağıtılır. Bu işlemle tüplerdeki serum sulandırmaları birer kat artmıştır. Tüpler çalkanarak karıştırılır ve 37°C de 18-24 saat bekletilir. Sonuçların okunmasından önce antijen kontrol tüpünün aglütinasyon vermemiş olduğuna bakılır. Sonra diğer tüplere bakılarak üstteki sıvının berraklığı ve dantele şeklinde çöküntü derecesine göre 4+, 3+, 2+, 1+ ve – olarak değerlendirilir ve titreleri ile birlikte kaydedilir. Düğme şeklinde çöküntü negatif olarak değerlendirilir. Aglütinasyon sonuçları okunurken tüpler çalkalanmaz.

### Sonuçların değerlendirilmesi

Bu şekilde okunan sonuçlar serumun sulandırılma derecesine göre her tüp için yazılır. Örneğin 1: 80 4+, 1:160 2+... gibi. Serumun aglütinasyon titresi en az 2+ sonuç veren serumun sulandırmasıdır.

## 8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

- 1- Bilgehan H. (1995) Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 2. Baskı. Barış Yayınları, İstanbul
- 2- Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. [http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A\\_00140.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00140.htm)
- 3- WHO (2004) Laboratory Biosafety Manual - Third Edition, [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_2004\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/).

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

# ANTHRAX'IN TEŞHİSİ

## 1. AMAÇ

Anthrax şüpheli materyallerden *Bacillus anthracis*'in izolasyon ve identifikasyonudur.

## 2. UYGULAMA ALANI

Şüpheli materyallerden *Bacillus anthracis*'in izolasyon ve identifikasyonu için yapılan bakteriyolojik teşhis uygulamalarını kapsamaktadır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeniyle enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışırken dikkatli olunur ve OIE Manual ve WHO Laboratory Biosafety Manual esas alınarak kurallara uyulması sağlanır.

## 5. KISALTMALAR/TANIMLAR

**Anthrax:** *Bacillus anthracis* tarafından oluşturulan perakut ya da akut seyirli septisemik, vücut ısısının yükselmesi, dalağın şişmesi, kanın katran gibi koyu renk alması, pıhtılaşmaması, doğal deliklerden kan gelmesi, derialtı ve subseröz dokularda serohemorajik infiltrasyonların oluşması ile karakterize enfeksiyöz bir hastalıktır.

***Bacillus anthracis*** : Gram pozitif bir basil olup, hastalık oluşturan infektif formu spor formudur. Vücuda alındıktan sonra spor formu vejetatif forma dönüşür ve hastalık tablosunu ortaya çıkarır. Bu nedenle anthrax'tan ölen insan ve hayvanların nekropsi'sini yapmak yasaktır. Zira bu işlem etkenlerin sporlanmasına neden olur ve anthrax sporları 30-60 yıl arası canlılığını koruyabilir. Fakat kadavra açılmadığı ve etkenler vejetatif formda kaldığı zaman birkaç gün için de etkenler ölür.

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

Gönderilen numunelerden hazırlanan frotilerin Giemsa ve Metilen Mavisi boyamalarında bakteriyoskopik muayene yapılarak morfolojisi tanımlanır. Gerekirse daha spesifik test ve uygulamalar yapılarak teşhis edilir (R koloni formu, central spor formu, deneme inokülasyonu, inci dizisi reaksiyonu, vs.)



## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1. Materyal

Froti, kan, dalak, kemik.

### 7.2. Kullanılan ekipman

Stereo mikroskop

Diseksiyon seti

Etüv

Benmari

### 7.3. Kullanılan Kimyasallar

Giemsa, Metilen blue, etil alkol, Gram boyama seti, etkili dezenfektanlar, penisilin.

### 7.4. Kullanılan Besi Yerleri

Nutrient Agar, Nutrient Broth, Kanlı Agar

#### Nutrient Agar

Meat extract	3.0 g
Peptone	5.0 g
Agar	12.0 – 18.0 g
Distile su	1000 ml konur ve pH: 7.0'ye ayarlanır.

121°C de 20 dakika otoklav edilir.

#### Nutrient Broth

Meat extract	3.0 g
Peptone	5.0 g
Distile su	1000 ml konur ve pH: 7.0'ye ayarlanır.

Yukarıdaki formülü içeren besi yerinden 13 gramı 1 litre distile su için de eritir. Tüplere 5 ml taksim edilir. 121°C' de 15 dakika otoklavda tutulur. Bir gece inkübasyonda sterilite kontrolüne bırakıldıktan sonra kullanılır.

#### Kanlı Agar

Nutrient agardan 28 gram 1 litre distile suda eritilir. 121°C' de 15 dakika otoklava konur. 56 °C' de % 7 – 10 oranında aynı sıcaklıkta defibrine koyun kanı eklenir. Köpürtmeden iyice karıştırılır. Steril petrilere dökülür. Bir gece inkübasyona bırakılıp kontrol edildikten sonra kullanılır.

## 7.5. Numunenin Hazırlanması ve Analiz/Test/Muayenenin Yapılması

Anthrakstan şüpheli, ölü hayvana kesinlikle otopsi yapılmaz. Bu durumda *V.jugularis*'e yapılan bir ensizyon sonucunda alınan kandan yapılan froti ya da pamuğa emdirilmiş kan laboratuvara uygun koşullarda gönderilir.

### 7.5.1 Bakteriyoskopi:

Şüpheli materyalden (kan, pamuğa emdirilmiş kan, dalak vb) lam da hazırlanan ince frotiler Giemsa ya da Metilen mavisi ile boyanarak mikroskopta incelenir. Direkt dokudan hazırlanan frotilerin Giemsa ya da Metilen Mavisi ile boyamasının ardından, bakteriyoskopik muayenesi yapıldığında, *Bacillus anthracis*; koyu mavi renkte düzgün, keskin kenarlı ve etrafında pembe renkli kapsülü ile görünür. Kapsülün görünmesi teşhis için önemli bir kriterdir.

### 7.5.2. İzolasyon:

*Bacillus anthracis* birçok nutrient agar türünde kolayca üreyebilmektedir. Ancak genellikle % 5-7 oranında koyun kanı içeren agar tercih edilir. İzolasyon için tercih edilen ilk materyal otopsi yapılamadığı için kan olmalıdır. Ancak diğer nedenlerden dolayı yapılan otopside elde edilen organ örnekleri de izolasyon amaçlı kullanılabilir. Şüpheli materyal inoküle edilen agar plakları 37° C'de bir gece inkube edilir. *B. anthracis* kolonileri agar yüzeyinde 0.3-0.5 cm çapında, non hemolitik olarak görünür. Koloniler rough karakterde olup buzlu cam görünümündedir. Koloni kenarları grintili çıkıntılıdır. Nutrient broth'da ise tüpün dibinde atılmış pamuk ya da bulut tarzında bir üreme gösterir. Sıvı besi yerini bulandırmaz. Kolonilerden hazırlanan ve gram yöntemi ile boyanan preparatlarda *B. anthracis* uzun zincirler (saç benzeri yoğunlukta) halinde görülür. Spor formu vardır ancak kapsül yoktur.

### Kapsül formu:

İdentifikasyon için önemli kriter olan kapsül formu için kültürden defibrine koyun kanına inokülasyon yapılır ve 3-5 saat inkube edilir. Bu kan kültüründen yapılan ve Giemsa veya Metilen Mavisi yöntemi ile boyanan frotilerde etken kapsüllü ve sporlu olarak görünür.

### Beklemiş numuneler:

Laboratuvara gönderilen uzun süreli bekletilmiş, kokuşmuş materyallerde ve toprak gibi çevresel materyallerde saprofitik kontaminantlar çok sayıda ürer ve *Bacillus anthracis* basillerinin üremesini engeller. Dolayısıyla Kanlı agar, Nutrient agar gibi selektif olmayan besiyerlerinde *Bacillus anthracis* izole edilemez. Saprofitik kontaminantların yoğun ürediği materyaller incelenirken; örnek, önce deney tüpünde steril distile su veya deionize su içine alınıp iyice emülsifiye edilir ve 62±0.5 C°de 30-60 dakika kadar benmaride saprofitik

kontaminantların eliminasyonu için ısı şoku uygulanır. Isı şoku uygulanan materyallerin  $10^{-2}$  ve  $10^{-3}$ e kadar dilusyonları yapıp, her dilusyondan Kanlı agar ve Nutrient agara 10- 100 µl kadar inokule edilir. Agar pleytler 37°C'de bir gece inkube edilip, *Bacillus anthracis* için tipik koloni formasyonu; gri-beyazdan 0.3-0.5 mm çapında, hemolitik olmayan buzlu cam görünümü yapışkan, R-koloni formu; açısından değerlendirilir. Nutrient broth'da ise tüpün dibinde atılmış pamuk ya da bulut tarzında bir üreme gösterir. Sıvı besi yerini bulandırmaz. Nutrient agara yapılan ekimlerden Antraks basilleri –R tipi koloni formu (kenarları düzgün olmayan, buzlu cam görünümlü, gri renkte) oluşturur. Kolonilerden yapılan gram boyamada, gram pozitif kenarları düzgün ve keskin, sınırları belirli olan filamantöz basillerin görülmesi *Bacillus anthracis* tanısına götürür.

### 7.5.3. Hayvan inokulasyonu:

Hayvan inokulasyonu ise hayvan refahı göz önüne alınarak, diğer tanı metotları ile başarı elde edilemediği durumlarda son çare olarak başvurulan bir yöntemdir. Deneme hayvan inokulasyonunda fare ve kobaylar kullanılır. Deneme hayvanların ortam ısıları 20–24°C, nem %50–60, vantilasyon 15, ortalama ağırlık 20-25 g olmalıdır. Marazi maddeden (marazi madde mutlaka  $62 \pm 0.5$  C °de 15 dakika benmaride ısı şokuna tabi edildikten sonra inokulasyon için kullanılır) veya şüpheli kolonilerden yapılan emülsiyonlardan fare veya kobaylara deri altı yolla verilir. İnokulasyon hacmi, 0.05-0.1 ml'dir. Şayet emülsiyon için de *Bacillus anthracis* mevcut ise inokulasyondan 48-72 saat sonra farelerde ölümler başlar. Farelere nekropsi yapılır ve deri altında ödem, septisemi tablosu, dalakta büyüme ve kanın renginde koyulaşma olduğu görülür. Dalaktan frotiler yapılarak Giemsa ve Metilen mavisi ile yapılan boyamalarda kapsüllü *Bacillus anthracis* tespit edilir.

### 7.5.4. İnci dizisi reaksiyonu:

İnci dizisi reaksiyonu için 0,5-0,05 Ünite/ml penisilin bulunacak şekilde fizyolojik tuzlu su ile iki dilusyon hazırlanır. Bu dilusyonlardan ayrı ayrı 0,7'şer ml, daha önce eritilip soğutulmuş 6,3 ml'lik nutrient agara katılarak petrilere dökülür . Böylece birinci petrideki besi yerinde ml'sinde 0,5 UI , ikinci petrideki agarın ml'sinde 0,05 UI penisilin bulunmaktadır. Ayrıca kontrol olarak kullanılmak üzere bir petri ye yalnız 7 ml nutrient agar hazırlanarak donması beklenir.

Her petrideki agarlar bir bistüri ile takriben 1,5x1,5 cm. büyüklüğünde kesilerek bistüri ucu ile kaldırılır ve bir lam üzerine sırasıyla konur. Muayenesini yapacağımız süşun 24 saatlik buyyon kültüründen birer ans dolusu alınarak lam üzerindeki agarlara sırasıyla ekilir. Lamlar steril boş bir petri kutusuna konulmuş diğer bir lam üzerine dik gelecek şekilde yerleştirilir. Petri kutusundaki rutubeti sağlamak için lamların kenarlarındaki boş sahaya birkaç damla steril distile su damlatılır. Petri kutusunun kapağı kapatılarak 37°C'lik etüve konur. 3-4 saat

sonra etüvden çıkarılarak her bir agar parçası üzerine lamel kapatılır ve mikroskopta sedir yağsız olarak 400 büyütme ile muayene edilir. Anthraks basilinin penisilinli agardaki yeni üremeleri inci dizisi şeklinde (gerdanlık gibi) yuvarlak şekiller gösterir.

## 8. İLGİLİ DOKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

1. Bisping, W., Amtsberg., G. (1988): Gram-positive spore-forming organisms. Colour Atlas For The Diagnosis Of Bacterial Pathogens İn Animals. 72 – 76.
- 2.. OIE (2012). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals Chapter. 2.1.1. Anthrax, pg 1-10.
3. Holt G.J., Krieg,R.,N.,Staley, T.,J., Williams, T.,S. Endospore-Forming Gram-Positive Rods and Cocci. Beergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9:(559 – 560).
- 4.WHO (2004) Laboratory Biosafety Manual - Third Edition, [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_2004\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/).

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

# COXIELLA BURNETTI' NİN ELISA İLE TEŞHİSİ

## 1. AMAÇ

Bu test *Coxiella burnetti*' ye karşı oluşan antikorları tespit amacıyla kullanılır.

## 2. UYGULAMA ALANI

Koyun ve sığırlarda Q-Fever'un serolojik teşhisini kapsar.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeniyle enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışırken dikkatli olunur ve OIE Manual ve WHO Laboratory Biosafety Manual esas alınarak kurallara uyulması sağlanır.

1. Kiti ve tüm reagentları 2-8°C'de muhafaza ediniz.
2. Tüm reagentlar kullanılmadan önce 18- 25°C'lik oda sıcaklığına getirilmelidir.
3. Tüm açıklamalar dikkatlice okunup izlenmelidir.
4. Kullanılmamış pleyt gözleri kapatılarak kapalı bir plastik torba için de 2-8°C' de saklanmalıdır.
5. Farklı serilerdeki (farklı zamanlarda üretilen) kitlerin malzemeleri ve kılavuz kitapçıkları karıştırılmamalıdır.
6. Reagentlarla çalışırken dikkatli olunmalıdır. Son kullanma tarihi geçmiş kit kullanılmamalıdır.
7. Her örnek için ayrı pipet ucu kullanılmalıdır.
8. Her pleyt'de hem negatif hem de pozitif kontrol kullanılmalıdır.
9. Substrat solüsyonunun göz, solunum sistemi ve deri üzerinde tahriş edici etkisi vardır. Deri ve gözlerle temasından kaçınılmalıdır.

## 5. KISALTMALAR/TANIMLAR

**Q-Fever :** Hayvanlarda yavru atma ve mastitis gibi semptomlarla seyreden zoonoz bir hastalıktır. Hastalığın bulaşmasında, enfekte hayvanların uterus akıntıları, fötal sıvıları, idrar, dışkı, süt ve her türlü bulaşık ürünlerinin yanı sıra keneler de önemli bir vektör görevi yapmaktadır.

***Coxiella burnetti*:** Q-Fever hastalığının etkeni olup, hava yolu ile bulaşması, çevre koşullarına direnç göstermesi ve abort yapmış, dişi koyun veya keçilerin plasentalarında çok miktarda etkenin kolaylıkla üremesi, gibi özelliklerinden dolayı, kategori B biyolojik silah olarak sınıflandırılmıştır.

**ELISA:** Enzyme Linked Immunosorbent Assay

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

Antijen kaplı pleytlere test edilecek serum ilavesi ve *Coxiella burnetti*' proteinlerine karşı antikorların varlığı durumunda daha sonra ilave edilecek spesifik enzim bağlı konjugatından bu antikorlara bağlanarak yıkama sonucu atılmadan pleytte kalması ve test sonunda ilave edilen substratı parçalayarak renk oluşturması prensibine dayalıdır

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1. Materyal

Kan serumu

### 7.2. Kullanılan Ekipman

- 100,200' µl' lik tek ve çok kanallı pipetler
- ELİSA cihazı
- Yıkama şişesi
- 37°C'lik etüv
- 1,5 ml'lik ependorf tüp
- Buzdolabı (+4 °C)
- Deepfreeze (-20)

### 7.3. Kullanılan Kimyasallar

- Test pleyti
- Konsantre Yıkama solüsyonu(×10): 1/10 oranında distile suyla dilüe edilir.
- Anti-Ruminant-IgG, monoclonal,PO-Konjugat
- Pozitif Kontrol
- Negatif Kontrol

-TMB-Substrate Solüsyon

-Stop Solüsyon TMB

#### 7.4. Numunenin Hazırlanması ve Analiz/Test/Muayene'nin Yapılması

Çalışılacak numunelerin oda sıcaklığına gelmesi beklenir.

Test Kiti Prosedürü

-Çalışılacak serum, plazma ve kontrol serumları 1,5 ml'lik ependorf tüplerde dilüe edilmiş yıkama solüsyonuyla, 1/400 oranında sulandırılır.(1200 µl Yıkama solüsyonu,3 µl örnek ve kontrol serumlarından)

-Süt örneği çalışılacaksa 1/5 oranında sulandırılır.

-Sulandırılmış her bir serumdan 100'er µl alınarak mikropleytin gözlerine konur.

-Mikropleytin üstü kapatılarak 37°C'de 60 dakika süre ile inkübe edilir.

-3 defa Yıkama Solüsyonuyla yıkanır.

-Her göze 100 µl Anti-Ruminant-IgG, monoclonal,PO-Konjugat konarak 37°C'de 60 dakika süre ile inkübe edilir.

-3 defa Yıkama Solüsyonuyla yıkanır.

-100 µl Substrate Solüsyonu konarak 15 dk oda ısısında beklenir.

-100 µl Stop Solüsyonu eklenir.450 nm de ELISA okuyucusunda okutulur.

#### 7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi

Testin Geçerlilik Kriterleri;

-Pozitif Kontrolün OD değeri 2 yi geçmemeli.

-Negatif Kontrolün OD değeri 0.5 i geçmemeli.

-Pozitifle, negatif kontrolün farkı >\_ 0.3

-%Değeri= [ (Örneğin OD-Negatif Kontrolün OD)/(Pozitif OD-negatif OD )]×100

-Yüzde Değeri %30 un altında ise Negatif

-Yüzde Değeri %30ile %40 arasında ise şüpheli

-Yüzde Değeri %40ve üzeri ise pozitif kabul edilir.



## 8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

1. CHEKIT Q-FEVER Test Kiti Prosedürü.
2. WHO (2004) Laboratory Biosafety Manual - Third Edition, 2004. [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_11/en/).

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni



# SİĞİR TÜBERKÜLOZU (BOVINE TUBERCULOSIS)'NUN TEŞHİSİ

## 1. AMAÇ

Şüpheli organ ve dokulardan *Mycobacterium* spp izolasyonu ile teşhis amaçlanır.

## 2. UYGULAMA ALANI

Bu test metodu akciğer, karaciğer, dalak gibi iç organlar ile retrofaryngeal, bronchial, mediastinal, supramammary, mandibular ve bazı mesenterial ve karaciğer lenf yumrularının lezyonlu kısımlarından *Mycobacterium* spp'nin izolasyonu için uygulanır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeniyle enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışırken dikkatli olunur ve OIE Manual ve WHO Laboratory Biosafety Manual esas alınarak kurallara uyulması sağlanır. Materyalin taze olması ve soğuk zincir koşullarında gönderilmesi gerekir.

## 5. KISALTMALAR/TANIMLAR

**L.J.** :Lowenstein-Jensen

**TSS** : Trisodyum Sitrat

**U.V.** :Ultraviyole

**AF** : Aside dirençli (asit fast).

**HCl** : Hidroklorik Asit

**NaOH** : Sodyum hidroksit

**Z.N.** : Ziehl-Neelsen

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

Doku materyalleri ve klinik örneklerinden yayma preparat hazırlanarak tüberküloz basillerinin (asit fast ) direkt olarak saptanması ve etken izolasyonu esasına dayanır.

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1 Materyal

Akciğer, karaciğer, dalak v.s. iç organlar, retrofaryngeal, bronchial, mediastinal, supramammary, mandibular ve bazı mesenterik ve karaciğer lenf yumruları.

### 7.2. Kullanılan ekipman

- Lam
- Steril bıçak, pens, spatül,öze v.b. malzemeler
- Sterilizatör (160±5°C)
- Bunzen beki
- U.V.
- Otomatik pipet ve steril pipet ucu
- Boyama sehpa
- Şale
- Pamuk
- Kurutma sehpa
- Su banyosu (80-100°C)
- Standart laboratuvar cam malzemesi
- Havan
- Filtre kağıdı
- Mikroskop
- pHmetre
- Homojenizatör
- Laminar Flow
- Falcon tüp (50 µl'lik)
- Vorteks
- Santrifüj
- Pipetör
- 5-10'luk steril pipetler
- Eldiven- Maske
- İnkubatör (37°C'lik)

### 7.3. Kullanılan Kimyasallar

- Bazik Füksin
- Fenol Kristalize
- %95'lik Etil alkol
- HCl
- Metilen Mavisi
- Kristalize Asit Fenik
- Distile su
- NaOH
- TSS
- Sodyum monohidrojen fosfat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)
- Potasyum dihidrojenfosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
- Distile su
- N-asetil-L-sistein

### 7.4. Kullanılan Besiyerleri:

### 7.5. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

#### 7.5.1. Bakteriyoskopi :

- Doku materyali veya diğer klinik örneklerden lamlara ince bir tabaka şeklinde yayma yapılır. Sert dokular gerekirse iki lam arasında ezilerek froti hazırlanır.
- Preparat uygun bir yerde kurumaya bırakılır. Olanak varsa kurutma işlemi U.V. ışığı olan kapalı bir kabinde yapılmalıdır.
- Kurumuş preparatlar kuvvetlice bir alevden çok hızlı ve çok yavaş olmayacak bir şekilde 2-3 kez geçirilerek tespit edilir.
- Tespit edilen preparat soğuduktan sonra boyanır.

#### Ziehl-Neelsen Boyama Yöntemi

- Fikse edilen lamlar boya sehpa üzerine dizilir.
- Lamların üzeri süzgeç kağıdı huniden süzülerek füksinle kaplanır.
- Bir tel ucuna sarılmış, alkole batırılıp yakılmış pamukla lamlar alttan ısıtılır. Bu ısıtma sırasında boya kristallerinin çökmesine neden olan kaynatmamaya dikkat edilmelidir.
- Boya soğumaya, çıkan buhar kaybolmaya başlayınca işlem tekrarlanır. Isıtma bu şekilde 3 kez yapılır.

-Tekrar boyama sehпасına konulan lamaların üzeri metilen mavisi ile kaplanır. 20-30 sn. beklenir. Bu süre sonunda boya dökülür.

-Tekrar distile su ile yıkanır. Kurutma sehпасına dizilip kurumaya terk edilir.

İmmersion mikroskopta *mavi zemin üzerinde kırmızı ince, uzun basiller* aranır.

### 7.5.2. İzolasyon:

Doku ve organ örneklerine, NaOH-NaLC Yöntemi ile dekontaminasyon işlem uygulandıktan sonra Lowenstein-Jensen besiyerine ekim yapılır.

- Gelen marazi maddeler steril bisturi veya makas ve pens yardımı ile parçalanır.
- Steril distile su steril kumla havanda ezilir. Homojenizatör varsa steril su ile homojenizatörde parçalanır. Üstteki sıvı 50 µl'lik falcon tüplere alınır.
- Üzeri tülbentli behere süzöldükten sonra 50 µl'lik falcon tüplere alınır.
- Üzerine aynı miktarda sodyum hidroksit sodyum sitrat (NaOH-TSS) N-asetil-L-sistein çözeltisi eklenir.
- Tüpün kapağı kapatıldıktan sonra iyice çalkalanarak oda ısısında 15 dakika tutulur.
- Bu süre 15 dakikayı aşmamalıdır. Bekleme süresi dolan numuneye tüpün ağzına 1-2 cm kalacak şekilde fosfat tampon eklenir.
- Tüpün ağzı sıkıca kapatılır. Birkaç kez tüp baş aşağı çevrilerek karışması sağlanır.
- Yoğunlaştırma amacıyla numune 3600xg'de 15 dakika santrifüj edilir.
- Üstteki sıvı kısım dikkatlice kirli kabına dökülür ve geri kalan çökelti 1-2 ml hacime ulaşacak şekilde fosfat tamponu ile süspansiyon haline getirilir. ( Kirli kabında toplanan sıvıya 1/10 oranında çamaşır suyunda öldürülür.)

Hazırlanan numuneden bir damla preparat hazırlamada kullanılır. Geri kalan kısımdan 22'şer adet gliserinli - gliserinsiz L.J. besiyerine inokulasyon yapılır.

Kültürler en az 8 hafta 37 °C de tutulur. İnkubasyon sırasında kurumaya engel olmak için tüp kapakları sıkıca kapatılmalıdır.

Kültürlerin 4. Ve 7. Gününde ilk kontrolleri yapılır. Daha sonra haftalık kontroller yapılır. Üreme görüldüğünde buradan yayma preparat hazırlanarak Z.N.'le boyama yapılır.

### 7.5.3. İdentifikasyon:

#### Biyokimyasal testler

Niasin üretimi, Nitrat redüktaz aktivitesi, katalaz aktivitesi, Peroksidaz aktivitesi ve TCH 2 duyarlılığı mikobakterilerin ayırımında kullanılan başlıca testlerdir. Bu testler ile *M. tuberculosis* ile *M. bovis* 'in ayırımı yapılır. Bu testlerin sonuçları aşısındaki tabloda belirtildiği gibi değerlendirilir.

	Niasin	Nitrat	Katalaz	Peroksidaz	TCH2
<i>M. tuberculosis</i>	+	+	+ - (68 °C'de)	+	-
<i>M. bovis</i>	-	-	+ - (68 °C'de)	+	+

## 8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

1. OIE (2009) Manual of Standarts for Diagnostic Tests and Vaccines,.
2. T.C. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı” Tüberküloz Laboratuvar Rehberi.
3. WHO (2004) Laboratory Biosafety Manual - Third Edition, 2004. [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_11/en/).

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

# PARATÜBERKÜLOZ (PARATUBERCULOSİS)'UN ELISA İLE TEŞHİSİ

## 1. AMAÇ

Test, Paratüberküloz hastalığına karşı oluşan antikorların tespitidir.

## 2. UYGULAMA ALANI

Paratüberküloz hastalığının teşhisi amacıyla ELISA tekniğinin kullanıldığı uygulamaları kapsamaktadır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solüsyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

1. Kiti ve tüm reagentları 2-8°C’de muhafaza ediniz.
2. Tüm reagentlar kullanılmadan önce 18- 25°C’lik oda sıcaklığına getirilmelidir.
3. Tüm açıklamalar dikkatlice okunup izlenmelidir.
4. Kullanılmamış pleyt gözleri kapatılarak kapalı bir plastik torba için de 2-8°C’ de saklanmalıdır.
5. Farklı serilerdeki (farklı zamanlarda üretilen) kitlerin malzemeleri ve kılavuz kitapçıkları karıştırılmamalıdır.
6. Reagentlarla çalışırken dikkatli olunmalıdır. Son kullanma tarihi geçmiş kit kullanılmamalıdır.
7. Her örnek için ayrı pipet ucu kullanılmalıdır.
8. Her pleyt’de hem negatif hem de pozitif kontrol kullanılmalıdır.
9. Substrat solüsyonunun göz, solunum sistemi ve deri üzerinde tahriş edici etkisi vardır. Deri ve gözlerle temasından kaçınılmalıdır.

10. Stop solüsyonu kuvvetli bir asit olup, yanıklara sebep olabilen H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içerir. Dikkatli çalışılmalıdır.
11. Ağızla pipetleme yapılmamalıdır.
12. Bu kit sadece in vitro teşhis amacıyla kullanılır.
13. Kit prosedürü takip edilmelidir.

## 5. KISALTMALAR/TANIMLAR

M.pt	: <i>Mycobacterium paratuberculosis</i>
M.phlei	: <i>Mycobacterium phlei</i>
OD	: Optik dansite
ELISA	: Enzim Linked Immunosorbent Assay
S	: Serum örneği

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

Ticari ELISA test kiti, büyük ve küçük ruminant orijinli plazma ve serum örneklerinde M.pt. spesifik antikorlarının tespiti amacıyla dizayn edilmiştir. Örnekler indirekt ELISA testinden önce spesifik olmayan antikorları bağlamak amacıyla *M.phlei* ekstraktı ile inkube edilir.

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1. Materyal

Sığır, koyun ve keçi kan serum/plazma örnekleri.

### 7.2. Kullanılan ekipman

- ELISA mikropleyt okuyucu
- Santrifüj
- Santrifüj tüpleri
- Çalkalamalı pleyt inkubatörü
- Tek kanallı ve çok kanallı mikropipetler
- Tek kullanımlık steril pipet uçları
- U-tabanlı kaplanmamış mikropleytler
- Ultra-saf su (Yıkama sol. için)
- Yapışkan pleyt bandı

### 7.3 Kullanılan Kimyasallar/ Reagent/ Solüsyonlar

- M.pt antijeni kaplı mikropleyt (96 gözlü)
- Konsantre Yıkama Solüsyonu (x20)
- Dilution buffer No: 12 yeşil (örnekler için)
- Dilution buffer No:1 mavi (konjugat için)
- M.pt Pozitif/ Negatif Kontrol Serumları
- Konjugat (Conjugate anti-IgG ruminant peroxidase )
- Substrat solüsyonu No:5 kullanıma hazır (TMB)
- Stop solüsyonu ( $H_2SO_4$  0,5M solüsyon)
- Antijen kaplı pleytler, substrat solüsyonu ve stop solüsyonu kullanıma hazırdır.
- Örnekler ve kontrol serumların *M.phlei* ile adsorbsiyonu yapılır. (1/20 oranında)
- Yıkama Solüsyonu : Konsantre yıkama solüsyonu ultra-saf su ile 1/20 oranında sulandırılarak kullanılır. İyice karıştırılır (100 ml yıkama solüsyonu + 1900 ml ultra-saf su).

### 7.4. Serum Örneklerinin Hazırlanması:

Serumlar teste alınmadan önce çalkalamalı pleyt inkubatöründe 1-2 dakika çalkalanır.

Ön inkubasyon için U tabanlı kaplanmamış mikropleyt kullanılır.

1.Tüm gözlere 190 µl Dilution buffer No:12 konur.

2. Pozitif serum, negatif serum ve test edilecek serum örneklerinden 10 µl eklenir.

Oda ısısında (18-26 °C) 15 dakika çalkalanır.

Not: İnkubasyon süresi 2 saate kadar uzatılabilir.

### 7.5. Testin Yapılması:

Adsorbsiyon işleminden sonra negatif kontrol serum antijen kaplı pleytin A1 gözüne, pozitif kontrol serum B1 ve C1 gözlerine, test edilecek serum örnekleri sırasıyla D1'den başlayarak (D1 , E1, F1..... H12 ) gözlere 100µl eklenir. Homojenize olması için hafifçe çalkalanır.

Yapışkan pleyt bandı ile kapatılarak 18-26 °C de 45 dakika veya +5 °C ( $\pm 3$  °C) de 1 gece bekletilir.

- Gözlerdeki sıvı çekildikten sonra her göze yıkama solüsyonu doldurulur, boşaltılır. Bu işlem 3 kez yapılır.
- Tüm gözlere dilution buffer No:1 ile 1/100 oranında sulandırılan konjugat 100 µl ilave edilir



- 30 dakika ( $\pm 3$  dakika) 18-26 °C de yapışkan pleyt bandı ile kapatılarak inkube edilir.
- Gözlerdeki sıvı çekildikten sonra her göze 300 µl yıkama solüsyonu doldurulur, boşaltılır. Bu işlem 3 kere yapılır.
- Tüm gözlere 100 µl Substrat solüsyonu No:5 ilave edilir.
- 18-26 °C de karanlık bir ortamda 10 dakika inkube edilir.
- Tüm gözlere 100 µl stop solüsyonu ilave edilerek reaksiyon durdurulur.
- ELISA okuyucusunun güvenli çalışıp çalışmadığını kontrol amacıyla self test yapılır.
- Serum örnekleri ve kontroller ELISA okuyucuda 450 nm 'de okunur.

### 7.6. Sonuçların değerlendirilmesi

Testin geçerliliği için Pozitif kontrol OD<sub>450</sub> de minimum 0.350 ve Pozitif kontrolün OD<sub>450</sub> değerinin negatif kontrolün OD<sub>450</sub> değerine oranı 3'e eşit veya daha büyük olmalıdır.

Her örnek için S/P oranı hesaplanır.

$$S/P=100x \frac{(OD_{450} \text{ örneğin değeri}-OD_{450} \text{ negatif kontrol})}{(OD_{450} \text{ pozitif kontrol ortalaması}-OD_{450} \text{ negatif kontrol})}$$

Sığır, koyun, keçi serumda:

- Örnek serumun S/P değeri %45'den düşük veya eşit ise negatif
- Örnek serumun S/P değeri %45 ile %55 arasında ise şüpheli
- Örnek serumun S/P değeri %55 ' den büyük veya eşit ise pozitif olarak değerlendirilir.

## 8 . İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

1. Ptb. ELISA Kit kullanım kılavuzu.
2. OIE (2008) Manual of Standarts for Diagnostic Tests and Vaccines,.
- 3.WHO (2004) Laboratory Biosafety Manual, 3<sup>rd</sup> edition. 2004. [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO__11/en/).

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

# SALMONELLA İZOLASYONU, SEROTİPLENDİRİLMESİ ve ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİĞİNİN TESPİTİ

## 1. AMAÇ

Şüpheli materyallerde, Salmonella türü mikroorganizmaların bakteriyolojik kültür yöntemi ile izolasyonu, identifikasyonu ve *Salmonella* spp. düzeyindeki kültürlerin serotiplendirilmesi, antibiyotik dirençliliklerinin tespiti.

## 2. UYGULAMA ALANI

Bu test metodu *Salmonella* spp.'nin izolasyon, identifikasyon, serotiplendirilme ve antibiyotik dirençliliklerinin tespiti amacıyla kullanılan uygulamaları kapsamaktadır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeniyle enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışırken dikkatli olunur ve OIE Manual ve WHO Laboratory Biosafety Manual esas alınarak kurallara uyulması sağlanır. Materyalin taze olması ve soğuk zincir koşullarında gönderilmesi gerekir.

## 5. KISALTMALAR/TANIMLAR

**Salmonella spp.:** Gram (-), kısa, küçük çomak şeklinde sporsuz, kapsülsüz bakterilerdir. *Salmonella* genusuna (cinsine) bağlı olan patojen bakteriler Salmonellosis denilen bir tür akut bağırsak enfeksiyonu oluşturmakla birlikte zoonotik özelliğindedir.

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

*Salmonella* şüpheli gıda, yem, dışkı numuneleri ve çevresel swap örneklerinden ISO 6579' a göre *Salmonella* izolasyonunun ve biyokimyasal identifikasyonunun yapılması, müspet olanların lam aglütinasyon testi ile serotiplendirildikten sonra antibiyotik dirençliliğinin disk diffüzyon test yöntemiyle tespiti.

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1. Materyal

Gıda, yem, dışkı numunesi, çevresel swap ve *Salmonella* spp. düzeyinde kültür.

### 7.2. Kullanılan Kimyasallar

Etil Alkol (%70'lik), Tamponlanmış Peptonlu su, Fizyolojik Tuzlu Su

### Pozitif ve Negatif Kontrol Suşları

Pozitif Kontrol suşu olarak; *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028

Negatif Kontrol suşu olarak; *Escherichia coli* ATCC 25922

### 7.3. Kullanılan Besiyerleri, Antiserumlar

Buffered Peptone Water, Rappaport – Vassiliadis Soya Broth, Mueller Kauffmann Tetrathionate Broth Base, Modifiye Semi-Solid Rappaport Vassiliadis Medium, XLD Agar, Müller Hinton Agar II ve *Salmonella* Antiserumları

### TAMPONLANMIŞ PEPTONLU SU

Pepton	10.0 g
NaCl	5.0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5 g
Distile Su	1000 ml
	Ph: 7.0

225 ml miktarlarda erlenlere konarak 121°C de 15 dakika sterilize edilir.

### RAPPAPORT – VASSİLİADİS SOY PEPTONE (RVS) BROTH (Ref.2) BASE

Soy peptone	5.0 g
Sodium chlorid	8.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.4 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2 g
Distile su	1000 ml

70 – 80°C ye kadar ısıtılır. Taze hazırlanmalıdır.

### MAĞNESİUM CHLORİDE SOLÜSYONU

Mağnesium chloride ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ )	400 g
Distile su	1000 ml

### MALACHİTE GREEN SOLÜSYONU

Malachite green oxalate	0.4 g
Distile su	100 ml

### BİLEŞİM BESİYERİ

Base	1000 ml
Mağnesium chloride solüsyonu	1000 ml
Malachite green solüsyonu	1000 ml

Tüplere 10 ml miktarında dağıtılıp 115°C de 15 dakika otoklav edilir.

### BRİLLANT GREEN SOLÜSYONU

Brillant green	0.1 g
Steril distile su	100 ml

### BASE (E.G. TETRATHİONATE ANREİCHERİNGS BUYYON NACH MUELLER KAUFMAN FROM MERCK.)

Meat extract	0.9 g
Peptone from meat	4.5 g
Yeast extract	1.8 g
Sodium chloride	4.5 g
Calcium carbonate	25.0 g
Sodium thiosulfate	40.7 g
Ox bile, dried	4.75 g
Steril su	1000 ml
Brillant green solüsyonu 1:100	10 ml
İodine – Potassium iodine solüsyonu	20 ml
PH: 7.4 – 7.8	Tüplere 10 ml taksim edilir.

### XLD AGAR

Yeast extract	3.0 g
Sodium choride	5.0 g
Xylose	3.75 g
Lactose	7.5 g
Sucrose	7.5 g
L – lysine hydrogen chloride	5.0 g
Sodium thiosulphate	6.8 g
Iron (III) ammonium citrate	0.8 g
Phenol red	0.08 g
Sodium desoxycholate	1.0 g
Agar	15.0 g

Distile su 1000 ml PH: 7.4 ± 0.2 otoklav edilmez.

### İODİNE – POTASSİUM İODİNE SOLÜSYONU

İodine double sublimiert	16.0 g
Potassium iodid z.A	20.0 g
Steril distile su	80.0 ml

### NUTRIENT AGAR

Meat extract	3.0 g
Peptone	5.0 g
Agar	12.0 – 18.0 g
Distile su	1000 ml
	pH: 7.0

121°C de 20 dakika otoklav edilir. *Salmonella* şüpheli kolonilerden saf kültür yapmak için kullanılır.

### LDC Kontrol MEDIUM

D (+) – glukose – Monohydrate	0.5 g
Lab – Lemco powder	3.0 g
Peptone “Orthana”	5.0 g
Cresol red % 0.2	2.5 ml
Bromocresol purple % 1.6 (% 96 ethanolda)	0.63 ml
Distile su	1000 ml
	pH : 6.0

Tüplere 2 ml miktarında taksim edilip 121°C de 10 dakika otoklav edilir.

## L – LYSİNE DECARBOXYLATION MEDIUM

L – lysine dhydrochloride	10.0 g
D (+) – glukose – monohydrate	0.5 g
Lab – lemco powder	3.0 g
Peptone “Orthana”	5.0 g
Cresol red % 0.2	2.5 ml
Bromocresol purple % 1.6 (% 96 ethanol)da	0.63 ml
Distile su	1000 ml
	pH: 6.0

Tüplere 2 ml miktarında taksim edilip 121°C de 10 dakika otoklav edilir.

Her iki tüpe bir öze dolusu saf kültürden ekim yapılır. Steril parafin ile hava teması kesilir. Bakteri lysini kullanmışsa kontrol tüpü sarı renkli kalır. Test tüpünde menekşe renk oluşur. Her iki tüp sarı veya menekşe renk verirse test geçersizdir.

## DULCİTOL BROTH

### BİLEŞİMİ

Enzymatic digest of casein (Pepton) 10 g.

Et ekstraktı 3 g.

Sodyum klorür 5.6 g.

Andrade indikatörü 10 ml

Dulcitol çözeltisi 50 µl

Distile Su 1000 ml

### HAZIRLANIŞI

Bileşenler su için de eritilir. Gerekirse sterilizasyondan sonra pH ayarlanır (pH 7.1-7.2 olacak şekilde)15 ml nominal kapasiteye sahip tüplere besiyerlerini 5 er ml hacimlerinde aktarınız. 121°C’de 15 dakika süreyle sterilize ediniz. 6 haftaya kadar 5°C ± 3°C te ışık almayan yerde muhafaza ediniz.

## DULCİTOL SOLÜSYONU

### BİLEŞİMİ

Dulsitol 10 g

Distile su 100 ml

### Hazırlanışı

Dulsitolü distile su içerisinde çözdürünüz.

0,22 µm gözenek boyutuna sahip bir membran filtreden süzülerek sterilize ediliniz.

2 aya kadar 5° C ± 3° C de muhafaza ediniz.

### TRİPLE SUGAR / İRON AGAR

Meat extract	3.0 g
Yeast extract	3.0 g
Peptone	20.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Lactose	10.0 g
Sucrose	10.0 g
Glucose	1.0 g
İron (III) citrate	0.3 g
Sodium thiosulfate	0.3 g
Phenol red	0.024 g
Agar	12.0 – 18.0 g
Distile su	1000 ml
	pH: 7.4

Tüplere 10 ml miktarında taksim edilir. 121°C de 10 dakika otoklav edilir. Yatık vaziyette dondurulur. Dip kısım 2.5 cm olmalıdır. Yatık agar halinde kullanılır. Yüzeğe sürme ekim yapıp öze tüpün dibine doğru batırılır. 18 – 24 saat 37°C derecede inkübasyondan sonra lactose, glucose, sucrose, H<sub>2</sub>S ve gaz testleri değerlendirilir.

### ÜREA AGAR BASE

Peptone	1.0 g
Glucose	1.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Potassium dhydrogen phosphate	2.0 g
Phenol red	0.012 g
Agar	12.0 – 18.0 g
Distile su	1000. Ml
	pH 6.8

121°C de 20 dakika otoklav edilir.

## ÜRE SOLÜSYONU

Ürea	40.0 g
Distile su	100 ml

Üre suda eritilip fitrasyon ile sterilize edilir.

## BİRLEŞİM BESİ YERİ

Base	950 µl
Üre solüsyonu	50 µl

Otoklav edildikten sonra 45°C ye soğutulan vasata üre solüsyonu eklenir. Homojen karışım sağlandıktan sonra steril tüplere takım edilir. Tüpler yatık agar olarak katılaştıktan sonra şüpheli koloniden yatık yüzeye ekim yapılır. Bakteride bulunan ürease enzimi üreyi amonyak ve CO<sub>2</sub> 'e hidrolize eder. Bileşimindeki indikatörden dolayı rengi kırmızılaşır.

## VP MEDİUM

Peptone	7.0 g
Glucose	5.0 g
Dipotassium hydrogen phosphate	5.0 g
Distile su	1000 ml
	PH: 6.9

Tüplere 5 ml miktarında taksim edilip 115°C de 20 dakika otoklav edilir. Besiyeri şüpheli suşun ekiminden sonra 37°C de 18–24 saat inkübe edilir. Üremeden sonra alfa – naftol solüsyonundan 6, % 40'lık KOH solüsyonundan 4 damla eklenir. Glukozdan aseton oluşumu nedeni ile kırmızı renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilir.

## ONPG TESTİ

Bir öze dolusu kültür 0.5 ml distile su ile süspansiyonu yapılır. Bir tablet ONPG eklenir. 37°C de inkübe edilir. 18–24 saat sonra sonuçlar okunur. Pozitif durumda sarı renk oluşmaktadır.

## İNDOL BESİYERİ

Tyripton	10.0 g
NaCl	5.0 g
DL – tryptophan	1.0 g
Distile su	1000. Ml
	pH :7.5



Tüplere 5 ml miktarında takism edilir. 121°C de 10 dakika otoklav edilir. Bileşiminde tripton veya triptofan vardır. *Salmonella*'lar triptofanı parçalayarak indol oluştururlar. Vasata ekim yapıp 37°C de 18–24 saat inkübasyondan sonra kovaks ayırıcı damlatılır. Kırmızı renk meydana gelişi pozitif olarak değerlendirilir.

Reaktifler

Kovaks ayırıcı ( İndol testi için),

% 40 lik KOH solüsyonu (VP için),

% 5 lik alfa naftol solüsyonu ( 95 derecelik alkolde)(VP için).

NAPHTHOL, ETHANOLİK SOLÜSYONU

Alfa – naphthol	5.0 g
Ethanol % 96	100 ml

#### 7.4 Numunenin Hazırlanması ve Analiz/Test/Muayene'nin Yapılması

##### 7.4.1. Gıda ve Yem Numuneleri için izlenen yöntem:

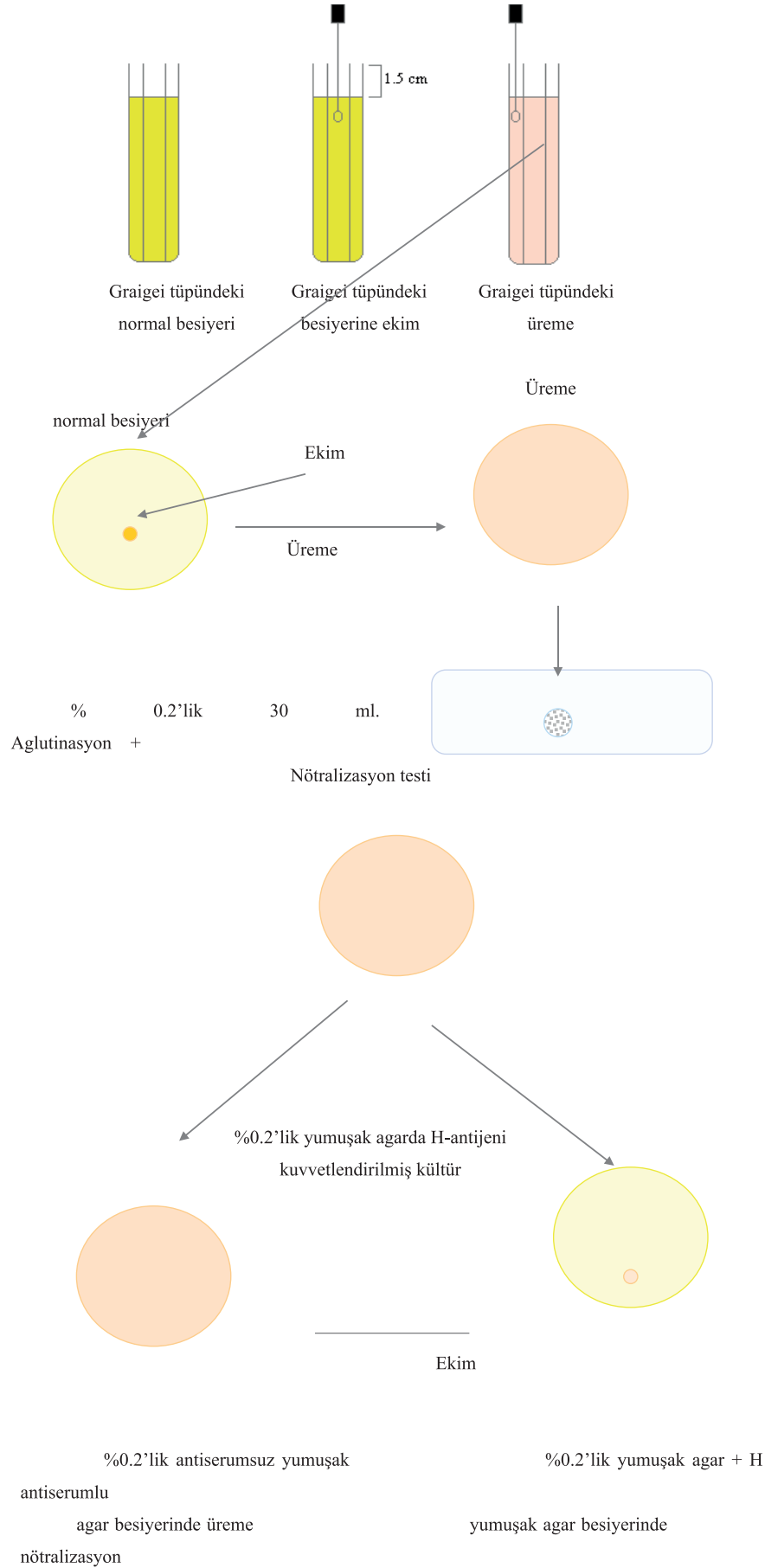
25 g numune random yöntemiyle aseptik koşullarda alınarak için de steril %10'luk Tamponlanmış Peptonlu Su ile homojenize edilir. 37°C±1°C etüvde 18±2 saat inkübe edilerek ön zenginleştirme sağlanır. Ön zenginleştirme sonunda ikinci gün kültürden için de 10 ml Rappaport –Vassiliadis Soy Buyyonu (RVS) bulunan tüpe 0.1ml inokule edilerek 41.5°C±1°C ve için de 10 ml Tetrathionate Buyyon (Müller-Kauffman) bulunan tüpe 1 ml aktarılarak 37 °C±1°C'de 24±3 saat zenginleştirme için inkübe edilir. İnkübasyon sonunda üçüncü gün bir öze dolusu kültür alınarak izolasyon için XLD agara azaltma yöntemiyle ekilir. 24±3 saat 37°C±1°C'de inkübasyondan sonra *Salmonella* şüpheli kolonilerden (XLD'de siyah merkezli kırmızı koloniler) dördüncü gün Nutrient broth'da saf kültürü yapılır. Kültürün biyokimyasal konfirmasyonu yapılır. Beşinci gün biyokimyasal konfirmasyonun sonunda, laktoz (-), glukoz (+), sukroz (-), gaz (+), H<sub>2</sub>S (+), üre (-), indol (-), VP (-), Lisin dekarboksilaz (+), b-galaktosidaz (-) kültürler *Salmonella* spp. olarak kabul edilir.

##### 7.4.2.Dışkı ve çevresel swap örneklerinde izlenen yöntem

25 g numune veya swap random yöntemiyle aseptik koşullarda alınarak için de steril % 10'luk tamponlanmış Peptonlu Su ile homojenize edilir. 37°C±1°C etüvde 18±2 saat inkübe edilerek ön zenginleştirme sağlanır. Ön zenginleştirme sonunda ikinci gün kültürden 3 damla MSRV Mediuma birbirinden eşit uzaklıkta olacak şekilde inokule edilir. MSRV Medium 41.5°C±1°C'de 24±3 saat zenginleştirme için inkübe edilir. İnkübasyon sonrası *Salmonella* pozitif kültürler yarı katı besiyerinde, besiyerinin renginde maviden beyaza değişen renk değişimi meydana getirip, zon çapları oluşturur. Oluşan bu zonların en uç noktasından,

üçüncü gün bir öze dolusu kültür alınarak izolasyon için XLD agara azaltma yöntemiyle ekilir. 24±3 saat 37°C±1°C'de inkübasyondan sonra *Salmonella* şüpheli kolonilerden (XLD'de siyah merkezli kırmızı koloniler) dördüncü gün Nutrient broth'da saf kültürü yapılır. Kültürün biyokimyasal konfirmasyonu yapılır. Beşinci gün biyokimyasal konfirmasyonun sonunda, laktoz (-), glukoz (+), sukroz (-), gaz (+), H<sub>2</sub>S (+), üre (-), indol (-), VP (-), Lisin dekarboksilaz (+), b-galaktosidaz (-) kültürler *Salmonella* spp. olarak kabul edilir.

Biyokimyasal test sonucunda *Salmonella* olduğu tespit edilen suşlar 1/5 oranında sulandırılmış *Salmonella* polivalan O antiserumlarıyla ayrı ayrı olarak lam aglütinasyona tabi tutulur. Hangi *Salmonella* polivalan O serum ile aglütinasyon vermiş ise o polivalan serumun içerdiği grup serumları ile ayrı ayrı lamda aglütinasyon yapılır. Böylece bakteri hangi grup serumu ile aglütinasyon verirse serolojik grubu tayin edilmiş olur. Serolojik grubu tayin edilen suşun tipini tayin etmek için flagellar antijenin kuvvetlendirilmesi gerekir. Bu amaçla suş önce tekniğine uygun olarak Graigei tüpündeki % 0.2'lik agar besi yerine ekilir. 37° C'de 18-24 saat inkübe edilir. Bu inkübasyon periyodu sonunda craigei tüpündeki üremeyi gördükten sonra taze olarak hazırlanmış %0.2'lik agar besi yeri 30 ml miktarında petri kutusuna dökülür. Craigei tüpündeki kültürün dış yüzeyinden pastör pipetiyle bir damla kültür alınır ve petrideki besi yerinin tam ortasına kenarlara bulaştırmadan ekilir. Kültür plak yüzeyine yayılmadan 37°C'lik etüvde 18-24 saat üremeye bırakılır. İnkübasyon süresi sonunda üreyip petriyi kaplayan kültürün petrinin kenarındaki kısmından pastör pipetiyle bir damla alınıp 1/100 oranında serum fizyolojik (0.14 M) ile sulandırılmış H antiserumu ile lamda aglütinasyona tabi tutulur. Böylece hangi H antiserumu (monofazik) veya antiserumlarıyla (difazik) aglütinasyon vermiş ise suşun tipi tayin edilmiş olur. Tip tayininin doğrulanması nötralizasyon testi ile yapılır. Nötralizasyon testi için suş hangi H antiserumu ile aglütinasyon vermiş ise o antiserum kesif olarak 8.3 ml miktarında %0.2'lik 5 ml agar besi yerine katılıp ufak petriye (5 ml'lik) dökülür. Kontrol için aynı besiyeri aynı miktarda antiserumsuz olarak ikinci bir petriye dökülür. % 0.2'lik agardaki 18 saatlik flagelleri kuvvetlendirilmiş kültürün kenar kısmından alınarak bu petrilerdeki besi yerlerinin tam merkezine pastör pipetiyle bir damla ekilir. 18-24 saat 37°C'de inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda bilinen H antiserumu içeren yumuşak agardaki üremenin olmadığı, H antiserum içermeyen yumuşak agarda ise üremenin olmasıyla nötralizasyon testi gerçekleştirilmiş olur. Nötralizasyon testi sonucunda daha önce yaptığımız tip tayini doğrulanmış olur.



Kullanılan besiyerleri, standart-referans suşlar üretim ve test protokollerine göre test edilerek kontrolleri yapılır. Yapılan çalışmalar dökümante edilerek dosyaları (Ek-2).DİSK DİFFÜZYON METODU (CLSI/Kirby-Bauer) İLE ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİĞİNİN SAPTANMASI

MÜLLER HİNTON AGAR II	STERİL FİZYOLOJİK TUZLU SU
Gram/litre	Gram/litre
Beef infüzyon.....2.0	NaCl.....8.5
Acid hydrolysed casein...17.5	Distile su.....1
Starch.....1.5	pH:7.3±0.1
Agar No:1.....17.0	
Calcium ions 5-100 mg/litre	
Magnezyum ions 20-35 mg/litre	
pH: 7.3±0.1	

Besi yeri hazırlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklav edilir. Daha sonra 9 mm'lik steril petrilere kalınlığı yaklaşık 4mm+/-0.5 olacak şekilde dökülür. 37°C'de bir gece sterilite kontrolünde tutulur.

Hazırlanan fizyolojik tuzlu su 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilir.

Pozitif kontrol amacıyla *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 kullanılır.

**1.GÜN:** İnokulumun Standardizasyonu: 3-4 adet koloni alınarak steril fizyolojik tuzlu su (% 0.9'luk, 4 ml) içine aktarılır. İyi emülsifiye edilir. Yoğunluk 0.5 Mc Farland'a ayarlanır.

Agara inokulasyon: İnokulum 15 dakika içerisinde swap yardımıyla Müller Hinton II Agara sürülür. Agar yüzeyine 60°'lik eğimle birkaç dairesel hareketle inokulum yayılır. Steril forseps yardımıyla antibiyotik diskleri 5 dakika içerisinde yerleştirilir (15 dakikayı geçmemelidir). Forsepsi agar yüzeyine değdirmemeye dikkat edilmelidir. Agar 37°C' de bir gece inkübasyona bırakılır.

#### 7.5. Sonuçların Okunması ve Değerlendirilmesi:

**2. GÜN:** Üremenin saflığı kontrol edilir. Zon ve çapları kontrol edilir (Oval olmamalıdır). Zon çapları bir cetvel yardımıyla ölçülür ve CLSI'ye göre duyarlı, intermedier ve dirençli olarak değerlendirilir.

## 8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

1. TSE EN ISO 6579(2005) Annex 1: Ocak 2010 Gıda ve Hayvan Yemleri-Salmonella türlerinin belirlenmesi için yatay yöntem.
2. TSE EN ISO 6579 (2007) Annex D: 2007 Dışkı ve Çevresel swap örneklerinden Salmonella türlerinin belirlenmesi.
3. CLSI (2011). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing ; Twenty first Informational Supplement Informational Supplement; Vol. 31 No. 1 Replaces M100-S20 and M100-S20-U Vol. 30 No. 1 and Vol. 30 No. 15.
4. Patrick A.D. Grimont and François-Xavier Weilll.(2007) Antigenic Formulae of Salmonella serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Institute Pasteur, 9th revision .
5. WHO (2004) Laboratory Biosafety Manual - Third Edition, 2004. [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO__11/en/).

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

# MASTITİS TEŞHİSİ İÇİN SOMATİK HÜCRE SAYIMI

## 1. AMAÇ

Sığır, koyun ve keçilerde mastitisin teşhisi ve üretilen sütün kalitesini amacıyla çiğ sütlerde uygulanan bakteri sayım yöntemidir.

## 2. UYGULAMA ALANI

Süt örneklerinde mastitisin teşhisi amacıyla hücre sayım tekniğinin kullanıldığı uygulamaları kapsamaktadır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeniyle enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışırken dikkatli olunur ve OIE Manual ve WHO Laboratory Biosafety Manual esas alınarak kurallara uyulması sağlanır. Materyalin taze olması ve soğuk zincir koşullarında gönderilmesi gerekir.

## 5. KISALTMA VE TANIMLAR

**Subklinik mastitis:** Yangısal belirtinin gözlenmediği, sütün normal görünüşte olduğu ancak patojen mikroorganizmaları içerdiği mastitis.

**Klinik mastitis:** Meme loblarında ağrı, şişkinlik, sıcaklık ve sertlik gibi yangısal belirtilerle birlikte genel semptomların görüldüğü mastitis.

**California Mastitis Test (CMT):** Mastitisli memelerdeki süte sızan lökositlerin için de bulunan DNA'nın serbest kalması esasına dayanan bir testtir.

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

Somatik Hücre Sayımı yapılacak olan sütün, mikroskop altında incelenmesi prensibine dayanır.

Somatik hücreler temel olarak süt hayvanlarının çekirdeğe sahip olan alyuvarları (lökositleri) ve epitelyum hücreleri olup, memede başta mastitis olmak üzere bir enfeksiyon olduğunda süt bezelerinde ve dolayısıyla sütte sayıları artar.

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1. Materyal

Süt

(Sütün laboratuvara getirilmesi sırasında, içerisindeki bakterilerin çoğalmasını önlemek için, süt soğutulmalı veya süt içine uygun bir antibakteriyel madde ilave edilmelidir.

### 7.2. Kullanılan Ekipman

- Mikrobiyoloji Laboratuvarında olması gereken alet-ekipman
- Metilen mavisi
- 1,1,1-trichloroethane
- Milimetrik kağıt

### 7.3. Kullanılan Kit/Reagent/Sarf malzemesi:

- Metilen mavisi 0.6 g
- % 96'lık etil alkol 54 ml
- 1,1,1- trichloroethane 40 µl
- Glasial asetik asit 6 ml

Ağzı kapaklı şişe için de bulunan etil alkol ile 1,1,1- trichloroethane karıştırılır, su banyosunda 65°C'a ısıtılıp metilen mavisi eklendikten sonra iyice karıştırılır ve buzdolabı sıcaklığına soğutulup, bu sıcaklıkta 12-24 saat bekletilir. Daha sonra asetik asit eklenir, Whatman ya da eşdeğeri bir filtre kağıdından süzülür ve ağzı kapaklı bir şişede saklanır. Boya çözeltisinde partiküler ve/veya çökelti görülürse tekrar filtre edilerek kullanılır.

### Şablon Lamının Hazırlanması:

Milimetrik kağıttan 5x20mm olacak şekilde şerit kesilir, milimetrik kısım şablon olarak kullanılacak bir lama alttan yapıştırılır. Somatik hücre sayımında her örnekten iki sayım yapılması esas olduğundan lam üzerine iki şerit yapıştırılması gerekir.

### 7.4. Analiz/Test/Muayenenin Yapılması

#### Boyama:

Süt örneği en çok 6 saat için de analiz edilmelidir. Sütün depolanması zorunlu ise asla dondurulmadan, mutlaka buzdolabı sıcaklığında saklanmalıdır.

Lamlar etil alkol ile temizlenip, tozsuz kağıt ile kurutulup, tozsuz bir yerde saklanır. Mikropipet ile 10µl süt örneği alınır, 5x20mm'lik şablon alanına yayılır. Süt 37°C'da film tabakası oluşuncaya kadar kurumaya bırakılır. Kuruduktan sonra lam boya küvetindeki boya

çözeltisine 10 dakika süre ile batırılır. Lam yıkanmadan film tabakası üste gelecek şekilde petri kutusuna yerleştirilir. Ve kendi haline kurumaya bırakılır. Kuruduktan sonra yeteri büyüklükteki beherde bulunan musluk suyuna daldırılıp fazla boyanın çıkması sağlanır. Temiz su ile işlem tekrarlanır ve lam yine kendi halinde kurumaya bırakılır.

### **Sayım:**

Somatik hücre sayımı mikroskop görüş sahasında yapılabileceği gibi eni mikroskop çapı, boyu dar kenar olan 5mm. alanında bir şeritte sayım yapılabilir. Sayım şeritte yapıldığında 3-4 farklı şerit kullanılması yeterlidir. Buna karşın sayım için mikroskop görüş sahası kullanılıyor ise uzun hat boyunca ortadaki 1/3'lük bölgede en az 20 saha sayımı yapılmalıdır. Gerek şerit gerekse görüş sahası sayımlarında sayılacak her alanın rasgele seçilmesi önemlidir. Buna göre şerit sayımında 20mm uzun kenar boyunca birbirlerinden yeterli uzaklıkta 3-4 şerit sayılması yeterlidir. Mikroskop görüş alanı kullanılarak sayım yapıldığında uzun kenarın bir ucundan başlayarak 1-1.5 görüş sahası kaydırma ile diğer uca doğru hareket edilmesi ile amaca ulaşılabilir. Bu yöntemde görüş sahasına yine 1-1.5 çap boyunca aşağı yukarı hareketi ve aynı zamanda diğer uca doğru 1-1.5 çap kaydırma ile zikzak şeklinde bir şaryo hareketi ile sayım yapılması da mümkündür.

### **7.5. Sonuç:**

1 ml'deki somatik hücre sayısı:  $A \times \text{ÇF}$  formülü ile bulunur. Burada A: farklı alanlarda yapılan somatik hücre sayım ortalaması, ÇF (çalışma faktörü) ise objektif mikrometre kullanılarak hesaplanan mikroskop faktörü ile 10 µl'deki sayıyı 1ml'ye çevirmek için kullanılan sabit sayıdır.

Objektif ve/veya oküler ve/veya bazı mikroskoplarda bulunan tüp boyu uzunluğu değiştirilmedikçe çalışma faktörü her sayımda bir sabit sayı olarak kullanılır. Bu üç unsurdan biri değiştirilirse mikroskop faktörü ve dolayısıyla çalışma faktörü baştan hesaplanmalıdır.

Prensip olarak aynı lamda yapılan aynı süte ait 2 örnek ayrı ayrı sayılır ve bu iki sayım ortalaması sütteki somatik hücre sayısı olarak kaydedilir.

### **Şerit Sayımı:**

Şerit üzerinde sayım yapılacağı zaman ÇF:  $(20\text{mm} \times 100) / (\text{milimetre olarak mikroskop görüş sahası çapı})$  formülü ile hesaplanır. Şeritlerde yapılan sayımın ortalaması ÇF ile çarpılarak sonuç elde edilir.

**Örnek 1:** Standart objektif mikrometre kullanılarak görüş sahası çapı 42.2 aralık olarak ölçüldü ve 4 adet şeritte toplam 370 somatik hücre sayıldı ise; 42.2 aralık bu çapın  $422\mu\text{m} = 0,422\text{mm}$  olduğunu gösterir.  $20\text{mm} / 0,422\text{mm} = 47.4$  adet sayım yapılacak



5mm boyunda saha (şerit) olduğunu gösterir. Dolayısıyla “A” olarak hesaplanan  $370/4=92.5$  ortalama sayım sonucu 47.4 ile çarpılarak sayım yapılan toplam 5x20mm toplam alanda diğer bir deyişle 0,01ml için de kaç adet hücre olduğu hesaplanır. Buna göre 0.01ml örnekte  $92.5 \times 47.4 = 4384,5$  adet somatik hücre vardır. Bu değer 1ml’ye çevrilebilmesi için tekrar 100 ile çarpılması gerekir. Ve 1ml sütteki somatik hücre sayısı 438450 olarak hesaplanır.

Yukarıdaki örnekte  $\text{ÇF} = (20 \times 100) / 0,422 = 4740$  olarak hesaplanır ve bu değer sabit ÇF olarak kaydedilir.

### **Görüş Sahası Sayımı:**

Standart Breed yönteminde olduğu gibi mikroskop ve çalışma faktörü hesaplanır.

**Örnek 2:** Örnek 2: Yukarıdaki örneğe uyularak görüş sahası çapı 0.422mm olarak ölçüldü ve 22 mikroskop görüş sahasında toplam 141 ve ortalama olarak  $141/22=6.4$  somatik hücre sayıldı ise önce  $5 \times 20 \text{mm} = 100 \text{mm}^2$  sayım alanı için de kaç adet mikroskop görüş sahası olduğu hesaplanmalıdır. Bu değer yukarıdaki örneğe göre  $(100 \text{mm}^2 / \text{mm}^2 \text{ olarak görüş sahası alanı}) = 100 \text{mm}^2 / ((0.422 \text{mm} / 2)^2 \times \pi) = 100 \text{mm}^2 / 014 \text{mm}^2 = 714.97$  olarak bulunur ve ortalama olarak elde edilen 6.4 somatik hücre sayısı bu değer ile çarpılarak 0.01ml sütteki somatik hücre sayısı 4575,78 olarak hesaplanır Bu sonucu 1ml’ye çevirmek için 100 ile çarpılır ve 1ml’deki sütteki sayım sonucu 457578 olarak hesaplanır. Bu yöntemde çalışma faktörü özet olarak  $(100 \text{mm}^2 \times 100) / (\text{mm}^2 \text{ olarak mikroskop görüş sahası alanı})$  şeklindedir.

Yukarıdaki örneğe uygun olarak ÇF 71497 olarak hesaplanır ve ÇF olarak kaydedilir.

Not: Somatik hücre sayımında ele alınan temel kriter  $10^4/\text{ml}$ ’dir. Bu değer altındaki sayım sonuçları normal olarak kabul edilirken, üzerindeki değerler mastitis göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Avrupa Topluluğu için geçerli olan limit değer süt cinsine göre inek sütü için 400000/ml, manda sütü için 500000/ml olarak belirlenmiş olup topluluk bu değeri giderek aşağı çekmektedir.

## **7.6. Sonuçların Değerlendirilmesi**

7.4’ te anlatılmıştır.



## 8. KAYNAKLAR/İLGİLİ DOKÜMANLAR/EKLER

1. Anonymous (1991) Enumeration of Somatic Cells. 91/180 EEC. Official J of the European Communities. No L 93 pp. 33-38.
2. Anonymous (1997) International Standard. ISO 13366-1, Milk Enumeration of Somatic Cells-Part 1 Microscopic Method 6p.

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

# MASTITİSE NEDEN OLAN MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYON VE İDENTİFİKASYON YÖNTEMLERİ

## 1. AMAÇ

Süt örneklerinde mastitise neden olan bakterilerin izolasyon ve identifikasyonudur.

## 2. UYGULAMA ALANI

Süt örneklerinden mastitis etkenlerinin izolasyon ve identifikasyonu için gerçekleştirilen bakteriyolojik uygulamaları kapsamaktadır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeniyle enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışırken dikkatli olunur ve OIE Manual ve WHO Laboratory Biosafety Manual esas alınarak kurallara uyulması sağlanır. Materyalin taze olması ve soğuk zincir koşullarında gönderilmesi gerekir.

## 5. TANIMLAR/KISALTMALAR

**Mastitis:** Meme dokusunun yangısıdır.

**Subklinik mastitis:** Yangısel belirtinin gözlenmediği, sütün normal görünüşte olduğu ancak patojen mikroorganizmaları içerdiği mastitis.

**Klinik Mastitis:** Meme loblarında ağrı, şişkinlik, sıcaklık ve sertlik gibi yangısel belirtilerle birlikte genel semptomların görüldüğü mastitis.

**CMT (California Mastitis Test):** Mastitisli memelerdeki süte sızan lökositlerin için de bulunan DNA (Deoksiribonukleik asit)'nin serbest kalması esasına dayanan bir testtir.

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

Mastitis şüpheli süt örneklerinden, bakteriyel etkenlerin kültürel metot ile izolasyon ve identifikasyonu.

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1. Materyal

Mastitise neden olan bakterileri içeren şüpheli süt örneği.

### 7.2 Kullanılan Ekipman

- Işık mikroskobu
- Etüv
- Pastör pipeti
- Otoklav
- Biyogüvenlik kabini (class II)

### 7.3. Kullanılan Kimyasallar

#### California Mastitis Test (CMT) solüsyonu :

Sodium lauryl sulphate	20 g
Sodium hydroxyde (%10)	15 g
Brom cresol purple	0.1 g
Distile su	1000 ml

#### Metilen Mavisi (Stok Solüsyonu):

Metilen Mavisi	1,5 g
Alkol	100 ml

Metilen Mavisi bir havana konur, Üzerine konan azar miktarlardaki alkolde eritilir. Bir şişeye alınan boya solüsyonu, 4-5 saat çalkalanır ve 24 saat bekletildikten sonra filtre kağıdından süzülür ve şişelerde saklanır.

- Kullanma Solüsyonu (Löffler)

Metilen Mavisi (stok) solüsyon	30 ml
Distile su (%0,01 KOH'li)	100 ml

Önce distile su içine %0,01 oranında KOH konur ve karıştırılır, sonra da 30 ml stok metilen mavisi solüsyonu katılır ve karıştırılır. Bir gün bekletildikten sonra filtre kağıdından süzülerek cam kapaklı şişelerde muhafaza edilir.

### **Jansiyana Moru (Stok Solüsyon)**

Jansiyana moru 5 g  
Alkol (%95) 100 ml

Jansiyana moru bir havana konur, Üzerine konan azar miktarlardaki alkolde erimesi sağlanır. Bundan sonra . bir şişeye alınan boya solüsyonu, 4-5 saat çalkalanır ve 24 saat bekletildikten sonra filtre kağıdından süzülür ve şişelerde saklanır.

- Kullanma Solüsyonu (karbollü)

Jansiyana moru (stok) solüsyon 10 ml  
Distile su (% 1 asit fenikli'li) 100 ml

Önce fenol suda eritilir ve sonra boya ilave edilir. Bir gün bekletildikten sonra filtre kağıdından süzülerek cam kapaklı şişelerde muhafaza edilir.

### **Fuksin Boyası (Stok Solüsyon)**

Bazik fuksin 3 g  
Alkol (%95) 100 ml

Bazik fuksin bir havada alkolde ezip eritildikten sonra. bir şişeye alınan boya solüsyonu, 4-5 saat çalkalanır ve 24 saat bekletildikten sonra filtre kağıdından süzülür ve şişelerde saklanır.

### **Sulu Fuchsin Solüsyonu**

Bazik fuksin (Stok) 10 ml  
Distile su 100 ml

Fuksin distile su ile karıştırılır ve filtre kağıdından süzülür.

### **Lugol Solüsyonu**

Gram boyama metodunda mordan olarak kullanılır.

İyot 1 g  
KI 2 g  
Distile su 300 ml

Veya

İyot 5 g  
KI 10 g  
Distile su 1000 ml

İyot ile KI havanda iyice ezilir. Sonra distile su yavaş yavaş katılır ve iyice karıştırılır. Sonra bir şişeye aktarılır. Kahverengi şişelerde saklanır.

## Kovaks Ayracı

Kültürde oluşan indol'u ortaya koymada kullanılır.

P-dimetil amino benzaldehit	5 g
Amil alkol (veya butil Alkol)	75 ml
HCl (konsantre)	25 ml

Önce P-dimetil amino benzaldehit alkolde eritilir ve sonra hidroklorik asit yavaş yavaş katılır. Ağzı kapalı şişelerde buzdolabında muhafaza edilir.

## 7.4. Numunenin Hazırlanması ve Muayene/Analizin Yapılması

### 7.4.1. Süt örneğinin alınması

Bakteriyolojik muayeneler için alınacak süt örnekleri öncelikle sağımdan önce ve mümkün olduğu kadar aseptik koşullarda alınmalıdır. Meme içi veya sistemik antibiyotik ile tedaviden önce bir süt örneği elde etmek esastır. CMT pozitif reaksiyon veren memelerin başları %70 alkol veya bir antiseptik ile dezenfekte edildikten sonra meme başı kurulanır. Meme kanallarındaki ilk sütte somatik hücre sayısı ve bakteri sayısı yüksektir. Bu nedenle ilk sağım süt atıldıktan, sonra CMT pozitif reaksiyon vermiş olan her memeden ayrı ayrı, tercihen ağzı vida kapaklı, steril şişelere 15-20 ml süt alınır, ağzı kapatılır ve etiketlenir. Etiketeye hayvan numarası ve hangi memeden alındığı yazılır. Süt örneği bakteriyolojik muayene yapıncaya kadar 4°C'de tutulmalıdır, mümkün olan en kısa sürede soğuk zincire uygun olarak laboratuvara ulaştırılmalıdır.

- Koşullar elverişli ise, süt örnekleri dondurularak laboratuvara gönderilmelidir.

-*Mycoplasma* spp'den ileri gelen mastitisten şüphe ediliyor ise 5mg/ml miktarında ampicillin ilave edilmiş bir nakil vasatına süt örneği konur, nakil süresince uygun bir ısıda tutulur.

**California Mastitis Testi (CMT) :** Uygulamada dört gözlü küçük plastik kabın her gözüne hayvanın (sığır için) her memesinden, 2ml süt konulur, üzerine eşit miktarda CMT ayracı ilave edilir. Karışım 15-20 saniye dairesel hareketlerle karıştırılır, oluşan presipitasyon durumuna göre değerlendirme yapılır.

### 7.4.2. Muayenenin yapılması:

**7.4.3. Bakteriyoskopi:** Süt örneği santrifüj edilerek, çöküntüden bir preparat hazırlanır. *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* gibi Gram (+) patojenleri ve kristal viyole ile koyu boyanan *Candida albicans* gibi mayaların da ortaya konması için Gram boyama rutin olarak kullanılır. *Mycobacterium sp.* ve *Nocardia astroides*'den şüphe ediliyorsa Ziehl-Nielsen ile boyanır.

### Gram Boyama

- 1.Preparat hazırlanır, havada kurutulur ve alevde tespit edilir ( fiksasyon ),
- 2.Kristal Violet (veya metil violet) solüsyonu dökülür ve 2-3 dakika bekletildikten sonra, boya uzaklaştırılır
3. Üzerine Lugol solüsyonu konularak 1-2 dakika beklenir. Lugol solüsyonu dökülür
- 4.Absolut (% 96'lık) alkolle dekolere edilir (İşlem, alkol renksiz akıncaya kadar devam eder),
- 5.Preparat su ile yıkanarak alkol uzaklaştırılır.
- 6.Eosin veya sulu fuksin ile 5-10 saniye boyanır ve su ile yıkanarak boya giderilir.
- 7.Hazırlanan preparat kurutma kağıdında veya havada kurutulur.
- 8.İmmersion yağı konularak immersiyon objektif ile incelenir.

**Sonuç:** Gram (+) bakteriler koyu mor,

Gram (-) bakteriler pembe renkli boyanmış olarak görülür.

### Ziehl-Nielsen boyama yöntemi:

- a- Preparat hazırlanır, kurutulur ve tespit edilir.
- b- Lam üzerine ve tüm lamı kaplayacak şekilde karbol fuksin solüsyonu konur.
- c- Preparat alttan 4-5 dakika ve aralıklı olarak hafifçe ısıtılır. Preparatın yanmamasına ve kabarcıkların çıkmamasına dikkat edilir (preparat üzerinden hafif buharlar çıkabilir).
- d- Boya dökülür ve asit-alkolde (%95 alkol + %5 HCL asit) dekolore edilir.
- e- Su ile yıkanır.
- f- Preparat üzerine metilen mavisi solüsyonu konur ve 10-15 saniye boyanır.
- g- Boya dökülür ve su ile yıkanır.
- h- Kurutulur ve immersiyonla muayene edilir. *Mycobacterium* spp. kırmızı renkte, diğer bakteriler ise mavi renkte görülürler.

**Giemsa Boyama :** Hazırlanan ince damla kurutulmuş frotiler, absolü metil alkolde 3 dakika tespit edildikten sonra, %5'lik Giemsa boya solüsyonunda (%5 Giemsa stok boyası, pH'sı 7.2 olan distile su ile %5 oranında sulandırılır) oda ısısında 40 dakika süreyle veya %10'luk Giemsa boya solüsyonunda 20-30 dakika boyanır. Daha sonra distile su ile yıkanıp kurutulan boyalı preparatlar üzerine immersiyon yağı damlatılarak, mikroskopta immersiyon objektifle *Prototheca* spp. (Algler) yönünden muayene edilir.

**Giemsa solüsyonu:** 1 Kısım Stok Giemsa solüsyonu + 9 kısım Distile su

#### 7.4.4. Kültür :

Bakteriyolojik muayene uygulanacak sütler buzdolabından çıkarılır. Biraz bekletilerek ılıtılır. 10-12 kez alt üst edilerek iyice karıştırılır. Sonra bu sütlerden 0.01-0.05 ml birer öze dolusu ekilir. Kanlı agar ve MacConkey agara ikişer süt örneği, Edwards besiyerine dört süt örneği ekilir. Kanlı agar ve MacConkey agar 24 saat, Edwards besiyerindeki ekim 48 saat 37<sup>0</sup>'de üremeye bırakılır. Üreyen koloniler önce gözle sonra koloni mikroskobu ile kontrol edilir. Katı besiyerinde üreyen koloniler pigment özellikleri, renkleri, büyüklükleri vs. gibi morfolojik özellikleri yönünden incelendikten sonra frotiler yapılır ve Gram boyanarak kolonilerin mikroskobik görünümüleri kaydedilir. Daha sonra bu mikroorganizmaların kültürel, biyokimyasal ve bazı özel testlerdeki özellikleri incelenerek identifikasyonuna gidilir. Mastitise neden olan etkenlerin izolasyon ve identifikasyonu için çok değişik besiyerleri ve bazı özel testler kullanılır.

Belirtilen besi yerlerindeki ekimlerde üreme olmazsa, eğer sütler ekimden önce inkübasyona bırakılmamışsa 16-20 saat 37<sup>0</sup>'de tutulduktan sonra tekrar ekilirler. Sublinik mastitis vakalarından alınmış numunelerse C.M.T. derecelerinin bilinmesi yararlı olacaktır. Tüm bunlara rağmen (C.M.T. 2 ve 3) üremez ise:

1-Kültürler 2-3 gün daha inkübasyonda tutulurlar.

2-Üreme olmayan sütler 3000 rpm. de 15 dakika santrifüj edilerek sedimentten frotiler yapılır, boyanarak muayene edilir ve tekrar bu sedimentten ekim yapılır.

3-Üreme olmayan süttten *Sabouraud* agar, PPLO besiyeri ve anaerob koşullarda üretmek üzere Kanlı agara ekim yapılır.

Yine üreme olmazsa üremeyen süttün alındığı hayvandan sağımın başında, ortasında ve sonunda alınacak süt örneklerinden tekrar ekimler yapılır.

Mastitise neden olan etkenlerin izolasyon ve identifikasyonu için kullanılan bazı özel besiyerleri ve testler aşağıda belirtilmiştir.

**Kanlı Agar:** Mastitis oluşturan patojen mikroorganizmaların çoğu Kanlı agarda ürer. *Staphylococcus* spp. ve *Streptococcus* spp.'nin hemoliz durumları da bu besi yerinde incelenir. *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Micrococcus* spp., Koliform bakteriler, *Corynebacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. ve *Clostridium* spp. gibi çok sayıda mikroorganizma üretilerek morfolojik, kültürel ve biyokimyasal özellikleri incelenebilir. Bununla birlikte bu besiyerinde *Candida albicans* ve *Aspergillus fumigatus* gibi fungal patojenler 37<sup>0</sup>C'de 2-3 gün için de daha hızlı üreyen bakteriler işe karışmamış ise ya da az miktarda bulunuyorsa ürerler.



**Eskulinli Kanlı Agar:** Kanlı agara %0.05-0.1 oranında eskulin ilave edilerek hazırlanır. Bu besiyerinde eskulinin ayrışmasından başka, hemoliz yapan birçok bakterilerin hemolitik özelliklerini gözlemek de mümkündür. Sürü bazında çok sayıda süt örneğinin kültürünün yapılması gerekiyorsa sadece eskulinli kanlı agarın kullanılması yeterlidir.

**Edwards Besiyeri:** *Streptococcus spp.*'nin tipik koloniler oluşturması ve hemoliz durumları gözlenir. Bu besi yerinde *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, Koliform bakteriler ve *Proteus spp.* ürediği halde *Staphylococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Bacillus spp.* ve *Corynebacterium spp.* üreyemez.

**MacConkey Agar:** Laktozu fermente eden bakterilerin (Koliform grubu) kolonileri, gri-pembe ve kırmızı renkte görülürler.

**Buyyon:** Katı besiyerinde üretilen mikroorganizmaların biyokimyasal özelliklerini incelemek ve antibiyogram testinde kullanılır. Buyyona %5-10 oranında steril at serumu katılarak serumlu buyyon hazırlanır.

**Mastitise neden olan bakterilerin identifikasyonunda kullanılan bazı biyokimyasal testler:**

#### **Katalaz Testi:**

Katalaz bir enzimdir ve aerobik mikroorganizmalar tarafından oluşturulur.

#### **Materyal**

- 1)Taze hazırlanmış hidrojen peroksid solüsyonu (%3-%30 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- 2)Taze mikroorganizma (12-18 saatlik) sıvı veya katı kültürü
- 3)Bilinen pozitif olarak kullanılacak pozitif (*Staph. aureus*) ve negatif (*S.faecalis*) kültürleri.

#### **Metot**

1)Mikroorganizma ekildikten sonra 37°C'de 1-7 gün inkübe edilir. Katı besiyerinde (kanlı agar hariç) üremiş mikroorganizma kolonilerinden yeterli miktarda alınarak lam üzerine konulur, sonra üzerine %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 damla konur.

2)Sıvı besiyerinde (5ml) üremiş kültür üzerine %3'lük hidrojen peroksitten 3-4 damla katılır. Kabarcıkların çıkması reaksiyonun pozitif olduğunu gösterir. Özellikle *Staphylococcus spp.*ın ayırdedilmesinde kullanılır.

### **Oksidaz Testi:**

Besi yerine ekilen mikroorganizma 37°C'de 1-7 gün inkübe edildikten sonra üreyen koloniler üzerine oksidaz çubuklarının açık sarı renkli kısmına besi yerinde üretilmiş mikroorganizmalardan ekim yapılarak 5-10 saniye beklenir. Pozitif reaksiyonda koyu mor renk oluşur, bir dakikadan sonraki reaksiyonlar negatif kabul edilir.

### **Koagulaz Testi:**

*Staphylococcus spp.*'nin identifikasyonunda kullanılan bir testtir. Genellikle patojen *Staphylococcus spp.*'nin salgıladığı bir enzim olan koagulazın tavşan ve insan plazmasını, pıhtılaştırma özelliğinden yararlanır. Test tüpte ve lamda olmak üzere iki şekilde uygulanmaktadır.

Birinci yöntem tüp için de plazma ile uygulanır. Tüpte koagulaz testi için iki küçük tüpe 0.5 ml 1/10 sulandırılmış olan plazmadan konulur. Tüplerden birine 5 damla kontrol edilecek kültürden ilave edilir. Kültür olarak 18 saatlik buyyon kültürü veya tipik kolonilerin fizyolojik tuzlu sudaki (FTS) süspansiyonu olabilir. Her iki tüp 37°C'de inkübe edilir ve sık sık pıhtılaşma izlenir. Genellikle 1-5 saat için de koagulaz pozitif *Staphylococcus spp.* plazmayı pıhtılaştırmaktadır.

Lam üzerinde koagulaz testi için tipik bir koloni lam üzerinde bir damla FTS ile süspansiyon edilir. Oluşan emülsiyon üzerine bir damla sulandırılmış plazma konulur ve iyice karıştırıldıktan sonra koagulaz pozitif *Staphylococcus spp.* birkaç saniye için de kümeler oluştururlar. Her iki testte kendiliğinden kümelenen *Staphylococcus spp.*'nin ayırdedilmeleri için, plazma ilave edilmeden bu yönden kontrolleri yapılmalıdır.

### **Mannitol Fermentasyonu:**

*Staph. aureus* suşlarının birçoğu *Staph. epidermidis*'ten ayrı olarak mannitolden asit oluştururlar. Patojenik *Staphylococcus spp.*'nin izolasyonunda Mannitol Salt Agar çok kullanılan selektif bir besiyeridir. Bu ortamda *Staph.aureus* iyi bir şekilde ürer ve agar yüzeyinde koloni etrafında Mannitol'den asit oluşumunu ortaya koyan sarı renkli bir açılma meydana getirir.

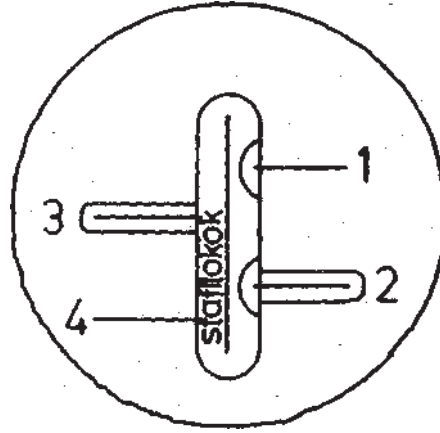
### **CAMP (Christie, Atkins ve Munc- Peterson) Testi :**

*Streptococcus agalactiae*'nin identifikasyonunda oldukça güvenilir bir yöntemdir. Besiyeri olarak kanlı ve eskülinli kanlı agar kullanılır. Petrinin tam merkezinden geçecek şekilde kalın bir çizgi halinde bir beta toksin oluşturan hemolitik bir stafilokok suşundan (*Staph. aureus*) ekim yapılır. Sonra bu inokulasyonu dik olarak ve hemen inokulasyonun kenarından başlayan fakat stafilokok'a temas etmeyecek şekilde şüpheli streptokokun ekimi yapılır.

Kontrol olarak mevcut bilinen bir streptokok suşunun ekimi yapılır. Petriler 24 saat 37°C' inkubasyonda bırakıldıktan sonra değerlendirilir. Pozitif durumlarda *Streptococcus agalactia* – stafilokok üreme hattının kesiştiği yerde beta hemolitik bir hemoliz alanı oluşur. Reaksiyonu değerlendirmek için şüpheli kültür kontrol kültürle karşılaştırılır.

### Şekil : CAMP testi

- 1 - CAMP + , gama hemolitik *Str. agalactiae*
- 2 - CAMP + , beta hemolitik *Str. agalactiae*
- 3 - CAMP — , beta hemolitik *Str. zooepidemicus*
- 4 - CAMP — , gama hemolitik *Str. dysgalactiae*



### Metil Kırmızısı Testi

Test, mikroorganizma cinslerini (*E. coli* +, *Enterobacter aerogenes* -, *E. cloacae* -) ve türleri (*L. monocytogenes* +) ayırmada kullanılır. Metil kırmızısı solüsyonu pH 6.0 da sarı renk ve pH 4.4 den aşağıda kırmızı renk gösterir.

### Materyal

- 1) Tüpte hazırlanmış Clark ve Loops besi yeri (MR/VP buyyonu)
- 2) Saf ve taze mikroorganizma kültürleri
- 3) Kontrol pozitif (*E.coli*) ve negatif (*E. cloacae*) mikroorganizma kültürleri
- 4) Metil kırmızısı pH indikatörü
- 5) Ekilmemiş besi yerleri

### Metil Kırmızısı İndikatörü

Besi yerlerinin pH'sını ölçmede işe yarayan bir indikatördür. Ortamın pH'sı 4.4'e inince, bu kırmızı renkte ve pH 6.2'de ise sarıdır.

Metil Kırmızısı	0.2 g
Alkol (%95)	50 ml
Distile su	50 ml

### Metot

Üremiş kültürlerden, besi yerlerine ekimler yapılır ve tüpler 37°C de 2-7 gün inkubasyona bırakılır. Üzerine metil kırmızısı solüsyonundan 4-5 damla damlatılır ve iyice karıştırılır, üstte kırmızı renkli bir halkanın meydana gelişi pozitif metil kırmızısı testi olarak kabul edilir. Negatif reaksiyon halinde üst tarafta sarı bir halka görülür. Testte dikkat edilecek noktalar, kültürlerin yeterince inkubasyonda kaldıktan sonra test uygulanmalıdır. Besi yerine katılan peptonların metil kırmızısı testi üzerine etkisi fazladır ve besi yerlerine katılan glikoz oranı % 0.5 den aşağı olmamalıdır ve fosfat buffer içermelidirler.

### Voges-Proskauer (VP) Testi

Bu test, bazı mikroorganizmaların glikozu fermente edilerek, nötral bir ürün olan acetylmethyl-carbinol'u (acetoin) meydana getirme yeteneğini tayinde kullanılır. Bakteri türlerini (*K.pneumoniae* (+), *E.coli* (-) belirlemede kullanılır.

Voges Proskauer testi ile metil red testi, ortamlarının aynı olması nedeniyle birlikte uygulanabilirler. Metil red pozitif olanlarda (organik asit fazla olması nedeniyle), VP reaksiyonu negatif olabilir. Nötral ürünler meydana gelmeyebilir (genel bir kural değil). İlk başlangıçta MR testi pozitif görülebilir. inkubasyon süresi uzarsa acetoin oluşabilir.

### Materyal

- 1) MRA/P besi yeri (Clark-Loops, pH 6.9,5 ml)
- 2) Mikroorganizmaların saf ve taze kültürleri
- 3) Kontrol pozitif (*E.cloacae*, *K.pneumoniae*) ve negatif (*E.coli*) suşlarının kültürleri
- 4) O'Meara ayırıcı (veya Barzıt VP ayırıcı)
- 5) Ekilmemiş besi yerleri

### Metot

Glikoz içeren bufferli besi yerine kültürlerden ekilir ve 37°C de 2-7 gün inkube edilir. Bu sürenin sonunda kültürlerle ve ekilmemiş tüplere ayıraçtan (O'Meara) 1 ml ilave edilerek hafifçe çalkalanır ve su banyosunda (37°C de) 4 saat tutulur. Aralıklı olarak hafifçe çalkalanır. Besiyerinin üstünde 2-5 dakika için de pembe rengin oluşu, acetoin varlığını ortaya koyduğundan pozitif reaksiyon olarak kabul edilir. Eğer sarı renk meydana gelirse negatif olarak dikkate alınır. Testte dikkat edilecek noktalar, bazen ayıraç ilaveden 1 saat sonra

bakır renkli gibi bir görünüm meydana gelebilir. Negatif olarak değerlendirilir. T- infüzyon buyyonu, için de acetoin ve diasetil bulunabilmesi nedeniyle tercih edilmemelidir.

### **Sitrat Testi**

Bu test, mikroorganizmaların, besi yerlerine katılan sitrati karbon kaynağı ve amonyum tuzlarını da nitrojen kaynağı olarak kullanabilme yeteneğini saptamada, bakteri cins ve türlerini identifikasyonda kullanılır.

Materyal

- 1) Tüp için de yatık Simmons citrate agar besi yeri (4-5 ml, pH 6.9 ve yeşil renkte) veya Christensen sitrat sulfid besi yeri (4-5 ml pH 6.7, açık renkte)
- 2) Test edilecek mikroorganizmaların taze ve saf kültürleri
- 3) Kontrol pozitif (*Klebsiella aerogenes*) ve negatif (*E.coli*] mikroorganizmaları
- 4) Ekilmemiş besi yerleri

### **Metot**

Muayeneleri yapılacak saf kültürler steril fizyolojik su veya buffer ile biraz sulandırıldıktan sonra besi yerlerine ekimler yapılır ve tüpler 2-7 gün 37°C inkubasyonda tutulur. Christensen besi yerine iğne ile inokulasyon yapılır ve yatık yüzeye de iğne sürülür. Testin sonucunda, hiçbir üremenin olmaması ve ortamın orijinal yeşil rengini muhafazası negatif reaksiyon ve ekim hattı boyunca üreme ile birlikte koyu mavi rengin meydana gelmesi de pozitif reaksiyon olarak değerlendirilir. Christensen sitrat sulfid besi yerinde hiç bir renk değişikliğinin görülmemesi (açık rengin muhafaza edilmesi) negatif reaksiyon ve ekim hattı boyunca üreme ile birlikte pembe-kırmızı rengin oluşumu da pozitif reaksiyonu ifade eder. Değerlendirme, kontrollere bakılarak yapılmalıdır. Besi yerlerine çok fazla ekim yapılması, yanlış pozitif reaksiyona neden olabilir. İnokulum uygun oranda sulandırılmalıdır. Besi yerine konan indiktor boyaların (brom timol mavisi ve fenol kırmızısı) ticari firmalara göre değişmek üzere, aynı miktarların da renk farklılıkları görülebilir. Ekim yapılırken pepton, glikozun veya azot'un sitratlı besi yerine taşınması, yanlış pozitif reaksiyona yol açabilir. Simmons sitrat besi yerinde üreyen bir mikroorganizma Christensen'de de üreyebilir. Ancak, Christensen besi yerinde üreyen Simmons ortamında üremeyebilir. Buna göre de pozitiflik değişebilir.

### **Deoksiribonuklease (Dnase) ve Termonuklease Testleri**

Bu test, mikroorganizmaların ısıya dayanıklı olan deoksiribonuklease (DNase) enzimini sentezleyebilme yeteneklerini ölçmede kullanılır. Enzim, hücre çekirdeklerinde bulunan deoksiribonukleik asid'i (DNA) depolimerize ederek ayrıştırır.

Ayrıca, *S. aureus*'un DNase'inin ısı karşısında termonuklease stabilitesini ölçmede de yararlanır.

DNase aktivitesi, özellikle, koagülaz negatif reaksiyon veren *S. aureus*'un patojenitesini tayinde yardımcı olur. Bu yönden, *S. aureus* (+) ve *S. epidermidis* (-) dir. Ayrıca, birbirlerine yakın pigment vermeyen genulardan *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* türlerini ayırmada da kullanılır. *Serratia* spp (+), *Klebsiella* ve *Enterobacter* spp. (-) dir.

Thermonuclease testinde, ısı karşısında, *S. aureus* tarafından sentezlenen DNase varlığı ortaya konur ve *S.epidermidis* ve diğer *Micrococcus* spp.ın oluşturduklarından farkı ortaya konur.

DNase'ler birçok mikroorganizmanın ekstraksiyonundan elde edilebilir. Ekstraselluler karakterde olanlar, *S. aureus*, grup/A *Streptococcus* spp., *C. diphtheriae*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *Bacillus* spp. ve *Vibrio* spp.ler'den izole edildiği bildirilmiştir. DNase enzimleri hem *S. aureus* ve hem de *S. epidermidis*'den elde edilmistir. Bunlardan *S. aureus*'unki ısıya dayanıklıdır (100°C 15 dakika).

## Materyal

Kültür filtratlarında bulunan ekstrasellüler DNase ölçmede aşağıdaki materyal kullanılır.

- 1) İçinde, son konsantrasyonu 2 mg/ml kadar olan DNA ile toluidin mavisi (% 1) bulunan agar plakları (Toluidin mavisi DNA agar)
- 2) Teste tabi tutulacak mikroorganizmaların (stafilokok susları) saf ve taze sıvı kültürleri
- 3) Kontrol mikroorganizmalar pozitif (*S. aureus*) ve negatif (*S. epidermidis*) suşlar.
- 4) Hidroklorik asit (1 N HCL).

## Metot

Petri kutusunda ki Toluidin mavisi DNA agar üzerine ortasına (bir noktaya) incelenecek mikroorganizma kültürlerinden çizgi tarzında ekim yapılır. Petri kutusu 37°C'de 2-3 gün inkube edildikten sonra, ekimin yapıldığı yerlerde üremenin etrafında parlak-pembe bir açıklık meydana gelir. Eğer, besi yerinde Toluidin mavisi yoksa o zaman hidroklorik asit (1 N, solüsyonu, agar üzerine yayılır. Testin değerlendirilmesi, toluidin mavisi DNA agar üzerinde üreme etrafında parlak pembe açık sahanın oluşması DNase pozitif olarak değerlendirilir. Negatif olgularda bir değişiklik görülmez. Toluidin mavisi içermeyen DNA agar üzerine hidroklorik asit (1 N) ince bir tabaka halinde yayılır. Pozitif durumlarda üreme etrafında açık bir alan meydana gelir. Buna karşın negatif kültürlerde, üreme etrafında opak bir renk vardır. Termonuklease ölçmek için ise, kültürler su banyosunda ısıtılır (kaynayan 100°C suda 15 dakika) ve soğutulur. Toluidin mavisi DNA agar üzerinde açılan 5 mm. çapındaki çukurlara ısıtılmış (kontrol) kültürlerden konulur. Petri kutuları 37°C de 2-4 saat inkube edilirler. Bu sürenin sonunda, etrafında parlak pembe renk oluşan çukurlardaki filtratlarda ısıya

dayanıklı (termostabil) DNase (termonuklease) bulunmaktadır (pozitif reaksiyon). Pembe renk göstermeyenler ise negatif olarak kabul edilir (*S. marcescens*).

	Isıtılmış	Isıtılmamış
<i>S.aureus</i>	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	+	-

Testte dikkat edilecek noktalar, kültürler taze olmalı ve yeterli bir üreme meydana gelmeli, deneme çift olarak düzenlenmeli ve hem DNase ve hem de termonuklease aktivite ölçülmelidir. DNase'lerin çoğu aktiviteleri için besiyerlerinde divalan katyonlara gereksinimleri vardır. Negatif durumlarda, gerektiğinde inkubasyon süreleri uzatılabilir.

### Urease Testi

Bu test, mikroorganizmaların üreyi hidrolize eden urease enzimini saptamak amacıyla yapılır. Urease aktivitesi için optimal pH 7.0 dir. Besi yerinde amonyak'ın meydana gelmesi pH'nın yükselmesine neden olur. Amonyakın meydana geldiği de indikator boya ve Nessler ayırıcı ile ortaya konur. Amonyakın meydana geldiği de indikator boya ve Nessler ayırıcı ile ortaya konur.

Urease testi için bazı yöntemler (Christensen, Stuart, vs.) geliştirilmiştir.

Christensen metodu aşağıdadır.

### Materyal

- 1) Christensen'in üreli agarı (tüp veya petri kutusunda) veya üreli buyyon
- 2) Mikroorganizmaların saf ve taze kültürleri

Kontrol mikroorganizmalar. *P. vulgaris* (+) ve *E. coli* (-)

### Nessler Ayırıcı

Amonyak aranmasında kullanılan bir eriyiktir.

Nessler tuzu 68 g

NaOH 85 g

Distile su 800 cc

Önce Nessler tuzu 100 cc. distile su da ayrı olarak eritilir. 800 cc distile suda eritilen 85 g NaOH, birinci solüsyonla karıştırılır ve bir litreye tamamlanır.

### Metot

Petri kutusu üzerine fazla miktarda mikroorganizma ekildikten sonra 37°C de 1 -5 gün bırakılır. Her gün kontrol edilen kültürlerde (kırmızı rengin meydana gelmesi pozitif

reaksiyon) renk değişmelerine dikkat edilir. Bazı durumlarda renk değişikliği 5-6 saat için de meydana gelebilir. Kültürde kırmızı rengin meydana gelmesi (amonyak oluşumu nedeniyle pH'nın yükselmesi sonu indiktorün renginin ortaya çıkması) pozitif reaksiyon olarak ve hiçbir değişikliğin olmaması de negatif olarak değerlendirilir.

**Tablo -I: Sığır Mastitisi oluşturabilen bakteriler ve bunların tahmini identifikasyonuna yardımcı temel özellikleri:**

Mastitise Neden Olan Bakteriler	Gram Reaksiyon	Mikroskopik Görünüm	Katalaz	Oksidaz	Hemoliz	Mac Conkey Agarda Üreme	Escülin Hemolizi	Camp Testi	Lancefield Grup	Diğer Özellikler ve Teyit Testleri
<i>Str.agalactiae</i>	+	C	-	-	βγ	-	-	+	B	CAMP testi pozitif
<i>Str.dysgalactiae</i>	+	C	-	-	α	-	-	-	C	Alfa hemolitik, CAMP negatif
<i>Str.uberis</i>	+	C	-	-	αγ	-	+	-	-	Eskülin seçici, Mac Conkey agarda üreme yok
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	C	-	-	αγ	+	+	-	D	Mac Conkey agarda topluğne başı şeklinde kırmızı koloniler, Escülin hemolizi
<i>Str.pyogenes</i>	+	C	-	-	β	-	-	-	A	Basitrasine duyarlı (0.04 unite disk)
<i>Str.pneumoniae</i>	+	C	-	-	α	-	±	-	-	Optochin'e duyarlı, Sıklıkla mukoid
<i>Str.equi subs. zooepidemicus</i>	+	C	-	-	β	-	-	-	C	Grup C: trehaloz (-), sorbitol (+), laktoz (+), maltoz (-)
<i>Staph.aureus</i>	+	C	+	-	□+	-	-	-	-	Altın sarısı pigment, çift zonlu hemoliz, koagulaz (+) mor agarda maltozu fermente eder
<i>E.coli</i>	-	R	+	-	±	+	-	-	-	Toz şeklinde beyaz koloniler IMVIC testi +/-/-/, EMB agarda metalik parlaklık. Nadiren mukoid, oldukça sıklıkla hemolitik
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	R	+	-	□	+	-	-	-	Mukoid, Filamentöz koloniler, hareketsiz
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	R	+	-	□	+	-	-	-	Mukoid koloniler, hareketli, IMVIC testi -/-/+/-/+/+
<i>Serratia marcescens</i>	-	R	+	-	□	+	-	-	-	25 °C'de kırmızı pigment, bazı suşlar 37 °C'de kırmızı pigmentli
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	R	+	+	±	+	-	-	-	Yeşilimsi-mavimsi pigment, meyve kokulu
<i>Actinomyces pyogenes</i>	+	R	-	-	□	-	-	-	-	Küçük koloniler, puslu hemoliz
<i>Nocardia asteroides</i>	+	F	+	-	±	-	-	-	-	Toz şeklinde beyaz koloniler, vasata yapışık, MZN +, inkubasyon süresi 3 gün, Sabouraud agarda ürer.
<i>Pasteurella multocida</i>	-	R	+	+	□	-	-	-	-	Tatlı kokulu koloniler, non-hemolitik, indol +, Mac Conkey agarda üreme yok.
<i>P.heamolytica</i>	-	R	v	+	+	+	-	-	-	Kokusuz, hemolitik, indol -
<i>Bacillus cereus</i>	+	R	+	-	□	-	-	-	-	Endospor oluşturur, geniş kapillalı hemoliz, büyük kuru koloniler

C=Kok, R=Çomak, F=Flamentöz (+)= Pozitif Reaksiyon +/- Çoğu Suşları Pozitif Olan V= Değişik Suşlara sahip,(-) = Negatif Reaksiyon, IMVIC=İndol, Metil Red, Voges-Proskauer ve Sitrat Testleri, MZN= Modifiye Ziehl-Neelsen boyama



**Bakteri İdentifikasyonu :** Tablo-1'de özetlenmiştir.

***Staph. aureus*'un İdentifikasyonu**

**a- Koloni morfolojisi:** Yuvarlak, parlak, altın sarısı renkteki koloniler, çift-hemoliz zonu ile çevrelenmiştir. McConkey agarın çoğu formülasyonunda özellikle kristal viyole ilave edilmiş olanlarda ve Edwards besiyerinde üreme olmaz.

**b-Gram boyama:** Gram pozitif koklar.

**c-Koagulaz testi:** Bu test izole edilen suşun Koagulaz (+) dolayısıyla patojen bir suş olduğunun ortaya konmasında gereklidir.

**d- %1 Maltoz ilave edilmiş Mor Agar:** İzole edilen suşun *Staph. aureus* olup olmadığının belirlenmesinde tahmini bir kontrol yöntemidir.

**e) Antibiyotik duyarlılık Testi:** Çoğu *Staph. aureus* suşları penisiline ve yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere dirençli olması nedeniyle antibiyotik duyarlılık testi gereklidir.

**Streptokokların (Mastitis oluşturan) identifikasyonu:**

**a- Koloni morfolojisi:** Kanlı agardaki 24 saatlik inkubasyonda küçük, yarı-şeffaf, alfa, beta ve gama hemoliz görülebilir.

**b-Edwards besiyerinde üreme:** Tüm *Streptococcus spp.* bu seçici vasat da üreme yeteneğine sahiptir. *S. uberis* ve *Enterococcus faecalis* eskülünü hidrolize eder fakat *S. agalactiae* ve *S. dysgalactiae* hidrolize etmez. Edwards besiyerindeki hidroliz vasatın ve kolonilerin koyulaşmasıyla ortaya çıkar. Bu durum U.V. ışığında ( veya Wood's lambasında) daha net görülür. Vasattaki eskülin UV ışığı altında mat mavi renk olarak ortaya çıkar.

**c-Gram boyama:** *Streptococcus spp.*, katı vasattaki kolonilerde zincir şekli çoğunlukla görülmez, yayılmış gram (+) koklar olarak görülürler.

**d- Koagulaz Testi:** Koagulaz özelliği pozitif olan *Staphylococcus spp.* patojen olarak nitelendirilirler

**e-Katalaz Testi:** *Streptococcus spp.*, katalaz (-) dir. *Staphylococcus spp.*' da (+) dir.

**f- Mac Conkey Agarda üreme:** *E. faecalis* ve Lancefield Grup-D'deki diğer *Streptococcus spp.* nin bir kısmı MacConkey agardaki safra tuzlarına tolerans gösterir ve kırmızı renkli toplu iğne başı şeklinde ürerler.

**g- CAMP Testi:** Sadece *S. agalactiae*, *Staph. aureus*'un beta hemolizini tarafından oluşturulan hemolizi keskin okbaşı şeklinde çoğaltır.

**h-Lancefield gruplandırma:** Çoğunlukla gerekli değildir fakat latex aglütinasyon kiti vasıtasıyla gerçekleştirilebilir. A,B,C,D,G grupları için Streptex (Welcome) ve A,B,C ve G gruplar için Phadebact Streptococcus Testi (Remel Inc.) kullanılır. *S. uberis* Lancefield gruplarına dahil değildir, fakat izolat dikkatlice alınmış bir süt örneğine ait saf kültür ise ve Tablo-de gösterilen özelliklere uyuyorsa (karşılık geliyorsa) tahmini bir identifikasyon yapılabilir.

**i- Optochin ve basitrasın duyarlılığı:** Başlıca insan patojenleri olan *S. pyogenes* ve *S. pneumoniae*'dan şüphe ediliyorsa basitrasın veya optochin duyarlılık testleri yapılabilir. Grup A *Streptococcus spp.* (*S. pyogenes*) basitrasine duyarlıdır fakat diğer beta hemolitik *Streptococcus spp.* dirençlidir. *S. pneumoniae* optochin'e duyarlıdır fakat diğer alfa hemolitik *Streptococcus spp.* değildir.

**k- Antibiyotik duyarlılık Testi:**

Mastitis oluşturan bazı *Streptococcus spp.*, penisiline dirençli hale gelmiştir. Bu nedenle izolat üzerinde antibiyotik duyarlılık testi yapılması tavsiye edilir. Bu test, çoğu *Streptococcus spp.* kan veya serum içermeyen vasatlarda üremediğinden kanlı agarda yapılmalıdır.

**Koliform Bakterilerin identifikasyonu:**

*E.coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Enterobacter aerogenes* sığır mastitisi ile sık olarak ilişkili *Enterobacteriaceae* ailesi üyesidir. *Serratia marcescens* ise daha az sık olarak ilişkilidir.

**a) Koloni morfolojisi:** *K.pneumoniae*, *E.aerogenes* ve çok nadir olarak da *E.coli* mukoid koloniyeye sahiptir. *E.coli* kolonileri MacConkey agarda yuvarlak, belirgin ve parlak pembe renklidirler (Laktoz fermentasyonu). *Enterobacteriaceae* için de *E.coli* kanlı agarda en yaygın hemolitik olanıdır, ancak bu durum değişken bir özelliktir. Koliform bakteriler Edwards vasatında üremezler.

**b) Gram boyama:** Orta büyüklükte Gram (-) çomakçıklardır.

**c) Oksidaz testi:** Gram (-) bakterilerin çoğu oksidaz pozitifdir, fakat *Enterobacteriaceae* üyeleri istisnadır, bunlar oksidaz negatiftir.

**d) Yarı-katı vasatta hareketlilik:** *K. pneumoniae*'yı *E. aerogenes*ten ayırdetmek için (her ne kadar bu iki bakteride karakteristik olarak mukoid kolonilere sahiplersedeyse) *K. pneumoniae* hareketsizdir, *E. aerogenes* ise hareketlidir.

**e) IMVIC testi:** *E.coli*'nin tahmini identifikasyonu için kullanılmakta olup sabit olarak +MR+/VP-/sitrat (-) dir.

**f) Pigment üretimi:** *Serratia marcescens* 25 °C' de belirgin kırmızı pigmenti olan prodigiosin oluşturur. Bu pigmenti MacConkey agardaki kolonilerde görebiliriz.

**g) Ticari identifikasyon sistemi:** *Enterobacteriaceae* için mevcuttur.

**h) Antibiyotik duyarlılık testi:** Bu *Enterobacteriaceae* üyeleri için çok önemlidir. Zira R-faktör plazmidlerinin varlığı nedeniyle çoklu ilaç direncini kodlar.

***Actinomyces pyogenes*'in identifikasyonu :**

**a) Koloni morfolojisi:** 24 saatlik inkubasyondan sonra kanlı agardaki koloniler o kadar küçüktür ki zor görülürler, fakat kenar hatları boyunca belli belirsiz hemoliz vardır. Daha uzun süreli inkubasyondan sonra ise küçük koloniler puslu hemolizli çevrelenmiş şekilde görülür hale gelir. MacConkey agar ve Edwards vasatında üreme gözlenmez.

**b) Gram boyama:** Çok şekilli Gram (+) çomakçıklardır.

**c) Katalaz testi:** *A.pyogenes* katalaz (-) dir.

**d) Loeffler serum testi:** 24-48 saat için de *A.pyogenes* tarafından eğim çukurlaştırılır, buda tahmini bir identifikasyon sağlar.

**e) Antibiyotik duyarlılık testi:** Bu yavaş üreyen bakteri ile testin değerlendirilmesi zordur, bununla birlikte penicillin'e duyarlıdır.

#### ***Pseudomonas aeruginosa*'nın identifikasyonu:**

**a) Koloni morfolojisi:** Kanlı agarda *P.aeruginosa* büyük çoğunlukla hemolitik, yassı, yeşil-mavi pigmentli (pyocyanin) kolonilere sahiptir. Koloniler karakteristik olarak meyvemsi kokuya sahiptir. MacConkey agarda bakteri laktozu fermente etmez fakat yeşil-mavi pigment sıklıkla görülür. Edwards vasatında üremez

**b) Gram boyama:** Orta büyüklükte Gram (-) çomakçıklardır.

**c) Oksidaz testi:** *P.aeruginosa* kuvvetli şekilde oksidaz (+) dir. Bu oksidaz (-) koliformlardan ayırt etmeye yarar.

**d) Pyocyanin artırma testi (*Pseudomonas* agar P –Difco):**Pyocyanin *P.aeruginosa*' ya özgü olduğundan, tahmini identifikasyonu için bu pigmentin ortaya konması yararlıdır. Pyocyanini artırma vasatı etkeni zayıf pigment oluşturan suşları için yararlıdır.

**e) Antibiyotik duyarlılık testi:** Bu test şiddetli ilaçlara dirençli bir bakteri olduğundan, *P.aeruginosa* için gereklidir.

#### ***Nocardia asteroides*'in identifikasyonu:**

Kronik vakalarda palpe edilebilir granülalar çoğunlukla memebaşı dokusunda mevcuttur.

**a) Direkt mikroskopi:** *N.asteroides*, yavaş üreyen, konakçı, kültürü zor yapılan ve özellikle de hayvan antibiyotiklerle tedavi edildiğinde bu özellikleri belirgenleşen bir bakteridir. Santrifüje edilmiş süt numunesinin tortusundan yapılan preparatları teşhise ulaşmada en iyi vasıtaadır.

**b) Koloni görüntüsü:** 3-4 günlük inkubasyondan sonra beyaz toz şeklinde, agarda gömülmüş koloniler gözlemlenir. Bazı suşları hemolitikdir. *N.asteroides* kolonileri kokusuzdur, buda bunları benzer kolonilere sahip streptomyces türlerinden ayırtedilmelerini sağlar.

**c) Sabouraud dextroz agarda üreme:** *N.asteroides* ve bazı streptomyces türleri alışılmışın dışında olarak Sabouraud agarda üreme yeteneğine sahiptir. Bu vasat mantarlar için seçici bir besi yeridir.

#### ***Pasteurella* türlerinin identifikasyonu:**

**a) Koloni morfolojisi:** *P. multocida*, kanlı agarda orta büyüklükte, parlak (bazen mukoid), non-hemolitik, pembemsi renkte koloniler oluşturur. Koloniler hassas, narin yapıdadır, karakteristik olarak oldukça tatlı bir kokuya sahiptir.*P. haemolytica*, kanlı agarda beta hemolitik *Streptococcus spp.*a benzer koloniler oluşturur. *P. multocida*, MacConkey agarda üremez ancak *P. haemolytica* küçük, kırmızı, toplu başı benzeri koloniler şeklinde ürer. Bu *Enterococcus faecalis*'e benzer değildir. Edwards besiyerinde üreme olmaz.

**b) Gram boyanan preparat:** Kokobasil benzeri Gram-negatif çomakçıklardır.

- c) **Katalaz testi:** Pastörellalar, *Streptococcus spp.* dan katalaz pozitif olmaları ile ayrılır.
- d) **Oksidaz test:** *P. multocida* ve *P. haemolytica*'nın her ikisinde oksidaz pozitifdir. Oysaki Enterobacteraceae'ler oksidaz negatiftir.
- e) **İndol üretimi:** *P. multocida* iyi bir indol üreticisidir.

#### **Bacillus cereus'un identifikasyonu:**

- a) **Koloni morfolojisi:** Kanlı agarda geniş, düz, granüllü yapıda koloniler oluşturur. MacConkey agar veya Edwards besiyerinde üremez.
- b) **Gram boyanan preparat:** Geniş, Gram pozitif çomaklardır. Bazıları sporlu olabilir. Endosporlar, ana hücre için de temiz, boya almamış, oval bölgeler şeklinde görülür.

**Mycoplasma spp.:** *Mycoplasma spp.*'nin izolasyonu için özel vasatlar gerekir. Mastitis vakalarına *Mycoplasma spp.*'nin karıştığına göstergesi olarak, önemli patojenlerin izole edilmemesi (rutin kültür yöntemleri ile) gelir. Meme bezlerinde şiddetli değişiklikler olur, fakat çoğunlukla sistemik gelişim gözlenmez.

#### **Mycobacterium spp:**

Memenin *Mycobacterium spp.* ile enfeksiyonu, sığır tüberkülozunun hala nisbeten yaygın olduğu ülkeler dışında nadirdir. Mikobakteriyel bir enfeksiyondan şüphe ediliyorsa, 50 µl. miktarında süt dikkatli olarak alınmalıdır. Bu enfeksiyonlarda nisbeten az sayıda *Mycobacterium spp.* mevcuttur, bu nedenle süt numunesi bakterilerin tortuda toplanması için santrifüj edilmelidir. Çökelti ZN boyama ve kültür için kullanılır.

#### **Leptospiral agalactia:**

Her ne kadar *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* ya da *pomona* meme bezlerinde bulunabilmekteyse de, bu durum tipik bir mastitis değildir. Durumun tahmini teşhisi, klinik bulgularla ve daha sonra karanlık saha mikroskopunda idrarda *Leptospira spp.*'nin görülmesi esasına dayanır.

#### **Fungal patojenler:**

Bu potansiyel patojenler her zaman her yerde bulunabilirler ve çoğunlukla da memeye meme içi antibiyotik tüplerinin sokulması yoluyla girerler. Zira mantarlar her yerde bulunabilir, süt örneğinin tekrar alınması tavsiye edilir. Çok sayıda mantar mastitisli süt numunelerinden izole edilmiş olup, bunlar arasında *Candida albicans*, *Trichospora* ve *Saccharomyces* türleri yer alır.

### Prototheca türleri:

*P. zopfii* ve *P. wickerhamii* klorofilsiz alglerdir, fakat kanlı agarda 25-37 °C 'de 48-72 saatlik inkubasyonu takiben bakteri benzeri koloniler oluşturur. Bu koloniler küçük ve grimsi-beyaz renktedir. Mikroskopik muayenede 4-8 adet kız-hücre içeren daha büyük sporangialar görülür. Bunlar en iyi şekilde nemli preparatlarda ya da Wright veya Giemsa yöntemleriyle boyanmış preparatlarda ortaya konur. Bu algler suda, toprakta, çamurda ve dışkıda çok yaygındır. Tekrarlanan süt numunesi bu alglerin meme bezinden gelmediğinin ortaya konması için en garantili yoldur. Bu tip mastitisin prognozu zayıftır, zira tedaviye zayıf yanıt verir ve algler meme dokusunda 100 günü aşkın bir süreye kadar persiste halde kalabilir. Enfekte hayvanlar sürüdeki diğer hayvanlar için tehlike oluşturur ve acilen uzaklaştırılmaları gerekir.

## 8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- 1-Anonim:** Erişim Adresi; <http://classes.ansci.illinois.edu/ansc438/mastitis/bacticulture.html>
- 2-Arda,M.** (1981): *Genel Bakteriyoloji*, sh. 460-461, A. Ü. Basımevi, Ankara.
- 3-Arda,M.** (2000): *Temel Mikrobiyoloji*, sh. 297-314, Medisan Yayın Serisi.46 - Ankara.
- 4-Minbay, A., Aydın,N., Akay,Ö., İzgür, M., Leloğlu, N., Kahraman, M., Ilgaz, A., Diker, S.** (1999): *Özel Mikrobiyoloji*, sh. 31-39, Medisan Yayın Serisi:26- Ankara.
- 5- Quinn, J.P., Carter E.M., Markey B., Carter G.R.** (2004) *Clinical Veterinary Microbiology*, Mastitis, Section-2, Chapter-36, pg.327-345.
- 6- WHO** (2004): Laboratory Biosafety Manual - Third Edition, 2004. [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_11/en/).

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni



# LEPTOSPIROSIS'İN TEŞHİSİ

## 1. AMAÇ

Şüpheli materyallerde, *Leptospira* türü mikroorganizmaların bakteriyolojik kültür yöntemi ile izolasyonudur.

## 2. UYGULAMA ALANI

Şüpheli materyallerden, *Leptospira* türü mikroorganizmaların izolasyon ve identifikasyonu için yapılan bakteriyolojik teşhis uygulamalarını kapsamaktadır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeniyle enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışırken dikkatli olunur ve OIE Manual ve WHO Laboratory Biosafety Manual esas alınarak kurallara uyulması sağlanır. Materyalin taze olması ve soğuk zincir koşullarında gönderilmesi gerekir.

## 5. KISALTMALAR/TANIMLAR

**Leptospirosis** : İnsan ve hayvanlarda çeşitli *Leptospira* türleri tarafından oluşturulan önemli bir zoonozdur. Bulaşma, rodentler ve yabani hayvanlarla olur. *Leptospira* türleri, Gram negatif, sporsuz, kapsülsüz, sarmal biçimde mikroorganizmalar olup, bataklık, durgun sularda, sulu, sıcak ve alkali topraklarda bulunurlar.

## 4. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

Klinik belirti göstermeyen kronik taşıyıcı hayvanların böbrek, idrar ve genital yollarından, klinik olarak enfekte olan hayvanların iç organlarından (karaciğer, akciğer, beyin ve böbrek) ve vücut sıvılarından (idrara, kan, süt, beyin omurilik sıvısı, göğüs ve karın boşluğu sıvıları) veya kronik enfekte bir annenin atık fetusundan spesifik besiyerine ekim yapılarak etkenin izolasyonu çalışmasıdır. Bu test leptospirozisin teşhisi açısından referans bir yöntemdir.

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1. Materyal

Şüpheli insan veya hayvan iç organ, vücut sıvısı ve atık materyalleri

### 7.2. Kullanılan ekipman

Standart laboratuvar cam malzemesi

Karanlık Saha Mikroskobu

Etüv (29 +/- 1° C), Çalkalayıcı Etüv

Disposable Milipor Filtre

Manyetik Karıştırıcı

Vakum Pompası

Filtrasyon Sistemi

### 7.3. Kullanılan kimyasallar/ reagentler/ biyolojik maddeler

Leptospira medium base EMJH (Bacto)

Sığır serum albumin

Kalsiyum klorid (2H<sub>2</sub>O)

Magnezyum klorid (6 H<sub>2</sub>O)

Çinko sulfat (7 H<sub>2</sub>O)

Bakır sulfat. (5H<sub>2</sub>O)

Demir sulfat (7 H<sub>2</sub>O)

Sodyum klorür(NaCl)

Sodyum hidrofosfat.(2sulu) (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O)

Potasyum fosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

Vit. B12

Tween 80

Gliserol

5-flourourasil

Tavşan serumu

Actidione

Sodyum hidroksit(%4)

Hidroklorik asit



#### 7.4. Kullanılan Besi Yerleri/Solüsyonlar

##### Fosfat buffer solüsyonu (PBS)

NaCl	8.50g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.85g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.25g
Distile su	1000 ml

##### Modifiye Johnson besiyeri

Leptospira medium base EMJH (Bacto)

Albumin- yağ asit supplementi

Leptospira medium base EMJH eritilip, 25°C'de pH 7.5'e ayarlandıktan sonra otoklavda 121 °C de 15 dakika sterilize edilir. 25-30°C'ye kadar soğutulan 9 kısım temel besi yerine, aktidione, pH 7.2-7.4'e ayarlanmış 1 kısım supplement steril koşullarda eklenir ve otoklav edilmiş (121°C de 40 dakika) milipor filtrelerden (aşağıdan yukarıya doğru 0.22+ipek filtre+0.45+prefiltre) 0.2 atmosfer basınçla süzülerek steril şişelere taksim edilir. Sterilite kontrolleri için, en az 15 gün oda ısısında bekletildikten sonra kullanılır.

#### 7.5. Numunenin Hazırlanması ve Analiz/Test/Muayene'nin Yapılması

##### 7.5.1. Bakteriyoskopi

Leptospirosis döneminde hastadan defibrine kan alınır, preparat hazırlanarak karanlık saha mikroskopu ile muayene edilir ve Leptospira etkenleri aranır. Daha sonra eritrositler santrifüj ile çöktürülür ve plazmada etken aranır.

Materyal idrar ise leptospirüri döneminde alınmalıdır. Hafif santrifüj ile üstten alınan bir damla idrar karanlık sahada muayene edilir. Etken görülmezse 30 dakika 5000 devirde santrifüj yapılır ve tekrar muayene edilir.

##### 7.5.2. Kültür

Leptospirosisin izolasyonu, antibiyotik kalıntılarının olmadığı, alındıktan hemen sonra kültürünün yapılabileceği otoliz olmamış dokuların ve idrar ise uygun pH ile etkenin varlığını göstermede en etkili yoldur. Eğer dokular ve sıvılar kültür için laboratuvara derhal götürülemeyecek ise diğer bakterilerin ürememesi ve dokuların kokuşmaması için örneklerin +4°C'de muhafazası gerekmektedir. Örneklerin taşınmasında sıvı kültür besiyeri veya 100-200 µg/ml 5-fluorourasil içeren %1'lik BSA solüsyonu kullanılmalıdır.

Kültür, için de BSA bulunan yarı katı (%0,1-0,2 agar) besiyerine alınmalıdır. Kontaminasyonu önlemek için 5-fluorourasil, actidione, nalidixic asit gibi seçici maddeler konulabilir ancak bu

maddeler az sayıdaki canlı leptospiraların üreme şansını azaltabilir ve Leptospira suşlarının çoğu çeşitli antibiyotikleri içeren besiyerinde üreyemez. Yarı katı besiyerine ilave edilecek %0.4-1 oranındaki tavşan serumu, bazı **müşkülpesent** leptospira serotiplerinin izolasyon şansını arttıracaktır. Ateşli dönemde alınan kandan sıvı besi yerine birkaç damla ekilir. Fazlası serum için deki muhtemel antikor nedeniyle üremeye mani olabilir. Aynı dönemde alınan beyin omurilik sıvısında daha az sayıda etken olabileceği düşünüldüğü için 1/10 oranında ekim yapılmalıdır. Aseptik koşullar altında ikinci haftadan sonra alınan idrardan birkaç damla direk ve 1/10 oranında besiyeri ile sulandırılarak ekim yapılır.

Böbrek, karaciğer gibi iç organlardan yapılacak ekim için steril bir havan içine örnekten küçük parçalar konur. Steril kum ile ezilir ve besiyeri veya PBS ile 1/10 oranında sulandırılır. Süspansiyonun üst kısmından pipet ile çekilerek besi yerine birkaç damla ekim yapılır.

Kültürler, 29 +/- 1°C'de en az 16 hafta tercihen 26 hafta tutulmalıdır. Kültürler her 1-2 haftada bir karanlık saha mikroskobunda kontrol edilmelidir. 100 watt ışık kaynağı olan kaliteli bir mikroskop kullanmak önemlidir.

### 7.5.3. Hayvan deneyi

Deneme hayvanlarından en duyarlı olan hamster eğer yoksa kobay kullanılır. İzolasyon amacı ile 25-30 günlük hamsterlere defibrine kan, idrar ve süspanse edilmiş iç organlardan 0,5-1 ml miktarında karın içi verilir. Kontrol altındaki hayvanlardan 5, 8, 10 ve 14. günlerde kan alınarak besi yerine ekim yapılır. Hamsterler 21 gün için de ölmezlerse tüm kanları alınarak öldürülürler. Kan serumlarında antikor bakılır ve böbreklerinden ekim yapılarak etken izolasyonuna çalışılır.

## 8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

1. OIE (2008) Manual of Standarts for Diagnostic Tests and Vaccines,
2. Bey R.F., Johnson R.C. (1978) Protein-free and low-protein media for the cultivation of Leptospira. Infect. Immun., 19, 562–569.
3. Cole J.R., Ellinghausen H.C., Rubin H.L. (1980) Laboratory diagnosis of leptospirosis of domestic animals. Proc. U.S. Anim. Health Assoc., 83, 189–199.
4. Blobel H., Schlieber T. (1985) Handbuch der bakteriellen infektionen bei tieren. V, 131-135.
5. WHO (2004) Laboratory Biosafety Manual - Third Edition, [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_2004\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/).

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

# LEPTOSPIROSIS'İN ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) İLE TEŞHİSİ

## 1. AMAÇ

Şüpheli materyallerde, *Leptospira* türü mikroorganizmalara karşı oluşmuş antikorların tespit edilmesidir.

## 2. UYGULAMA ALANI

Test, Leptospirosis'in teşhisi amacıyla ELISA tekniğinin kullanıldığı uygulamaları kapsamaktadır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeniyle enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışırken dikkatli olunur ve OIE Manual ve WHO Laboratory Biosafety Manual esas alınarak kurallara uyulması sağlanır.

## 5. KISALTMALAR/TANIMLAR

**Leptospirosis** : İnsan ve hayvanlarda çeşitli *Leptospira* türleri tarafından oluşturulan önemli bir zoonozdur. Bulaşma, rodentler ve yabani hayvanlarla olur. *Leptospira* türleri, Gram negatif, sporsuz, kapsülsüz, sarmal biçimde mikroorganizmalar olup, bataklık, durgun sularda, sulu, sıcak ve alkali topraklarda bulunurlar.

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

PBS (Phosphate Buffered Saline)

BSA (Bovine serum albumin)

5-AS (5-amino-2-hidroksi salisilik asit)

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

ELISA, *Leptospira* antikorlarını belirlemede oldukça hassas fakat serovar spesifitesi daha az olan bir testtir.

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1. Materyal

Şüpheli hayvan veya insana ait kan serumu

### 7.2. Kullanılan Ekipman

Etüv

Mikropleyt (düz tabanlı)

Pipetler (5, 10 ml)

Mikropipetler (20,100µl )

Disposable uçlar

ELISA okuyucu

Su banyosu

### 7.3. Kullanılan kimyasallar /reagentler/biyolojik maddeler

Sodyum klorür(NaCl)

Sodyum hidrofosfat.(2sulu) ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

Potasyum fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

Pozitif serum

Negatif serum

Antijenler (ısı ile inaktive edilmiş)

$\text{H}_2\text{O}_2$  % 0.05

Subtrat (5-amino-2-hidroksi salisilik asit)

Konjugat

Tween 20

Tween 80

BSA

NaOH

### 7.4. Kullanılan Besi Yerleri

PBS (Phosphate Buffered Saline) : Test Metodu Leptospirozis'in Mikroskopik Aglutinasyon Test ile Teşhisi'nde anlatılmıştır.

Modifiye Johnson besiyeri : Test Metodu Leptospirozis'te Etken İzolasyonunda anlatılmıştır.

PBS/Tween solüsyonu (%0.05)

Tween 20	0.5 ml
PBS	1000 ml

#### PBS/Tween/BSA solüsyonu (%0.5)

BSA	5 g
PBS/Tween	995 ml

#### Substrat (5-AS)

5-amino-2-hidroksi salisilik asit	80 mg
Steril Distile su (75°C)	100 ml

(1 N NaOH ile pH 6.0'a ayarlanır. Kullanılacağı zaman %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile karıştırılır.)

#### Hidrojen Peroksit solüsyonu

Hidrojen Peroksit	3 ml
Steril Distile su	100 ml

(Her ml substrat için 4 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonu hesap edilerek kullanılır).

### 7.5. ELISA Antijeninin Hazırlanması

Testte kullanılacak olan standart suşlar 5 ml modifiye Johnson besiyerinde 10-12 gün 30°C de inkübe edilir. Elde edilen kültür yeterli yoğunluğa ulaştığında (1x10<sup>9</sup> / ml), 50 µl besiyerine steril şartlar altında ekilir ve 4-7 gün üremeye bırakılır. Daha sonra üremenin yoğunluğu, saflığı ve besiyeri için deki Tween'in varlığı kontrol edilir. Tween'in varlığını test etmek için, 1-2 ml kültür bir tüpe alınır ve son konsantrasyonu %0.5 olacak şekilde formalin ilave edilerek mikroorganizmalar öldürülür. 10.000 rpm de 30 dakika santrifüj edilir ve süpernatant kısmı kaynayan su banyosu içine konularak ısıtılır. Isıtılan süpernatantın bulanıklaşması ile Tween'in tamamen kullanılmadığı anlaşılır ve kültür birkaç gün daha üremeye bırakılır. Isıtılan süpernatantta berraklık görüldüğü zaman Tween'in tamamen harcanmış olduğu anlaşılır. Tween'in kullanıldığı anlaşılan kültüre son konsantrasyonu %0.5 olacak şekilde formalin ilave edilir ve 1 saat leptospiraların ölmesi için beklenilir. Ölü leptospira süspansiyonu 30 dakika kaynayan su banyosu için de her 5 dakikada bir çalkalanarak ısıtılır. Oda derecesine kadar soğuduğu zaman 30 dakika 10.000 rpm de santrifüj edilir. Antijen olarak kullanılacak olan süpernatant kısım ayrılır ve kullanılıncaya kadar +4°C'de saklanır.

## ELISA Pleytlerinin Kaplanması

Test için düz tabanlı mikroyeşiller kullanılır. Pleytin her bir gözüne 100 µl antijen konulur. Pleytler oda sıcaklığında (güneş ışığı gelmeyecek şekilde) içlerindeki sıvı tamamen kuruyuncaya kadar (1-3 gün) bekletilir. Kaplanmış olan pleytler üstleri kapatılarak oda ısısında saklanır.

### 7.6. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

Hastalık şüphesi ile gönderilen kan serumunun PBS/ Tween/ BSA solüsyonu ile seroloji tüplerinde sulandırması yapılır. (İnsan için 1/25, hayvan için 1/50 sulandırma hazırlanır.)

Her antijen ayrı bir pleyte kaplanır.

Daha önce antijen ile kaplanmış olan pleytler PBS/ Tween solüsyonu ile 4 defa yıkanır. Son iki yıkamada solüsyon gözlerde 1'er dakika bekletilir. Pleytte kalan solüsyonun fazlası kurutma kağıdı veya havlu üzerine vurularak kurutulur.

Pleytin birinci kolonu boş bırakılarak ikinci kolondan itibaren bütün gözlere 100µl PBS/ Tween/ BSA solüsyonu konulur.

Üst iki sıra pozitif ve negatif serum sulandırmasına ayrılır.

Sulandırılmış serumlardan ikinci kolonlara 100 µl konulur ve diğer gözlere 100 µl aktararak serumların iki katlı sulandırmasına devam edilir. Son gözlerden 100 µl sıvı dışarıya atılır.

Pleytin üstü kapatılarak 1 saat 30 °C 'de inkube edilir. Yıkama işlemi 4 defa yapılır ve kurutulur.

Bütün gözlere PBS/ Tween/ BSA solüsyonu için de sulandırılan konjugattan 100 µl konulur ve tekrar 1 saat 30 °C 'de inkube edilir.

Sonra konjugat boşaltılır, 4 kez yıkanıp kurutulduktan sonra substrat ilave edilir, iyice çalkalanır ve üstü kapatılarak oda ısısında 2 saat bekletilir.

### 7.7. Sonuçların Değerlendirilmesi

Pleyt iyice çalkalanır ve 492 nm'de okunur.

Pozitif kontrolün en yüksek OD değeri olan sayı 2'ye bölünür. Bulunan X değeridir. Bütün sulandırmalarda X değerinden büyük olan OD değerleri pozitif, sulandırmalarda X değerinden küçük olan OD değerleri negatif olarak değerlendirilir.

Aynı zamanda çıplak göz ile de değerlendirme yapılabilir. Substratın özelliğinden dolayı pozitif kontrol ve pozitif bulunan serumlarda kırmızı-kahverengi bir renk oluşur.

## 8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

1. OIE (2008) Manual of Standarts for Diagnostic Tests and Vaccines.
2. International Course on Laboratory Methods for Diagnosis of Leptospirosis (Royal Tropical Institute, Department of Biomedical Research, WHO/FAO Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis. Amsterdam – The NETHERLANDS
3. Terpstra,W.,Ligthart,G.S., Schoone,G.J. (1980) Serodiagnosis of human leptospirosis by enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA). Zbl.Bakt. Hyg., A247, 400-405.
- 4.WHO (2004) Laboratory Biosafety Manual - Third Edition, [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_2004\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/).

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni



# LEPTOSPIROSIS'İN MİKROSKOPİK AGLUTİNASYON TEST (MAT) İLE TEŞHİSİ

## 1. AMAÇ

Bu test, kan serumlarında Leptospirosis'e karşı oluşan antikorların Mikroskopik Aglutinasyon Testi ile tespitidir.

## 2. UYGULAMA ALANI

Bu test metodu Leptospirosis'in serolojik teşhisini kapsar.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının, kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve "OIE Manual Laboratory Biosafety Manual", esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solüsyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

## 5. KISALTMALAR/TANIMLAR

MAT (Mikroskopik Aglutinasyon Test)

PBS (Phosphate Buffered Saline)

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

Mikroskopik Aglutinasyon Test, Leptospira antikorlarının görülmesinden itibaren bilinen bütün serogrupları temsil eden antijenlerin kullanıldığı en yüksek sensitiviteye sahip olan testtir. Bu test, leptospirozisin teşhisi açısından referans bir yöntemdir.

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1. Materyal

Şüpheli hayvan veya insana ait kan serumu

### 7.2. Kullanılan ekipman

Lam

Karanlık Saha Mikroskopi

Etüv (29 +/- 1° C)

Öze

Mikropleyt (düztabanlı)

Pipetler (5, 10 ml)

Mikropipetler (20,100µl )

Disposable uçlar

### 7.3. Kullanılan kimyasallar / reagentler/biyolojik maddeler

Sodyum klorür(NaCl)

Sodyum hidrofosfat.(2sulu) ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

Potasyum fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

Pozitif serum

Negatif serum

Antijenler (en az 4 en fazla 8 günlük, canlı)

### 7.4. Kullanılan besiyerleri

#### Fosfat buffer solüsyonu (PBS)

NaCl 8.50g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.85g

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.25g

Distile su 1000 ml

Modifiye Johnson besiyeri Test Metodu Leptospirozis'te Etken İzolasyonu 'nda anlatılmıştır.

### 7.5. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

Hastalık şüphesi ile gönderilen kan serumunun mikropleylerde PBS ile sulandırması yapılır. (İnsan için 1/25, hayvan için 1/50 sulandırma hazırlanır.)

Sulandırılmış olan seruma  $1-2 \times 10^8$  /ml olan antijenlerin her birinden eşit miktarda ilave edilir. Final serum sulandırması iki katına çıkmış olur.

Kontrol için pozitif ve negatif serumlar konulur.

Mikropleytlar çalkalanır ve etüvde  $29 \pm 1^\circ \text{C}$  de 2-4 saat tutulur.

## 7.6. Sonuçların Değerlendirilmesi

Pozitif ve negatif kontrolden başlamak üzere karanlık saha mikroskopunda değerlendirme yapılır.

Sonuçları değerlendirmeye daima en yüksek sulandırmadan başlanır.

Karışımdan bir öze dolusu alınarak temiz bir lam üzerine konulur ve 10X objektif ile lamel kapatmadan değerlendirilir.

Leptospiralar % 100 aglutine olmuş ise 4+; % 75 aglutinasyon varsa 3+ olarak değerlendirilir. Eğer serbest leptospira sayısı aglutine olan leptospira sayısına eşit ise yani %50 aglutinasyon varsa 2+; %50'den daha az ise 1+ olarak değerlendirilir.

Eğer bir serum 1/100 dilusyonda 2+ olarak değerlendirilirse, serum titresini belirleyebilmek için serum iki katlı olarak sulandırılır. Başlangıç sulandırması 1/100, son sulandırma 1/12800 veya daha yüksek olabilir. 2+ veya daha yüksek reaksiyon görülen en yüksek sulandırma serum titresini olarak belirlenir.

## 8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

1. OIE (2008) Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines.
2. Bey R.F., Johnson R.C. (1978) Protein-free and low-protein media for the cultivation of Leptospira. Infect. Immun., 19, 562–569.
3. Cole J.R., Ellinghausen H.C., Rubin H.L. (1980) Laboratory diagnosis of leptospirosis of domestic animals. Proc. U.S. Anim. Health Assoc., 83, 189–199.
4. WHO (2004) Laboratory Biosafety Manual - Third Edition, [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_2004\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/).

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

# CLOSTRIDIUM BOTULINUM TOKSİNLERİNİN TESPİTİ

## 1. AMAÇ

Bu metotta, şüpheli materyalde *Clostridium botulinum* toksinlerinin (tip C ve tip D) in vivo olarak identifikasyonudur .

## 2. UYGULAMA ALANI

Şüpheli materyalden *Clostridium botulinum* toksinlerinin (tip C ve tip D) in vivo olarak teşhisi için uygulanır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeniyle enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışırken dikkatli olunur ve OIE Manual ve WHO Laboratory Biosafety Manual esas alınarak kurallara uyulması sağlanır.

Toksin tespitinin ölmek üzere veya yeni ölmüş hayvanlardan yapılması gerekir. Çünkü *Clostridium botulinum* sporları normal hayvanların bağırsaklarında geçici olarak bulunabilir ve hayvanın ölümü sporları jermantasyonu ve toksin üretimi için uygun anaerobik ortamı sağlar. Ölümden uzun süre geçmişse teşhis güvenilir olmaz.

## 5. KISALTMALAR/TANIMLAR

***Clostridium botulinum***: İnsan ve hayvanlarda gıda zehirlenmeleri ile karakterize bir sinir sistemi hastalığı olan botulismusun etkeni olup, 8 farklı toksin-A, B, C $\alpha$ , C $\beta$ , D, E, F, G, (C. Argentinense), nörotoksik bir toksin üretmektedir. Sığır ve koyunlar için tip D'nin toksisitesi yüksektir. Sporları 121°C'de 15 dakikada ölür, toksinleri 100°C'de 20 dakikada tahrip olur. Botulismus bir toksikasyon olup, diğer Clostridial hastalıklardan farklı yem maddelerinde önceden oluşan toksinin alınmasıyla oluşmaktadır. Teşhis anamnez, klinik bulgular ve laboratuvar toksin tespitine dayanır.

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI/PRENSİBİ

Şüpheli materyalden (mide içeriği, kan serumu ve yem numunesi) beyaz farelerde toksinin identifiye edilmesidir.

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1. Materyal

Yem numuneleri ve hasta hayvana ait mide içeriği, kan serumu.

### 7.2. Kullanılan Alet-Ekipman

- Santrifüj
- Laboratuvar terazisi
- 1 ml'lik insülin enjektörü
- Pipet (1ml, 2ml, 5ml)
- Laboratuvar tüpleri (5ml, 20ml)
- Havan
- Anaerob jar

### 7.3. Kullanılan Kimyasallar ve besiyerleri

- Tripsin
- FTS (Fizyolojik tuzlu su)
- Kanlı Agar
- Kıymalı Buyyon
- TPGY (Tryptcase Peptone Glucose Yeast Extract ) Medium

### 7.4. Kullanılan Numune ve Hazırlanması

- Kan serumu veya seröz eksudat
- Mide içeriği (bağırsak içeriği uygun değil: toksin ince bağırsaklardan kolayca emilerek kana karışıyor)
- Şüpheli yem örneği, FTS ile iyice ezilip karıştırıldıktan sonra anaerob ekimler yapılır kalan kısım bir gece buzdolabında bekletilir ve fareler enjeksiyon farelere intravenöz olarak (0.3 ml) veya intraperitoneal olarak (0.5 ml) inokule edilir. Mide içeriğide FTS ile süspanse edilip 3000 rpm de 15 dakika santrifüj edilip, filtreden (45 nm) geçirildikten sonra fareye verilir.

### 7.5. Analiz/Test/Muayenenin Yapılması Yapılan Testler

Farelerde toksin nötralizasyon testleri uygulanır. Testin esası toksinin letal aktivitesinin spesifik antitoksini ile inhibe edilmesidir.

- Hayvanlardan alınan serum ya da seröz eksudatlar doğrudan farelere intravenöz olarak (0.3 ml) veya intraperitoneal olarak (0.5 ml) inokule edilir. Toksin varsa farede ilk

birkaç saat veya 5 güne kadar tipik olarak belinin içeri çekildiği bir görünüm olur. (solunum kaslarında ki felç nedeniyle abdominal solunumdan dolayı)

- Yem maddeleri FTS ile iyice ezilip karıştırıldıktan sonra santrifüj edilir. Süpernatant 0.45 um filtreden geçirildikten sonra aynı şekilde farelere inokule edilir. Filtratın bir kısmına protoksin halinde olabilen toksini aktive etmek için tripsin ilave edilir: 9 kısım filtrata 1 kısım %1'lik tripsin solüsyonu ilave edilir. 45°C'de 45 dakika bekletildikten sonra fareye verilir.

-

**Toksin İdentifikasyonu:** Farelere (veya kobay) inokule edilen örnekler önce polivalan daha sonra monovalan antiserumlarla birlikte verilerek toksin identifikasyonu yapılır.

### **Yemden *C. botulinum* İzolasyonu:**

1. Yem örnekleri az bir miktar FTS ile iyice karıştırılır.
2. Süspansiyon 65-80°C'de 30 dakika ısıtılır. (kontaminant mikroorganizmaların öldürülmesi ve *C. botulinum* sporlarının jermantasyonunu sağlamak için)
3. Kanlı agara ekim yapılır. Pleytler anaerob ortamda 35°C'de 5 güne kadar inkübe edilir. *C. botulinum* kolonileri kanlı agarda genellikle beta hemolitik ve düzensiz kenarlı, yüzeyi granüler koloniler oluşturmaktadır.

Toksinin identifikasyonu için kanlı agardan alınan koloniden kıymalı buyyon ve TPGY Medium'a pasaj yapılır, 35°C'de 5-10 gün inkübe edilir. Kültür filtratı santrifüj edilerek farelere intraperitoneal olarak inoküle edilir.

### **7.6. Sonuçların Değerlendirilmesi**

Farelerde belin içeri çekildiği bir görünüm (solunum kaslarında ki felç nedeniyle abdominal solunumdan dolayı) olur ve ölüm görülür.

## 8. KAYNAKLAR/İLGİLİ DOKÜMANLAR/EKLER

1. **Nadas, Ü. G.** (1993) Seminer notları, Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Anaerob Laboratuvarı.
2. **Quinn P.J., Carter M.E., Markey B. K., Carter G.R.** (1994) Clinical Veterinary Microbiology, Mosby.
3. **WHO** (2004) Laboratory Biosafety Manual - Third Edition, [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_2004\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/).

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

# CLOSTRIDIUM OEDEMATIENS TOKSİNLERİNİN İDENTİFİKASYON TESTİ

## 1. AMAÇ

Şüpheli materyalde *Clostridium oedematiens* toksinlerinin (alfa ve beta) in vivo ve in vitro olarak identifikasyonudur.

## 2. UYGULAMA ALANI

Şüpheli materyalden *Clostridium oedematiens* toksinlerinin (alfa ve beta) identifikasyonu amacıyla in vivo ve in vitro tekniklerin kullanıldığı uygulamaları kapsamaktadır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeniyle enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışırken dikkatli olunur ve OIE Manual ve WHO Laboratory Biosafety Manual esas alınarak kurallara uyulması sağlanır.

## 5. KISALTMALAR/TANIMLAR

***Clostridium oedematiens***: İnsan ve hayvanlarda gazlı gangren etkeni olan *Clostridium oedematiens*, koyun, keçi, kuzu ve oğlaklarda enfeksiyöz nekrotik hepatitis , sığırlarda basiller hemoglobinuri hastalığına neden olan anaerob bir bakteridir.

**Alfa ve beta toksin**: *Clostridium oedematiens* tipleri tarafından salgılanan protein tabiatında, letal, nekrotik, hemolitik ve lesitinolitik etkiye sahip biyolojik ürünlerdir.

***Clostridium oedematiens* alfa antitoksin**: *Clostridium oedematiens* tip A antijeni ile hiper immünize edilen koyunların pürifiye edilmemiş serumları ile hazırlanan biyolojik maddedir. *Clostridium oedematiens*'e bağlı hastalıkların kesin tanısında infekte materyallerden spesifik toksinlerin saptanması, kültürlerin identifikasyonu amacı ile toksin-serum testi gibi invivo ve hemoliz ve lesitinaz nötralizasyon testi gibi invitro yöntemlerde uygulanır.

***Clostridium oedematiens* beta antitoksin**: *Clostridium oedematiens* tip D antijeni ile hiper immünize edilen koyunların pürifiye edilmemiş serumları ile hazırlanan biyolojik maddedir. *Clostridium oedematiens* bağlı hastalıkların kesin tanısında infekte materyallerden spesifik toksinlerin saptanması, kültürlerin identifikasyonu amacı ile toksin-serum testi gibi invivo



ve hemoliz ve lesitinaz nötralizasyon testi gibi invitro yöntemlerde uygulanır.

**Eritrosit süspansiyonu:** Defibrine edilmiş, yıkanmış koyun eritrositleri ile %2-4 oranında hazırlanan süspansiyon.

**Lesitin süspansiyonu:** Bir yumurta sarısına 20 ml steril fizyolojik tuzlu su katılarak hazırlanan yumurta sarısı solüsyonu ile % 2-4 oranında hazırlanan süspansiyon.

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

*Clostridium oedematiens*'in, şüpheli materyalde (kültür filtratı, karaciğer emülsiyonu, visceral sıvı), alfa ve beta toksinlerinin, beyaz farelerde toksisite testi ile in vivo olarak; tüp hemoliz ve lesitinaz nötralizasyon ve petri kanlı agar ve yumurta sarılı agar jel diffüzyon testleri ile de invitro (kalitatif olarak ) olarak identifikasyonudur.

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1. Materyal

Karaciğer emülsiyonu, visceral sıvı, kültür filtratı

### 7.2. Kullanılan ekipman

- Santrifüj
- Laboratuvar terazisi
- 1 ml' lik insülin enjektörü
- ph metre
- Pipet (1 ml, 2ml, 5ml)
- Deney tüpleri (5 ml, 20ml)
- Burgulu kapaklı 20ml' lik cam şişe
- 0.2µm, 0.45µm ve 0.80 µm' lik filtreler

### 7.3. Kullanılan Kimyasallar

### 7.4. Kullanılan Besi yerleri

### 7.5. Numunenin Hazırlanması ve Analiz/Test/Muayene'nin Yapılması

#### 7.5.1. İn vivo Test:

Kültür, karaciğer emülsiyonu ve visceral sıvı 3500 rpm' de 20 dakika santrifüj edilir. Üstteki sıvı alınır. Testte 18-20 g. ağırlığında beyaz fareler kullanılır ve şüpheli materyalin her birinden en az iki beyaz fareye 0.2-0.3 ml miktarında arka bacak adalesi içine (intramuskuler – İ.M.) injekte edilir. Reaksiyonlar 24, 48 ve 72 saat izlenir.

**7.5.2. In vitro Test:** Bu amaçla iki test yapılır.

**Tüp hemoliz ve lesitinaz nötralizasyon test:**

Testte eritrosit süspansiyonu için iki, lesitin süspansiyonu için iki olmak üzere toplam dört tüp kullanılır. Her tüpe 0.5 ml filtrat (3500 rpm' de 20 dakika santrifüj edilecek) konur. Her tüpün üzerine 0.3 ml fizyolojik tuzlu su ilave edilir. Tüplerin ikisine 0.2 ml anti alfa antitoksin, diğer ikisine de 0.2 ml anti beta antitoksini konur. Antitoksin ilavesinden sonra tüpler çalkalanır ve 37° C' de 30 dakika bırakılır. Anti alfa ve anti beta antitoksinli tüplerden birer tanesine 1 ml eritrosit süspansiyonu, birer tanesine de lesitin süspansiyonu ilave edilir. 37°C' de iki saat ve +4°C' de bir gece bırakılır.

**Petri kanlı veya yumurta sarılı agar jel diffüzyon test:**

Testte biri tip A diğeri tip D için olmak üzere iki tüp; birer tane de kanlı ve yumurta sarılı agar besiyeri kullanılır. Kanlı ve yumurta sarılı agar besiyerlerine birbirine eşit uzaklıkta üç oyuk açılır. Her iki tüpe 0.5 ml filtrat (3500 rpm' de 20 dakika santrifüj edilecek) konur. Tüplerden birinin üzerine 0.3 ml anti alfa antitoksini, diğerine 0.3 ml anti beta antitoksini ilave edilir. Antitoksin ilavesinden sonra tüpler çalkalanır ve 37°C' de 30 dakika bırakılır.

Kanlı ve yumurta sarılı agar besiyeri petrilere açılan üç oyuktan birincisine filtrat, ikincisine filtrat+anti alfa antitoksin karışımı, üçüncüsüne de filtrat + anti beta antitoksin karışımı taşımadan konur. 37°C' de iki saat ve +4°C' de bir gece bırakılır.

**7.6. Sonuçların değerlendirilmesi:**

Kültür filtratı, karaciğer emülsiyonu ve visseral sıvı verilen faraların ölçmesi ; invitro testlerden tüp hemoliz ve lesitinaz testte anti alfa antitoksini ilave edilen tüpte nötralizasyon, anti beta antitoksini ilave edilen tüpte hemoliz veya lesitin parçalanmasının görülmesi ; yine invitro testlerden petri kanlı ve yumurta sarılı agar jel diffüzyon testte filtrat konulan oyukta hemoliz veya opalesans oluşması, filtrat + anti alfa antitoksin karışımı konulan oyukta nötralizasyon, filtrat + anti beta antitoksin karışımı konulan oyukta hemoliz veya opalesans şekillenmesi durumunda sonuç tip A' dır.

Kültür filtratı, karaciğer emülsiyonu ve visseral sıvı verilen faraların ölçmesi; invitro testlerden tüp hemoliz ve lesitinaz testte anti alfa antitoksini ilave edilen tüpte hemoliz veya lesitin parçalanması, anti beta antitoksini ilave edilen tüpte nötralizasyon görülmesi; yine invitro testlerden petri kanlı ve yumurta sarılı agar jel diffüzyon testte filtrat konulan oyukta hemoliz veya opalesans oluşması, filtrat + anti alfa antitoksin karışımı konulan oyukta hemoliz veya opalesans şekillenmesi, filtrat + anti beta antitoksin karışımı konulan oyukta nötralizasyonun oluşması durumunda sonuç tip B' dir.

Kültür filtratı, karaciğer emülsiyonu ve visseral sıvı verilen faraların sağ kalması; invitro testlerden tüp hemoliz ve lesitinaz testte anti alfa antitoksini ilave edilen tüpte hemoliz veya lesitinin parçalanması, anti beta antitoksini ilave edilen tüpte nötralizasyon görülmesi; yine invitro testlerden petri kanlı ve yumurta sarılı agar jel diffüzyon testte filtrat konulan oyukta hemoliz veya opalesans oluşması, filtrat + anti alfa antitoksin karışımı konulan oyukta hemoliz veya opalesans şekillenmesi, filtrat + anti beta antitoksin karışımı konulan oyukta nötralizasyonun oluşması durumunda sonuç tip D' dir.

## 8. İLGİLİ DOKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

- 1- **Nadas, Ü. G.** (1993) Seminer notları, Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Anaerob Laboratuvarı.
- 2- **WHO** (2004) Laboratory Biosafety Manual - Third Edition, [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_11/en/).

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

# CLOSTRIDIUM PERFRINGENS TOKSİNLERİNİN İDENTİFİKASYONU

## 1. AMAÇ

*Clostridium perfringens* toksinlerinin in vivo ve in vitro olarak identifikasyonudur.

## 2. UYGULAMA ALANI

Şüpheli materyalden *Clostridium perfringens* toksinlerinin identifikasyonu amacıyla in vivo ve in vitro tekniklerin kullanıldığı uygulamaları kapsamaktadır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeniyle enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışırken dikkatli olunur ve OIE Manual ve WHO Laboratory Biosafety Manual esas alınarak kurallara uyulması sağlanır.

## 5. KISALTMALAR/ TANIMLAR

***Clostridium perfringens***: Koyun, kuzu, keçi ve oğlaklarda sindirim sistemi hastalığı olan enteretoksemiye oluşturan anaerob karakterde bir bakteridir.

**Alfa, beta ve epsilon toksin**: *Clostridium perfringens* tipleri tarafından salgılanan protein tabiatında, letal ve nekrotik etkiye sahip biyolojik ürünlerdir.

***Clostridium perfringens* alfa antitoksin** : *Clostridium perfringens* tip A antijeni ile hiperimmunize edilen koyunların pürifiye edilmemiş serumları ile hazırlanan biyolojik maddedir. *Clostridium perfringens*'e bağlı hastalıkların kesin tanısında enfekte materyallerden spesifik toksinlerin saptanması, kültürlerin identifikasyonu amacı ile toksin-serum nötralizasyon ve intradermal nekrotik test gibi invivo yöntemlerde uygulanır

***Clostridium perfringens* beta antitoksin** : *Clostridium perfringens* tip C antijeni ile hiperimmunize edilen koyunların pürifiye edilmemiş serumları ile hazırlanan biyolojik maddedir. *Clostridium perfringens*'e bağlı hastalıkların kesin tanısında enfekte materyallerden spesifik toksinlerin saptanması, kültürlerin identifikasyonu amacı ile toksin-serum nötralizasyon ve intradermal nekrotik test gibi invivo yöntemlerde uygulanır.

***Clostridium perfringens* epsilon antitoksin** : *Clostridium perfringens* tip D antijeni ile hiperimmunize edilen koyunların pürifiye edilmemiş serumları ile hazırlanan biyolojik maddedir. *Clostridium perfringens*'e bağlı hastalıkların kesin tanısında enfekte materyallerden spesifik toksinlerin saptanması, kültürlerin identifikasyonu amacı ile toksin-serum nötralizasyon ve intradermal nekrotik test gibi invivo yöntemlerde uygulanır.

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI/PRENSİBİ

*Clostridium perfringens* olarak izole edilip, üretilen toksik kültürün veya şüpheli materyalin (ince bağırsak içeriği) beyaz farelerde ve kobaylarda identifikasyonudur.

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI:

### 7.1. Materyal

Şüpheli ince bağırsak içeriği ve izole edilen toksik kültür

### 7.2. Kullanılan Ekipman

- Santrifüj
- Laboratuvar terazisi
- 1 ml' lik insülin enjektörü
- ph metre
- Pipet (1 ml, 2ml, 5ml)
- Laboratuvar tüpleri (5 ml, 20ml)
- Burgulu kapaklı 20ml' lik cam şişe
- 0.2µm, 0.45µm ve 0.80 µm' lik filtreler

### 7.3. Kullanılan Kimyasallar ve Besiyerleri

- Tripsin
- FTS (Fizyolojik tuzlu su)
- Kanlı Agar
- Kıymalı Buyyon

### 7.4. Numunenin Hazırlanması ve Analiz/Test/Muayene'nin Yapılması

#### 7.4.1 Numunenin Hazırlanması

İnce bağırsak içeriği ve kültür 3500 devirde 20 dakika santrifüj edilir.

#### 7.4.2. Analiz/Test/Muayenenin Yapılması

**Bağırsak içeriği;** Üstteki sıvı alınır ve filtre edilir. Filtratın pH'sı nötrlenir. Her filtrat örneği için 5 tüp hazırlanır. 1. tüpe yalnız filtrat, 2. tüpe filtrat + anti alfa, 3. tüpe filtrat + anti alfa + anti beta, 4. tüpe filtrat + anti alfa + anti epsilon, 5. tüpe filtrat + anti alfa + anti beta + anti epsilon antitoksinleri konur. 2., 3., 4., ve 5. tüplere filtrat 0.6 ml, antitoksinler 0.3 ml miktarında konur. Karışımlar 37°C' de 30 – 45 dakika nötralizasyona bırakılır. Testte 18 -20 g. ağırlığında beyaz fareler kullanılır ve en az iki fareye verilmek üzere filtrattan 0.2 ml, 2. tüpten 0.3 ml, 3. ve 4. tüpten 0.4 ml, 5. tüpten 0.5 ml miktarında periton içi (veya intravenöz de uygulanabilir) injekte edilir. Fareler 24 – 48 saat izlenir.

**Toksik kültürde ;** 6 ve 24 saatlik kültürler 3500 rpm'de 20 dakika santrifüj edilir, üstteki sıvı alınır. 24 saatlik kültür filtratına % 0.1 oranında tripsin katılarak epsilon toksininin aktivasyonu için 1 saat süre ile tripsinisazyona bırakılır. Tripsinsiz 6 saatlik ve tripsinli 24 saatlik kültür filtratlarının her biri için 4 tüp hazırlanır. Tripsinsiz 6 saatlik kültür için ; 1. tüpe yalnız kültür filtratı, 2. tüpe filtrat + anti alfa, 3. tüpe filtrat + anti alfa + anti beta, 4. tüpe filtrat + anti alfa + anti beta + anti epsilon antitoksinleri konur. Tripsinli 24 saatlik kültür için; 1. tüpe yalnız kültür filtratı, 2. tüpe filtrat + anti alfa, 3. tüpe filtrat + anti alfa + anti epsilon, 4. tüpe filtrat + anti alfa + anti beta + anti epsilon antitoksinleri konur. 2., 3., ve 4. tüplere toksik filtrat 0.9 ml, antitoksinler 0.2-0.3 ml miktarında konur, karışımlar 37°C 'de 30-45 dakika nötralizasyona bırakılır. Testte 18-20 g ağırlığında beyaz fareler kullanılır ve toksik kültür filtratı ile filtrat + antitoksin karışımlarının herbirinden en az iki beyaz fareye 0.2-0.3 ml miktarında damar içine (intravenöz) injekte edilir. Fareler 24 – 48 saat izlenir.

#### 7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi

##### □ Barsak içeriği ile yapılan testin sonuçlarının değerlendirilmesi

- Yalnız filtrat alan farelerin ölmesi, diğerlerinin sağ kalması durumunda sonuç tip A'dır.
- 1.,2.,3., ve 4. tüplerle injekte edilen farelerin ölmesi, yalnız filtrat + anti alfa + anti beta + anti epsilon (5. tüp) alan farelerin sağ kalması durumunda sonuç tip B'dir.
- Filtrat, filtrat + anti alfa ile filtrat + anti alfa + anti epsilon alan farelerin ölmesi, filtrat + anti alfa + anti beta ile filtrat + anti alfa + anti beta +anti epsilon alan farelerin sağ kalması durumunda sonuç tip C' dir.
- Filtrat , filtrat + anti alfa ile filtrat + anti alfa + anti beta alan farelerin ölmesi, filtrat + anti alfa + anti epsilon ile filtrat + anti alfa + anti beta + anti epsilon alan farelerin sağ kalması durumunda sonuç tip D' dir.

## □ Toksik kültür ile yapılan testin sonuçlarının değerlendirilmesi

- Tripsinsiz 6 saatlik ve tripsinli 24 saatlik toksik filtrat alan farelerin ölmesi, diğerlerinin sağ kalması durumunda sonuç tip A'dır.
- Tripsinsiz 6 saatlik toksik filtrat ile filtrat + anti alfa ve tripsinli 24 saatlik toksik filtrat ve filtrat + anti alfa alan farelerin ölmesi, diğerlerinin sağ kalması durumunda sonuç tip B'dir.
- Tripsinsiz 6 saatlik toksik filtrat ile filtrat + anti alfa alan farelerin ölmesi, diğerlerinin sağ kalması durumunda sonuç tip C'dir.
- Tripsinsiz 6 saatlik toksik filtrat ile tripsinli 24 saatlik toksik filtrat ve filtrat + anti alfa alan farelerin ölmesi, diğerlerinin sağ kalması durumunda sonuç tip D'dir.

## 8. KAYNAKLAR/İLGİLİ DOKÜMANLAR/EKLER

- 1- **Nadas, Ü. G.** (1993) Seminer notları, Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Anaerob Laboratuvarı.
- 2- **Quinn P.J., Carter M.E., Markey B. K., Carter G.R.** (1994) Clinical Veterinary Microbiology, Mosby.
- 3- **WHO** (2004) Laboratory Biosafety Manual - Third Edition, [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_11/en/).

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

# ENTEROTOKSEMİ (ENTEROTOXEMIA)'NİN ELISA İLE TEŞHİSİ

## 1.A MAÇ

Bu test ile Enterotoksemi hastalığı etkeni olan *Clostridium perfringens* ile etkenin  $\alpha$  (alpha),  $\beta$  (beta) ve  $\epsilon$  (epsilon) toksinlerinin ELISA ile tespiti dir.

## 2. UYGULAMA ALANI

Sığır, koyun ve keçilerde Enterotoksemi'nin ELISA ile serolojik teşhisini kapsar.

### 1. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

### 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının, kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solüsyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

1. Kiti ve tüm reagentları 2-8°C'de muhafaza ediniz.
2. Tüm reagentlar kullanılmadan önce 18- 25°C'lik oda sıcaklığına getirilmelidir.
3. Tüm açıklamalar dikkatlice okunup izlenmelidir.
4. Kullanılmamış pleyt gözleri kapatılarak kapalı bir plastik torba için de 2-8°C' de saklanmalıdır.
5. Farklı serilerdeki (farklı zamanlarda üretilen) kitlerin malzemeleri ve kılavuz kitapçıkları karıştırılmamalıdır.
6. Reagentlarla çalışırken dikkatli olunmalıdır. Son kullanma tarihi geçmiş kit kullanılmamalıdır.
7. Her örnek için ayrı pipet ucu kullanılmalıdır.
8. Her pleyt'de hem negatif hem de pozitif kontrol kullanılmalıdır.
9. Substrat solüsyonunun göz, solunum sistemi ve deri üzerinde tahriş edici etkisi vardır. Deri ve gözlerle temasından kaçınılmalıdır.



10. Stop solüsyonu kuvvetli bir asit olup, yanıklara sebep olabilen  $H_2SO_4$  içerir. Dikkatli çalışılmalıdır.
11. Ağızla pipetleme yapılmamalıdır.
12. Bu kit sadece in vitro teşhis amacıyla kullanılır.
13. Kit prosedürü takip edilmelidir.

## 5. KISALTMA VE TANIMLAR

**ELISA:** Enzyme Linked Immunosorbent Assay

**Enterotoksemi:** *Clostridium perfringens*'in  $\alpha$  (alpha),  $\beta$  (beta) ve  $\epsilon$  (epsilon) toksinlerinin neden olduğu, ekonomik kayıplara yol açan hastalık

**OD :** Optik dansite

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI/PRENSİBİ

Numunede, *Clostridium perfringens* proteinlerine karşı antikorların varlığı durumunda spesifik enzim bağlı konjugatından bu antikora bağlanması ve test sonunda ilave edilen substratı parçalayarak renk oluşturması prensibine dayalıdır.

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1 Materyal

Dışkı numuneleri, *Clostridium perfringens* kültürü

### 7.2. Kullanılan Ekipman

- 100, 200  $\mu$ l' lik tek ve çok kanallı pipetler
- Yıkama şişesi
- Buzdolabı (+4 °C)
- Derin dondurucu (-20 °C)
- Santrifüj
- ELISA cihazı
- 96 gözlü kaplanmamış U tabanlı pleyt

### 7.3. Kullanılan Kimyasallar

Ticari Kitin içeriği;

□ 96 gözlü, A, C, E, G gözleri spesifik antikorla kaplı, B, D, F, H gözleri spesifik antikorla kaplı olmayan pleytler.

- A gözü: anti  $\alpha$  toksin
- B gözü: kontrol
- C gözü: anti  $\beta$  toksin
- D gözü: kontrol
- E gözü: anti  $\epsilon$  toksin
- F gözü: kontrol
- G gözü: anti *Clostridium perfringens*

□ Konjugat: 6 ml'lik;  $\alpha$  toksin(kırmızı),  $\beta$  toksin(sarı),  $\epsilon$  toksin(mavi), *Clostridium perfringens* (yeşil) renkli şişelerde.

- Dilution buffer ( $\times 5$ )
- Kontrol antijeni
- Konsantre yıkama solüsyonu (20x)
- TMB-Single component/ Kromojen tetrametilbenzidin
- Stop solüsyonu (1M fosforik asit)

#### 7.3.1. Ayraçların (Raagentların) Hazırlanması:

□ Antijen kaplı pleytler, konjugatlar, substrat solüsyonu ve stop solüsyonu kullanıma hazırdır.

□ Dilution buffer ( $\times 5$ ): Distile suyla 5 kat sulandırılarak kullanılır.

□ Kontrol antijeni: Liyofilize haldedir. 0,5 ml distile suyla sulandırıldıktan sonra kullanılır. Sulandırıldıktan sonra (-20 °C) de saklanır.

□ Konsantre yıkama solüsyonu (20x): Distile suyla 20 kat sulandırılarak kullanılır.

### 7.4. Numunelerin Hazırlanması

□ Çalışılacak numunelerin her biri eşit hacimde sulandırılmış dilution buffer ile karıştırılarak (500  $\mu$ l dışkı+500  $\mu$ l dilüsyon buffer) 10-15 dakika oda ısısında bekletilir.

□ Bu karışım kesinlikle santrifüj işlemine tabi tutulmaz. Bakteri kültüründen elde edilen süpernatant ise dilüe edilmeden doğrudan kullanılabilir.

### 7.5. Analiz/Test/Muayene'nin Yapılması

- Numunelerden 100'er µl mikropleytin birinci sütunundaki bütün gözlerle konur. İkinci sütunun bütün gözlerine 100'er µl kontrol antijeni konur.
- 1 saat oda ısısında bekletilir.
- 1 saat sonunda yıkama solüsyonuyla (20x) 3 defa yıkanır.
- A ve B gözlerine α toksini, C ve D gözlerine β toksini, E ve F gözlerine
- ε toksini, G ve H gözlerine Clostridium perfringens ilişkili konjugatı, 100'er µl konur.
- 1 saat oda ısısında bekletilir.
- İnkübasyon sonunda pleyt 3 kere yıkanır.
- Tüm gözlerle 100 µl Single component TMB (Kromojen) eklenerek 10 dakika oda ısısında üzeri kapatılmadan karanlık ortamda bekletilir.
- Tüm gözlerle 50 µl stop solüsyonu ilave edilir.

### 7.6. Sonuçların Değerlendirilmesi

Sonuçlar ELISA reader'da 450 nm de okunur.

- Yapılan testin validasyonu için pozitif kontrol antijen sırasındaki her bir toksinin OD değeri, ilgili kontrolün OD değerinden çıkarılarak kitin kalite kontrol sayfasında verilen validasyon kriterleri ile karşılaştırılır.
  - Her bir toksin için örneğin sayısal değeri aşağıdaki formüle göre hesaplanır,( Delta OD× 100)/(Delta OD)
- Örnek olarak α toksini için=(Örneğin α toksin için OD'si -Örneğin Kontrol OD'si)×100/  
(Kontrol antijeninin α toksin OD'si- Kontrol antijeninin OD'si)
- Çıkan sayısal değer kitin kalite kontrol sayfasında verilen değere göre yorumlanır.
  - Tiplendirme aşağıdaki tabloya (Tablo 1) göre yapılır.

Tablo 1: Enterotoksemi hastalığında toksin tiplendirilmesi

Tip	α toksin	β toksin	ε toksin
A	++	-	-
B	+	++	+
C	+	++	-
D	+	-	++
E	+	-	-

## 8. KAYNAKLAR/İLGİLİ DOKÜMANLAR/EKLER

1. BIO-X ENTEROTOXAEMIA (BIO K 270) Ticari kit kullanım kılavuzu
2. WHO (2004) Laboratory Biosafety Manual - Third Edition, [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_2004\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/).

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

# YANIKARA HASTALIĞI ETKENİNİN FAT İLE TEŞHİSİ

## 1. AMAÇ

Yanıkara şüpheli materyallerden Floresans Antikor Tekniği (FAT) ile *Clostridium chauvoei*'nin teşhisidir.

## 2. UYGULAMA ALANI

Şüpheli materyalden *Clostridium chauvoei*'nin direkt etken tespitine yönelik teknikler kullanılarak yapılan uygulamaları kapsamaktadır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeniyle enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışırken dikkatli olunur ve OIE Manual ve WHO Laboratory Biosafety Manual esas alınarak kurallara uyulması sağlanır.

## 5. KISALTMALAR/TANIMLAR

**Yanıkara:** Sığır ve koyunlarda gluteal bölgedeki kaslarda sıcak ağrılı, serohemorajik ve çitirtılı-ödemli lezyonların oluşması, enfeksiyon alanında derinin kararması ile şekillenen *Clostridium chauvoei*'in neden olduğu bir hastalıktır. Enfeksiyon ateşli ve akut seyirlidir.

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

Teşhis, gönderilen lezyonlu kas dokusundan, *Clostridium chauvoei*'in teşhis yöntemlerinden biri olan FAT testi ile yapılmaktadır.

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1. Materyal

Lezyonlu kas dokusu ve lezyonlu kas dokusundan hazırlanan froti

## 7.2. Kullanılan Ekipman

- Etüv
- Floresan mikroskop
- Cam petri
- Kurutma kağıdı
- Lam, lamel

## 7.3. Kullanılan Kimyasallar

**Ticari** *Clostridium chauvoei*' ye ait spesifik gamma globulin konjugatı, Phosphate Buffered Saline(PBS),

### Phosphate Buffered Saline

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> X 2 H <sub>2</sub> O	1.72 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .	0.50 g
NaCl.	7.20 g
Distile su	1000 ml
	PH: 7.2

121°C de 20 dakika otoklav edilir. Buzdolabı ısısında bir ay boyunca muhafaza edilebilir.

## 7.4. Numunenin Hazırlanması ve Analiz/Test/Muayene'nin Yapılması

Yanıkara Hastalığı şüpheli lezyonlu kas dokusu soğuk zincirde uygun koşullarda gönderilir. Lezyonlu kas dokusundan hazırlanan frotilerin oda ısısında kuruması beklenir ve ateşte tespit edilir. Preparat soğuduktan sonra Gram boyama metodu ile boyanır. Gram pozitif anaerob basiller tespit edilirse, diğer preparatlar *Clostridium chauvoei*'in spesifik gamma globulin konjugatı ile boyanır ve alt tarafına ıslak kurutma kağıdı konularak rutubetlendirilmiş petri kutularına yerleştirilir. Petrinin kapağı kapatılarak 37°C 'lik etüvde 30 dakika inkubasyona bırakılır. Petri kutusu etüvden çıkarılır. Preparat phosphate buffer saline solüsyonu ile yıkanır ve son yıkama aşamasında 5 dakika üzerinde solüsyon bekletilip dökülür. Lamalar uygun şekilde havada kurutulur, sonra 1/9 buffer-gliserin (pH 7) karışımından birer damla konularak lamelle kapatılır. Muayene için hazır duruma gelmiş olan preparat Floresan mikroskop ile incelenir. Pozitif durumda antikor-antijen birleşmesi olduğundan parlak yeşil floresan renkli *Clostridium chauvoei* mikroorganizmaları görülür.

## 8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

1. BEKAR, M., Ankara (2003) Gram Pozitif Patojen Mikroorganizmalar Genel Karakterleri ve Tanı Yöntemleri
2. KONEMAN, ELMER W., ALLEN, STEPHEN D., JANDA, WILLIAM M., SCHRECKENBERGER, PAUL C., WASHINGTON, C. WINN, JR.( 1992) Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, Fourth Edition., J.P. Lippincott Company.
3. KRİEG, N.R.(1984) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. I Williams and Wilkins Baltimore-London .
4. NADAS, Ü.G. Anaerob Hastalıklar Pendik Hayv. Hast. Araşt. Enst. Seminer Notları.
5. NADAS, Ü. G.(1993) Clostridial sporlu patojen anaerob mikroorganizmaların hayvanlarda sebep olduğu hastalıklar. Pendik Hayv. Hast. Araşt. Enst. Seminer Notları.

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

# LİSTERİOSİS'İN TEŞHİSİ

## 1. AMAÇ

Bu test ile şüpheli materyallerde, *Listeria* türü mikroorganizmaların izolasyonu ve identifikasyonudur.

## 2. UYGULAMA ALANI

Şüpheli materyallerden Listeriosis'in teşhisi yapılan bakteriyolojik teşhis uygulamalarını kapsamaktadır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeniyle enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışırken dikkatli olunur ve OIE Manual ve WHO Laboratory Biosafety Manual esas alınarak kurallara uyulması sağlanır.

## 5. KISALTMALAR/TANIMLAR

**Listeria Türü Mikroorganizmalar:** *Listeria* cinsinin *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii* ve *L. grayi* olmak üzere 6 türü vardır. *L. grayi* ve *L. ivanovii*'nin 2'ser alt türü bulunmaktadır. *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii* fare ve diğer hayvanlar için patojeniktir. Listerialar, peritrich flagellalarla hareketli, Gram pozitif, çubuk şeklinde, sporsuz ve kapsülsüz, 3-45 °C arasında üreyebilen, katalaz pozitif, indol, oksidaz ve üreaz negatif reaksiyon veren, fakültatif anaerob bakterilerdir. 25 °C'de hareketli, 37 °C'de hareketsizdirler. İnsanları, ruminantlar başta olmak üzere bir çok hayvan türünü ve kanatlıları etkileyerek, genel olarak septisemi, meningoensefalitis ve abortus klinik formlarında seyreden listeriosise sebep olmaktadır. Hayvanlarda listeriosis enfeksiyonunun etkeni çoğunlukla *L. monocytogenes*'tir. Diğer 2 patojen olan *L. ivanovii* ve *L. innocua* hayvan hastalıklarında daha az görülürler. Özellikle koyunların listeria kökenli septisemilerine % 10-15 oranında *L. ivanovii* de sebep olmaktadır. *L. seeligeri* ise insanlarda nadiren enfeksiyon yapabilir. Hayvanlara listeria etkenlerinin bulaşmasında, kontamine yemler özellikle de silaj önemlidir. Bu bakteriler topraktan, lağım sularından, çiğ meyve ve sebzelerden, çiğ ve pastörize sütlerden, çeşitli peynirlerden fermente sosislerden, deniz ürünlerinden ve silajdan



izole edilmiştir. Bu grup için de yer alan *L. monocytogenes*, son yıllarda gıdalarla bulaşan patojen bir mikroorganizma olarak gıda endüstrisinde önemli bir sorun haline gelmiştir.

**Biyokimyasal Özellik:** Bakterinin identifikasyonunda kullanılan biyokimyasal özelliklerdir.

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

Gelen materyallerden, klasik olarak *Listeria* selektif besiyerleri kullanarak ön zenginleştirme, izolasyon ve biyokimyasal testlerle identifikasyon esasına dayanır. Bu testte esas olarak, Amerika Birleşik Devletleri, Gıda ve İlaç Dairesinin (US Food and Drug Administration, (FDA), Bacteriological Analytical Manual (BAM)) kitabında açıklanan metodu alınmıştır. Diğer metotlardan kısmen yararlanılmıştır.

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1. Materyal :

Enfeksiyondan şüpheli hayvana ait iç organlar (serebral formda beyin kökü, spinal sıvı, medulla oblangata'nın çeşitli bölgeleri; abortif formda plasenta (kotiledonlar), amniyon sıvısı, fetal abomasum içeriği, septisemik formda karaciğer, böbrek, dalak) mastitiste süt ve ayrıca *Listeria* ile kontamine örnek olarak şüpheli toprak, silaj, gıda materyali vs. test materyalini oluştururlar.

**Tür :** Büyükbaş ve küçükbaş hayvanlardır.

**Teste uygunluk:** Gönderilecek materyalin mümkün olduğunca taze olması gerekmektedir.

### 7.2 Kullanılan Ekipman:

Standart laboratuvar cam malzemesi

İnkübatörler ( $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ )

Sterilizatör ( $160\pm 5^{\circ}\text{C}$ )

Su banyoları ( $35-100^{\circ}\text{C}$ 'ler arasında ayarlanabilen)

Gram boyama seti

Işık Mikroskobu

### 7.3. Kullanılan Kimyasallar, Besiyerleri ve Hazırlanışı:

Besiyerleri çeşitli firmalardan hazır olarak temin edilebileceği gibi, aşağıdaki şekilde laboratuvar da hazırlanabilir.

***Listeria* zenginleştirme sıvı besiyeri (Buffered *Listeria* Enrichment Broth)**

***Listeria* selektif zenginleştirme suplementi (*Listeria* selective enrichment supplement)**

***Listeria* selektif agar (Oxford formülasyonu)**

## Listeria Selektif Supplement (Oxford formülasyonu)

### Palcam Agar

### Palcam selektif Supplement (Bir şişede)

### Yeast Ekstraktlı Trypticase Soy Agar (TSAYE)

### Yeast Ekstraktlı Trypticase Soy Broth (TSBYE)

### Glucose Phosphate Broth (MRVP Medium)

### Listeria zenginleştirme sıvı besiyeri (Buffered Listeria Enrichment Broth)

- Triptik soya broth	30 g
- Maya ekstraktı	6 g
- Potasyum dihidrojen ortofosfat	1.35 g
- Disodyum hidrojen ortofosfat	9.6 g
- Distile su	1000 ml

Listeria zenginleştirme sıvı besiyerinden 23,5 g tartılır ve 500 ml distile suda iyice karıştırılıp çözdürülür. Otoklav sonrası pH  $7.3 \pm 0.2$  olacak şekilde kontrol edilir. Otoklavda  $121 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de 15 dakika sterilize edilir. Aseptik şartlar altında  $225 \pm 5$  ml olarak steril şişe veya erlenmayerlere taksim edilir. Son pH  $7.3 \pm 0.2$  olmalıdır.

### Listeria selektif zenginleştirme supplementi (Listeria selective enrichment supplement)

Bir şişede (Listeria zenginleştirme sıvı besiyerinin 500 ml'sine katılacak şekilde hazırlanmıştır):

- Akriflavin HCl	7.5 mg
- Nalidixic asit (sodyum tuzu)	20 mg
- Cycloheximide	25 mg

Listeria selektif zenginleştirme supplementinin bir şişesi, 2 ml steril distile suda hazırlanır ve bir şişesi Listeria zenginleştirme sıvı besiyerinin 500 ml'sine katılacak şekilde hazırlanmıştır. Numune ile birlikte karıştırılan ve 4 saat inkubasyonda tutulan Listeria zenginleştirme sıvı besiyerine hesaplanarak aseptik olarak ilave edilir. Örneğin  $225 \pm 5$  ml Listeria zenginleştirme sıvı besiyeri için, bir şişesine 2 ml distile su katılarak hazırlanan Listeria selektif zenginleştirme supplementinden 0.9 ml miktarında ilave edilir.

### Listeria selektif agar (Oxford formülasyonu)

- Columbia blood agar base	39 g
- Esculin	1.0 g
- Ferric amonyum citrat	0.5 g
- Lityum klorit	15 g
- Distile su	1000 ml konur ve pH: $7.0 \pm 0.2$ olacak şekilde ayarlanır.

### **Listeria Selektif Supplement (Oxford formülasyonu)**

Bir şişede (Listeria selektif agar temel besi yerinin 500 ml'sine katılacak şekilde hazırlanmıştır):

- Cycloheximide	200 mg
- Colistin sülfat	10 mg
- Acriflavin	2.5 mg
- Cefotetan	1 mg
- Fosfomycin	5 mg

Listeria selektif agar besiyerinden 27,75g tartılır ve 500 ml distile suda yavaşça karıştırılıp, ısıtılarak çözülür.  $121\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika sterilize edilir. Listeria Selektif Supplementin bir şişesi, 5 ml %70'lik etanol için de çözülerek,  $50^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulan besi yerine, aseptik şartlarda ilave edilir, karıştırılır ve steril petrilere dökülür.

### **Palcam Agar**

- Columbia blood agar base	39 g
- Yeast extract	3 g
- Mannitol	10 g
- Ferrik amonyum sitrat	0.5 g
- Esculin	0,8 g
- Glucose	0,5 g
- Phenol red	0,08 g
- Lityum clorür	15 g
- Distile su	1000 ml

Tartılan Palcam agar hazır besiyeri, distile su ile ısıtılarak çözülür. Otoklav sonrası pH  $7.2\pm 0.2$  olacak şekilde ayarlanır. Otoklavda  $121\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika sterilize edilir.

### **Palcam selektif Supplement (Bir şişede)**

- Polymixin B	5 mg
- Acriflavine hydrochloride	2,5 mg
- Ceftazidime	10 mg

Palcam selektif supplementin bir şişesi 1ml steril distile su ile çözülür ve  $50^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulan 500 ml Palcam besiyerine katılıp karıştırılır. Steril şartlar altında petrilere dökülür. (Supplementlerin hazır ticari formları tercih edilir.)

### Yeast Ekstraktlı Trypticase Soy Agar (TSAYE)

- Trypticase soy agar 40 g
- Yeast extract 6 g
- Distile su 1000 ml

Tartılan besiyeri içeriği distile su ile ısıtılarak çözdürülür. Otoklav sonrası pH  $7.3\pm 0.2$  olacak şekilde ayarlanır. Otoklavda  $121\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika sterilize edilir. Steril şartlar altında petrilere dökülür.

### Yeast Ekstraktlı Trypticase Soy Broth (TSBYE)

- Trypticase soy broth 30 g
- Yeast extract 6 g
- Distile su 1000 ml

Tartılan besiyeri içeriği distile su ile iyice karıştırılır ve tüplere dağıtılır. Otoklav sonrası pH  $7.3\pm 0.2$  olacak şekilde ayarlanır. Otoklavda  $121\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika sterilize edilir.

### Glucose Phosphate Broth (MRVP Medium)

- Pepton 7 g
- Glukoz 5 g
- Fosfat buffer 5 g
- Damıtık su 1000 ml

Bileşenler damıtık suda çözdürülür. Ortam pH'ı  $6.9\pm 0.2$  ye ayarlanır,  $121\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika sterilize edilir.

### Voges Proskauer Reaktifleri

#### Çözelti-1

- Alfa-naphtol 5 g
- Alkol 100 ml

#### Çözelti-2

- KOH 40 g
- Damıtık su 100  $\mu\text{l}$ 'ye tamamlanır.

Cam tüplere 5'er ml hacimlerde dağıtılır.  $121\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası pH  $6.5\pm 0.2$  olacak şekilde ayarlanır.

## Üre Agar

### Temel Besi yeri

- Peptone	1 g
- Glukoz	1 g
- Sodyum klorür	5 g
- Potasyum dihidrojen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	2 g
- Fenol red	0.012 g
- Agar	12-18 g
- Damıtık su	1000 ml

Bileşenler damıtık suda çözündürülür. Sterilizasyon sonrası pH  $6.8\pm 0.2$  olacak şekilde ayarlanır.  $121\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 20 dakika sterilize edilir.

### Üre çözeltisi

- Üre	400 g
- Damıtık su	1000 ml

Üre suda çözündürülür, filtre ile sterilize edilir ve sterilitesi kontrol edilir.

### Komple Üre Besiyeri

- Temel besi yeri	950 $\mu\text{l}$
- Üre çözeltisi	50 $\mu\text{l}$

Üre önceden eritilip  $45\pm 1^\circ\text{C}$  ye soğutulmuş temel besiyerine aseptik koşullarda ilave edilir. 10 ml aseptik şartlarda steril deney tüplerine dağıtılır ve tüplerde eğik olarak katılaştırılır.

### Nitrat broth

- Sığır ekstrakt	3 g
- Pepton	5 g
- $\text{KNO}_3$	1 g
- Damıtık su	1000 ml

Bileşenler damıtık suda çözündürülür. Deney tüplerine 5 ml hacimlerde dağıtılır.  $121\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 15 dakika otoklavlanır. Sterilizasyon sonrası pH  $7.3\pm 0.2$  olacak şekilde ayarlanır.

### Nitrit Deteksiyon Çözeltileri

#### Çözelti A

- Sulfanilik asit 1 g
- 5 N asetik asit 125 ml

#### Çözelti B

- Alfa-naftol 1 g
- 5 N asetik asit 200 ml

5 N asetik asit hazırlamak için 28.75 ml glasiyel asetik asit, 71.25 ml damıtık su ile karıştırılır. Çözeltiler koyu renkli kapaklı şişede saklanır.

### SIM Hareketlilik Medium

- Pancreatic casein 20 g
- Sığır ekstrakt 6.1 g
- Demir amonium sulfat 0.2 g
- Sodyum thiosulfat 0.2 g
- Agar 3.5 g

Bileşenler damıtık suda çözdürülür. 6 ml tüplere dağıtılır. 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası pH 7.3±0.2 olacak şekilde ayarlanır.

### Koyun Kanlı Agarı

- Koyun kanlı agar besiyeri 95 ml
- Steril koyun kanı 5 ml

Koyun kanlı agar besiyeri prospektüsüne göre hazırlanır. Kan ve kanlı agar besiyeri 45°C'de karıştırılır ve petrilere dökülür.

### Purple Carbohydrate Fermentation Broth Base

- Proteaz peptone 10 g
- Et ekstraktı 1 g
- NaCl 5 g
- Brom creasol purple 0.02 g
- Damıtık su 1000 ml

Purple broth base suya ilave edilir. Sterilizasyon sonrası pH 6.8±0.2 olacak şekilde ayarlanır.

İçin de Durham tüpü bulunan tüplere 9 ml dağıtılır.  $121\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika sterilize edilir. Karbonhidratların (esculin dışında) % 5'lik çözeltileri hazırlanır. Filtrede veya otoklavda sterilize edilir. Hazırlanan karbonhidrat çözeltilerinden 1 ml alınarak 9 ml'lik ana broth'a eklenir. Esculin ise % 0.5 olacak şekilde direk olarak ana broth'a eklenir.  $115^{\circ}\text{C}$  de 15 dakika sterilize edilir. Oda sıcaklığında jelleştiği için pipetlenmemelidir.

Karbonhidrat testleri ve biyokimyasal testler için **Vitek otomatik identifikasyon sistemi, API Listeria** gibi **hazır biyokimyasal test kitleri** kullanılabilir.

**Katalaz Testi** için % 3'lük Hidrojen peroksit çözeltisi.

#### 7.4. Numunenin Hazırlanması ve Analiz / Test / Muayenenin Yapılması

Gelen materyaller  $+4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmalıdır. Örnekler donmuş halde ise analiz edilene kadar donmuş olarak saklanmalıdır.

##### 7.4.1. Zenginleştirme Prosedürü

Gelen materyallerden (serebral formda beyin kökü, medulla oblongata'nın çeşitli bölgeleri; abort formunda plasenta, amniyon sıvısı, fetal abomasus içeriği; genel enfeksiyonda karaciğer, akciğer, böbrek, dalak; mastitiste süt ve ayrıca Listeria ile kontamine örnek olarak şüpheli toprak, silaj, gıda materyali vs.) numuneyi temsil edecek şekilde ve etkenin tespit edilebileceği yerlere de dikkat edilerek  $25\pm 1$  g veya ml numune üzerine, supplement içermeyen  $225\pm 5$  ml Listeria zenginleştirme sıvı besiyeri ilave edilir ve homojenize edilir. Numunenin yetersiz olması durumunda; mümkün olan numune miktarına (10-25 g veya ml), 9 katı miktarında Listeria zenginleştirme sıvı besiyeri ilave edilir. Homojenize edildikten sonra  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 4 saat inkübe edilir. Daha sonra akriflavin, nalidiksik asit, cycloheximide içeren Listeria selektif zenginleştirme supplementi ilave edilir ve  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de  $44\pm 2$  saat olmak üzere toplam  $48\pm 2$  saat inkübasyona bırakılır.

##### 7.4.2. İzolasyon Prosedürü

Listeria selektif zenginleştirme supplementi ilave edilmiş zenginleştirme besiyerinden, inkübasyonun yaklaşık olarak 24. ve 48. saatlerinde 0.1 ml miktarında alınarak, Listeria selektif agar (Oxford) veya Palcam Agar besi yerlerine öze ile geçilir ve petriyerler aerobik ya da mikroaerofilik koşullarda  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de  $24-48\pm 2$  saat inkübasyona bırakılır.

İnkübasyon sonrasında; Oxford agarda 2-3 mm çapında, etrafı siyah zonlu, siyahımsı çökük merkezli, siyah-kahverengi koloniler ve palcam agarda 1.5-2 mm çapında, merkezinde siyah bir çöküntü ile gri-yeşil renkte olan ve kiraz kırmızısı vasatta siyah zon veren tipik koloniler, şüpheli kabul edilerek doğrulama testlerine alınırlar.

Tipik kolonilerin belirlenmesi ve saflaştırma için *Listeria* selektif agar (Oxford) veya Palcam Agar besi yerlerindeki tipik kolonilerden en az 5 tanesi (5 veya daha fazla koloni) alınarak yeast ekstraktlı trypticase soy agara (TSAYE) sürme ekim yapılır. Plaklar  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de  $24-48\pm 2$  saat inkübe edilir. *L. monocytogenes* ve *L. ivonavii* klasik ramnoz ve ksiloz fermentasyon testi ile ayırt edilebilir.

### 7.4.3. İdentifikasyon Prosedürü

İnkübasyon süresi sonucunda üreyen mikroorganizmaların identifikasyonunu yapmak amacı ile aşağıdaki işlemler yapılır:

1. Yeast ekstraktlı trypticase soy agarda (TSAYE) üreyen tipik koloniler incelenir.
2. Tipik kolonilere katalaz testi uygulanır. *Listeria* türleri katalaz pozitifdir.
3. 16-24 saatlik koloniler, Gram boyama ile boyanırlar. Tüm *Listeria* türleri, Gram pozitif çubuklardır. Buna karşın eski kültürlerde Gram boyanma değişken olabilir ve etkenler coccoid formda görülebilir.
4. Tipik kolonileri Yeast ekstraktlı trypticase soy brotha (TSBYE) toplanarak, karbonhidrat fermentasyon testi ve diğer testler için  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de  $24\pm 2$  saat inkübe edilir. Bu kültür  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de birkaç gün saklanabilir.
5. Kalın dökülmüş ve iyice kurutulmuş % 5'lik koyun kanlı agarına dikey şekilde ızgaralar açılır. Bu ızgaraların her birine TSAYE'de üreyen ayrı bir koloni sürülür. Pozitif kontrol *L. monocytogenes* ve negatif kontrol olarak *L. innocua* kullanılır.  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de  $24-48\pm 2$  saat inkübe edilir. Parlak ışıkta incelenir. *L. monocytogenes* ve *L. seeligeri* koyun kanlı agarında hafif belirgin zonlu hemoliz oluşturur. *L. innocua* hemoliz zonu oluşturmaz. *L. ivanovii* ise çok belirgin zonlu hemoliz oluşturur. Hemoliz durumu kanlı agarın kalınlığı 5 mm'den ince olduğunda daha kolay belirlenir. Şüpheli durumlarda CAMP testi ile sonuca gidilir.
6. İstenirse nitrat redüksiyon testi yapılır. Sadece *L. grayi spp. murrayi* nitratı indirger bu sebeple test, *L. grayi spp grayi* den ayırt etmek için kullanılır. Nitrat redüksiyon testi için nitrat broth TSBYE'de üreyen kültür ile inoküle edilir.  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 5 gün inkübe edilir. 0.2 ml A çözeltisi ve 0.2 ml B çözeltisi katılır. Turuncu renk değişimi nitrit varlığını yani nitratın indirgenliğini gösterir. Eğer renk değişimi yoksa bir miktar çinko tozu eklenir ve bir saat beklenir. Turuncu renk değişimi indirgenmemiş nitratın varlığını gösterir.
7. TSBYE kültüründen SIM mediuma ekim yapılır ve 7 gün oda ısısında inkübe edilir. Günlük olarak kontrol edilir. *Listeria spp.* hareketli tipik şemsiye benzeri üreme verir. Alternatif olarak, faz kontrast mikroskopunda immersiyon yağı ile, kolonilerin lam üzerinde % 0.85'lik fizyolojik tuzlu suda, ıslak ortamda hareket muayenesi yapılır ve ince yapılı, kısa çomak şeklindeki *Listeria* bakterilerinin dönme ve yuvarlanma hareketleri incelenir. Koklar, büyük basiller ve hızlı yüzme hareketi yapan basiller *Listeria spp.* değildir.



8. Karbonhidrat fermentasyonu için TSAYE'deki tipik kolonilerden alınır ve için de Durham tüpü ve % 0.5 oranında aşağıdaki karbonhidratların bulunduğu mor renkli karbonhidrat brotha inokülasyon yapılır. Dextroz, esculin, maltoz, ramnoz, mannitol ve ksilozlu tüpler  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 7 gün inkübe edilir. Pozitif reaksiyon veren *Listeria* türleri gaz üretmeyip asit üretirler. Bütün *Listeria* türlerinde dekstroz, esculin ve maltoz pozitif olmalıdır. *L. grayi* hariç bütün *Listeria* türleri mannitol negatif olmalıdır. *Listeria* türlerinin ayrımı için test sonuçları Tablo-1'dedir.

9. Kanlı agar da hemoliz test sonuçları belirsiz ve şüpheli olduğunda, CAMP testi faydalıdır. CAMP testi için kanlı koyun agarına *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ve *Rhodococcus equi* (ATCC 6939) suşları paralel olarak sürülür. Bu çizgiye dik olarak yatay ve birbirine paralel test kültürleri sürülür. Test kültürlerinin bu kültürlerle değmemesine dikkat edilir.  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 24-48 $\pm$ 2 saat inkübe edilir ve hemoliz açısından kontrol edilir. *Listeria monocytogenes* ve *L. seeligeri* kolonilerinin hemolizleri, *S. aureus* yanında genişleme gösterirken, diğer türler hemoliz göstermezler. Sadece *L. ivanovii*, *R. equi* çizgisi yanında hemoliz gösterir.

10. Elde edilen saf izolatlar, özellikle biyokimyasal içerikli ticari kitler (Vitek, API *Listeria* ve MICRO-ID gibi) kullanılarak hızlı olarak da identifiye edilebilirler. Vitek veya Api *Listeria* kitlerinin kullanımı ile ilave olarak CAMP testine gereksinim duyulmaz.

11. İstenirse veya gerektiğinde Voges Proskauer testi yapılabilir. Voges Proskauer testi için glucose phosphate brotha (MRVP Medium) test kültüründen inoküle edilir ve  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 48 $\pm$ 2 saat inkübe edilir. İnkübasyonun sonunda steril bir tüpe bu kültürden 1 ml aktarılır, üzerine 0.2 ml % 40 KOH ve 0.6 ml alfa naftol çözeltisi ilave edilir. Birkaç creatin tanesi konur. Kırmızı bir halkanın oluşumu pozitif reaksiyonu gösterir. Tüm *Listeria* türleri (*L. denitrificans* hariç) Voges proskauer pozitifdir.

Tablo-1 *Listeria* türlerinin ayrımı

	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. ivonavi</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshmeri</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. grayi</i> spp. <i>murrayi</i>	<i>L. grayi</i> spp. <i>grayii</i>
β-hemoliz	+ <sup>d</sup>	+ <sup>c</sup>	-	-	(+)	-	-
CAMP test ( <i>S. aureus</i> )	+	-	-	-	(+)	-	-
CAMP test ( <i>Rhodococcus equi</i> )	-	+	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-	+	+
L-Ramnoz	+	-	<b>d</b>	<b>d</b>	-	<b>d</b>	-
D-Ksiloz	-	+	-	+	+	-	-
Dekstroz	+	+	+	+	+	+	+
Maltoz	+	+	+	+	+	+	+
Hareket (20 °C de)	+	+	+	+	+	+	+
Nitrat'ın indirgenmesi	-	-	-	ND	ND	+	-
Eskülin hidrolizi	+	+	+	+	+	+	+
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+
Oksidaz	-	-	-	-	-	-	-
Üre	-	-	-	-	-	-	-
İndol	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-
MR/VP	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Virulens (Fare testi)	+	+	-	-	-	-	-

**Not:** +: % 90 pozitif; -: % 90 negatif; **d**: % 11-89 pozitif, **ND**: veri yok.  
c: Genellikle geniş bir zon yapar; <sup>d</sup>: Pek az suş negatif reaksiyon gösterir. (+): Zayıf Reaksiyon

**Besi Yerlerinin Kontrolü :** Hazır olarak alınan ya da laboratuvarında hazırlanan besi yerinin, *Listeria* cinsi mikroorganizmalarını üretme kapasitesi, *Listeria monocytogenes* kontrol suşu ile test edilir. İzolasyon ve identifikasyonda kullanılan bütün besi yerlerinin sterilite kontrolü sorumlu kişi tarafından yapılır. Analiz sırasında pozitif kontrol olarak *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), negatif kontrol olarak *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) kullanılmaktadır.

## 8. İLGİLİ DOKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- 1-United States Department of Agriculture (USDA) (2006) Food Safety and Inspection Service (FSIS). Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Egg and Environmental Samples, Revision 03, *In: Microbiology Laboratory Guidebook On Line*, <http://www.fsis.usda.gov/OPHS/microlab/mlgbook.htm>, MLG 8.05 pp 1-20.
- 2-WHO (2004) Laboratory Biosafety Manual-Third Edition, [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_2004\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/).

## 9.REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni



# Sıır Bakteriyel Enfeksiyonları





# BULAŞICI SIĞIR PLEUROPNEUMONIA (CBPP)'NİN C-ELISA İLE TEŞHİSİ

## 1. AMAÇ

Test; sığır kan serumunda, Bulaşıcı Sığır Pleuropneumonisi (Contagious bovine pleuropneumonia-CBPP)'nin etkeni *Mycoplama mycoides* subspecies *mycoides* small colony (MmmSC)'ye karşı oluşan antikorların Competitive ELISA ile tespit edilmesi amacıyla yapılır.

## 2. UYGULAMA ALANI

Test, CBPP'nin serolojik teşhisi amacıyla sığır kan serumlarına uygulanır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve "OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual", esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solüsyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

1. Kiti ve tüm reagentları 2-8°C'de muhafaza ediniz.
2. Tüm reagentlar kullanılmadan önce 18- 25°C'lik oda sıcaklığına getirilmelidir.
3. Kullanılmamış pleyt gözleri kapatılarak kapalı bir plastik torba için de 2-8°C' de saklanmalıdır.
4. Farklı serilerdeki (farklı zamanlarda üretilen) kitlerin malzemeleri ve kılavuz kitapçıkları karıştırılmamalıdır.
5. Reagentlarla çalışırken dikkatli olunmalıdır. Son kullanma tarihi geçmiş kit kullanılmamalıdır.
6. Her örnek için ayrı pipet ucu kullanılmalıdır.
7. Substrat solüsyonunun göz, solunum sistemi ve deri üzerinde tahriş edici etkisi vardır. Deri ve gözlerle temasından kaçınılmalıdır.
8. Stop solüsyonu kuvvetli bir asit olup, yanıklara sebep olabilen H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içerir. Dikkatli çalışılmalıdır.

9. Ağızla pipetleme yapılmamalıdır.
10. Bu kit sadece in vitro teşhis amacıyla kullanılır.
11. Kit prosedürü takip edilmelidir.

## 5. KISALTMALAR/TANIMLAR

Testte kullanılan pleytler, kontrol serumları, konjugeyter ve diğerk kimyasal maddeler ticari kit için de hazır olarak bulunmaktadır.

## 6. TEST METODU’NUN KISA TANIMI

C-ELISA Bulaşıcı Sığır Pleoropneumonisi olgularında tarama testi olarak kullanılır.

## 7. TEST METODU’NUN TANIMI

### 7.1. Materyal

Sığır kan serumu

### 7.2. Teknik Ekipman

Etüv, mikropleyt, çok kanallı pipetler, ELISA okuyucu, su banyosu.

### 7.3. Kullanılan kimyasallar

OIE CBPP referans laboratuvarlarından (CIRAD Montpeiller/FRANCE) temin edilen C-ELISA kiti kullanılarak yapılır.

### 7.4. Testin yapılışı

Test kit protokolünde belirtilen şekilde yapılır. (Bakınız kullanılan kit prosedürü)



## 8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

- 1- Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2012) Contagious bovinepleuropneumonia.[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/CBPP.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/CBPP.pdf)
2. WHO (2004) Laboratory Biosafety Manual-Third Edition, [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_11/en/).

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

# BULAŞICI SIĞIR PLEUROPNEUMONIA (CONTAGIOUS BOVINE PLEUROPNEUMONIAE)'NİN KOMPLEMENT FİKZASYON TEST (CFT) İLE TEŞHİSİ

## 1. AMAÇ

Siğır kan serumlarında bulaşıcı siğır pleuropnömonisi (Contagious bovine pleuropneumoniae) etkeni olan *Mycoplama mycoides subspecies mycoides* SC'ye karşı oluşan antikorların saptanmasıdır.

## 2. UYGULAMA ALANI

Bulaşıcı siğır pleuropnömonisi hastalığının identifikasyonu amacıyla serolojik tekniklerin kullanıldığı uygulamaları kapsamaktadır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve “OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual”, esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solüsyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

## 5. KISALTMALAR/TANIMLAR

**Mycoplama mycoides subspecies mycoides SC:** OIE List A hastalığı olan Bulaşıcı Siğır Pleuropnömonisi'nin etkenidir.

**MmmSC:** *Mycoplama mycoides subspecies mycoides* small colony.

**CBPP:** Contagious bovine pleuropneumoniae/Bulaşıcı Siğır Pleuropnömonisi

**CFT:** Complement Fixation Test/ Komplement fikzasyon testi

**VBD:** Veronal buffer dilüent

**Komplement (C):** Sağlıklı kobay kanından elde edilen serumdur.

**MHD:** Minimum hemolitik doz

**FHD:** Full hemolitik doz

**MmmSC Antijeni:** OIE referansı Instituto Zooprofilatico Seprimentale (IZS) Terramo'dan temin edilen antijen. Titresi 1/70 dir.

**Pozitif Kontrol Serum:** OIE referansı Instituto Zooprofilatico Seprimentale (IZS) Terramo'dan temin edilen pozitif kontrol serumu. Titresi 1/320 dir.

**Negatif Kontrol Serum:** CBPP geçirmemiş hayvandan alınan kan serumu.

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

MmmSC antijeni kendi antikoru ile birleştikten sonra oluşan bu bileşik ortama katılan kompleman ile birleşerek onu bağlar. Bu testle elde MmmSC antijeni var iken serumda ona uygun antikorun varlığı araştırılır.

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1. Materyal:

Sığır kan serumu

#### 7.1.1. Kullanılan Ekipman:

- Santrifüj
- Su banyosu, 37°C ve 56°C
- Laboratuvar terazisi
- Isıtıcı manyetik karıştırıcı
- ph metre
- Pleyt okuyucu ayna
- Pipetler 1 ml, 5ml, 10 ml
- U tabanlı mikropleyt
- Mikropipetler 25 µl-50µl
- Çok kanallı mikropipetler 25 µl-50µl
- Pipetler için plastik uçlar
- Reagentlerin dilüsyonu için 5 ml 'lik cam tüpler
- Tüp taşıyıcıları (sporlar)
- Reagentlerin hazırlanması için kimyasal kalıntılardan free cam beher ve erlenler

### 7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Sodyum klorür

Barbiton

Sodyum dietil barbitürat

Magnezyum sülfat

Kalsiyum klorür

Distile su

### 7.1.3. Reagentler

MmmSC antijeni

Pozitif ve negatif kontrol serum

Komplement

%6'lık koyun eritrosit süspansiyonu

Sodyum sitrat

## 7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analiz/Test/Muayene'nin Yapılması

### 7.2.1. Eritrosit süspansiyonu

Koyun kanı aseptik koşullar altında ya hayvanın vena jugularisinden için de (%10) sodyum sitrat eriyiği bulunan (alınacak kan hacminin 1/10'u kadar) steril bir şişeye alınır. Kan ile sitrat eriyiği karışımına kadar çevirme hareketleri ile karıştırılarak pıhtılaşması önlenir. CFT için kullanılacak kan en az bir günlük olmalıdır.

### Koyun eritrositlerinin yıkanması:

Kan steril santrifüj tüplerine konur. Santrifüj edilir (3000 rpm de 10 dakika), üst sıvı dökülür, tortu VBD ile sulandırılır ve yeniden santrifüj edilir. Bu işlem üç kez tekrarlanır. Sonunda tüp dibindeki eritrosit tortusu dereceli pipetle ölçülür, %6 oranında VBD ile sulandırılır.

### 7.2.2. Amboceptor

Amboceptor, hemolitik anti- koyun eritrosit serumudur. Prezervatif olarak %0,1 sodyum azid ihtiva eder. Çalışma dilüsyonunu elde etmek için VBD ile 1/500 oranında dilüe edilir.

Tavşan hemolitik serumu veya hemolizin komplement fikzasyon testte kullanılan en önemli reagenttir. Tavşan serumu koyun kırmızı kan hücrelerine karşı antikor içerir. Tavşana koyun kırmızı kan hücrelerinin enjeksiyon yoluyla verilmesiyle elde edilir. Enjeksiyondan belli gün sonra tavşan serumu toplanır. Serum koyun kırmızı kan hücrelerine karşı antikor

içermektedir. Bu serum tavşan komplementinin inaktivasyonu için ısıtılır ve eşit miktarda gliserin ile karıştırılarak muhafaza edilir. Hemolitik sistemin hazırlanması için eşit miktarda hemolizin eşit miktarda %6 koyun eritrosit solüsyonu ile karıştırılmalıdır. Bu iki solüsyon karıştırıldıktan sonra oda ısısında inkübe edilerek hemolizinde bulunan antikorların koyun kırmızı kan hücrelerine bağlanması sağlanır. Antikorların varlığından emin olmak için hemolizin her zaman fazla kullanılmalıdır ki tüm kırmızı kan hücrelerinin yüzeyine bağlansın.

### 7.2.3. Antijen

Yeteri miktarda antijen üzerinde yazan orana göre VBD ile sulandırılarak çalışma dilüsyonu elde edilir. Yaklaşık olarak bir pleyt için 3 ml antijen dilüsyonu gereklidir. Kullanılincaya kadar +4°C'de saklanır.

### 7.2.4. Komplement:

Komplement non spesifik immun sistemde görev alır ve bazı özel görevleri yerine getirir. Komplementin en önemli fonksiyonlarından biri de özel antikorların varlığında çeşitli hücrelerin lizisidir. Bu CFT deki rolünün temelini oluşturur. En standart ve en etkili komplement kobay serumlarında bulunduğundan komplement olarak bu hayvanların taze serumu kullanılır. Kan, kobayın kalbinden uygun teknik ile ve bir hayvandan büyüklüğüne göre 4-7 ml miktarlarında alınabilir. Alınan kan steril santrifüj tüplerine konur. Buzdolabında bekletilirken pıhtının ayrılmaya başladığı görülünce steril bir cam çubuk ya da pipet ile pıhtı kenarlarından ayrılır. Bir gece buzdolabında bekletilerek pıhtının küçülmesi sağlanır. Santrifüjlenerek serum ayrılır. Birkaç kobayın serumları karıştırılarak kullanım anına kadar buzdolabında saklanır. Komplement kobaylardan test günü veya bir gün önce elde edilerek taze olarak kullanılabilceği gibi daha önceden alınmış ufak volümler halinde (-20°C de en fazla 1-2 ay titresini muhafaza eder) kullanılır. CFT komplementinin mutlaka titre edilerek kullanılması gereklidir. Titrasyonun amacı hemolitik sistemin tam hemolizinin görüldüğü en yüksek dilüsyonu saptamaktır. Komplement her testten önce mutlaka titre edilmelidir.

### Komplementin Titrasyonu

9 tüpten oluşan 3 sıra yapılıdır.

1/40 C dilüsyonunun hazırlanması:

0.5 ml komplement

3.5 ml distile su

12.0 ml VBD

Dilüsyon aşağıda gösterilmiştir:

TÜP	C 1/40	VBD	VBD
1	0.1 ml	0.4ml	1.5ml
2	0.150ml	0.350ml	1.5ml
3	0.200ml	0.300ml	1.5ml
4	0.250ml	0.250ml	1.5ml
5	0.300ml	0.200ml	1.5ml
6	0.350 µl	0.150ml	1.5ml
7	0.400ml	0.100ml	1.5ml
8	0.450ml	0.050ml	1.5ml
9	0.5ml	-	1.5ml

Bazen antijenin antikomplementer aktivitesinin derecesini sıralamada çalışma dilüsyonunda antijen ile 0.5 ml VBD yer değiştirebilir. Tüpler 37°C de su banyosunda 1 saat bekletilir. Bu süre esnasında hemolitik sistem hazırlanır. %6'lık koyun eritrositleri ve çalışma dilüsyonundaki amboseptör ayrı olarak tutulur. Her tüpe 0.5 ml amboseptör ve 0.5 ml koyun eritrositleri eklenir. Tüpler dikkatlice çalkalanır ve tekrar 30 dakika için su banyosuna konur. Tam hemoliz gösteren ilk tüp komplementin minimum hemolitik dozu (MHD,C) olarak okunur. Hemen yanındaki tüp full hemolitik dozu gösterir (FHD). Kullanılacak komplement aşağıdaki formülle hesaplanır.

$\frac{40}{2} = 80$  (1:80 olarak çevrilir)

$2 \times 0.250$

### 7.3. Testin Yapılışı:

Her bir test serumunun ve kontrol serumlarının 1/5'lik dilüsyonları yapılır. Bunun için küçük tüplere 200 µl komplement fiksasyon dilüenti (VBD) ve 50 µl serum konulur ve karıştırılır. Tüpler kontaminasyonun engellenmesi için Nescofilm veya bir benzeri ile örtülür. Test ve kontrol serumları 56°C'lik benmaride 30 dakika inaktive edilir. Yeteri miktarda antijen üzerinde yazan orana göre VBD ile sulandırılarak çalışma dilüsyonu elde edilir. Yaklaşık olarak bir pleyt için 3 ml antijen dilüsyonu gereklidir. Kobay komplementi, VBD ve steril distile su ile bir dilüsyon faktörü verilerek çalışma dilüsyonu elde edecek şekilde sulandırılır. Yaklaşık olarak bir pleyt için 3 ml komplement dilüsyonu gereklidir. Her bir test serumu ve kontrol serumları için pleytte 12 çukurluk bir set gereklidir. İlk 11 çukur serum dilüsyon serileri için, 12. çukur antikomplementer kontrol için kullanılır. Setler buna göre etiketlenir.

### **Her bir test serumu ve kontrol serumları için çift katlı dilüsyon serileri ve antikomplementer**

**kontrol hazırlanması:** Bir serum için 12 çukurluk set'in ilk 11 çukurunda 1/10'dan 1/10240'a kadar 25'er µl hacimde inaktive edilmiş serum dilüsyon serileri gereklidir. Bunun için aşağıdaki basamaklar takip edilir:

- Bir setteki 12 çukurun hepsine de 25'er µl VBD konulur.
- Koyun eritrosit süspansiyonu kontrolü için hazırlık:** Koyun eritrosit süspansiyonu kontrolü olarak etiketlenmiş 4 çukura 75'er µl VBD konulur.
- 25 µl test serumu veya kontrol serumu uygun setteki 1. çukura (çift katlı dilüsyon serisini hazırlamak için) ve 12. çukura (antikomplementer kontrol için) konulur.
- Her bir set için ayrı bir pipet ucu kullanmak üzere, birinci çukurdan başlanarak içerik pipetle üç kez çekilip boşaltılarak karıştırılır ve 2. çukura 25 µl aktarılır. Bu işlem 2. çukurdan 3. çukura, 3. çukurdan 4. çukura, 4. çukurdan 5. çukura olacak şekilde böylece devam ettirilir ve nihayet 11. çukura kadar tekrarlanır. 11. çukurdaki 25 µl fazla sıvı atılır. Böylece iki katlı test serumu ve kontrol serumu dilüsyon serileri hazırlanmış olur. Anti-komplementer kontrol olan 12. çukurun içeriği pipetle üç kez çekilip boşaltılarak karıştırılır ve 25 µl'si atılır.
- Komplementin eklenmesi:** Test ve kontrol serumlarına ait her bir setteki 12'şer çukurun tümüne 25'er µl komplement çalışma dilüsyonu ilave edilir.
- Antijenin eklenmesi:** Test ve kontrol serumlarına ait her bir setteki 12'şer çukurun ilk 11'ine 25'er µl antijen çalışma dilüsyonu ilave edilir.
- Test ve kontrol serumlarına ait her bir setteki anti-komplementer kontrol olarak kullanılan 12. çukurlara 25'er µl VBD ilave edilir.
- Pleytin kapağı kapatılır ve manuel olarak veya karıştırıcıda 20 saniye kadar karıştırılır.
- 37°C'de 30 dakika inkübe edilir.
- Hemolitik sistemin hazırlanması:** Pleyt etüve yerleştirildikten sonra hazırlamaya başlanır ve her pleyt için 3 ml gereklidir. VBD'de hazırlanmış hemolizin çalışma dilüsyonu ile yine VBD'de hazırlanmış %6 koyun eritrosit süspansiyonu eşit hacimde karıştırılır. Sensitizasyon için 30 dakika 37°C'lik benmaride inkübe edilir.
- 30 dakikalık inkübasyonun ardından etüvden alınan pleytin tüm kullanılmış çukurlarına 25'er µl sensitize edilmiş hemolitik sistem ilave edilir. Bunlara koyun eritrosit süspansiyonu kontrolü olarak etiketlenmiş 4 adet çukur da dahildir.
- Pleytin kapağı kapatılır ve 37°C'de 30 dakika arasıra çalkalanarak inkübe edilir.
- Yaklaşık olarak 600 g'de 1 dakika santrifüj edilir.
- Sonuçlar okuma aynası ile okunur. İlk olarak kontrol serumları ve kontrollere bakılır. Tüm sonuçlar kaydedilir.

#### 7.4. Sonuçların Değerlendirilmesi:

- Hemolizi derecelendirme (Lysis Score):** Her bir çukurdaki eritrositlerin % hemoliz oranı “lysis score” olarak adlandırılır. Lysis score aşağıdaki tabloya göre (Tablo 1) belirlenerek kaydedilir.

Tablo 1: Lysis score değerlendirmesi

% Hemoliz	% Komplement Fiksasyon	Lysis Score	Yorum
75-100	0-25	Negatif ya da Eseri	Negatif
50-75	25-50	1	Negatif
25-50	50-75	2	Pozitif
0-25	75-100	3	Pozitif
0	100	4	Pozitif

“Ayrıntılı titre sonucu (overall titre result)” test ve kontrol serumları için, 2 ya da daha yüksek lysis score veren ilk serum dilüsyonudur ve bu dilüsyonda pozitifliği ifade eder (örneğin 1/40’lık dilüsyonda pozitif gibi). Eğer bir test veya kontrol serumu 1/10’luk dilüsyonda 2’den küçük lysis score verirse, ayrıntılı titre sonucu “1/10’luk dilüsyonda negatif” diye yorumlanır. Elde edilen sonuçların geçerli olması için aşağıdaki koşulların gerçekleşmiş olması gereklidir:

- Pozitif ve negatif kontroller beklenen ayrıntılı titre sonucunu vermelidir.
- Komplementin antijenli ve antijensiz kontrolleri aşağıdaki gibi lysis score vermelidir.

Tablo 2: Sonuçların değerlendirilmesi

Komplementin “çalışma dilüsyonu”nun dilüsyonu	1/1	1/2	1/4	1/8
Geçerli lysis score	Negatif	Negatif, eseri veya 1	2, 3 veya 4	4

- Koyun eritrosit süspansiyonu kontrolleri 4 lysis score vermelidir.
- Eğer kontrol sonuçlarından herhangi biri beklenenin dışında ise test geçersizdir ve tekrarlanmalıdır.



### Veronal Buffer (Stok)

Sodyum klorid (NaCl)	85 g
Barbiton	5.750 g
Sodyum dietil barbitürat	3.750 g
Magnezyum sülfat	2.036 g
Kalsiyum klorid	0.294 g
Distile su	2000 ml

Barbitürik asit 100 ml distile su içerisinde benmaride kaynatılarak eritilir. Sodyum klorid, barbiton, magnezyum sülfat, kalsiyum klorid yeterli miktarda distile su ile çözündürülür. İki solüsyon karıştırılır ve hacmi distile su ile 2000 ml 'ye tamamlanır. Karışım süzülür. Solüsyonun pH'sı kontrol edilir. pH 7.3-7.4 arasında olmalıdır. Bu konsantre solüsyon küçük miktarlarda steril şişelere konarak ağzı vidalı kapaklarla kapatılır. Stok solüsyon olarak +4°C de saklanır.

Çalışma dilüsyonunun hazırlanması için; 1 kısım stok solüsyon 4 kısım distile su ile karıştırılır. Çalışma dilüsyonunun pH sı kontrol edilmelidir. pH 7.3-7.4 arasında olmalıdır. Yukarıda bahsedilen dilüent ticari olarak da temin edilebilir.

## 8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

1-O.I.E. Manual 2004

2-WHO (2004) Laboratory Biosafety Manual - Third Edition,. [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_2004\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/).

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

# BOVINE GENİTAL CAMPYLOBACTERIOSIS'İN TEŞHİSİ

## 1. AMAÇ

Sığır fötüs, boğa prepusyum ve inek vaginal yıkantılarından *Campylobacter fetus subsp. veneralis* ve *Campylobacter fetus subsp. fetus*'ün izolasyonu dur.

## 2. UYGULAMA ALANI

Bu test, Bakteriyel Teşhis Laboratuvarında Campylobacteriosis'in teşhisi amacıyla bakteriyolojik kültür yöntemlerinin kullanıldığı uygulamaları kapsamaktadır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeniyle enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışırken dikkatli olunur ve OIE Manual ve WHO Laboratory Biosafety Manual esas alınarak kurallara uyulması sağlanır.

## 5. KISALTMALAR/TANIMLAR

**Venereal Campylobacteriosis:** İneklerde infertilite, erken embriyonik ölüm ve abortlara neden olan boğa aracılığı ile genital yolla yayılan enfeksiyondur.

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

Sığır fötüsü, boğa preputium ve inek vaginal yıkantılarından yapılan bakteriyolojik muayene ile venereal campylobacteriosis'in teşhisi amaçlanır.

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1. NUMUNENİN ALINIŞI VE GÖNDERİLMESİ:

Boğalarda numune; smegma, semen ve prepusyal yıkantı alınarak gönderilir. Bunun için; **Smegma:** Semen alındıktan sonra suni vagenin 20-30ml PBS ile yıkanarak elde edilen,yıkantı olarak,

**Semen:** Steril koşullarda alınıp, PBS ile dilue edilerek, direk veya transport besi yeri ile,

**Prepusyal yıkantı:** Prepusyal kesenin 20-30ml PBS ile yıkanarak toplanması ile elde edilen yıkantı olarak, steril bir tüp için de gönderilir.

Dişilerde ise vaginal boşluğun 20-30ml PBS'le yıkanarak suni tohumlama pipetleri ile vaginal mukusun alınması ile elde edilen yıkantı steril bir tüpe konarak gönderilir.

Numuneler 4-10°C'de ışıktan korunarak direkt olarak aynı gün için de laboratuvara ulaştırılmalıdır. Aynı gün için de ulaşım sağlanamıyorsa, transport medium (Clark's, SBL, Lander's) için de 24-48 saat için de gönderilmelidir.

## 7.2. Materyal

Boğa Prepusyum yıkantısı, semen, smegma, inek vaginal yıkantısı, İnek fötüsü

## 7.3. Kullanılan ekipman

- Tüp (12ml uzunluğunda U tabanlı cam)
- Tüp spor (çelik 24 gözlü, tabanı delik)
- Beher (değişik ebatlarda 50-500ml)
- jar
- pipet
- Santrifüj (3000 devirli,soğutmalı)
- Etüv (aerobik)
- Co<sub>2</sub>'li Etüv
- Işık mikroskobu
- Lam, lamel

## 7.4. Kullanılan Kimyasallar

- Gram boyama seti

## 7.5. Kullanılan Besiyerleri

- Skirrow besi yeri ve supplementleri

## Skirrow Selektif Besiyeri Hazırlanması:

Blood agar base No.2 (Oxoid) ..... 40 g

Distile su ..... 930 ml, Ph 7.2, 121°C'de 15 dakika sterilizasyon

Defibrine koyun kanı ..... 70 ml

## Skirrow Supplement

Vancomycin .....	20 mg
Trimethoprim .....	10 mg
Polymyxin B sulphate .....	5000 IU
Cycloheximide .....	100 mg

40 gram Blood agar base No.2 (Oxoid) 930 ml Distile suda eritilinceye kadar kaynatılır. 121°C'de 15 dakika sterilizasyonu yapılır. 50°C'ye kadar soğutulan besi yerine %7-10 oranında defibrine koyun kanı ve Skirrow supplement (SR 069E ve SR084E) ve katılır. Karıştırılarak steril petrilere dağıtılır.

## 7.6. Numunenin Hazırlanması ve Analizin Yapılması

**Prepusyum yıkantısı:** 3000-3500 devirde 10 dakika santrifüj edilir. Üst sıvı atılır. Çökelti ya direk olarak veya filtre edilerek besi yerine ekilir.

**Vaginal mukus:** Vaginal mukus koyu değil ise direkt veya eşit miktarda PBS ile sulandırılarak besi yerine ekilir. Vaginal mukus koyu kıvamda ise eşit hacimdeki cysteine solüsyonu ( pH'sı 7,2 ye ayarlanmış ve filtereden geçirilmiş 100 ml'de 0,25 g lık cystein hydrochlorid) nda 15-20 dakika beklettikten sonra besi yerine ekilir.

Prepusyal yıkantı veya vaginal yıkantı ile fötustan alınan mide suyu direk, karaciğer ve dalak ise işleme tabi tutulduktan sonra skirrow besi yeri hazırlanmış olan petrilere öze yardımı ile ekilerek % 5-10 Oksijen, %5-10 CO<sub>2</sub> ve %85 N<sub>2</sub> içeren etüve veya anaerob jara konulur. Belirtilen atmosfer 3 litrelik jara BR 038B anerob kiti konularak (bunun için önce kit kenarından makasla kesilerek 10ml çeşme suyu pipet yardımı ile konur) sağlanır.

Jar kapatıldıktan sonra 37°C'lik etüvlerde 3-4 gün bekletilir. İnkubasyon süresi sonunda, petrilere üreyen kolonilerin morfolojisi incelenerek bakterinin özellikleri olan hareket muayenesi ve gram boyama ile genel karakteristiğine bakılır. Hareketli ve gram boyamada gram negatif, virgül, spiral olan bakteriler için identifikasyona gidilir. CO<sub>2</sub>'li etüvde her gün üreme kontrol edilir.

İdentifikasyonda oksidaz, katalaz testi, selenit redüksiyon testi, %1 glisin duyarlılık testi, 42°C'de üreme testi yapılır.

## 7.7. Sonuçların değerlendirilmesi:

Oksidaz ve katalaz pozitif olan, 42°C'de üremeyen, %1 lik glisinli ortamda üremeyen ve seleniti redükte etmeyenler *C. fetus subsp. venerealis*, %1 lik glisinli ortamda üreyen ve seleniti redükte edenler *C.fetus subsp. fetus* olarak ayrılır.

## 8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

1. Isenberg, H.D. (1992) Clinical Microbiology Procedures Handbook Vol.I .
2. OIE (2008) Manual of Standarts for Diagnostic Tests and Vaccines.
- 3.WHO (2004) Laboratory Biosafety Manual - Third Edition, [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_2004\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/).

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni



# Koyun-Keçi Enfeksiyonları







# CHLAMYDOPHILA ABORTUS'UN ENZİM LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) İLE TEŞHİSİ

## 1. AMAÇ

Bu test *Chlamydomphila abortus*'a karşı oluşan antikorların tespit edilmesidir.

## 2. UYGULAMA ALANI

Koyunlarda *Chlamydomphila abortus*'un serolojik teşhisini kapsar.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve "OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual", esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solüsyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

1. Kiti ve tüm reagentları 2-8°C'de muhafaza ediniz.
2. Tüm reagentlar kullanılmadan önce 18- 25°C'lik oda sıcaklığına getirilmelidir.
3. Tüm açıklamalar dikkatlice okunup izlenmelidir.
4. Kullanılmamış pleyt gözleri kapatılarak kapalı bir plastik torba için de 2-8°C' de saklanmalıdır.
5. Farklı serilerdeki (farklı zamanlarda üretilen) kitlerin malzemeleri ve kılavuz kitapçıkları karıştırılmamalıdır.
6. Reagentlarla çalışırken dikkatli olunmalıdır. Son kullanma tarihi geçmiş kit kullanılmamalıdır.
7. Her örnek için ayrı pipet ucu kullanılmalıdır.
8. Her pleyt'de hem negatif hem de pozitif kontrol kullanılmalıdır.
9. Substrat solüsyonunun göz, solunum sistemi ve deri üzerinde tahriş edici etkisi vardır. Deri ve gözlerle temasından kaçınılmalıdır.

10. Stop solüsyonu kuvvetli bir asit olup, yanıklara sebep olabilen  $H_2SO_4$  içerir. Dikkatli çalışılmalıdır.
11. Ağızla pipetleme yapılmamalıdır.
12. Bu kit sadece in vitro teşhis amacıyla kullanılır.
13. Kit prosedürü takip edilmelidir.

## 5. KISALTMALAR/TANIMLAR

**ELISA:** Enzyme Linked Immunosorbent Assay

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

Antijen kaplı pleytlere test edilecek serum ilavesi ve *Chlamydomyphila abortus* proteinlerine karşı antikorların varlığı durumunda daha sonra ilave edilecek spesifik enzim bağlı konjugatından bu antikorlara bağlanarak yıkama sonucu atılmadan pleytde kalması ve test sonunda ilave edilen substratı parçalayarak renk oluşturması prensibine dayalıdır.

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1. Materyal

Kan serumu

### 7.2. Kullanılan ekipman

- 100, 200 µl' lik tek ve çok kanallı pipetler
- ELİSA cihazı
- Yıkama şişesi
- 37°C' lik etüv
- 1,5 ml'lik ependorf tüp
- Buzdolabı (+4 °C)

### 7.3. Kullanılan Kimyasallar

- Test pleyti
- Konsantre Yıkama solüsyonu( $\times 10$ ): 1/10 oranında distile suyla dilüe edilir.
- Anti-Ruminant-IgG, monoclonal,PO-Konjugat
- Pozitif Kontrol
- Negatif Kontrol
- TMB-Substrate Solüsyon
- Stop Solüsyon TMB

#### 7.4 Numunenin Hazırlanması ve Analiz/Test/Muayene'nin Yapılması

Çalışılacak numunelerin oda sıcaklığına gelmesi beklenir.

##### 7.4.1. Test Kiti Prosedürü

- Çalışılacak serumlar ve kontrol serumları 1,5 ml'lik ependorf tüplerde dilüe edilmiş yıkama solüsyonuyla, 1/400 oranında (1200 µl Yıkama solüsyonu, 3 µl örnek ve kontrol serumlarından) sulandırılır.

-Sulandırılmış her bir serumdan 100'er µl alınarak mikropleytin gözlerine konur.

-Mikropleytin üstü kapatılarak 37°C'de 60 dakika süre ile inkübe edilir.

-3 defa Yıkama Solüsyonuyla yıkanır.

-Her göze 100 µl Anti-Ruminant-IgG, monoclonal,PO-Konjugat konarak 37°C'de 60 dakika süre ile inkübe edilir.

-3 defa Yıkama Solüsyonuyla yıkanır.

-100 µl Substrate Solüsyonu konarak 15 dk oda ısısında beklenir.

-100 µl Stop Solüsyonu eklenir.450 nm de ELISA okuyucusunda okutulur.

##### 7.5. Sonuçların Değerlendirilmesi

Testin Geçerlilik Kriterleri;

-Pozitif Kontrolün OD değeri 2 yi geçmemeli.

-Negatif Kontrolün OD değeri 0.5 i geçmemeli.

-Pozitifle, negatif kontrolün farkı >\_ 0.3

-%Değeri= [ (Örneğin OD-Negatif Kontrolün OD)/(Pozitif OD-negatif OD )]×100

-Yüzde Değeri %30 un altında ise Negatif

-Yüzde Değeri %30ile %40 arasında ise şüpheli

-Yüzde Değeri %40ve üzeri ise pozitif kabul edilir.

## 8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

1. CHEKIT Chlamydomphila Abortus Antibody Test Prosedürü.
2. WHO (2004) Laboratory Biosafety Manual - Third Edition, [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_11/en/).

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

# BULAŞICI AGALAKSİ (CONTAGIOUS AGALACTIAE)'NİN TEŞHİSİ

## 1. AMAÇ

Test; koyun ve keçi'ye ait örneklerden bulaşıcı agalaksi'nin başlıca etkeni olan *Mycoplama agalactiae*, başta olmak üzere, *M. capricolum* subsp. *capricolum*, *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. putrefaciens*'in (koyun ve keçi'ye ait örneklerden), klasik bakteriyolojik yöntemlerle izolasyonu ve identifikasyonudur.

## 2. UYGULAMA ALANI

Bulaşıcı agalaksi etkeni olan *Mycoplama agalactiae*, *M. capricolum* subsp. *capricolum*, *M. mycoides* subsp. *capri*, ve *M. putrefaciens*'in izolasyon ve identifikasyonu için yapılan bakteriyolojik teşhis uygulamalarını kapsamaktadır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeniyle enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışırken dikkatli olunur ve OIE Manual ve WHO Laboratory Biosafety Manual esas alınarak kurallara uyulması sağlanır.

## 5. KISALTMALAR/TANIMLAR

**Bulaşıcı agalaksi:** OIE tarafından B listesi hastalıkları arasında sınıflandırılan, koyun ve keçi yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara yol açan bir enfeksiyondur.

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

Test, bulaşıcı agalaksiden şüpheli koyun ve keçilere ait şüpheli materyallerden veya *Mycoplasma* izolatlarından bulaşıcı agalaksi etkenlerinin izolasyon ve identifikasyonu amacı ile yapılır.

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1. Materyal

Bulaşıcı Agalaksi'den şüpheli örnekler ve/ya bakteri kültürleri.

### 7.2. Kullanılan Ekipman

Biyogüvenlik Kabini

İnkübatör (37°C±1°C, %5 CO<sub>2</sub>)

Stereo mikroskop

Mikroskop

Santrifüj

Analitik terazi (50-0.1 mg hassasiyette)

Platin ve disposable özeler (10µl'lik)

Steril santrifüj tüpleri

Isıtıcılı manyetik karıştırıcı

Soğutmalı santrifüj (6000-17000 rpm)

Su banyosu, (37-100°C arasında ayarlanabilen)

Steril enjektör 5,10 ve 20 ml lik

ph metre

0.22µm şırınga filtresi

Steril pipetler 1 ml (0.01 bölmeli), 5 ve 10 ml (0.1 ml bölmeli)

Pipetörler (10-1000µl ölçüm aralığında ve plastik uçları)

Buzdolabı

Otoklav

Steril pens, spatül, v.b. malzemeler

Vortex

Erlen, beher, mezür v.b. standart laboratuvar cam malzemesi.

### 7.3. Kullanılan Besi Yerleri Solüsyonlar

#### Hayflik's medium (Broth)

##### A. Otoklavlanacak Kısım (12°C'de 15 dakika):

Bacto PPLO broth without crystal violet (Difco) 2,1 g

Distile su 70 ml

### **B. Membran Filtreden Geçirilecek Kısım:**

At serumu (56°C'de 30 dakika inaktive edilmiş)	20 ml
Yeast extract (%25'lik solüsyon)	10 ml
Glikoz (0,5 g/ml'lik steril solüsyon)	0,2 ml
Fenol red (%1'lik solüsyon)	0,2 ml
Thallium acetate (%0,5)	0,5 ml
Penisilin G (200.000 IU/ml)	0,25 ml

B kısmı, A kısmına aseptik olarak eklenir. Final pH 7,6 olmalıdır.

### **Hayflik's medium (Agar)**

A. Otoklavlanacak Kısım (121°C'de 15 dakika):

PPLO agar (Difco)	3,5 g
Distile su	70 ml

B. Membran Filtreden Geçirilecek Kısım:

At serumu (56°C'de 30 dakika İnaktive edilmiş)	20 ml
Yeast extract (%25'lik solüsyon)	10 ml
Glikoz (0,5 g/ml'lik steril solüsyon)	0,2 ml
Fenol red (%1'lik solüsyon)	0,2 ml
Thallium acetate (%0,5)	0,5 ml
Penisilin G (200.000 IU/ml)	0,25 ml

A kısmı otoklavdan çıktıktan sonra 50°C'ye soğuyunca, B kısmı aseptik olarak eklenir. Petri kutularına dökülür. Final pH 7,6 olmalıdır.

### **Stok thallium acetate (%5)**

5 g. Thallium acetate 100 ml distile su için de eritilir. Filtre ile sterilize edilerek +4°C de saklanır.

### **Yeast extract solüsyonu (%25)**

25 g. Yeast extract 100 ml distile su için de eritilir pH 7,6'ya ayarlanarak filtre ile sterilize edilir ve 10 ml miktarında şişelere bölünerek -20°C de saklanır.

### **Glikoz solüsyonu (%50)**

50 g. glikoz 100 ml distile su için de eritilir ve filtre ile sterilize edildikten sonra +4°C de saklanır.

### **Phenol red solüsyonu (%1)**

1 g. Fenol red 100 ml distile su için de eritilir ve filtre ile sterilize edilerek +4°C de saklanır.

## 7.4. İzolasyon

### 7.4.1. Örnek Seçimi

Seçilmesi gerekli örnekler; süt, konjunktival swab ve eklem sıvısıdır. Genç hayvanlarda lezyon varsa akciğer de örnek olarak seçilebilir. Transport medium olarak “Hayflik’s medium” içeren swablar laboratuvarından temin edilir. Eklem sıvısı steril enjektöre çekilerek alınır. Süt örnekleri steril tüplere alınır. Örneklemeden önce meme başı temizlenir, meme ucundaki ilk süt atılır. Örneklerin laboratuvara gönderimi mutlaka soğuk zincir altında yapılmalıdır.

### 7.4.2. Örneklerle Uygulanan İşlem

Swablar 2-3 ml Hayflik’s medium içine bırakılır. Eklem sıvısı ve sütler 1/10 ekim oranıyla sıvı Hayflik’s medium’a ekilir. Eklem sıvısı, süt veya swab süspansiyonunun medium için de, en az  $10^{-4}$ e kadar dilüsyonu yapılır. Dilüsyonlardan katı besiyerlerine ekimler yapılır.

### 7.4.3. Kültür

Kültürler  $37^{\circ}\text{C}$ 'de, % 5 karbondioksitli ve nemli atmosferde inkübe edilir. Sıvı kültürler, üremenin kanıtı olan renk değişikliği yönünden her gün kontrol edilir. Aşırı bulanıklık bakteriyel kontaminasyonu gösterir. Böyle kültürlerin subkültürü  $0,45\ \mu\text{m}$  por çaplı membran filtreden geçirilerek yapılır. Broth kültürlerin pasajları 1/10 inokulasyon oranı ile taze broth'lara ve öze ile agara yapılır.

Katı kültürler üremeler yönünden her 1-3 günde bir stereo mikroskop ( $\times 5-50$  büyütme) ile incelenir. Negatif durumlarda petriyeler 14 gün sonra atılır. Kolonilerin gözlenmesi durumunda koloni içeren agar kısmı blok şeklinde kesilip çıkarılarak hem sıvı hem de katı besiyerine subkültürü yapılır. Katı besiyerine pasajda, agar bloğun koloni içeren yüzü aşağıda olacak şekilde yeni besi yeri üzerine konular ve öze ile yüzeyde hareket ettirilir.

İzolatların klonlanması ve saflaştırılması, görülen her bir morfolojik tipteki kolonilerin tekrarlayan pasajları ile yapılır. Pasajlamalarda tek bir koloni kullanılır.

İzolasyonun olmadığını söylemek için broth kültürler ve bir adet ekim yapılmamış broth 3 hafta inkübe edilir.

## 7.5. İdentifikasyon

### 7.5.1. Film ve Spot Formasyonu

Eskiyen kolonilerin civarında, agar için de siyah spotlar ve yüzeyde belirgin kırışıkların oluşumu olarak tanımlanır.



### 7.5.2. Serolojik İdentifikasyon

Serolojik identifikasyon amacıyla kullanılan üreme inhibisyon testi (growth inhibition test) yapılır.

#### Üreme inhibisyon testi (Growth inhibition test)

Test yapılacak safkültürden sıvı besi yerine pasaj yapılır. 24-48 saat inkübe edilir. Süre sonunda kültürün  $10^{-3}$ 'e kadar dilüsyonu yapılır. Test için en az iki dilüsyon kullanılmalıdır ( $10^{-1}$  ve  $10^{-3}$ ). Uygun besi yeri bulunan petrilerin arkasına kalemle boydan boya düz ve birbirine paralel çizgiler çizilir. 9 cm çaplı petrilere iki-üç çizgi çizilebilir. Her bir kültür dilüsyonundan 50µL çizginin bir kenarına bırakılarak petri eğilir ve damlanın çizgi boyunca ilerlemesi sağlanır. Kuruması beklenip ekim çizgisi uzunluğunun ortasından 6 mm çaplı daire şeklinde agar parçası kesilip çıkarılır.

Bu işlem için steril pastör pipeti kullanılabilir. Oluşan çukura 30-40 µL tavşanda hazırlanmış spesifik antiserum taşırmadan konulur. Kuruması beklenip, petri ters çevrilerek 37°C'de uygun süre boyunca inkübe edilir. Süre sonunda çukur etrafında üreme inhibisyon zonu oluşması testin pozitif olduğunu gösterir.

## 8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

- 1- Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2008) Contagious agalactia. [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.07.05\\_CONTAGIOUS\\_AGALACTIA.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.05_CONTAGIOUS_AGALACTIA.pdf).
2. WHO (2004) Laboratory Biosafety Manual - Third Edition, 2004. [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_11/en/)

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

# BULAŞICI AGALAKSİ (CONTAGIOUS AGALACTIAE) 'NİN ELISA İLE TEŞHİSİ

## 1. AMAÇ

Test; koyun, keçi kan serumunda, Bulaşıcı Agalaksi etkeni *Mycoplasma agalactiae*'ye karşı oluşmuş antikorların tespit edilmesidir.

## 2. UYGULAMA ALANI

Test, Bulaşıcı Agalaksi'nin teşhisi amacıyla koyun ve keçi kan serumlarına, ticari *M. agalactiae* ELISA test kiti kullanılarak uygulanır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve "OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual", esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solüsyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

1. Kiti ve tüm reagentları 2-8°C'de muhafaza ediniz.
2. Tüm reagentlar kullanılmadan önce 18- 25°C'lik oda sıcaklığına getirilmelidir.
3. Tüm açıklamalar dikkatlice okunup izlenmelidir.
4. Kullanılmamış pleyt gözleri kapatılarak kapalı bir plastik torba için de 2-8°C' de saklanmalıdır.
5. Farklı serilerdeki (farklı zamanlarda üretilen) kitlerin malzemeleri ve kılavuz kitapçıkları karıştırılmamalıdır.
6. Reagentlarla çalışırken dikkatli olunmalıdır. Son kullanma tarihi geçmiş kit kullanılmamalıdır.
7. Her örnek için ayrı pipet ucu kullanılmalıdır.
8. Her pleyt'de hem negatif hem de pozitif kontrol kullanılmalıdır.
9. Substrat solüsyonunun göz, solunum sistemi ve deri üzerinde tahriş edici etkisi vardır. Deri ve gözlerle temasından kaçınılmalıdır.

10. Stop solüsyonu kuvvetli bir asit olup, yanıklara sebep olabilen H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içerir. Dikkatli çalışılmalıdır.
11. Ağızla pipetleme yapılmamalıdır.
12. Bu kit sadece in vitro teşhis amacıyla kullanılır.
13. Kit prosedürü takip edilmelidir.

## 5. KISALTMALAR/TANIMLAR

Testte kullanılan pleytler, kontrol serumları, konjugeytlar ve diğer kimyasal maddeler ticari kit için de hazır olarak bulunmaktadır.

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

Koyun ve keçi kan serumlarında *M.agalactiae*'ye karşı oluşan antikorları indirekt ELISA ile tespit edilmesi için uygulanır.

Test; antijen kaplı pleytlere, test edilecek koyun ve keçi kan serum örneklerinin ilavesi ve *M.agalactiae*'ye karşı oluşan antikorların varlığı durumunda daha sonra ilave edilen spesifik enzim bağlı konjugatından bu antikorlara bağlanması ve test sonunda ilave edilen substratı parçalayarak renk oluşturması prensibine dayalı bir ELISA'dır.

Testin aşağıda verilen temel basamakları ticari olarak farklı kuruluşlar tarafından üretilen bütün antikor ELISA kitlerinde aynıdır, ancak test de kullanılan örnek miktarı, test reagentlerinin kullanım konsantrasyonları ve inkübasyon süreleri bakımından farklılıklar bulunmaktadır. Bu nedenle kullanılan ELISA kitinin protokolüne uygun olarak test yapılmalıdır.

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1 Materyal

Laboratuvara teşhis amacıyla gönderilen koyun ve keçi kan serum örnekleri

### 7.2. Kullanılan Ekipman

- 37 °C etüv ve shaker veya 37 ° C' ye ayarlanabilen Orbital Shaker
- Vorteks
- 50 ve 200 µl'lik tek kanallı pipetler
- 50 ve 300 µl'lik çok kanallı pipetler
- Tek kullanımlık pipet uçları
- Disposable pipet
- Yıkama şişesi veya otomatik pleyt yıkayıcı
- ELISA okuyucu

### 7.3 Kullanılan reagentlar

- Antijen kaplı Pleyt
- Negatif Kontrol
- Pozitif Kontrol
- Konjugat
- Substrate solüsyonu
- Stop Solüsyonu
- Yıkama Solüsyonu
- Sulandırma sıvısı

### 7.4 Numunenin Hazırlanması ve Analiz/Test/Muayene'nin Yapılması

Test kullanılan kit prosedürüne göre yapılır. (Bakınız kullanılan kit prosedürü )

### 7.5. Sonuçların değerlendirilmesi

Sonuçların değerlendirilmesi kit prosedürüne göre yapılır. (Bakınız kullanılan kit prosedürü ).

## 8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

- 1- Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2012, Contagious agalactia.[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.07.05\\_CONTAGIOUS\\_AGALACTIA.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.05_CONTAGIOUS_AGALACTIA.pdf)
2. WHO Laboratory Biosafety Manual - Third Edition, 2004. [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_2004\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/).

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

# BULAŞICI AGALAKSİ (CONTAGIOUS AGALACTIAE)'NİN MOLEKÜLER TEŞHİSİ

## 1. AMAÇ

Test, koyun ve keçilerde bulaşıcı agalaksiye neden olan *Mycoplasma agalactiae*'nin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile teşhisini amaçlar.

## 2. UYGULAMA ALANI

*Mycoplasma agalactiae*'nin identifikasyonu amacıyla polimeraz zincir reaksiyonu tekniklerinin kullanıldığı uygulamaları kapsamaktadır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeniyle enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışırken dikkatli olunur ve OIE Manual ve WHO Laboratory Biosafety Manual esas alınarak kurallara uyulması sağlanır.

## 5. KISALTMALAR/TANIMLAR

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Bulaşıcı agalaksi: OIE tarafından B listesi hastalıkları arasında sınıflandırılan, koyun ve keçi yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara yol açan bir enfeksiyondur.

*Mycoplasma agalactiae*: Bulaşıcı agalaksi'nin başlıca etkenlerinden biridir.

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

Bu metot Bulaşıcı agalaksiden şüpheli koyun ve keçilere ait marazi madde veya *Mycoplasma* izolatlarının PCR testi ile teşhislerinin yapılmasında kullanılır.

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1. Materyal

Bulaşıcı agalaksiden şüpheli süt, akciğer, konjunktival swab, eklem sıvısı veya *Mycoplasma* kültürleri.

## 7.2. Kullanılan Ekipman

Analitik terazi (50-0.1 mg hassasiyette)  
Pipetler 1 ml (0.01 bölmeli), 5 ve 10 ml (0.1 ml bölmeli)  
Otomatik pipetler  
Buzdolabı  
Derin dondurucu  
Mikrodalga fırın  
Biyogüvenlik Kabini  
Steril pens, spatül, bistüri v.b. malzemeler  
Vorteks  
Mikrosantrifüj  
Benmari veya kuru blok ısıtıcı  
Pastör pipeti  
Mikrosantrifüj tüpü,  
PCR tüpü  
Thermal cycler  
Elektroforez tankı  
Güç kaynağı  
UV transillüminatör  
Fotoğraf makinesi

## 7.3 Kullanılan Kimyasallar

DNA izolasyon kiti  
PCR-grade PBS  
PCR reagentları  
Agaroz  
0,5x TBE buffer  
Ethidium bromür

## 7.4. DNA izolasyonu

### 7.4.1. Swablardan veya sıvı kültürden DNA izolasyonu

1,5 ml'lik kapaklı eppendorf tüpündeki 1 ml PCR-grade PBS için de yıkanmış swablardan veya sıvı kültürden DNA ekstrakte edilir. Süspansiyon 14.000 g'de 30 dakika süreyle santrifüj

edilir. Süpernatant bir pastör pipeti ile dikkatlice alınıp atılır. Sediment 25 µl PCR-grade su ile süspanse edilir. Tüp ve içeriği 10 dakika kaynatılır, 10 dakika buzda bekletilir ve 14.000 g'de 5 dakika santrifüjlenir. DNA süpernatantın için dedir.

#### 7.4.2. Süt veya dokudan DNA izolasyonu

Ticari DNA izolasyon kiti kullanılarak kitin talimatlarına göre yapılır.

#### 7.5. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Primerler aşağıda tabloda (Tablo 1) belirtilen dizinden oluşur

Tablo 1: *Mycoplasma agalactiae* spesifik primer dizinleri

Primer Adı	Dizin	PCR Ürün Büyüklüğü	Refer
MAPol-1F	5'-CAT'TGAACCTCTTATGTCATTTACTTTG-3'	265 bp	Marenda ve ark, 2005
MAPol-5R:	5'-CTATGTCATCAGCTTTTGGGTGA-3'		

Reaksiyon karışımı ayrı temiz bir bölgede ve yalnız bu iş için kullanılan pipetlerle hazırlanır. 50 µl'lik PCR reaksiyonu için master-mix aşağıda tabloda (Tablo 2) oluşur:

Tablo 2: PCR master-mix içeriği

Reagent	Miktar
Ultra saf su (PCR grade)	33 µl
10x PCR Buffer (15 mM MgCl <sub>2</sub> içeren)	5 µl
dATP (10 mM)	1,5 µl
dTTP (10 mM)	1,5 µl
dCTP (10 mM)	0,75 µl
dGTP (10 mM)	0,75 µl
F Primer (20 pikomol/µl)	1 µl
R Primer (20 pikomol/µl)	1 µl
Taq polimerase (5 U/µl)	0,5 µl

Her bir PCR tüpüne 45 µl reaksiyon karışımı konur. Tüpler diğer bir temiz bölgeye alınır ve her bir tüpe 5'er µl DNA örneğinin ilave edilir. Her çalışmada pozitif ve negatif (su) kontrollerle beraber çalışılmalıdır.

Tüpler thermal cycler'a yerleştirilir ve aşağıda tabloda belirtilen (Tablo 3) PCR programına tabi tutulur:

Tablo 3: PCR programı

94 °C	2 dakika	1 kez
94 °C	30 saniye	30 siklus
49 °C	30 saniye	
72 °C	30 saniye	
72 °C	5 dakika	1 kez

## 7.6. Elektroforez

Bu aşama diğer tüm aşamalardan ayrı bir oda veya bölmede yapılır.

Agaroz jel, 0,5x TBE buffer için de %2 agaroz eritilerek hazırlanır. Erimiş jele final konsantrasyonu 0,5 µg/ml olacak şekilde ethidium bromür ilave edilir ve kalıba dökülür. Jel, donmasını takiben running buffer olarak 0,5x TBE buffer içeren elektroforez tankına yerleştirilir. PCR ürünleri 6x loading buffer ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklenir. Ayrıca uygun moleküler marker da yüklenir. Elektrotlar arası mesafeye göre her bir cm'ye 5 V hesabıyla doğru akım uygulanır.

Elektroforezi takiben jel, UV transillüminatör altında gözlenir. Beklenen bant büyüklüğü 265 bp'dir. Sonuçların geçerli olabilmesi için pozitif kontrolle pozitif, negatif kontrolle negatif sonuç alınmalıdır.



## 8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

- 1- Marena, M. S., Sagne, E., Poumarat, F. & Citti, C. (2005) Suppression subtractive hybridization as a basis to assess *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* genomic diversity and species-specific sequences. Microbiology 151, 475-489.
2. WHO (2004) Laboratory Biosafety Manual - Third Edition, 2004. [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO__11/en/).

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

# BULAŞICI KEÇİ CİĞER AĞRISI (CONTAGIOUS CAPRINE PLEUROPNEUMONIAE-CCPP) 'NİN TEŞHİSİ

## 1. AMAÇ

Test; Bulaşıcı keçi ciğer ağrısı (Contagious Caprine Pleuropneumonia)'nın etkeni olan *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*'nin (Mccp) keçi dokularından, klasik bakteriyolojik yöntemlerle izolasyonu ve identifikasyonudur .

## 2. UYGULAMA ALANI

Bulaşıcı keçi ciğer ağrısı etkeni olan *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*'nin (Mccp) izolasyon ve identifikasyonu için yapılan bakteriyolojik teşhis uygulamalarını kapsamaktadır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeniyle enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışırken dikkatli olunur ve OIE Manual ve WHO Laboratory Biosafety Manual esas alınarak kurallara uyulması sağlanır.

## 5. KISALTMALAR/TANIMLAR

**Bulaşıcı Keçi Ciğer Ağrısı:** OIE tarafından B listesi hastalıkları arasında sınıflandırılan ve gösterdiği yüksek mortalite ve morbidite nedeni ile keçi yetiştiriciliğinde çok ciddi ekonomik kayıplara yol açan, keçilerin en önemli hastalıklarından biridir.

**CCPP:** Contagious bovine pleuropneumoniae

***Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* (Mccp):** Bulaşıcı keçi ciğer ağrısına neden olan mikroorganizmadır.

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

Test, CCPP'ye neden olan *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*'in keçilere ait marazi madde veya *Mycoplasma* izolatlarından izolasyonu ve identifikasyonu amacı ile yapılır.

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1. Materyal

Şüpheli keçi iç organ örnekleri ve swablar

### 7.2. Kullanılan Ekipman

Biyogüvenlik kabini

İnkübatör (37 °C±1°C, %5 CO<sub>2</sub>)

Stereo mikroskop

Mikroskop

Santrifüj

Analitik terazi (50-0.1 mg hassasiyette)

Platin ve disposable özeler (10µl'lik)

Steril santrifüj tüpleri

Isıtıcı manyetik karıştırıcı

Soğutmalı santrifüj (6000-17000 rpm)

Su banyosu, (37-100°C arasında ayarlanabilen)

Steril enjektör 5,10 ve 20 ml lik

ph metre

0.22µm şırınga filtresi

Steril pipetler 1 ml (0.01 bölmeli), 5 ve 10 ml (0.1 ml bölmeli)

Pipetörler (10-1000µl ölçüm aralığında ve plastik uçları)

Buzdolabı

Otoklav

Steril pens, spatül, v.b. malzemeler

Vorteks

Erlen, beher, mezür v.b. standart laboratuvar cam malzemesi

### 7.3. Kullanılan Besi Yerleri ve Solüsyonlar (biyokimyasal besiyerleri çıkarıldı)

#### CCPP Medium (Broth)

##### A. Otoklavlanacak Kısım (121°C'de 15 dakika):

Bacto PPLO broth without crystal violet (Difco)	21 g
Deiyonize su	700 ml

##### B. Membran Filtreden Geçirilecek Kısım:

At serumu (56°C'de 30 dakika inaktive edilmiş)	200 ml
Fresh yeast extract	100 ml
Glikoz (0,5 g/ml'lik steril solüsyon)	2 ml
Sodium pyruvate (%25'lik steril solüsyon)	8 ml

B kısmı, A kısmına aseptik olarak eklenir. 0,1 g/L ampisilin ve 250 mg/ml thallium acetate ilave edilir. Final pH 7,4-7,6 olmalıdır.

#### CCPP Medium (Agar)

##### A. Otoklavlanacak Kısım (121°C'de 15 dakika):

Bacto PPLO agar without crystal violet (Difco)	21 g
Deiyonize su	700 ml

##### B. Membran Filtreden Geçirilecek Kısım:

At serumu (56°C'de 30 dakika inaktive edilmiş)	200 ml
Fresh yeast extract	100 ml
Glikoz (0,5 g/ml'lik steril solüsyon)	2 ml
Sodium pyruvate (%25'lik steril solüsyon)	8 ml

B kısmı, A kısmına aseptik olarak eklenir. 0,1 g/L ampisilin ve 250 mg/ml thallium acetate ilave edilir. Final pH 7,4-7,6 olmalıdır.

#### Stok thallium acetate (%5)

5 g. Thallium acetate 100 ml distile su için de eritilir. Filtre ile sterilize edilerek +4 °C de saklanır.

#### Fresh yeast extract solüsyonu (%25)

250 g. (Dry Baker's yeast) 1 L. distile deiyonize suyun için de kaynama noktasına kadar karıştırılarak eritilir. Daha sonra 3500 g. de santrifüjlenir dipteki tortu atılır. pH 8.0'e ayarlanarak filtre edilir ve -20°C de saklanır.

#### Glikoz solüsyonu (%50)

50 g. glikoz 100 ml distile su için de eritilir ve filtre ile sterilize edildikten sonra +4°C de saklanır.

### **Phenol red solüsyonu (%1)**

1 g. fenol red 100 ml distile su için de eritilir ve filtre ile sterilize edilerek +4°C de saklanır.

### **Sodyum pyruvate solüsyonu (%25)**

25 g. sodyum pyruvate 100 ml distile su için de eritilir ve filtre ile sterilize edilerek +4°C de saklanır.

## **7.4. İzolasyon**

### **7.4.1. Örnek Seçimi**

Otopside seçilmesi gerekli örnekler; akciğer lezyonları, plöral sıvı ve mediastinal lenf nodlarıdır. Akciğer örnekleri konsolide ve konsolide olmamış kısımları kapsayacak şekilde alınmalıdır. Örnekler laboratuvara hemen ulaştırılmayacaksa derin dondurucuda (-20°C'de) dondurulmalıdır. Canlı hayvanlardan alınması gereken örnek derin nazal swabtır. Transport medium olarak "Thiaucourt's medium" içeren swablar laboratuvardan temin edilir. Gerek otopsi sırasında alınan gerekse canlı hayvandan alınan örneklerin laboratuvara gönderimi mutlaka soğuk şartlarda yapılmalıdır.

### **7.4.2. Örneklerle Uygulanan İşlem**

Swablar 2-3 ml Thiaucourt's medium içine bırakılır. Doku örnekleri makasla küçük parçalar halinde kesilir ve 10 ml Thiaucourt's medium'a 1 g doku ilave edilerek süspansiyon haline getirilir. Pleural sıvı, doku veya swab süspansiyonunun medium için de, en az 10-4'e kadar dilüsyonu yapılır. Dilüsyonlardan katı besiyerlerine ekimler yapılır.

### **7.4.3. Kültür**

Kültürler 37°C'de, % 5 karbondioksitli ve nemli atmosferde inkübe edilir. Sıvı kültürler, üremenin kanıtı olan renk değişikliği ve floccular materyal oluşumu yönünden her gün kontrol edilir. Aşırı bulanıklık bakteriyel kontaminasyonu gösterir. Böyle kültürlerin subkültürü 0,45 µm por çaplı membran filtreden geçirilerek yapılır. Broth kültürlerin pasajları 1/10 inokulasyon oranı ile taze broth'lara ve öze ile agara yapılır.

Katı kültürler üremeler yönünden her 1-3 günde bir stereo mikroskop (x5-50 büyütme) ile incelenir. Negatif durumlarda pleytler 14 gün sonra atılır. Kolonilerin gözlenmesi durumunda koloni içeren agar kısmı blok şeklinde kesilip çıkarılarak hem sıvı hem de katı besiyerine subkültürü yapılır. Katı besiyerine pasajda, agar bloğun koloni içeren yüzü aşağıda olacak şekilde yeni pleyt üzerine konular ve öze ile yüzeyde hareket ettirilir.

İzolatların klonlanması ve saflaştırılması, görülen her bir morfolojik tipteki kolonilerin tekrarlayan pasajları ile yapılır. Pasajlamalarda tek bir koloni kullanılır.

Mccp ilk pasajlarda; küçük, düzensiz şekilli, merkezsiz veya küçük merkezli koloniler oluşturur. Tipik “kızarmış yumurta” görünümlü koloni tekrarlayan pasajlardan sonra gözlenir. İzolasyonun olmadığını söylemek için broth kültürler ve bir adet ekim yapılmamış broth 3 hafta inkübe edilir.

## 7.5. İdentifikasyon

### 7.5.1. Üreme inhibisyon testi (Growth inhibition test)

Test yapılacak mycoplasmanın saf kültüründen sıvı besi yerine pasaj yapılır. 24-48 saat inkübe edilir. Süre sonunda kültürün  $10^{-3}$ e kadar dilüsyonu yapılır. Test için en az iki dilüsyon kullanılmalıdır ( $10^{-1}$  ve  $10^{-3}$ ).

Uygun besi yeri bulunan petri plaklarının arkasına kalemle boydan boya düz ve birbirine paralel çizgiler çizilir. 9 cm çaplı petrilere iki-üç çizgi çizilebilir. Her bir kültür dilüsyonundan 50µL çizginin bir kenarına bırakılarak petri eğilir ve damlanın çizgi boyunca ilerlemesi sağlanır. Kuruması beklenip ekim çizgisi uzunluğunun ortasından 6 mm çaplı daire şeklinde agar parçası kesilip çıkarılır. Bu işlem için steril pastör pipeti kullanılabilir. Oluşan çukura 30-40 µL *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*'ye karşı tavşanda hazırlanmış antiserum taşırmadan konulur. Kuruması beklenip, petri ters çevrilerek 37 °C'de mikroorganizma için uygun süre inkübe edilir. Süre sonunda çukur etrafında üreme inhibisyon zonunun oluşması testin pozitif olduğunu gösterir.

## 8.İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

- 1- Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2012, Contagious caprine pleuropneumonia.[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.07.06\\_CCPP.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.06_CCPP.pdf)
2. WHO Laboratory Biosafety Manual - Third Edition, 2004. [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_2004\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/). Erişim Tarihi: 22.08.2012

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

# BULAŞICI KEÇİ CİĞER AĞRISI (CONTAGIOUS CAPRINE PLEUROPNEUMONIAE)'NİN KOMPLEMENT FİKZASYON TEST (CFT) İLE TEŞHİSİ

## 1. AMAÇ

Keçi kan serumlarında bulaşıcı keçi ciğer ağrısı hastalığı etkeni olan *Mycoplasma capricolum* subspecies *capripneumoniae*'ya karşı oluşan antikorların saptanmasıdır.

## 2. UYGULAMA ALANI

Bulaşıcı sığır pleuropnömonisi hastalığının identifikasyonu amacıyla serolojik tekniklerin kullanıldığı uygulamaları kapsamaktadır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeni ile enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışılırken dikkatli olunmalı ve "OIE Manual - Laboratory Biosafety Manual", esas alınarak kurallara uyulması sağlanmalıdır.

Testlerin başından sonuna kadar kullanılan bütün malzemeler dezenfektan solüsyonlar içine toplanmalı ve otoklav edildikten sonra imha edilmelidir.

## 5. KISALTMALAR/TANIMLAR

***Mycoplasma capricolum* subspecies *capripneumoniae*:** OIE List B hastalığı olan Bulaşıcı keçi ciğer ağrısı hastalığının etkenidir.

**Mccp:** *Mycoplasma capricolum* subspecies *capripneumoniae*.

**CCPP:** Contagious caprine pleuropneumonia/ Bulaşıcı keçi ciğer ağrısı

**CFT:** Complement Fixation Test/ Komplement fikzasyon testi

**VBD:** Veronal buffer dilüent

**Komplement (C):** Sağlıklı kobay kanından elde edilen serumdur.

**MHD:** Minimum hemolitik doz

**FHD:** Full hemolitik doz

**Mccp Antijeni:** OIE referansı CIRAD'tan temin edilen antijen. Titresi 1/80'dir.

**Pozitif Kontrol Serum:** OIE referansı CIRAD'tan temin edilen pozitif kontrol serumu. Titresi 1/80 dir.

**Negatif Kontrol Serum:** CCPP geçirmemiş keçiden alınan kan serumu.

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

Mccp antijeni kendi antikoru ile birleştikten sonra oluşan bu bileşik ortama katılan komplement ile birleşerek onu bağlar. Bu testle Mccp antijenine spesifik antikor varlığı araştırılır.

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1. Materyal:

Şüpheli keçi kan serumu.

#### 7.1.1. Teknik Ekipman:

- Santrifüj
- Su banyosu, 37°C ve 63°C
- Laboratuvar terazisi
- Isıtıcılı manyetik karıştırıcı
- ph metre
- Pleyt okuyucu ayna
- Pipetler 1 ml, 5ml, 10 ml
- U tabanlı mikropleyt
- Mikropipetler 25 µl-50µl
- Çok kanallı mikropipetler 25 µl-50µl
- Pipetler için plastik uçlar
- Reagentlerin dilüsyonu için 5 ml 'lik cam tüpler
- Tüp taşıyıcıları (sporlar)
- Reagentlerin hazırlanması için kimyasal kalıntılardan free cam beher ve erlenler



### 7.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Sodyum klorür

Barbiton

Sodyum dietil barbitürat

Magnezyum sülfat

Kalsiyum klorür

Distile su

### 7.1.3. Reagentler

MmmSC antijeni

Pozitif ve negatif kontrol serum

Komplement

%6'lık koyun eritrosit süspansiyonu

Sodyum sitrat

## 7.2. Numunenin Hazırlanması ve Analiz/Test/Muayene'nin Yapılması

### 7.2.1. Eritrosit süspansiyonu

Koyun kanı aseptik koşullar altında ya hayvanın vena jugularisinden için de (%10) sodyum sitrat eriyiği bulunan (alınacak kan hacminin1/10'u kadar) steril bir şişeye alınır. Kan ile sitrat eriyiği karışınca kadar çevirme hareketleri ile karıştırılarak pıhtılaşması önlenir. CFT için kullanılacak kan en az bir günlük olmalıdır.

#### **Koyun eritrositlerinin yıkanması:**

Kan steril santrifüj tüplerine konur. Santrifüj edilir (3000 rpm de 10 dakika), üst sıvı dökülür, tortu VBD ile sulandırılır ve yeniden santrifüj edilir. Bu işlem üç kez tekrarlanır. Sonunda tüp dibindeki eritrosit tortusu dereceli pipetle ölçülür, %6 oranında VBD ile sulandırılır.

### 7.2.2.Amboceptor

Amboceptor, hemolitik anti- koyun eritrosit serumudur. Prezervatif olarak %0,1 sodyum azide içerir. Çalışma dilüsyonunu elde etmek için VBD ile 1/500 oranında dilüe edilir.

Tavşan hemolitik serumu veya hemolizin komplement fikzasyon testte kullanılan en önemli reagentir. Tavşan serumu koyun kırmızı kan hücrelerine karşı antikor içerir. Tavşana koyun kırmızı kan hücrelerinin enjeksiyon yoluyla verilmesiyle elde edilir. Enjeksiyondan belli gün sonra tavşan serumu toplanır. Serum koyun kırmızı kan hücrelerine karşı antikor içermektedir. Bu serum tavşan komplementinin inaktivasyonu için ısıtılır ve eşit miktarda

gliserin ile karıştırılarak muhafaza edilir. Hemolitik sistemin hazırlanması için eşit miktarda hemolizin eşit miktarda %6 koyun eritrosit solüsyonu ile karıştırılmalıdır. Bu iki solüsyon karıştırıldıktan sonra oda ısısında inkübe edilerek hemolizinde bulunan antikorların koyun kırmızı kan hücrelerine bağlanması sağlanır. Tüm kırmızı kan hücrelerinin yüzeyine bağlanması için hemolizin her zaman fazla kullanılmalıdır.

### 7.2.3. Antijen

Yeteri miktarda antijen üzerinde yazan orana göre VBD ile sulandırılarak çalışma dilüsyonu elde edilir. Yaklaşık olarak bir pleyt için 3 ml antijen dilüsyonu gereklidir. Kullanılınca kadar +4°C'de saklanır.

### 7.2.4. Komplement:

Komplement non-spesifik immun sistemde görev alır ve bazı özel görevleri yerine getirir. Komplementin en önemli fonksiyonlarından biri de özel antikorların varlığında çeşitli hücrelerin lizisidir. Bu CFT deki rolünün temelini oluşturur. En standart ve en etkili komplement kobay serumlarında bulunduğundan komplement olarak bu hayvanların taze serumu kullanılır. Kan, kobayın kalbinden uygun teknik ile ve bir hayvandan büyüklüğüne göre 4-7 ml miktarlarında alınabilir. Alınan kan steril santrifüj tüplerine konur. Buzdolabında bekletilirken pıhtının ayrılmaya başladığı görülünce steril bir cam çubuk ya da pipet ile pıhtı kenarlarından ayrılır. Bir gece buzdolabında bekletilerek pıhtının büzüşmesi sağlanır. Santrifüjlenerek serum ayrılır. Birkaç kobayın serumları karıştırılarak kullanım anına kadar buzdolabında saklanır. Komplement kobaylardan test günü veya bir gün önce elde edilerek taze olarak kullanılabilmesi gibi daha önceden alınmış ufak volümler halinde (-20°C de en fazla 1-2 ay titresini muhafaza eder) kullanılır. CFT komplementinin mutlaka titre edilerek kullanılması gereklidir. Titrasyonun amacı hemolitik sistemin tam hemolizinin görüldüğü yüksek dilüsyonu saptamaktır. Komplement her testten önce mutlaka titre edilmelidir.

### Komplementin Titrasyonu

9 tüpten oluşan 3 sıra yapılır.

1/40 C dilüsyonunun hazırlanması:

0.5 ml komplement

3.5 ml distile su

12.0 ml VBD

Dilüsyon aşağıda gösterilmiştir:

TÜP	C 1/40	VBD	VBD
1	0.1 ml	0.4ml	1.5ml
2	0.150ml	0.350ml	1.5ml
3	0.200ml	0.300ml	1.5ml
4	0.250ml	0.250ml	1.5ml
5	0.300ml	0.200ml	1.5ml
6	0.350 µl	0.150ml	1.5ml
7	0.400ml	0.100ml	1.5ml
8	0.450ml	0.050ml	1.5ml
9	0.5ml	-	1.5ml

Bazen antijenin antikomplementer aktivitesinin derecesini sıralamada çalışma dilüsyonunda antijen ile 0.5 ml VBD yer değiştirebilir. Tüpler 37°C de su banyosunda 1 saat bekletilir. Bu süre esnasında hemolitik sistem hazırlanır. %6'lık koyun eritrositleri ve çalışma dilüsyonundaki amboseptör ayrı olarak tutulur. Her tüpe 0.5 ml amboseptör ve 0.5 ml koyun eritrositleri eklenir. Tüpler dikkatlice çalkalanır ve tekrar 30 dakika için su banyosuna konur. Tam hemoliz gösteren ilk tüp komplementin minimum hemolitik dozu (MHD,C) olarak okunur. Hemen yanındaki tüp full hemolitik dozu gösterir (FHD). Kullanılacak komplement aşağıdaki formülle hesaplanır.

$$40 \text{ } = 80 \text{ (1:80 olarak çevrilir)}$$

$$2 * 0.250$$

### 7.3. Testin Yapılışı:

Her bir test serumunun ve kontrol serumlarının 1/5'lik dilüsyonları yapılır. Bunun için küçük tüplere 200 µl komplement fiksasyon dilüenti (VBD) ve 50 µl serum konulur ve karıştırılır. Tüpler kontaminasyonun engellenmesi için Nescofilm veya bir benzeri ile örtülür. Test ve kontrol serumları 63°C'lik benmaride 30 dakika inaktive edilir. Yeteri miktarda antijen üzerinde yazan orana göre VBD ile sulandırılarak çalışma dilüsyonu elde edilir. Yaklaşık olarak bir pleyt için 3 ml antijen dilüsyonu gereklidir. Kobay komplementi, VBD ve steril distile su ile bir dilüsyon faktörü verilerek çalışma dilüsyonu elde edecek şekilde sulandırılır. Yaklaşık olarak bir pleyt için 3 ml komplement dilüsyonu gereklidir. Her bir test serumu ve kontrol serumları için pleytte 12 çukurluk bir set gereklidir. İlk 11 çukur serum dilüsyon serileri için, 12. çukur antikomplementer kontrol için kullanılır. Setler buna göre etiketlenir.

**Her bir test serumu ve kontrol serumları için çift katlı dilüsyon serileri ve antikomplementer kontrol hazırlanması:** Bir serum için 12 çukurluk set'in ilk 11 çukurunda 1/10'dan 1/10240'a kadar 25'er µl hacimde inaktive edilmiş serum dilüsyon serileri gereklidir. Bunun için

aşağıdaki basamaklar takip edilir:

- Bir setteki 12 çukurun hepsine de 25'er µl VBD konulur.
- Koyun eritrosit süspansiyonu kontrolü için hazırlık:** Koyun eritrosit süspansiyonu kontrolü olarak etiketlenmiş 4 çukura 75'er µl VBD konulur.
- 25 µl test serumu veya kontrol serumu uygun setteki 1. çukura (çift katlı dilüsyon serisini hazırlamak için) ve 12. çukura (antikomplementer kontrol için) konulur.
- Her bir set için ayrı bir pipet ucu kullanmak üzere, birinci çukurdan başlanarak içerik pipetle üç kez çekilip boşaltılarak karıştırılır ve 2. çukura 25 µl aktarılır. Bu işlem 2. çukurdan 3. çukura, 3. çukurdan 4. çukura, 4. çukurdan 5. çukura olacak şekilde böylece devam ettirilir ve nihayet 11. çukura kadar tekrarlanır. 11. çukurdaki 25 µl fazla sıvı atılır. Böylece iki katlı test serumu ve kontrol serumu dilüsyon serileri hazırlanmış olur. Antikomplementer kontrol olan 12. çukurun içeriği pipetle üç kez çekilip boşaltılarak karıştırılır ve 25 µl'si atılır.
- Komplementin eklenmesi:** Test ve kontrol serumlarına ait her bir setteki 12'şer çukurun tümüne 25'er µl komplement çalışma dilüsyonu ilave edilir.
- Antijenin eklenmesi:** Test ve kontrol serumlarına ait her bir setteki 12'şer çukurun ilk 11'ine 25'er µl antijen çalışma dilüsyonu ilave edilir.
- Test ve kontrol serumlarına ait her bir setteki antikomplementer kontrol olarak kullanılan 12. çukurlara 25'er µl VBD ilave edilir.
- Pleytin kapağı kapatılır ve elle veya karıştırıcıda 20 saniye kadar karıştırılır.
- 37°C'de 30 dakika inkübe edilir.
- Hemolitik sistemin hazırlanması:** Pleyt etüve yerleştirildikten sonra başlanır ve her pleyt için 3 ml gereklidir. VBD'de hazırlanmış hemolizin çalışma dilüsyonu ile yine VBD'de hazırlanmış %6 koyun eritrosit süspansiyonu eşit hacimde karıştırılır. Sensitizasyon için 30 dakika 37°C'lik benmaride inkübe edilir.
- 30 dakikalık inkübasyonun ardından etüvden alınan pleytin tüm kullanılmış çukurlarına 25'er µl sensitize edilmiş hemolitik sistem ilave edilir. Bunlara koyun eritrosit süspansiyonu kontrolü olarak etiketlenmiş 4 adet çukur da dahildir.
- Pleytin kapağı kapatılır ve 37°C'de 30 dakika arasıra çalkalanarak inkübe edilir.
- Yaklaşık olarak 600 g'de 1 dakika santrifüj edilir.
- Sonuçlar okuma aynası ile okunur. İlk olarak kontrol serumları ve kontrollere bakılır. Tüm sonuçlar kaydedilir.

#### 7.4. Sonuçların Değerlendirilmesi

**Hemolizi derecelendirme (Lysis Score):** Her bir çukurdaki eritrositlerin % hemoliz oranı “lysis score” olarak adlandırılır. Lysis score aşağıdaki tabloya (Tablo 1) göre belirlenerek kaydedilir.

Tablo 1: Lysis score değerlendirmesi

% Hemoliz	% Komplement Fiksasyon	Lysis Score	Yorum
75-100	0-25	Negatif ya da Eseri	Negatif
50-75	25-50	1	Negatif
25-50	50-75	2	Pozitif
0-25	75-100	3	Pozitif
0	100	4	Pozitif

“Ayrıntılı titre sonucu (overall titre result)” test ve kontrol serumları için, 2 ya da daha yüksek lysis score veren ilk serum dilüsyonudur ve bu dilüsyonda pozitifliği ifade eder (örneğin 1/40’lık dilüsyonda pozitif gibi). Eğer bir test veya kontrol serumu 1/10’luk dilüsyonda 2’den küçük lysis score verirse, ayrıntılı titre sonucu “1/10’luk dilüsyonda negatif” diye yorumlanır. Elde edilen sonuçların geçerli olması için aşağıdaki koşulların gerçekleşmiş olması gereklidir:

- Pozitif ve negatif kontroller beklenen ayrıntılı titre sonucunu vermelidir.
- Komplementin antijenli ve antijensiz kontrolleri aşağıdaki gibi (Tablo 2) lysis score vermelidir.

Tablo 2: Sonuçların değerlendirilmesi

Komplementin “çalışma dilüsyonu”nun dilüsyonu	1/1	1/2	1/4	1/8
Geçerli lysis score	Negatif	Negatif, eseri veya 1	2, 3 veya 4	4

- Koyun eritrosit süspansiyonu kontrolleri 4 lysis score vermelidir.
- Eğer kontrol sonuçlarından herhangi biri beklenenin dışında ise test geçersizdir ve tekrarlanmalıdır.

### Veronal Buffer (Stok)

Sodyum klorid (NaCl)	85 g
Barbiton	5.750 g
Sodyum dietil barbitürat	3.750 g
Magnezyum sülfat	2.036 g
Kalsiyum klorid	0.294 g
Distile su	2000 ml

Barbitürik asit 100 ml distile su içerisinde benmaride kaynatılarak eritilir. Sodyum klorid, barbiton, magnezyum sülfat, kalsiyum klorid yeterli miktarda distile su ile çözündürülür. İki solüsyon karıştırılır ve hacmi distile su ile 2000 ml 'ye tamamlanır. Karışım süzülür. Solüsyonun pH'sı kontrol edilir. pH 7.3-7.4 arasında olmalıdır. Bu konsantre solüsyon küçük miktarlarda steril şişelere konarak ağzı vidalı kapaklarla kapatılır. Stok solüsyon olarak +4°C de saklanır.

Çalışma dilüsyonunun hazırlanması için; 1 kısım stok solüsyon 4 kısım distile su ile karıştırılır. Çalışma dilüsyonunun pH sı kontrol edilmelidir. pH 7.3-7.4 arasında olmalıdır. Yukarıda bahsedilen dilüent ticari olarak da temin edilebilir.

### 8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

- 1- Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2012) Contagious caprine pleuropneumonia. [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.07.06\\_CCP.ppt](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.06_CCP.ppt)
- 2- WHO (2004) Laboratory Biosafety Manual - Third Edition, [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_1/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_1/en/).

### 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

# BULAŞICI KEÇİ CİĞER AĞRISI (CONTAGIOUS CAPRINE PLEUROPNEUMONIA-CCPP) 'NİN MOLEKÜLER TEŞHİSİ

## 1. AMAÇ

Test, keçilerde bulaşıcı keçi ciğer ağrısına neden olan *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* (Mccp)'nin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile teşhisi amacıyla yapılır.

## 2. UYGULAMA ALANI

*Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*'nin identifikasyonu amacıyla polimeraz zincir reaksiyonu tekniklerinin kullanıldığı uygulamaları kapsamaktadır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeniyle enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışırken dikkatli olunur ve OIE Manual ve WHO Laboratory Biosafety Manual esas alınarak kurallara uyulması sağlanır.

## 5. KISALTMALAR/TANIMLAR

**Bulaşıcı Keçi Ciğer Ağrısı:** OIE tarafından B listesi hastalıkları arasında sınıflandırılan ve gösterdiği yüksek mortalite ve morbidite nedeni ile keçi yetiştiriciliğinde çok ciddi ekonomik kayıplara yol açan, keçilerin en önemli hastalıklarından biridir.

**CCPP:** Contagious caprine pleuropneumonia/ Bulaşıcı Keçi Ciğer Ağrısı

***Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*:** Bulaşıcı keçi ciğer ağrısı etkeni olan mikroorganizmadır.

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

Bu metot Bulaşıcı keçi ciğer ağrısından şüpheli keçilere ait marazi madde veya *Mycoplasma* izolatlarının PCR testi ile teşhislerinin yapılmasında kullanılır.

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1. Materyal

Bulaşıcı keçi ciğer ağrısından şüpheli akciğer, pleura sıvısı veya *Mycoplasma* kültürleri.

### 7.2. Kullanılan Ekipman

Analitik terazi (50-0.1 mg hassasiyette)

Pipetler 1 ml (0.01 bölmeli), 5 ve 10 ml (0.1 ml bölmeli)

Otomatik pipetler

Buzdolabı

Derin dondurucu

Mikrodalga fırın

Biyogüvenlik Kabini

Steril pens, spatül, bistüri v.b. malzemeler

Vorteks

Mikrosantrifüj

Benmari veya kuru blok ısıtıcı

Pastör pipeti

Mikosantrifüj tüpü,

PCR tüpü

Thermal cycler

Elektroforez tankı

Güç kaynağı

UV transillüminatör

Fotoğraf makinesi

### 7.3 Kullanılan Kimyasallar

DNA izolasyon kiti

PCR reagentları

Agaroz

0,5x TBE buffer

Ethidium bromür



## 7.4. DNA izolasyonu

### 7.4.1. Sıvı kültürden DNA izolasyonu

1,5 ml'lik kapaklı eppendorf tüpündeki 1 ml sıvı kültürden DNA ekstrakte edilir. Süspansiyon 14.000 g'de 30 dakika süreyle santrifüj edilir. Süpernatant bir pastör pipeti ile dikkatlice alınıp atılır. Sediment 25 µl PCR-grade su ile süspansiyon edilir. Tüp ve içeriği 10 dakika kaynatılır, 10 dakika buzda bekletilir ve 14.000 g'de 5 dakika santrifüjlenir. DNA süpernatantın için dedir.

### 7.4.2. Dokudan DNA izolasyonu

Ticari DNA izolasyon kiti kullanılarak kitin talimatlarına göre yapılır.

## 7.5. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Primerler aşağıda tabloda (Tablo 1) belirtilen sekanslardan oluşur:

Tablo 1: *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* spesifik primer dizinleri

Primer Adı	Dizin	PCR Ürün Büyüklüğü	Refer
Mccp-spe-F:	5'-ATCATT'TTTAATCCCTTCAAG-3'	316 bp	Woubit ve ark., 2004
Mccp-spe-R:	5'-TACTATGAGTAATTATAATATATGCAA-3'		

Reaksiyon karışımı ayrı temiz bir bölgede ve yalnız bu iş için kullanılan pipetlerle hazırlanır. 50 µl'lik PCR reaksiyonu için master-mix içeriği aşağıda tabloda (Tablo 2) belirtilmiştir.

Tablo 2: PCR master-mix içeriği

Reagent	Miktar
Ultra saf su (PCR grade)	30,3 µl
10x PCR Buffer (15 mM MgCl <sub>2</sub> içeren)	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 µl
dATP (10 mM)	1,5 µl
dTTP (10 mM)	1,5 µl
dCTP (10 mM)	0,75 µl
dGTP (10 mM)	0,75 µl
F Primer (20 pikomol/µl)	1 µl
R Primer (20 pikomol/µl)	1 µl
Taq polimerase (5 U/µl)	0,2 µl

Her bir PCR tüpüne 45 µl reaksiyon karışımı konur. Tüpler diğer bir temiz bölgeye alınır ve her bir tüpe 5'er µl DNA örneğinin ilave edilir. Her çalışmada pozitif ve negatif (su) kontrollerle beraber çalışılmalıdır.

Tüpler thermal cycler'a yerleştirilir ve aşağıda tabloda belirtilen (Tablo 3) PCR programına tabi tutulur:

Tablo 3: PCR Programı

94 °C	2 dakika	1 kez
94 °C	30 saniye	35 siklus
47 °C	15 saniye	
72 °C	15 saniye	
72 °C	5 dakika	1 kez

## 7.6. Elektroforez

Bu aşama diğer tüm aşamalardan ayrı bir oda veya bölmede yapılır.

Agaroz jel, 0,5x TBE buffer için de %2 agaroz eritilerek hazırlanır. Erimiş jele final konsantrasyonu 0,5 µg/ml olacak şekilde ethidium bromür ilave edilir ve kalıba dökülür. Jel, donmasını takiben running buffer olarak 0,5x TBE buffer içeren elektroforez tankına yerleştirilir. PCR ürünleri 6x loading buffer ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklenir. Ayrıca uygun moleküler marker da yüklenir. Elektrotlar arası mesafeye göre her bir cm'ye 5 V hesabıyla doğru akım uygulanır.

Elektroforezi takiben jel UV transillüminatör altında gözlenir. Beklenen bant büyüklüğü 316 bp'dir. Sonuçların geçerli olabilmesi için pozitif kontrolle pozitif, negatif kontrolle negatif sonuç alınmalıdır.

## 8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

- 1- Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2012) Contagious caprinepleuropneumonia [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.07.06\\_CCPP.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.06_CCPP.pdf)
- 2- WOUBIT, S., Lorenzon, S., Peyraud, A., Manso-Silvan, L. and Thiaucourt, F, A (2004) Specific PCR for the identification of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*, the causative agent of contagious caprine pleuropneumonia (CCPP), *Vet. Microbiol.*, 104, 1-2, 125-132.
3. WHO (2004) Laboratory Biosafety Manual - Third Edition, [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_11/en/).

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni



# At Enfeksiyonları





# CONTAGIOUS EQUINE METRİTİS (CEM)'İN TEŞHİSİ

## 1. AMAÇ

Contagious Equine Metritis şüpheli aygır ve kısıraklara ait ürogenital swaplardan bakteriyolojik kültür yöntemi ile *Taylorella equigenitalis*'in izolasyon ve identifikasyonudur.

## 2. UYGULAMA ALANI

Bu test metodu, aygır ve kısıraklara ait ürogenital swaplardan *T. equigenitalis*'in izolasyon ve identifikasyonu için yapılacak işlemleri kapsamaktadır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeniyle enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışırken dikkatli olunur ve OIE Manual ve WHO Laboratory Biosafety Manual esas alınarak kurallara uyulması sağlanır.

## 5. KISALTMALAR/TANIMLAR

CEM: Contagious Equine Metritis; kısıraklarda servicitis, vajinitis, endometritis ve infertilite ile karakterize çok bulaşıcı venereal bir hastalıktır.

*T. equigenitalis*: CEM hastalığının etkenidir.

MECA-A: Amphoteresinli ModifiyeEugon Chocolate Agar, *T. Equigenitalis*'in izolasyonunda kullanılan bir besi yeridir.

MECA-S: Streptomisinli ModifiyeEugon Chocolate Agar. *T. Equigenitalis*'in izolasyonunda kullanılan bir besi yeridir.

MECA-CTA: Clindamycin, Trimethoprim ve Amphoteresinli ModifiyeEugon Chocolate Agar. *T. Equigenitalis*'in izolasyonunda kullanılan bir besi yeridir.

BHI Broth: Brain Heart Infusion Broth

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

CEM teşhisi amacıyla aygır ve kısıraklara ait ürogenital swaplardan *T. Equigenitalis*'in izolasyon ve identifikasyonu

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1. Materyal

2 yaşın üstündeki kısıraklardan; klitoral fossa ve klitoral sinus ile östrus döneminde bunlara ek olarak endometrial swap örnekleri; aygırlara ile enfekte bir işletmede olan 6 aylıktan küçük dişi taylarda ise üretra, fossa üretra, penile seath swap örnekleri ve pre-ejakulatör sıvı kullanılarak uygulanır.

### 7.2. Kullanılan Ekipman

- Biyogüvenlik kabini(Class 2)
- Karbondiyoksitli etüv (37 °C)
- Etüv (37 °C)
- Buzdolabı
- Işık Mikroskobu
- Su Banyosu
- Manyetik karıştırıcı

### 7.3. Kullanılan Kimyasal maddeler

- Amphoteresin B
- Streptomisin-
- Clindamycinhydrochloride
- Trimethoprim
- Kristal viyole
- Hidrojen peroksit
- Gram Boyama Seti
- 4- nitrophenyl disodium orthophosphate
- Sodium karbonat
- Sodium bikarbonat



#### 7.4. Biyolojik Madde ve Reagentler

- Defibrine At kanı
- Lize at kanı
- Spesifik Antiserum (Monotayl)
- Oksidaz test reagenti

#### 7.5. Kullanılan Besi Yerleri

- MECA-A
- MECA-S
- MECA-CTA
- BHI Broth
- O/F Besi yeri

##### 7.5.1. Besi Yerlerinin Hazırlanışı

###### Amphoterisinli Modifiye Eugon Chocolate agar- (MECA-A)

Eugon Agar

Defibrine at kanı (%10)

Amphoterisin-B (5 mg/l)

Eugon agar'dan gerekli miktarda tartılır, sulandırılır, tamamen eridikten sonra içerisine 1µg/ml miktarında kristal viyole ilave edilir. Tamamen karıştıktan sonra 121 C'de 15 dk otoklavda sterilize edilir. Besi yeri 80 C'de su banyosuna konur.

Hazırlanan besi yerine %10 oranında defibrine at kanı iki aşamada ilave edilir. 80<sup>0</sup> C'de 10 dk süreyle zaman zaman karıştırılarak çikolata rengi oluşuncaya kadar tutulur. Süre sonunda besi yeri petri kutularına dökülebilecek sıcaklığa (40<sup>0</sup>C)kadar soğutulur. Besi yerini dökmeden önce 5mg/l oranında Amphoterisin-B katılır. 9 cm çaplı petri kutularına 25 ml olacak şekilde taksim edilir.

Sterilite Kontrolü: Petri kutuları 1 gece 37<sup>0</sup> C'lik etüve kaldırılarak kontaminasyon olup olmadığı kontrol edilir.

Serinin kullanıma uygunluğunu kontrol etmek amacıyla her seri hazırlandığında *T. equigenitalis* K188 suşu ekilerek üreme olup olmadığına göre değerlendirilir

###### Streptomisinli Modifiye Eugon Chocolate agar (MECA-S)

Eugon Agar

Defibrine at kanı (%10)

Streptomisin 200 µg/ml

Besiyeri 5.2.2.1'deki gibi hazırlanarak içine Amphoteresin yerine 200 µg/ml Streptomisin ilave edilir. Petri kutularına besi yeri dökülür.

### **Clindamycin+Trimethoprim+Amphoteresinli Modifiye Eugon Chocolate agar - (MECA-CTA)**

Eugon Agar

Defibrine at kanı (%5-10)

Hemolizisli at kanı (%5)

Amphoteresin-B (5 mg/l)

Clindamycin (5 mg/l)

Trimethoprim (1mg/l)

Besi yeri 5.4.1.deki gibi hazırlanır. İlave olarak Clindamycin ve Trimethoprim besi yerine katılır.

## **7.6. .Numunenin Hazırlanması ve Analiz/Test/Muayene'nin Yapılması**

### **7.6.1. İzolasyon**

Kısırak ve aygırlara ait ürogenital swap örnekleri OIE standartlarına göre *T. equigenitalis* izolasyonu ve identifikasyonu yapılır.

Bu amaçla her bir swap örneğinin 1/3lük kısmı ilk olarak MECA-CTA ikinci 1/3lük kısmı MECA-A ve son 1/3lük kısmı MECA-S besi yerlerinin ¼ lük kısmına sürülerek yayılır. Her bir besi yerinde öze yardımı ile 3 kez seyreltilir. Her ekimde kontrol amaçlı olarak standart *T. equigenitalis* suşları da aynı besi yerlerine ekilerek ekimlerin tamamı 37 °C'de %5-10 CO<sub>2</sub> ortamda inkubasyona bırakılır. *T. equigenitalis* en erken 72 saat için de üreme gösterir. Bu süre 14 güne kadar uzayabilir. İnkubasyon süresi sonunda smooth sarımsı gri, çapları 2-3 mm'den küçük koloniler meydana gelir. Gram boyamada gram negatif küçük kokoid çomak bazen pleomorfik bazen, bipolar görünürler.

### **7.6.2. *T. equigenitalis*'in identifikasyonu**

*T. equigenitalis* katalaz, oksidaz ve fosfataz pozitifdir. Diğer biyokimyasal yönlerden reaktif olmaması sebebiyle kesin identifikasyon standart spesifik antiserumla yapılır. Bu amaçla üreyen kolonilerden bir miktar alınıp fizyolojik tuzlu su ile homojenize edilir eşit miktarda standart serumla karıştırılır aglutinasyon görülmesi pozitif kabul edilir.

Katalaz ve oksidaz testi Clinical Microbiology Procedures Handbook Vol.I (H.D. Isenberg 1992)'e göre yapılmaktadır

Slide fosfataz testi Mackintosh(1981)'a göre yapılır.

## 8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

1. OIE Manual of Standarts for Diagnostic Tests and Vaccines, 2012.
2. Clinical Microbiology Procedures Handbook Vol.I Editör:H.D. Isenberg 1992
3. Mackintosh. M.E.(1981) Bacteriological Techniques in the Diagnosis of Equine Genital Infections. Vet. Rec. 108: 52-55.
4. WHO (2004) Laboratory Biosafety Manual - Third Edition, [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_2004\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/).

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni



# Su Hayvanı Enfeksiyonları





# ALABALIKLARDA GÖRÜLEN BAKTERİYEL BÖBREK HASTALIĞI (BACTERIAL KIDNEY DISEASE)'NİN TEŞHİSİ

## 1. AMAÇ

Alabalıklarda görülen bakteriyel böbrek hastalığının teşhisi amacıyla etken *Renibacterium salmoninarum*'un izolasyonu ve identifikasyonudur.

## 2. UYGULAMA ALANI

Şüpheli Alabalık numunelerinde bakteriyel böbrek hastalığının teşhisi için gerçekleştirilen bakteriyolojik uygulamaları kapsamaktadır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeniyle enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışırken dikkatli olunur ve OIE Manual ve WHO Laboratory Biosafety Manual esas alınarak kurallara uyulması sağlanır.

## 5. TANIMLAR/KISALTMALAR

**Bakteriyel Böbrek Hastalığı (BKD) :** *Renibacterium salmoninarum*' un neden olduğu, gökkuşuğu alabalıklarında vücut yüzeyinde irinli kabarcıklar ile ülserlerin oluşması ve böbreklerin dejenerasyonu ile karakterize kronik ve bulaşıcı bakteriyel bir hastalıktır.

***Renibacterium salmoninarum*:** Etken Gram-pozitif kokobasil bir bakteri olup, balık dışında hızla ölür. Sporsuz, kapsüllü ve hareketsiz olan bakteri 0.3-0.5 mikron boyutlarındadır. Aside dirençli değildir.

**Gökkuşuğu alabalığı (Rainbow trout):** *Oncorhynchus mykiss* tatlı sularda yaşayan ve ülkemizde yaygın olarak kültürü yapılan bir alabalık türüdür

**Kolemik sıvı:** Anaçlardan alınan ovaryum sıvısı.

***Renibacterium salmoninarum* standart suşu:** ATCC 33209

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

Hastalık teşhisi için gönderilen alabalıkların otopsileri yapıldıktan sonra iç organlardan (karaciğer, dalak, böbrek) Kanlı Agar, KDM2 medium ve SKDM medium'a bir öze veya steril swab yardımı ile aseptik olarak ekim yapılır. Böbrek örnekleri her bir kafes için gruplanarak, 120 sn. boyunca stomacher'de FTS içerisinde homojenize edildikten sonra da KDM2 ve SKDM'ye ekim yapılabilir. 15°C' de (20 gün, Austin) 3-6 hafta boyunca koloni gelişimi için etüvde bekletilir. Daha sonra beyaz ya da krem renkli, parlak, düz, yuvarlak, 2 mm çapında kolonilerden Gram boyama yapılır. Gram (+) pozitif, hareketsiz, ikili kokobasil olarak görülen kolonilerden biyokimyasal testlere ve enzim analizlerine geçilerek identifikasyon yapılır.

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1. Materyal

BKD hastalığının laboratuvar teşhisinde hastalığın görüldüğü havuz ya da kafeslerden alınan 6 cm den küçük balıkların tamamı, daha büyüklerin balıkların iç organları ve damızlıkların yumurtaları ile ovaryum sıvıları kullanılır.

### 7.2. Kullanılan Ekipman

Level 2 düzeyinde laboratuvar ekipmanı kullanılır (\*).

### 7.3. Kullanılan Kimyasallar

KDM2 (Kidney Disease Medium 2) (34)

SKDM (Selective Kidney Disease Medium) (35)

DNAz Besi Yeri (36)

Kanlı Agar (1)

Jelatin eritme besi yeri (10)

### 7.4. Numunenin Hazırlanması ve Muayene/Analizin Yapılması

Balık nekropsisi prosedürüne uygun olarak yapılır (Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Teşhiste Metot Birliği, 2013). Hastalık teşhisi için gönderilen alabalıkların otopsileri yapıldıktan sonra iç organlarından (dalak, böbrek, karaciğer) Kanlı Agar, KDM2 medium ve SKDM medium'a bir öze veya steril swab yardımı ile aseptik olarak ekim yapılır. Çok sayıda balığın söz konusu olduğu survey çalışmalarında birden fazla örnek bir araya getirilerek havuz oluşturulup homojenize edildikten sonra ekimler buradan yapılır İç organ örnekleri, ovaryum sıvıları ve böbrek örnekleri her bir kafes için gruplanarak, 120 sn. boyunca stomacher'de FTS içerisinde homojenize edildikten sonra da KDM2 ve SKDM'ye ekim yapılabilir. 15°C'



de (20 gün, Austin) 3-6 hafta koloni gelişimi için etüvde bekletilir. Daha sonra beyaz ya da krem renkli, parlak, düz, yuvarlak, 2 mm çapında kolonilerden Gram boyama yapılır. Gram (+) pozitif, hareketsiz, ikili basil olan biyokimyasal testlere ve enzim analizlerine geçilerek identifikasyon yapılır.

#### 7.4.1. İdentifikasyon

Klasik kültürel yöntemler kullanılarak (DNAz TESTİ (24) ,Gram boyama (1) , Katalaz test metodu (2), Oksidaz test metodu (3), Jelatin eritme testi (4), Hemoliz testi (6) ve Hareket testi (7) yönteme uygun olarak yapılır. İdentifikasyon teorik olarak mümkün olsa da yavaş üreyen bir bakteri olduğu için pratik değildir. Bu nedenle identifikasyonda FAT ve PCR tercih edilir.

#### 7.5. Testin Değerlendirilmesi :

Muayeneler sonucu gram (+), sporsuz, hareketsiz, 0.6-1.0 µ boyutlarında “Çin harfleri görünümlü” hemolitik kokobasiller *Renibacterium salmoninarum* olarak tanımlanır. Bu bakteri, katalaz pozitif, jelatin testi pozitif, DNAz negatif, oksidaz negatiftir.

*Renibacterium salmoninarum* yavaş gelişen bir bakteri olduğu için klasik yöntemlerle izolasyon ve identifikasyon çalışmaları yerine daha hızlı metotlar önerilmektedir. Özellikle PCR, ticari FAT ve ELISA reaktifleri ve/ya kitleri teşhis çalışmalarında kullanılabilir.

## 8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

1. **Amos, K.H.** (1985) *Procedures for the Detection and Identification of Certain Fish Pathogens*. 3<sup>rd</sup>. Ed. Fish Health Section, American Fisheries Society. Corvallis, OR, 114.
2. **Austin B. and Austin, D. A.** (1987) *Methods for the Microbiological Examination of Fish and Shellfish*.
3. **Austin B and D. A. Austin A. D** (2007) *Bacterial Fish Pathogens Diseases of Farmed and Wild Fish* Fourth Edition.
4. **Austin, B. and McIntosh, D.** (1991) *Bacterial fish pathogens and their implications for fish farming*. Rev-in Med. Microbiol., 2: (4), 230-236.
5. **Cowan, S.T. and Steel K.J.** (1993) *Manual for the Identification of Medical Bacteria*. 3<sup>rd</sup>. Edt. (Barrow, G.I. and Feltham, R.K.A. Eds.) Cambridge Univ. Press. Hardback.
6. **Koneman, E.W., Allen, S.D., Dowel, V.R., Janda, W.M., Sommers, H.M. and Winn, W.C.** (1988) *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 3 rd. Ed. Company. Philedelphia.USA
7. **Sanders, E. And Fryer, L.J.** (1989) *Methods in Aquatic Bacteriology* . 115-143. (Austin, B. Eds.) 2<sup>nd</sup>. Ed. John Wiley & Sons. Chichester, UK.
8. **USFWS/AFS-FHS** (2004) *Standard Procedures for Aquaric Animal Health Inspections Chapter 3 Bacteriology 3.5 Renibacterium salmoninarum shf: 12-18*
9. **Woodland, J.**, (2004) *NWFHS Laboratory Procedures Manual, Chapter 5, Bacteriology*, 2<sup>nd</sup> edition, c: 5, p: 1 – 44, Arizona.
10. **WHO** (2004) *Laboratory Biosafety Manual - Third Edition*, 2004. [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_11/en/).

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

# ALABALIKLARDAN BAKTERİYEL BÖBREK HASTALIĞI'NIN FAT İLE TEŞHİSİ

## 1. AMAÇ

Alabalıkların bir enfeksiyonu olan Bakteriyel Böbrek Hastalığının Fluorescent antikor testi ile teşhisidir.

## 2. UYGULAMA ALANI

Şüpheli materyalden *Renibacterium salmoninarum*'un direkt etken tespitine yönelik teknikler kullanılarak yapılan uygulamaları kapsamaktadır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeniyle enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışırken dikkatli olunur ve OIE Manual ve WHO Laboratory Biosafety Manual esas alınarak kurallara uyulması sağlanır.

## 5. KISALTMALAR/TANIMLAR

***Renibacterium salmoninarum*** : Bakteriyel böbrek hastalığının etkeni olan ,Gram pozitif, çubuk şeklinde, sporsuz bir bakteridir. 15-18 C de ürer, katalaz pozitif, oksidaz negatiftir.

**BKD:** Bakteriyel Böbrek Hastalığı

**FAT:** Flourescence antikor testi

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

İndirekt Floresan antikor testi ile Alabalıklarda BKD hastalığının hızlı teşhisinin sağlanmasıdır

## 7.. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1. Materyal:

Hastalıktan şüpheli alabalıklara ait böbrek dokusu, *R. salmoninarum* kültürü

## 7.2. Kullanılan Ekipman:

ph metre  
Analitik teraziler  
Steril bıçak, pens, spatül, v.b. malzemeler  
Özeler  
Plastik steril petriler  
Steril pipet ve pipet ucu  
Deney tüpleri ve tüp taşıyıcıları  
Fluorescence Mikroskop  
Bunzen beki  
Buzdolabı

## 7.3. Kullanılan Solusyon ve Besi yerleri

**Fluorescein işaretli R.salmoninarum antikor (konjugate):** Ticari olarak temin edilir.

### 0.01 m PBS pH 7.1

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (anhydrose).....1.07 g  
Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O (monohydrate)....0.34 g  
Distile su.....1 lt  
%0.01 (w/v) thimerosal ile muhafaza edilir.

### 0.01 M PBS pH 7.4

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (anhydrose, 68.04 g/l).....3.36 ml  
K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (anhydrose, 87.09 g/l).....16.0 ml  
NaCl.....8.5 g  
Distile su ..... 1 l

### Glycerol buffer:

Glycerol .....90 ml  
1.4 diazobicyclo- (2,2,2)-octane(DABCO)....2.5 g  
0.01 M PBS pH 7.4.....10 ml

Önce DABCO glyserole eklenir ve bir us banyosunda ısıtılarak eritilir. Daha sonra PBS eklenir ve en sonunda 0.1 N HCl ya da 0.1 N NaOH kullanılarak pH 8.5 -9'a ayarlanır. Oda ısında koyu renkli şişede (alüminyum folyo ile kaplanarak) muhafaza edilir.

#### 7.4. Numunenin Hazırlanması ve Analiz/Test/Muayene'nin Yapılması

##### Slaytların hazırlanması

- a. Saf kültür: Saf kültür sterile pbs ile dilüe edilir ve bir lam üzerine yayılır. Havada kurutulur ve absolut metanol ile 5-10 dakika fikse edilir.
- b. Böbrek örneği: Bir miktar böbrek numunesi lam üzerine de ince olarak yayılır, havada kurutulur ve absolut metanol ile 5-10 dakika fikse edilir.

##### Boyama

- a-Pozitif ve negatif kontrol slaytları: Bilinen bir pozitif kültür ile çapraz reaksiyon vermediği bilinen başka bir bakteri kültüründen pozitif ve negatif kontrol için daha önceden slaytlar hazırlanarak saklanır. Bu kontrol slaytları uygulan boyama tekniğinin performansı ile bakround boyanma ve non spesifik bağlanmaların olup olmadığının tespiti açısından önemlidir.
- b-Pozitif ve negatif slaytlar ile test slaytı karanlık ve nemlendirilmiş bir ortama (nemlendirilmiş bir pamuk içeren kapalı bir kuru olabilir) yerleştirilir ve konjuagey'tin uygun çalışma dilusyonundan birer damla her slayta damlatılır ve slaytın yüzünü kaplaması sağlanır.
- c- Oda ısısında 60 dakika inkube edilir.
- d- Slaytlar PBS ile 3 kere 5'er dakika, hafifçe çalkalamak suretiyle (bir shakerdan faydalanılabilir)
- e-Gerek duyulursa Evan's blue ya da rhodamin kullanılarak 3-4 dakika. zıt boyama yapılır.
- f- Tekrar PBS ile belirtildiği şekilde yıkanır.

**7.5.Sonucun Değerlendirmesi:** Slaytlar gliserol buffer kullanılarak Flouescence mikroskopta 1000x büyütmede okunur. Önce pozitif ve negatif kontroller okunmalıdır. Böylece hem fluorescenece boyamanın performansı görülmüş olur hemde göz alıştırmış olur.

#### 8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

- 1- OIE (2006) Diagnostic Manuel for Aquatic Animal Diseases.
- 2- WHO (2004) Laboratory Biosafety Manual - Third Edition, [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO__11/en/).

#### 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

# BALIKLARDA GÖRÜLEN STREPTOCOCCOSIS ETKENLERİNİN İZOLASYON VE İDENTİFİKASYONU

## 1. AMAÇ

Balıklarda görülen Streptococcosis hastalığı etkenlerinin (*Streptococcus spp.* ve *Enterococcus spp.*) izolasyonu ve identifikasyonu'nun yapılmasıdır.

## 2. UYGULAMA ALANI

Şüpheli balık numunelerin den Streptococcosis hastalığının teşhisi için gerçekleştirilen bakteriyolojik uygulamaları kapsamaktadır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeniyle enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışırken dikkatli olunur ve OIE Manual ve WHO Laboratory Biosafety Manual esas alınarak kurallara uyulması sağlanır.

## 5. TANIMLAR/KISALTMALAR

**Streptococcosis:** Otopside karın boşluğunda asidik bir sıvı, karaciğerde ve karın duvarında hemoraji, dalakta büyüme, bağırsaklarda hemorajik enteritis ile seyreden bir enfeksiyondur. Balıklarda ekzoftalmusa neden olduğu için “pop-eye” hastalığı da denmektedir.

***Streptococcus spp.*** *Micrococcaceae* familyasına bağlı Gram pozitif (+), zincir şeklinde diziler yapan, hareketsiz, sporsuz ve kapsüllü bakterilerdir. Balıklarda hastalık yapan streptokok türlerinden önemli olanlar şunlardır:

***Streptococcus iniae (Streptococcus shiloi)*:** Etken BHIA'da 30°C'de 24 saat inokulasyondan sonra 1 mm. çapında pigmentsiz koloniler oluşturur. Gram pozitif, ikili ya da kısa zincirler tarzında (pleomorfizm görülebilmektedir), katalaz ve tuza tolerans ve VP reaksiyon negatiftir. Sığır kanı ile hazırlanmış kanlı agarda alfa hemoliz oluşturmaktadır

***Lactococcus garvieae (Enterococcus seriolicida)*:** Alfa hemolitik Gram-pozitif kısa

zincir tarzında üreyen bu tür, katalaz, H<sub>2</sub>S, indole ve oksidaz negatiftir. Bu tür tuza tolerans göstermekte olup serolojik olarak Lancefield gruplarından hiç biriyle reaksiyon vermemektedir. 22 °C de üreme (10-45 °C arasında ürer) gösterir.

***Enterococcus (Streptococcus) faecalis subsp. liquefaciens*** : TSA agar'da 1-2 mm çapında sarı koloniler (diğer streptokoklar beyaz koloniler oluşturur) tarzında üreme görülür. Gram pozitif kok olan bakteri katalaz, H<sub>2</sub>S, indol ve VP test negatiftir.

***Streptococcus difficilis (Streptococcus agalactiae)***: Kültür balıklarında meningo-encephalitise neden olmaktadır. Hareketsiz ve hemoliz negatiftir. Gram pozitif olan bu bakteri kısa zincirler tarzında görülmekte ürer, katalaz negatif tuza toleranslı değildir. VP reaksiyon pozitif olup diğer biyokimyasal özellikleri bakımından grup B streptokoklara benzemektedir.

***Streptococcus parauberis (Streptococcus uberis genotip II)***: Bakteri besi yerlerinde 24 saat inkübasyondan sonra 1.5-2 mm çapında zayıf alfa hemoliz yapan beyazımsı koloniler tarzında ürer. Hareketsiz Gram-pozitif kısa çomak ya da koko-basil şeklinde ikili ya da kısa zincir tarzında görünür. Katalaz negatif olup, tuza toleranslı değildir. 30°C'de 24 saatte ürer.

***Vagococcus salmoninarum***: Gram-pozitif kısa oval basiller tarzında üreyen etken katalaz negatif ve alfa hemolitiktir. 15 °C de üreme gösterir (5-30 oC arasında ürer)

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

Hastalık teşhisi için gönderilen balıkların otopsileri yapıldıktan sonra iç organlarından (dalak, böbrek, karaciğer) Kanlı agar, tavşan kanlı Nutrient agar veya BHIA'ya bir öze veya steril swap yardımı ile aseptik şartlarda ekim yapılır. 15-22-30-37°C'de 24-48 saat arasında koloni gelişimi için etüvde bekletilir. Daha sonra üreyen Gram (+) pozitif, hareketsiz, mat-gri renk veren, 1-2 mm çapında kolonilerden biyokimyasal testlere geçilerek identifikasyon yapılır.

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1. Materyal

Streptococcosis'in laboratuvar teşhisinde, hastalığın görüldüğü havuz ya da kafeslerden alınan balıkların iç organları kullanılır.

### 7.2 Kullanılan Ekipman

Level 2 düzeyinde laboratuvar ekipmanı kullanılır (\*).

### 7.3. Kullanılan Kimyasallar

- Kanlı Agar (1),  
BHIA (4),  
Hidrojen Peroksit Solüsyonu (9),  
Tavşan kanlı Nutrient Agar (27),  
% 6.5 tuzlu BHIB (27),  
Voges Preskauer Testi (28)

### 7.4. Numunenin Hazırlanması ve Muayene/Analizin Yapılması

#### 7.4.1. Numunenin Hazırlanması

Balık nekropsisi prosedürüne uygun olarak yapılır (Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Teşhiste Metot Birliği, 2013).

#### 7.4.2. Muayene/Analizin Yapılması

##### İç organlardan genel ve spesifik besiyerlerine ekim yapılması

Streptococcosis için Kanlı agar, tavşan kanlı Nutrient agar ve BHIA'ya iç organlardan (böbrek, dalak, karaciğer) ekim yapılır.

#### 7.4.3. İzolasyon

Ekim yapılan besiyerleri 15-22-37°C'de 24-48 saat kadar etüvde bekletilir ve her gün üreme olup olmadığına dair kontrol edilir. Üreme olan petriyelerdeki kolonilerin subkültürleri yapılır. Subkültürü yapılan besi yerlerinden hareket, oksidaz, katalaz testleri yapıldıktan sonra Gram boyama, Giemsa boyama yapılarak ışık mikroskopunda immersiyon objektifte muayene yapılır. Gram pozitif (+), hareketsiz, mat-gri pigment veren, 1-2 mm çapında kolonilerin identifikasyonu yapılır.

Streptococcus spp.'nin ayırımında kanlı agarda hemoliz durumuna göre;

- Alfa hemoliz
- Beta hemoliz
- Hemoliz yok
- Geniş çaplı alfa hemoliz, değerlendirmeleri yapılır. Ayrıca,
- %6.5 tuzlu besi yerinde tuza tolerans
- Bile-esculin (BE) hidroliz testi



SXT'e duyarlılık testleri uygulanır

Kategori	Bakteri görünümü	Hemoliz	Grup antijen	SXT direnç	BE test	Tuz toleransı
Grup A Streptokok	Zincir	Beta	A	+	-	-
Grup B Streptokok	Zincir	beta	B	+	-	+
Beta hemolitik fakat A,B,D grubunda yer almayan	Zincir	beta	A, B, D Grubuna girmez	-	-	-
Grup D Enterokok	Kısa zincir, ikili	Alfa, Beta, Hemoliz yok	D	+	+	+
Grup D non-enterokok	Kısa zincir, ikili	Alfa, hemoliz yok	D	-	+	-
Viridans streptokoklar	Zincir	Alfa, hemoliz yok	-	-	-	-
Pneumonokoklar	İkili, Kısa zincir	Alfa	-	?	-	-
Aerokoklar	Tek, tetra	Alfa, hemoliz yok	-	?	Değişken	+

#### 7.4.4. İdentifikasyon:

Katalaz Test Metodu (2), Oksidaz Testi (3), Hemoliz Testi (6), Hareket Testi (7), Tuza Dirençlilik Testi (19), Voges Preskauer Testi (20), Gram Boyama (1), Kirby – Bauer Antimikrobiyal Duyarlılık Testi (14) yöntemine uygun olarak yapılır.

**7.5. Test metodunun sonu:** Gram pozitif, katalaz negatif, yuvarlak veya oval yapılı, 2 µm' den daha küçük, hareketsiz, sporsuz, sıvı besiyerlerinde üretildiklerinde zincir oluşturmuş gibi peş peşe dizilen, fakültatif anaerob, glikozu heksozdifosfat yolu ile fermente ederek laktik asit oluşturan koklar *Streptococcus* spp. olarak tanımlanır.

## 8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

1. **Amos, K.H.** (1985): *Procedures for the detection and identification of certain fish Pathogens*. 3<sup>rd</sup>. Ed. Fish Health Section, American Fisheries Society. Corvallis, OR, 114.
2. **Austin B. and Austin, D. A.** (1987) *Methods For the Microbiological Examination of Fish and shellfish*.
3. **Austin B and D. A. Austin A. D** (2007) *Bacterial Fish Pathogens Diseases of Farmed and Wild Fish Fourth Edition*.
4. **Austin, B. and McIntosh, D.** (1991) *New Bacterial fish pathogens and their implications for fish farming*. Rev-in Med. Microbiol., 2: (4), 230-236.
5. **Carson, S. and Munday, B.I.** (1990) *Streptococcosis an emerging disease in aquaculture*. Austria Aquaculture, 5: 32-33.
6. **Kitao, T.** (1993) *Streptococcal infections*. In: Inglis, V., Roberts, R.J. and Bromage, R.N. (Eds): *Bacterial Disease of Fish*. Blackwell Science, USA., 196-210.
7. **Koneman, E.W., Allen, S.D., Dowel, V.R., Janda, W.M., Sommers, H.M. and Winn,**
8. **Muzquiz, J.L., Royo, F.M., Ortego, C., Blas, I., Ruiz, I. and Alonso, J.L.** (1999) *Pathogenicity of Streptococcosis in Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): Dependence on age of diseased fish*. Bull. Eur. Fish Pathol., 19 (3): 114-119.
9. **Sanders, E. And Fryer, L.J.** (1989) *Methods in Aquatic Bacteriology*. 115-143. (Austin, B. Eds.) 2<sup>nd</sup>. Ed. John Wiley & Sons. Chichester, UK.
10. **Woodland, J.,** (2004) *NWFHS Laboratory Procedures Manual, Chapter 5, Bacteriology*, 2<sup>nd</sup> edition, c: 5, p: 1 – 44, Arizona.
11. **WHO** (2004) *Laboratory Biosafety Manual - Third Edition*, [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO__11/en/).

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

# BALIKLARDA GÖRÜLEN VIBRIOSIS ETKENLERİNİN İZOLASYON VE İDENTİFİKASYONU

## 1. AMAÇ

Balıklarda görülen Vibriosis hastalığına neden olan, *Vibrio* türlerinin izolasyon ve identifikasyonudur.

## 2. UYGULAMA ALANI

Şüpheli balık numunelerinde Vibriosis hastalığının teşhisi için gerçekleştirilen bakteriyolojik uygulamaları kapsamaktadır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeniyle enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışırken dikkatli olunur ve OIE Manual ve WHO Laboratory Biosafety Manual esas alınarak kurallara uyulması sağlanır.

## 5. TANIMLAR/KISALTMALAR

**Vibriosis:** Gram negatif, hareketli, kıvrık çomaklar olan *Vibrio* genusuna ait bakterilerin oluşturduğu hastalıktır.

***Vibrio anguillarum:*** Özellikle çipura, levrek başta olmak üzere her tür deniz balığından izole edilebilen, tatlı sularda yetiştiriciliği yapılan Salmonid türü balıklar arasında da önemli kayıplara neden olan bakteri. Gram negatif (-), tek flagellası ile hareketli, kıvrık bir basil olup, katalaz, oksidaz, indol, beta-galaktosidaz ve arjinin dihidrolaz pozitif (+), H<sub>2</sub>S, lizin veya ornitin hidrolaz negatiftir.

***V. vulnificus:*** Yılan balıklarında vibriosis etkeni olup, 20-37°C'ler arasında üreme özelliğindedir.

***V. ordalii:*** Çipura ve levrekte ve üre negatiftir (-).22°C'de 4-6 günde üreme özelliğindedir.

***V. alginolyticus:*** Besi yeri üzerinde yaygın koloniler veren, kanı hemoliz eden, %0-10 tuz

içeren ortamlarda üremeyen, katalaz, oksidaz, H<sub>2</sub>S, indol, ornitin ve lizin dekarboksilaz pozitif (+), arginin dihidrolaz negatiftir (-). 37°C’ de üreme özelliğindedir.

**V. carchariae (harveyi):** Deniz akvaryumunda ölen bir tür köpek balığından hemorajik sepsisemiye neden olan bakteri olup, 11-40°C’ ler arasında üreme özelliğindedir.

**V. cholerae (non-01):** Hasta balıklarda vücut yüzeyinde peteşiyel kanamalara, iç organlarda konjesyona neden olur. Yapılan deneysel enfeksiyonlarda balıklarda yüksek patojeniteye sahip olan *V.cholerae* (non-01), insan için patojen olan *V.cholerae* O1’den ornitin dekarboksilaz ve mannoz negatif (-) olması ile ayrılır. 10-42 °C’ler arasında üreme özelliğinde olup, optimum üreme ısısı 37°C’dir.

**V. parahaemolyticus:** Gram negatif, hareketli (flagellar hareket), oksidaz pozitif, katalaz pozitif, O/129’ a duyarlı, sporsuz, kapsülsüz, fermantatif / oksidatif, aerob, fakültatif - anaerob, kıvrık - düz ve halofilik (tuza ihtiyaç gösteren) çomakçıklardır. Glikozdan asit yapar, laktoza etkimez. İndol pozitif, H<sub>2</sub>S negatif, sitrat negatif, üre negatiftir. İnsan veya tavşan kanlı jelozda hemoliz yapar. Halofilik olan bakteri tuzsuz ortamlarda ve, tuz miktarı %10 olduğunda üreyemez. Bakteri O antijenlerine göre 11, K antijenlerine göre ise 57 serotipe ayrılmaktadır.

**V. mimicus:** Pişirilmemiş deniz ürünleri ve en çok istiridyelerin yenmesiyle kolera formunda enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu bakteri tipinin ürettiği enterotoksinlerin ısıya dayanıklı olduğu bilinmektedir.

**V. fluvialis:** Oksidaz, nitrat, arginin, sukroz, arabinoz pozitif bir bakteridir.

**V. salmonicida:** Soğuk su balıklarında Vibriosis etkeni bakteri. 15°C’de 5 günde üreme gösterir.

**Biyokimyasal reaksiyonlar:** Bakterinin identifikasyonunda kullanılan özel biyokimyasal testler.

## 6. TEST METODU’NUN KISA TANIMI

Hastalık teşhisi için gönderilen balıkların otopsileri yapıldıktan sonra iç organlarından (dalak, böbrek, karaciğer) TSA, Kanlı agar, Nutrient agar, TCBS ve BHA’ya bir öze veya steril swap yardımı ile aseptik şartlarda ekim yapılır. 15-22-37°C’de 1-6 gün arasında koloni gelişimi için etüvde bekletilir. Daha sonra kolonilerden genel besi yerlerine saflaştırma yapılır, 15-22-37 °C’de 1-6 gün inkübasyondan sonra biyokimyasal testlere geçilerek identifikasyon yapılır.

## 7. TEST METODU’NUN TANIMI

### 7.1. Materyal

Vibriosis şüpheli havuz ya da kafeslerden alınan balıkların iç organları kullanılır.

## 7.2. Kullanılan Ekipman

Level 2 düzeyinde laboratuvar ekipmanı kullanılır.

## 7.3. Kullanılan Kimyasallar

Kanlı Agar (1)

Nutrient Agar (12)

BHIA (3)

% 3 Tuzlu TCBS (13)

Marine Agar ( 14)

Üçlü Tüp besiyerleri (7)

Peptonsuz Falkov besi ortamları (8)

Hugh –Leifson Glucose Besi Yeri (6)

O/129 10 µg ve O/129 150 µg diskleri (15)

Saline TSB serisi (16)

Fizyolojik Tuzlu Su (17)

## 7.4. Numunenin Hazırlanması ve Muayene/Analizin Yapılması

Balık nekropsisi prosedürüne uygun olarak yapılır (Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Teşhiste metot birliği, 2013).

### 7.4.1 Muayene/Analizin Yapılması

Solungaçlar ve deriden direkt preparatlar yapılarak faz kontrast mikroskopta muayene edilir. İç organlardan hazırlanan frotiler gram boyama tekniği ile boyanarak ışık mikroskobunda muayene edilir.

### İç organlardan genel ve spesifik besiyerlerine ekim yapılması

Vibriosis için Kanlı agar, Nutrient agar, Marine agar ve BHIA'ya iç organlardan (böbrek, dalak, karaciğer) ekim yapılır.

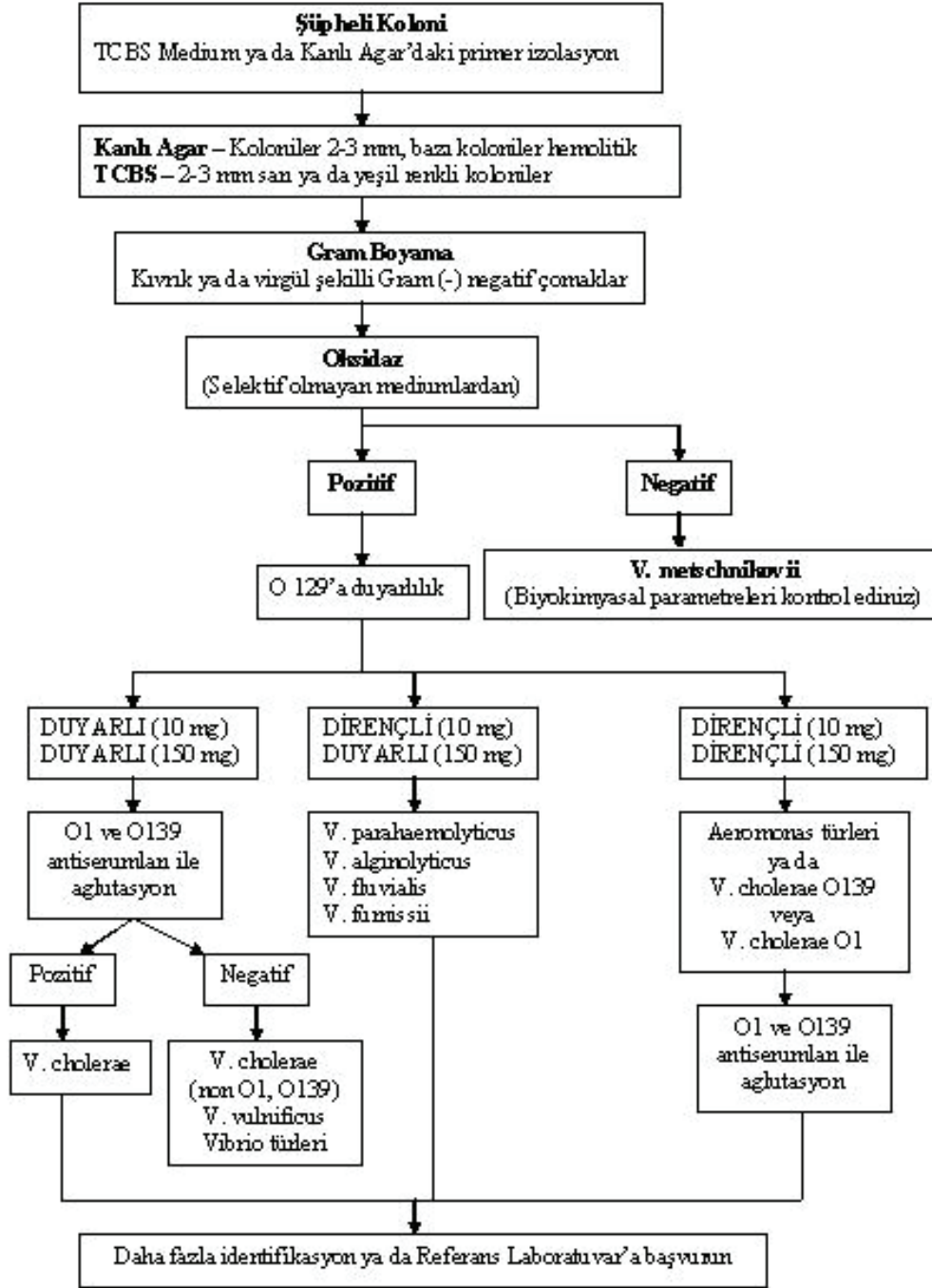
### 7.4.2. İ zolasyon

Ekim yapılan besiyerleri 22-37°C'de 24-48 saat kadar etüvde bekletilir ve her gün üreme olup olmadığı kontrol edilir. Üreme olan petriyelerdeki kolonilerin subkültürleri yapılır. Subkültürü yapılan besiyerlerinden hareket, oksidaz, katalaz testleri yapıldıktan sonra Gram boyama, Giemsa boyama yapılarak ışık mikroskobunda immersiyon objektifte muayene yapılır. Gram negatif (+), hareketsiz, mat-gri pigment veren, 1-2 mm çapında kolonilerin identifikasyonu yapılır.

### 7.4.3. İdentifikasyon:

Gram boyama (1), Oksidaz Testi (3), Hemoliz Testi (6), Hareket Testi (7), Oksidasyon Ve/ Veya Fermentasyon (O/F) Testi (8), Arginin Hidroliz Testi (9), Lizin dekarboksilaz Testi (10), Ornitin Dekarboksilaz Testi (11), İndol Testi (12), Üreaz Aktivitesinin Belirlenmesi (13) ve Kirby – Bauer Antimikrobiyal Duyarlılık Testi (14), 0/129 Vibriostat duyarlılık testi (15) yöntemine uygun olarak yapılır.

Organizma	TCBS üzerinde koloni rengi
<i>V. cholerae</i>	SARI
<i>V. alginolyticus</i>	
<i>V. cincinnatiensis</i>	
<i>V. fluvialis</i>	
<i>V. furnissii</i>	
<i>V. metschnikovii</i>	
<i>Aeromonas spp.</i>	
<i>Enterococcus spp.</i>	
	YEŞİL
<i>V. hollisae</i>	
<i>V. parahaemolyticus</i>	
<i>V. vulnificus</i>	
<i>V. mimicus</i>	SARI / YEŞİL
<i>V. carchariae</i>	
<i>Proteus spp.</i>	MAVİ / YEŞİL
<i>Pseudomonas spp.</i>	



### Test Metodunun Sonu :

Gram negatif, hareketli, *Vibrio metschnikovii* hariç oksidaz (+), O 129 150µg'a duyarlı, glikozu fermantatif kullanan virgül şeklinde basiller *Vibrio* spp. olarak adlandırılır.

## 8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

1. **Amos, K.H.** (1985) *Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens*. 3<sup>rd</sup>. Ed. Fish Health Section, American Fisheries Society. Corvallis, OR, 114.
2. **Austin B. and Austin, D. A.** (1987) *Methods For the Microbiological Examination of Fish and shellfish*.
3. **Austin B and D. A. Austin A. D** (2007) *Bacterial Fish Pathogens Diseases of Farmed and Wild Fish* Fourth Edition.
4. **Austin, B. and McIntosh, D.** (1991) *Bacterial fish pathogens and their implications for fish farming*. Rev-in Med. Microbiol., 2: (4), 230-236.
5. **Koneman, E.W., Allen, S.D., Dowel, V.R., Janda, W.M., Sommers, H.M. and Winn, W.C.** (1988) *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 3 rd. Ed. Company. Philedelphia.USA
6. **Michel, C. and Alderman, D.J.** (1992) *Chemotherapy in Aquaculture: from Theory to Reality*. Office International Des Epizooties.
7. **Sinderman, C.J.** (1990) *Diseases of marine fish caused by microbial pathogens and animal parasites*. 31-48. Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish. Academic Press, Newyork, 369.
8. **Woodland, J.**, (2004) *NWFHS Laboratory Procedures Manual, Chapter 5, Bacteriology*, 2<sup>nd</sup> edition, c: 5, p: 1 – 44, Arizona.
9. **WHO** (2004) *Laboratory Biosafety Manual - Third Edition*,. [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_2004\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/).

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni



# CRAYFISH PLAGUE (KEREVİT VEBASI)'IN KLASİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TEŞHİSİ

## 1. AMAÇ

Kerevit vebası etkeni *Aphanomyces astaci*'nin klasik ve moleküler yöntemlerle identifikasyonudur.

## 2. UYGULAMA ALANI

Kerevit numunelerinden *Aphanomyces astaci* tespiti için gerçekleştirilen mikolojik uygulamaları kapsamaktadır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeniyle enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışırken dikkatli olunur ve OIE Manual ve WHO Laboratory Biosafety Manual esas alınarak kurallara uyulması sağlanır.

## 5. TANIMLAR/KISALTMALAR

***Aphanomyces astaci***: Kerevit vebasının etkeni olan bir Oomycet mantar türüdür.

**Kerevit Vebası**: Kerevitlerde klinik görünüm olarak su yüzeyine çıkma (gün ışığına yakınlaşma) ve değişik yönlere kaçışmayla birlikte suyu terketme gibi davranış bozuklukları, özellikle birinci yürüme bacaklarında olmak üzere ayaklarda koordinasyon bozukluğu, sırt üstü devrilme, sırt kabuğundan tutularak sudan dışarıya çıkarıldıklarında makasların ve bacakların felç nedeniyle aşağıya doğru sarkması, yavaş hareket etme ve kuyrukta hareket kaybı bulgular gözlenir. Mantar, uygun besi yerinde renksiz koloni oluşturmaktadır. Hifalar yaklaşık 8-10 mikrometre eninde, septasız (ancak zoosporangiumun sınırlı septaları hariç), branşlı, uniform kalınlıkta ve yuvarlak uçlara sahiptir. Genç şekilleri yoğun kaba granüler yapılı, daha yaşlı olanlar vakuoler ve içi boş görülebilir. Hifaların besi yerinde ve dokudaki boyutu ve görünümü aynıdır. Zoosporları 2 flagellalı olup 8.1- 9.5 mikrometre çapında ve

eliptik bir morfolojiye sahiptir. Mantarın, 10°C nin üzerindeki su sıcaklıklarında çok çabuk üreyerek kısa sürede (3 hafta için de=akut infeksiyon) ölüme neden olduğu, su sıcaklığı azaldıkça gelişmesinin yavaşladığı ve kerevitlerde ölümün gecikebildiği (3 ayı bulabilir=kronik infeksiyon) bilinmektedir. Ayrıca sulardaki yüksek Mg oranlarının, mantarın infektif gücünü yani zoospor üretimini azaltıcı etki yapabileceği bildirilmiştir.

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

Kerevitin melanize dokusu başta olmak üzere kuyruk kası, peri anal bölge, yumuşak abdominal kütikül ile beyin ve karın ganglion bölgelerinden steril olarak alınan doku parçaları IM agar ortamına plante edilerek 22°C' de inkube edilir. Üreyen renksiz fungal koloniden PG1 ortamına ekilir. 20°C' de 18 saat inkube edilerek, inkubasyon sonrasında karakteristik spor boşalması yönünden incelenir. PCR yöntemi ile konfirmasyon yapılır.

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1. Materyal

Kerevit (tatlı su istakozu), ülkemizdeki türü *Astacus leptodactylus*'tur.

### 7.2. Kullanılan Ekipman

Level 2 düzeyinde laboratuvar ekipmanı (\*) ve PCR ekipmanları kullanılır.

### 7.3. Kullanılan Kimyasallar

IM agar (37)

PG1 medium (38)

PCR kimyasalları (39)

### 7.4. Numunenin Hazırlanması ve Muayene/Analizin Yapılması

#### 7.4.1. Numunenin Hazırlanması

##### Kerevitin muayenesi

Kerevitler pamuğa emdirilmiş eter bulunan kavanozlara konularak ötenaziler yapılır. Yüzeyleri yoğun alkollü pamukla temizlenir. Steril pens ve makasla kerevitin melanize dokusu başta olmak üzere kuyruk kası, peri anal bölge, yumuşak abdominal kütikül ile beyin ve karın ganglion bölgelerinden steril olarak alınan doku parçaları IM agar ortamına plante edilerek 22 °C' de inkube edilir.

### 7.5. Testin Değerlendirilmesi:

Spesifik IM ortamında üreyen renksiz fungal koloniden PG1 ortamına ekilir. 20°C’ de 18 saat inkube edilerek, inkubasyon sonrasında karakteristik spor boşalması yönünden incelenir. Spor boşalması gözlenen ve makroskobisi *Aphanomyces astaci* ile uyumlu misellerden PCR yapılır. Bunun için “AAG AAG GCT AAA TTG CGS TA” ve “CTA TCC GAC TCC GCA TTC TG” spesifik primer çifti kullanılarak, 94°C’ de 1 dakika denaturasyonu takiben, 54 °C’de 1 dakika, 72°C’de 1 dakika, 72°C’de 7 dakika diğer aşamalar (Her aşama 45 siklus) olacak şekilde 105 bp büyüklüğündeki gen bölgesi çoğaltılır. PCR ürünü daha sonra *Hph* restriksiyon endonükleazı ile muamele edilir ve agaroz jelde 55 ve 60 bp büyüklüğünde iki bant gözlenir ve fungus *Aphanomyces astaci* olarak tanımlanır.

## 8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- 1- OIE (2009) Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals Crayfish plague (*Aphanomyces astaci*), Chapter 4.1.7
2. WHO (2004) Laboratory Biosafety Manual - Third Edition, 2004. [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO__11/en/).

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

# DENİZ BALIKLARINDA GÖRÜLEN PASTEURELLOSIS'İN TEŞHİSİ

## 1. AMAÇ

Deniz balıklarında görülen Pasteurellosis'in etkeni *Photobacterium damsela subs. Piscisida*'nın izolasyonu ve identifikasyonu yapılarak teşhis edilmesidir.

## 2. UYGULAMA ALANI

Deniz balıklarında Pasteurellosis'in teşhisi için gerçekleştirilen bakteriyolojik uygulamaları kapsamaktadır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeniyle enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışırken dikkatli olunur ve OIE Manual ve WHO Laboratory Biosafety Manual esas alınarak kurallara uyulması sağlanır.

## 5. TANIMLAR/KISALTMALAR

**Pasteurellosis:** İnsan ve hayvanlarda Gram negatif, oksidaz pozitif, gliding harekete sahip, Giemsa boyamada bipolar görünen bakterilerin sebep olduğu hastalık

**Deniz balığı:** Levrek, çipura gibi yaşamak için tuzlu suya ihtiyaç duyan balık türleri.

**Deniz Pasteurellosis'i:** Deniz balıklarını etkileyen, üreyebilmek için tuz içeren ortamlara ihtiyaç duyan (halofilik) *Photobacterium damsela subs. piscisida* (önceden *Pasteurella piscisida*)'nın meydana getirdiği enfeksiyondur.

**Photobacteria genusu:** Filogenik analizler sonrası *Vibrio damsela* ve *Pasteurella piscisida* gibi etkenlerin dahil edildiği genus.

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

Hastalık teşhisi için gönderilen balıkların otopsileri yapıldıktan sonra iç organlarından (dalak, böbrek, karaciğer) Kanlı agar, Nutrient agar veya Marine agar 2216'ya bir öze veya steril swab yardımı ile aseptik şartlarda ekim yapılır. 25 °C'de 24 - 48 saat arasında koloni gelişimi için

etüvde bekletilir. Daha sonra üreyen Gram (-) negatif, hareketsiz, bipolar görünümlü, gri-sarı renk veren ufak kolonilerden biyokimyasal testlere geçilerek identifikasyon yapılır.

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

Pasteurellosis'in bakteriyolojik teşhisinde, hastalığın görüldüğü havuz ya da kafeslerden alınan balıkların iç organları kullanılır.

### 7.1. Materyal

### 7.2. Kullanılan Ekipman

Level 2 düzeyinde laboratuvar ekipmanı kullanılır (\*).

### 7.3. Kullanılan Kimyasallar

Hugh-Leifson Besi Yeri (6),

Üçlü Tüp Besi Yerleri (7),

Peptonsuz Falkov Besi Ortamları (8)

Nutrient agar (12),

Marine agar (14),

%1.5 tuzlu Kanlı Agar (25),

Voges Preskauer Testi (28)

### 7.4. Numunenin Hazırlanması ve Muayene/Analizin Yapılması

#### 7.4.1. Numunenin Hazırlanması

Balık nekropsisi prosedürüne uygun olarak yapılır (Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Teşhiste Metot Birliği, 2013).

#### 7.4.2. Muayene/Analizin Yapılması

##### İç organlardan genel ve spesifik besi yerlerine ekim yapılması

*Pasteurellosis* için KA, Nutrient agar ve Marine agara iç organlardan (böbrek, dalak, karaciğer) ekim yapılır.

### 7.5. İzolasyon

Ekim yapılan besi yerleri 25 °C'de 24-48 saat kadar etüvde bekletilir ve her gün üreme olup olmadığı kontrol edilir. Üreme olan petrilerdeki kolonilerin subkültürleri yapılır.

Subkültürü yapılan besiyerlerinden hareket, oksidaz, katalaz testleri yapıldıktan sonra Gram boyama, Giemsa boyama yapılarak ışık mikroskobunda immersiyon objektifte muayene yapılır. Ayrıca, şüpheli koloniler TCBS besi yerine ekilir. *P.damsela. subs. piscisida* TCBS' de üremez. Bu yönü ile *P.damsela. subs. damsela*' dan ayrılır. *P.damsela. subs. damsela* TCBS besi yerinde yeşil renkte ürer. Gram negatif (-), hareketsiz, bipolar görünümlü koko-basillerin görüldüğü gri-sarı pigment veren ufak kolonilerin identifikasyonu yapılır.

#### 7.6. İdentifikasyon:

Gram boyama (1) ,Giemsa boyama (21), Arginin Hidroliz Testi (9), Lizin dekarboksilaz Testi (10), Ornitin Dekarboksilaz Testi (11), İndol Testi (13), Üreaz Aktivitesinin Belirlenmesi (13) Katalaz test metodu (2), Oksidaz test metodu (3), Hemoliz testi (6), Hareket testi (7), Oksidasyon Ve/Veya Fermentasyon (O/F) Testi (8) Kirby – Bauer Antimikrobiyal Duyarlılık Testi (14) yöntemine uygun olarak yapılır.

#### 7.7. Testin Değerlendirilmesi :

Gram negatif (-), hareketsiz, Oksidaz pozitif, fermantatif, bipolar boya alan ve TCBS de üremeyen non-hemolitik kokobasiller *Photobacterium damsela subsp. piscicida* olarak adlandırılır. *Photobacterium damsela subsp. piscicida* ayrıca arjinin pozitif, lizin negatif ve ornitin negatiftir. Üre ve indol testi negatif iken, katalaz pozitifdir.

### 8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR/ KAYNAKLAR VE EKLER

1. **Amos, K.H.** (1985): *Procedures for the detection and identification of Certain Fish Pathogens*. 3<sup>rd</sup>. Ed. Fish Health Section, American Fisheries Society. Corvallis, OR, 114.
2. **Austin B. and Austin, D. A.** (1987): *Methods For the Microbiological Examination of Fish and Shellfish*.
3. **Austin B and D. A. Austin A. D** (2007) *Bacterial Fish Pathogens Diseases of Farmed and Wild Fish* Fourth Edition.
4. **Austin, B. and McIntosh, D.** (1991): *Bacterial fish pathogens and their implications for fish farming*. Rev-in Med. Microbiol., 2: (4), 230-236.
5. **Koneman, E.W., Allen, S.D., Dowel, V.R., Janda, W.M., Sommers, H.M. and Winn, W.C.** (1988): *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 3 rd. Ed. Company. Philedelphia.USA
6. **Magarinos, B., Pazos, F., Santos, Y., Romalde, J.L. and Toranzo, A.E.** (1995): *Response of Pasteurella piscicida and Flexibacter maritimus to skin mucus of marine fish*. Dis. Aquat. Org., 21: 103-108.

7. **Real, F.A., Oros, J., Acosta, F., Acosta, B., Santana, P. and Deniz, S.** (1997): *Pasteurellosis of Gilthead Sea bream (Sparus aurata) in Gran Canaria Island, Spain.* Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 17 (5): 153-157.
8. **Sinderman, C.J.** (1990): *Diseases of marine fish caused by microbial pathogens and animal parasites .31-48.* Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish. Academic Press, Newyork, 369.
9. **Toranzo, A.E., Barreiro, S. Cosal, J.F., Figueras, A., Magarinos, B. and Barja, J.L.** (1991): *Pasteurellosis in cultered Gilthead Sea bream, Sparus aurata.* Aquaculture, 99: 1-15.
10. **Woodland, J.,**(2004): *NWFHS Laboratory Procedures Manual, Chapter 5, Bacteriology,* 2<sup>nd</sup> edition, c: 5, p: 1 – 44, Arizona.
11. **WHO** (2004) Laboratory Biosafety Manual - Third Edition, 2004. [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO__11/en/).

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

# FURUNCULOSIS HASTALIĞI'NIN TEŞHİSİ

## 1. AMAÇ

Alabalıklarda görülen Furunculosis hastalığı etkeni olan *Aeromonas salmonicida*'nın izolasyon ve identifikasyonunun yapılmasıdır.

## 2. UYGULAMA ALANI

Alabalık numunelerinden Furunculosis hastalığının teşhisi için gerçekleştirilen bakteriyolojik uygulamaları kapsamaktadır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeniyle enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışırken dikkatli olunur ve OIE Manual ve WHO Laboratory Biosafety Manual esas alınarak kurallara uyulması sağlanır.

## 5. TANIMLAR/KISALTMALAR

**Furunculosis :** Alabalıklarda görülen *Aeromonas salmonicida*'nın neden olduğu septisemik enfeksiyöz bakteriyel bir hastalık.

***Aeromonas salmonicida* :** *Vibrionaceae* familyasında yer alan *Aeromonas* genusundan gram negatif (-), kokobasil şeklinde, 0.5 – 1.5 µm boyutlarında, flagellasız, hareketsiz, kahverengi pigmentli bir bakteridir.

**Biyokimyasal reaksiyonlar:** Bakterinin identifikasyonunda kullanılan özel biyokimyasal testlerdir.

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

Hastalık teşhisi için gönderilen alabalıkların otopsileri yapıldıktan sonra iç organlarından (dalak, böbrek, karaciğer) Kanlı Agar, TSA, BHIA, Rimmler – Shotts Medium ve *Aeromonas* agar base'e bir öze veya steril swab yardımı ile aseptik şartlarda ekim yapılır. 21 °C' de 3-4 gün koloni gelişimi için etüvde bekletilir. Daha sonra üreyen Gram (-) negatif, hareketsiz, TSA ve BHIA' da kahverengi pigment veren kolonilerden biyokimyasal testlere geçilerek identifikasyon yapılır.



## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1. Materyal

Hastalıktan şüpheli havuz ya da kafeslerden alınan balıkların iç organları kullanılır.

### 7.2. Kullanılan Ekipman

Level 2 düzeyinde laboratuvar ekipmanı (\*) kullanılır.

### 7.3. Kullanılan Kimyasallar

Kanlı Agar (1)

TSA (2)

TSB (29)

Rimmler - Shotts Medium (30)

Aeromonas Agar Base (31)

BHIA (4)

Üçlü Tüp besiyerleri (7)

Peptonsuz Falkov besi ortamları (8)

Hugh –Leifson Glucose Besi Yeri (6)

O/129 10 µg ve O/129 150 µg diskleri (15)

Jelatin besi yeri (10)

Simmons Citrate Agar (32)

### 7.4. Numunenin Hazırlanması ve Muayene/Analizin Yapılması

Balık nekropsisi prosedürüne uygun olarak yapılır (Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Teşhiste Metot Birliği, 2013).

#### İç organlardan genel ve spesifik besiyerlerine ekim yapılması

Furunculosis için KA, TSA, Rimmler - Shotts Medium, Aeromonas Agar Base ve BHIA'a iç organlardan (böbrek, dalak, karaciğer) ekim yapılır.

#### 7.4.1. İzolasyon

Ekim yapılan besiyerleri 21°C'de 3-4 gün etüvde bekletilir ve her gün üreme olup olmadığı kontrol edilir. Üreme olan petrilerdeki kolonilerin subkültürleri genel besi yerlerine yapılır. Subkültürü yapılan besiyerlerinden hareket, oksidaz, katalaz testleri yapıldıktan sonra Gram boyama yapılarak ışık mikroskopunda immersiyon objektifte muayene yapılır. Gram

negatif (-), hareketsiz kokobasillerin görüldüğü TSA ve BHIA'da kahverengi pigment veren kolonilerin identifikasyonu yapılır.

#### 7.4.2. İdentifikasyon:

Gram boyama (1), Katalaz test metodu (2), Nitrat redüksiyon test metodu (22), Oksidaz test metodu (3), O/129 Vibriostat duyarlılık testi (15), Hidrojen Sülfid (H<sub>2</sub>S) Testi (5), Hareket testi (7), Hemoliz testi (6), Oksidasyon Ve/Veya Fermentasyon (O/F) Testi (8) Jelatin eritme testi (4), Arginin Hidroliz Testi (9), Lizin dekarboksilaz Testi (10), Ornitin Dekarboksilaz Testi (11), sitrat testi (23) Kirby – Bauer Antimikrobiyal Duyarlılık Testi (14) metodları yöntemine uygun olarak yapılır.

#### 7.5. Testin Değerlendirilmesi:

*Vibrionaceae* familyasında yer alan *Aeromonas* genusundan Gram negatif (-), kokobasil şeklinde, 0.5–1.5 µm boyutlarında, flagellasız, hareketsiz, kahverengi pigment üreten, nitrat reduktaz pozitif, katalaz pozitif, indol pozitif, üre pozitif, sitrat pozitif, H<sub>2</sub>S pozitif, eskülini hidrolize edebilen, jelatinaz pozitif, O129 vibriostat dirençli bakteri *Aeromonas salmonicida* olarak adlandırılır. *Aeromonas salmonicida* ornitin dekarboksilaz için negatif, lysine dekarboksilaz için pozitif, arjinin dihidrolaz için pozitifdir. Çeşitli yayınlarda *Aeromonas salmonicida*'nın biyokimyasal testler yönünden atipik suşlarının varlığı da bildirilmiştir. İdentifikasyon sırasında bu durum göz önüne alınmalıdır.

## 8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

1. **Arda, M.** : *Genel Bakteriyoloji*. A.Ü Yayınları
2. **Austin B. and Austin, D. A.** (1987): *Methods For the Microbiological Examination of Fish and Shellfish*.
3. **Austin B and D. A. Austin A. D** (2007) *Bacterial Fish Pathogens Diseases of Farmed and Wild Fish* Fourth Edition.
4. **Austin, B. and McIntosh, D.** (1991): *Bacterial fish pathogens and their implications for fish farming*. Rev-in Med. Microbiol., 2: (4), 230-236.
5. **Cipriano, R.C. Bullock, G.C. and Pyle, S.W.** (1984): *Aeromonas hydrophila and Motile Aeromonad Septicemias of Fish*. Fish Disease Leaflet 68, V.S. Department of Interior, Fish and Wildlife Service, Division of Fisheries Research, Washington, D.C.
6. **Koneman, E.W., Allen, S.D., Dowel, V.R., Janda, W.M., Sommers, H.M. and Winn, W.C.** (1988): *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 3 rd. Ed. Company. Philedelphia.USA
7. **Sanders, E. And Fryer, L.J.** (1989): *Methods in Aquatic Bacteriology* . 115-143. (Austin, B. Eds.) 2<sup>nd</sup>. Ed. John Wiley & Sons. Chichester, UK.
8. **USFWS/AFS-FHS** (2004) *Standard Procedures for Aquatic Animal Health Inspections* Chapter 3 Bacteriology 3.2 *Aeromonas salmonicida* shf: 3-5
9. **WHO** (2004) *Laboratory Biosafety Manual - Third Edition*, 2004. [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_11/en/).

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

# VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS'UN İZOLASYON VE İDENTİFİKASYONU

## 1. AMAÇ

Çift kabuklu yumuşakça, deniz suyu ve diğer su ürünlerinden ISO/TS 21872-I Metoduna göre *Vibrio parahaemolyticus*'un izolasyon ve identifikasyonunun yapılmasıdır.

## 2. UYGULAMA ALANI

Çift kabuklu yumuşakça, deniz suyu ve diğer su ürünlerinden *Vibrio parahaemolyticus* teşhisi için uygulanır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeniyle enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışırken dikkatli olunur ve OIE Manual ve WHO Laboratory Biosafety Manual esas alınarak kurallara uyulması sağlanır.

## 5. TANIMLAR/KISALTMALAR

**V. parahaemolyticus:** Gram negatif, hareketli (flagellar hareket), oksidaz pozitif, katalaz pozitif, O/129 150 µg'a duyarlı, sporsuz, kapsülsüz, fermantatif / oksidatif, aerob fakültatif anaerob, kıvrık - düz ve halofilik (tuza ihtiyaç gösteren) çomakçıklardır. Glikozdan asit yapar, laktoza etkimez, sukroz negatiftir. İndol pozitif, H<sub>2</sub>S negatif, üre çoğunlukla negatiftir. Patojen suşlar insan veya tavşan kanlı jelozda hemoliz yapar. Halofilik olan bakteri tuzsuz ortamlarda ve tuz miktarı %10 olduğunda üreyemez. Bakteri O antijenlerine göre 11, K antijenlerine göre ise 57 serotipe ayrılmaktadır. *V. parahaemolyticus*'la kontamine su ürünlerinin tüketilmesi sonucu insanlarda gıda zehirlenmesi oluşur.

**Biyokimyasal Reaksiyonlar:** Bakterinin identifikasyonunda kullanılan özel biyokimyasal testler.

**Çift Kabuklu Yumuşakça:** *Bivalvidae* familyasında yer alan istiridye, kidonya, kara midye, kılı midye, kum midyesi, kum şırlanı, akivades, tarak gibi insan tüketimi amacıyla kullanılan deniz hayvanları.

**ASPW:** Alkali Salt Pepton Water

**TCBS:** Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar

**TSA:** Tryptic Soy Agar

**TSB:** Tryptic Soy Broth

**TSI:** Triple Sugar Iron Agar

**TSAT:** Triphenyl Tetrazolium Chloride Soy Tryptone Agar

**ADH:** Arjinin dehidrolaz

**LDC:** Lizin dekarboksilaz

**Kovacs ayracı:** n-Butanol; Hidroklorik Asit; 4- dimetil amino benzaldehit içeren ticari formül

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

Çift kabuklu yumuşakça eti / diğer su ürünleri 25 g tartılıp steril kum yardımı ile homojenize edilerek, veya 25 ml deniz suyu, 225 ml ASPW içerisine konulup (1/10 oranında)  $6 \pm 1$  saat  $41 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de inkube edilir, bu ön zenginleştirmeden alınan 1 ml kültür, 10 ml ASPW'ye ekilerek  $41 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de  $18 \pm 1$  saat boyunca inkube edilir. Ardından TCBS'ye ve TSAT'ye geçilir. TCBS'de morfolojik görünümleri yeşil renkli, ortası koyu olan koloniler, TSAT'de düz, yassı, koyu kırmızı renkli koloniler *V. parahaemolyticus* şüpheli kabul edilir ve şüpheli izolatların biyokimyasal testleri yapılır. Eğer homojenizasyon ve ilk ön zenginleştirme işlemi tek bir iş günü içerisinde tamamlanamıyorsa  $0$  ile  $+4^\circ\text{C}$  arasında bir gece muhafaza edilebilir.

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1. Materyal

Çift kabuklu yumuşakça / diğer su ürünleri veya deniz suyu materyal olarak kullanılır.

### 7.2 Kullanılan Ekipman

Level 2 düzeyinde laboratuvar ekipmanı kullanılır (\*\*).

### 7.3. Kullanılan Kimyasallar

Üçlü Tüp Besi Yerleri (7)

Peptonsuz Falkov Besi Ortamları (8)

Şeker solüsyonları (11)

TCBS agar (13)

O/129 10  $\mu\text{g}$  ve O/129 150  $\mu\text{g}$  diskleri (15)

Saline TSB serisi (16)

- Fizyolojik Tuzlu Su (17)
- Steril sıvı parafin (18)
- ONPG Diskleri (19)
- Novobiocin diskleri (50 U) (20)
- PolymyxinB ( 300IU) (21)
- ASPW (22)
- TSAT (23)
- %1.5 tuzlu TSA (24)
- %1.5 tuzlu Kanlı Agar (25)
- Üre-indol besi yeri (26)

#### 7.4. Numunenin Hazırlanması ve Muayene/Analizin Yapılması

##### 7.4.1. Numunenin Hazırlanması

###### Çift Kabuklu Yumuşakçaların Açılması

- İstiridyede; istiridye avuç içine alınarak sivri ucu alta, geniş kısmı parmakların iç yüzüne gelecek şekilde sıkıca kavranır. Diğer eldeki bıçak ya da bistüri ucu, yaralanmaları engellemek için alttan işaret parmağı ile desteklenerek kabukların sivri uç kısmındaki birleşim noktasına güç uygulanarak sokulmaya çalışılır. Bıçak ucu kapaklar arasına sokulduktan sonra bıçağın keskin kenarının kabuk iç yüzeyine doğru tutulmasına dikkat edilerek bir yarım daire hareketi ile adduktor kasının kabukla olan bağlantısı kesilir. Böylece bağlantıları kesilen kabuk, henüz istiridyenin üstünde bulunduğu diğer kabuğun altına konarak, açılan istiridye muayene için hazırlanmış olur.
- Midyede; midye parmak uçları ile tutulur. Her iki kabuğun alt düz kenardaki birleşim yeri (sivri uç altı kenar) yumuşak olduğundan buradan başlayarak kabuklar, bir daire hareketi ile sivri uca kadar kenar boyunca bistüri ile kesilerek ve yine kabuk iç yüzeyinin adduktor kası ile olan bağlantıları koparılarak ikiye ayrılır.
- Akivadesde; Akivades parmak uçları ile tutulur. Her iki kabuk, geniş kenardaki birleşim noktasından keskin bir bistüri ile aralanarak ve içeri sokulan bistüri ucu ile istiridyelerde olduğu gibi kabuk iç yüzeyinin adduktor kası ile olan bağlantıları dokulara zarar vermeden koparılarak ikiye ayrılır.
- Kum midyesinde; midye parmak uçları ile tutulur. Her iki kabuk, geniş kenardaki birleşim noktasından keskin bir bistüri ile aralanarak ve içeri sokulan bistüri ucu ile istiridyelerde olduğu gibi kabuk iç yüzeyinin adduktor kası ile olan bağlantıları dokulara zarar vermeden koparılarak ikiye ayrılır.
- Kum şırlanında; parmak uçları ile tutulur. Her iki kabuk, geniş kenardaki birleşim

noktasından keskin bir bistüri ile aralanarak ve içeri sokulan bisturi ucu ile istiridyelerde olduğu gibi kabuk iç yüzeyinin adduktor kası ile olan bağlantıları dokulara zarar vermeden koparılarak ikiye ayrılır.

- Kidonya da; parmak uçları ile tutulur. Her iki kabuk, geniş kenardaki birleşim noktasından keskin bir bistüri ile aralanarak ve içeri sokulan bisturi ucu ile istiridyelerde olduğu gibi kabuk iç yüzeyinin adduktor kası ile olan bağlantıları dokulara zarar vermeden koparılarak ikiye ayrılır.

Kabukları açılan yumuşakça dokularının toplanıp tartılması için; adduktor kası bağlantılarından tümüyle ayrılan kabuk atılmaz ve yumuşakçanın için de kaldığı diğer kabuk altına konur. Kabuğu açılan yumuşakçalar, bu şekilde masa üzerine dizilir. Daha sonra steril havan ya da steril naylon torba içine alınan yumuşak dokular terazide 25 g olacak şekilde tartılır. Tartım işleminden sonra örnek homojenize edilir.

#### 7.4.2. Muayene/Analizin Yapılması

##### Ön Zenginleştirme

Yukarıda belirtildiği gibi kabukları açılan çift kabuklu yumuşakça eti, 25 g tartılıp steril kum yardımı ile homojenize edilerek veya 25 ml deniz suyu, 225 ml ASPW içerisine konulup (1/10 oranında)  $6\pm 1$  saat  $41\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de inkube edilir. Eğer işlem tek bir iş günü içerisinde tamamlanamıyorsa  $0$  ile  $+4^{\circ}\text{C}$  arasında bir gece muhafaza edilebilir. Bu ön zenginleştirme ortamından 1 ml alınarak 10 ml ASPW'ye geçilir.  $41\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de  $18\pm 1$  saat inkube edilir.

Ardından TCBS'ye ve TSAT'ye geçilir. 18-24 saat  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de etüvde inkube edilir, TCBS'de morfolojik görünümleri yeşil renkli, ortası koyu olan koloniler ile TSAT'de düz, yassı, koyu kırmızı kolonilerin fenotipik karakterleri biyokimyasal tarama testleri identifiye edilir.

##### *Vibrio Parahaemolyticus* İzolasyonu

##### Birinci Gün

- Çift kabuklu yumuşakça etinden ya da diğer su ürünlerinden 25 gr alınarak steril havanda steril kum ile parçalanıp homojenize edildikten sonra 225 ml ASPW'a (1/10 sulandırma) ekim yapılır.
- Ekim yapılan besiyerleri  $41\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de  $6\pm 1$  saat inkube edilir. Eğer işlem tek bir iş günü içerisinde tamamlanamıyorsa  $0$  ile  $+4^{\circ}\text{C}$  arasında bir gece muhafaza edilebilir.
- Bu ön zenginleştirme ortamından 1 ml alınarak 10 ml ASPW'ye geçilir.  $41\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de  $18\pm 1$  saat inkube edilir.

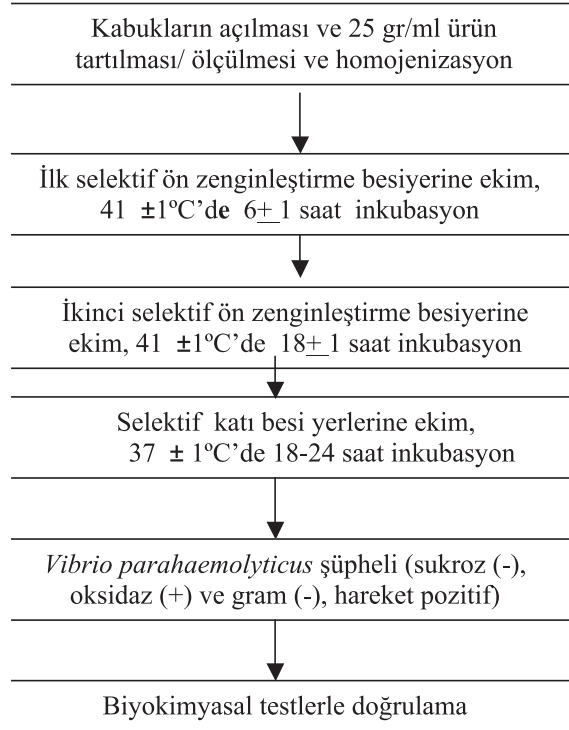
##### İkinci Gün

- İnkubasyon sonunda sıvı besi yerlerinden TCBS ve TSAT besi yerlerine öze yardımı ile çizme yöntemiyle ekim yapılır.

- Ekim yapılan petriyerler  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 18-24 saat inkube edilir.

- Üçüncü Gün
- Inkubasyon sonucunda 2-3 mm çapında, TCBS'de orta kısımları koyu yeşil, yuvarlak TSAT'de düz, yassı, koyu kırmızı koloniler seçilir.
- Daha ileri testler için %1.5 tuzlu TSA'ya sub kültür yapılır.
- Dördüncü Gün
- Subkültürü yapılmış olan seçilmiş kolonilerden Gram boyama, hareket ve oksidaz testleri yapılır.
- Gram negatif, kıvrık, uzun, oksidaz pozitif, hareketli basillerin görüldüğü seçilmiş kolonilerden %1,5 ve %3, %6, %8, %10 TSB'a ekimler yapılır.
- O/129 Vibriostat duyarlılık testi için %1.5 tuzlu TSB içerisinde Mc Farland Standart Tüp 3'e göre hazırlanan bakteri süspansiyonu yayma yöntemiyle %1.5 Tuzlu TSA'ya ekilir ve üzerine O/129 10 µg, O/129 150 µg, Novobiocin ve Polymyxin B diskleri aseptik koşullarda yerleştirilerek  $37 \pm 1^\circ C$ ' de 18-24 saat inkube edilir.
- O/129 10 µg'lık vibriostata dirençli, 150 µg'lık vibriostata duyarlı, Novobiocin'e duyarlı ve Polymyxin B' ye dirençli ve %8 tuzlu ortamda üreyen, %10 tuzlu ve tuzsuz ortamda üreme göstermeyen koloniler *V. parahaemolyticus* şüpheli kabul edilir.
- *Vibrio parahaemolyticus* yönünden şüpheli kabul edilen izolatlar daha ileri biyokimyasal testlere tabi tutulur.
- Biyokimyasal test sonuçları 24-48 saat sonra değerlendirilir.

### Test Metodunun Uygulama Şeması





Gram boyama (1), Oksidaz test metodu (3), Hidrojen Sülfid (H<sub>2</sub>S) Testi (5), Hemoliz testi (6), Hareket testi (7), Oksidasyon Ve/Veya Fermentasyon (O/F) Testi (8), Arginin Hidroliz Testi (9), Lizin dekarboksilaz Testi (10), Ornitin Dekarboksilaz Testi (11) İndol Testi (12), Üreaz Aktivitesinin Belirlenmesi (13), Beta Galaktosidaz Testi (16), Laktoz Kullanımının Belirlenmesi (17), Glikoz Kullanımı ve Glikozdan Gaz Oluşumu (18) yöntemine uygun olarak yapılır.

**7.5. Test Metodunun sonu:** Testler sonucu TCBS'de yeşil koloni oluşturan, Gram (-), virgül şeklinde, oksidaz (+), Laktoz (-), flagellar hareketli, LDC (+), % 0 ve % 10 NaCl içeren besi yerlerinde üremeyen basiller *Vibrio parahaemolyticus* olarak tanımlanır.

## 8. İLGİLİ DÖKÜMANLAR / KAYNAKLAR VE EKLER

- 1- ISO/TS 21872-1 (2007):** *Microbiology of food and animal feeding stuff- Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic Vibrio spp. Part 1: Detection of Vibrio parahaemolyticus and Vibrio cholerae.* (Published 2008-03-01)
- 2. WHO (2004)** Laboratory Biosafety Manual - Third Edition, [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_2004\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/).

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

# BALIK NEKROPSİSİ

## 1. AMAÇ

Bu prosedür, hastalık teşhisi için balıkların nekropsi kurallarını belirler.

## 2. UYGULAMA ALANI

Bu prosedür, nekropsi amacıyla kullanılan uygulamaları kapsamaktadır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri ile enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeniyle enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışırken dikkatli olunur ve OIE Manual ve WHO Laboratory Biosafety Manual esas alınarak kurallara uyulması sağlanır. Materyalin taze olması ve soğuk zincir koşullarında gönderilmesi gerekir.

## 5. KISALTMALAR/TANIMLAR

**Nekropsi:** Ölüm ve hastalık nedenini araştırmak amacı ile kadavranın bir yöntem çerçevesinde açılıp, organ ve dokuların incelenmesidir.

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

Ölüm ve hastalık nedenini araştırmak amacı ile balıkların bir yöntem çerçevesinde açılarak, organ ve dokularının incelenmesidir.

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1. Materyal

Balık

### 7.2. Kullanılan Kimyasallar

Alet ve ekipman da korozif etki göstermeyen, geniş bir antimikrobial spektruma sahip özellikte olmalıdır.

### 7.3 Kullanılan Ekipman

- Paslanmaz çelik küvet
- Aliminyum folyo
- Paslanmaz çelik çeşitli boylarda makas (Sivri ve küt uçlu ), pens ve bistüri
- Disposable petri kutuları
- Öze, pastör pipeti, Lam, lamel

### 7.4. Uygulama yöntemi

#### 7.4.1. Dış muayene

- Paslanmaz çelik küvet içine bir tabaka aliminyum folyo serildikten sonra alkol yardımıyla dezenfekte edilir.
- Balıklar canlı ise, otopside önce susuz ortamda tutularak, oksijensiz bırakılarak ya da kafalarına sert bir cisimle vurularak ölmeleri sağlanır
- Folyodaki alkol kalıntısı uçurulduktan sonra otopsi yapılacak balık/ balıklar küvete alınır.
- Balığın dış yüzeyi, yüzgeçleri muayene edilir, lezyon saptandığında, yüzgeçlerden ve gerek duyulursa deriden bistüri yardımıyla kazıntı alınarak lam –lamel arasında direk muayene için preparat hazırlanır.
- Ağız boşluğu muayene edilir.
- Solungaçlar muayene edilir ve ince uçlu bir makas yardımıyla kesilerek bir parça solungaç lam –lamel arasında sıkıştırılarak ezilmek suretiyle preparat hazırlanır.

#### 7.4.2 Nekropsi

##### - 6 cm ve daha büyük balıklar

- Gözler bistüri yardımıyla çıkarılarak uzaklaştırılır ve göz boşluğu incelenir.
- Karın boşluğunun açılabilmesi için; 1. insizyon, anus önünden başlayarak kafanın ventral kısmına kadar, solungaçları arasında sonlanacak şekilde yapılır. 2. insizyon anus önündeki aynı noktadan başlar sırta doğru kavis oluşturacak şekilde yapılır ve kafanın hemen gerisinde biter. 3. insizyon 1 ve 2. insizyonların uçları birleştirilerek yapılır. Bu insizyondan sonra abdominal yan duvar uzaklaştırılabilmelidir. Mümkün olduğu kadar, iç organlara zarar vermemek için küt uçlu makas kullanılır. Makasın seçimi balığın boyutu baz alınarak yapılır.
- Yan karın duvarı uzaklaştırıldıktan sonra açığa çıkan iç organlar muayene edilir. Organlardan direk muayene için öze ya da pastör pipeti yardımıyla bir miktar alınarak lam üstünde natif preparat hazırlanır. Gerekirse organlardan hemen uygun besi yerine ekim

yapılır. Küçük balıklarda özellikle böbrekten ekim yapılırken pastör pipeti kullanılır. Balık büyük ise steril şartlarda ekim yapılmasına imkan verecek büyüklükte organ parçaları (Dalak, karaciğer, kalp, böbrek) steril ikinci bir makas yardımıyla kesilerek steril petri kutusuna alınır.

- Organlar uzaklaştırılarak karın boşluğu muayene edilir.
- Bağırsaklar sivri uçlu makas yardımı ile açılarak muayene edilir. Bağırsaklardan lamel ile kazıntı alınarak lamda natif perapararat hazırlanır.
- Hava keseleri incelenir.
- Kaslar bistüri yardımıyla kesilerek incelenir.

#### - 6 cm den küçük balıklar

Sivri uçlu bir makas ile mümkün olduğu kadar iç organlar zarar verilmeden ventral bölgeden tek bir insizyon ile karın boşluğu açılır ve yukardaki prosedür balığın büyüklüğü imkan verdiği ölçüde takip edilir.

#### 7.5. Otopsi gereçlerinin temizliği

Otopside kullanılan makas, pens vb. aletler dezenfektanlı pamuk ile silinerek artıklar alınır. Bu pamuklar biyolojik atık olarak değerlendirilir. Aletler daha sonra dezenfektan içeren kap için de en az 10 dakika bekletilir. Daha sonra buradan alınarak paslanmaz çelik küvet için de 125°C'de 15 dakika otoklav edilir. Bundan sonra deterjan ile yıkandıktan sonra paketlenerek tekrar otoklav edilir ve bir sonraki kullanıma uygun hale getirilir.

## 6. İLGİLİ DOKÜMANLAR/KAYNAKLAR/EKLER

.Austin B and D. A. Austin A. D (2007) *Bacterial Fish Pathogens Diseases of Farmed and Wild Fish* Fourth Edition.

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni





# Arı Enfeksiyonları







# AMERİKAN FOULBROOD OF HONEY BEES (AMERİKAN YAVRU ÇÜRÜKLÜĞÜ)'NÜN TEŞHİSİ

## 1. AMAÇ

Şüpheli ergin arı, larva, pupa, balmumu, polen ve bal numunelerinden Amerikan Yavru Çürüklüğü etkeni olan *Paenibacillus larvae*'nin izolasyonu ve identifikasyonudur.

## 2. UYGULAMA ALANI

Şüpheli ergin arı, larva, pupa, balmumu, polen ve bal numunelerinden *Paenibacillus larvae*'nin teşhisi için uygulanır.

## 3. TESTİN YAPILMASINDAKİ SORUMLULUKLAR

Testin yapılmasından sorumlu yönetici ve laboratuvar uzman personeli sorumludur.

## 4. GÜVENLİK/UYARILAR/ÖNLEMLER

Şüpheli materyalin zoonoz hastalık etkenleri enfekte olabileceği, laboratuvar ortamının kontaminasyonuna ve çalışanların enfeksiyonuna yol açma riski nedeniyle enfeksiyöz materyalle ve sağlığa zararlı kimyasallarla çalışırken dikkatli olunur ve OIE Manual ve WHO Laboratory Biosafety Manual esas alınarak kurallara uyulması sağlanır.

## 5. KISALTMALAR/TANIMLAR

**Amerikan Yavru Çürüklüğü Hastalığı:** Arı larvalarında *Paenibacillus larvae*'nin oluşturduğu bir hastalıktır. Sağlıklı larva, inci beyazı görünüşünde petek gözünde dik vaziyette bulunur. Amerikan yavru çürüklüğünde, enfekte bir larva önce petek gözünün tabanında C harfi şeklinde gelişir. Sonra hücreyi dolduracak şekilde yukarı doğru büyür. İnfekte larvalar dik pozisyonda ölürler. Ölü larvalar petek gözünün tabanına doğru iç yan yüzeyine uzanmış ve gözün dibine eğik durumda pulcuk şeklinde yapışmıştır. Ölü larvalar donuk beyaz, açık kahve, koyu kahve sonunda siyah renge döner. Ölü larva çikolata rengi aldığında bir kibrit çöpü sokup çekilirse, larva iplik gibi 2.5-10 cm'ye dek uzar. Petekten ısıtılmış tutkal kokusu, bozulmuş balık kokusu benzeri bir koku yayılır. Arıcılıkta büyük zararlara neden olan ve kovanın sönmesi ile sonuçlanan ihbari mecburi hastalıklardandır.

***Paenibacillus larvae*:** Amerikan yavru çürüklüğü hastalığı etkeni.

**AYÇ:** Amerikan Yavru Çürüklüğü Hastalığı



**PCR:** Polymerase Chain Reaction

**PBS:** Fosfat Buffer Solution

**dNTP:** deoksiribonükleozid trifosfat

**bp:** Base pair ( Baz çifti )

**DNA:** Deoksiribonükleik asit

**ml:** mililitre

**µl:** mikrolitre

**pmol:** pikomol

**BHIA:** Brain Heart Infusion Agar

**BHITA:** Thiaminli Brain Heart Infusion Agar

**NA:** Nutrient Agar

**NB :** Nutrient Broth

**KA+N:** Nalidiksik asitli Kanlı Agar

**KCA:** Kanlı Kolombiya Agar

**KA:** Kanlı Agar

**OIE:** Ofis International Epizootica (World Organisation for Animal Health-Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü)

## 6. TEST METODU'NUN KISA TANIMI

Ergin arı, larva, pupa, balmumu, polen ve bal örneklerinde *Paenibacillus larvae* izolasyonu ve identifikasyonunu yapmak.

## 7. TEST METODU'NUN TANIMI

### 7.1. Materyal

Ergin Arı, Larva, Pupa, Balmumu, Polen ve Bal.

### 7.2. Kullanılan ekipman

Stereo mikroskop

Diseksiyon seti

Benmari

Karbondioksitli Etüv

Lam

### 7.3. Kullanılan Kimyasallar

Gram boyama seti, Carbol fuchsin ve Nigrosin, Nalidixic acid, thiamin, Hidrojen peroksit, %1'lik Süt Tozu Çözeltisi, Potasyum Nitrat

### 7.4. Kullanılan Besi yerleri

İzolasyon için; Nutrient Agar (NA), Nutrient Broth (NB), Kanlı Agar (Nalidixic acide ilave edilmiş) (KA+NA), Brain Heart Infusion Tiamin Agar (BHITA) ve Kanlı Columbia Agar (KCA), Biyokimyasal besiyerleri (İndol, VP)

### 7.5. Numunenin Hazırlanması ve Analiz/Test/Muayene'nin Yapılması

Amerikan yavru çürüklüğü hastalığından şüpheli numuneler muayeneye alınır.

#### Ergin Arı, Larva ve Pupa

Petek gözlerinden steril swap ile toplanan ölü larva ve pupa bir tüp içerisinde 5-10 ml steril su veya izotonik bir solüsyon (PBS veya % 0.9 NaCl) için de süspansiyon edilir. Süspansiyona, benmari içerisinde, 80 °C'de 10 dakika veya 95-96 °C'de 3-5 dakika diğer spor oluşturan mikroorganizmaları (saprofitik kontaminantlar) öldürmek için ısı-şoku uygulanır. Süspansiyon oda sıcaklığında soğuduktan sonra izolasyona geçilir.

#### Bal

Bal steril su ile yarı yarıya dilue edildikten sonra yaklaşık 30 dakika boyunca 3000 g'de santrifüj işlemine tutulur. Bu işlemde süpernatant atıldıktan sonra dipte kalan yaklaşık 200 µl izolasyon için kullanılır.

#### Polen

Polenler için, 1 g 10 ml steril distile suda süspansiyon edilir ve ardından Whatman No. 1 kağıtları ile filtre edilir.

#### Bal mumu

Petek artıkları veya bal mumu (1.5 g) toluene, kloroform, dietil eter gibi organik bir solvent için de çözündürülür. 2 ml sıvı çözelti 6 ml fizyolojik solüsyon içerisinde dilue edilir. İyiçe çalkaladıktan sonra, izolasyonu yapılır. Diğer bir protokol ise, bal mumu 1/10 oranında steril su için de dilue edilir ve 6 dakika 90°C'de ısıtılır. Soğuduktan sonra, 1/9 oranında organik solvent ilave edilir ve 2 dakika devamlı karıştırıldıktan sonra sulu sıvı *P. larvae* spor formlarını taşımaktadır.

#### 7.5.1 Besiyerleri

*P. larvae*'nin izolasyonu ve identifikasyonu için; izolasyon amacıyla, BHIT Agar (Brain Heart Infusion broth thiamin ilavesi ile) ve CSA (Columbia sheep blood agar, Kanlı agar (Nalidixic

acide ilave edilmiş), Nutrient Agar (NA), Nutrient Broth (NB) kullanılırken, biyokimyasal testler için İndol, Nitrat ve Voges-Proskauer besiyerleri kullanılmaktadır. Burada Paenibacillus larvae agar (PLA) ve MYPG agar (Mueller-Hinton broth, Yeast extract, Potassium phosphate, Glucose, Pyruvate) ilave edilebilir.

### **Nutrient Agar**

Meat extract	3.0 g
Peptone	5.0 g
Agar	12.0 – 18.0 g
Distile su	1000 ml konur ve pH: 7.0 olacak şekilde ayarlanır.

Yukarıdaki formülü içeren besi yerinden 28 gramı 1 litre distile su için de eritir. 121°C'de 15 dakika otoklavda tutulur. 56°C'ye kadar soğutulur ve steril petrilere dökülür. Bir gece inkübasyona bırakılıp kontrol edildikten sonra kullanılır.

### **Nutrient Broth**

Meat extract	3.0 g
Peptone	5.0 g
Distile su	1000 ml konur ve pH: 7.0 olacak şekilde ayarlanır

Yukarıdaki formülü içeren besi yerinden 13 gramı 1 litre distile su için de eritir. Tüplere 5 ml taksim edilir. 121°C'de 15 dakika otoklavda tutulur. Bir gece inkübasyona bırakılıp kontrol edildikten sonra kullanılır.

### **Kanlı Agar (Nalidixic acid ilave edilmiş)**

Nutrient agardan 28 gram 1 litre distile suda eritilir. 121°C' de 15 dakika otoklava konur. 56 °C' de % 7 – 10 oranında aynı sıcaklıkta defibrine koyun kanı eklenir. 50 defa bilek hareketi ile köpürtmeden karıştırılır. Steril petrilere dökülür, bir gece inkübasyona bırakılıp kontrol edildikten sonra kullanılır. Nalidixic acide stok solüsyonundan 0.1 g, 2 ml 0.1 N NaOH içerisinde hazırlanır ve 100 ml olacak şekilde 0.01 M PBS (pH 7.2) ile dilue edilir. 1 litreye 3 ml nalidixic acid ilave edilir.

### **Brain Heart Infusion Agar**

1 lt distile su içerisine 47 g agar ilave edilip eritilir. Eritilen agar 121°C'de 15 dakika otoklav edildikten sonra yaklaşık 25'er ml petrilere paylaşılır.

### **Columbia Kanlı Yatık Agar**

Columbia kanlı yatık agardan 39 g 1 lt distile suda eritilir. 121°C'de 15 dakika otoklav edilir. 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra içerisine % 5 steril defibrine koyun kanı eklenir. Tüplere 9'ar ml paylaşıldıktan sonra yatık vaziyette donmaya bırakılır. (pH 7.3±0.2)

### İndol Besiyeri

Tyripton	10.0 g
NaCl	5.0 g
Dl – tryptophan	1.0 g
Distile su	1000 ml konur ve pH 7.5 olacak şekilde ayarlanır.

Tüplere 5 ml taksim edildikten sonra 121°C'de 10 dakika otoklav edilir. Vasata ekim yapıp, 37°C'de 18 – 24 saat inkübasyondan sonra kovacs ayıracağı damlatılır. Kırmızı renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilir.

### VP Medium

Peptone	7.0 g
Glucose	5.0 g
Dipotassium hydrogen phosphate	5.0 g
Distile su	1000 ml konur ve pH 6.9 olacak şekilde ayarlanır.

Tüplere 5 ml miktarında taksim edilip 115°C'de 20 dakika otoklav edilir. Besiyeri şüpheli süşun ekiminden sonra 37°C' de 18 – 24 saat inkübe edilir. Üremeden sonra alfa – naftol solüsyonundan 6 damla, % 40 lık KOH solüsyonundan 4 damla eklenir. Glikozdan aseton oluşumu nedeni ile kırmızı renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilir.

### Nitrat

Nitrat redüksiyon testi; 1-2 mg/l potasyum nitrat ilave edilmiş Brain Heart Infusion Thiamine (BHIT) Broth'ta yapılır. Üreme şekillendikten sonra 1 damla sulfanilic acid-alpha-naphtanol ayıracağı damlatılır. *Paenibacillus larvae* nitratı nitrite indirgediğinden, kırmızı renk oluşur.

### Holst Süt Solüsyonu

Yağsız süttten (%1 oranında) 1 gram 100 cc. distile su için de eritilir. 100°C'de 1 saat tutularak 3 defa tindalize edilir. Şüpheli larvalardan 3-4 ml %1 yağsız süt içeren besiyerinde süspanse edilir ve 37°C'de 10-20 dakika inkübe edilir. Numune için de *P. larvae* mevcutsa, süspanسیونun rengi berraklaşır.

### Katalaz

Katı agarda üreyen kolonilerden bir öze dolusu lam üzerine alınıp, 1 öze dolusu % 3 hidrojen peroksit solüsyonu damlatılarak iyice karıştırılır. Hidrojen peroksit su ve oksijene indirgenirse kabarcıklar oluşur ve reaksiyon pozitif olarak değerlendirilir. *P. larvae* katalaz negatiftir.

### Biyokimyasal Konfirmasyon

### *Paenibacillus larvae*

Holst Süt Testi	+
Katalaz	-
Nitrat Testi	+
Nutrient Agar	-
İndol	-
VP	-

### 7.6. Mikroskopik inceleme

**Gram boyama:** Besiyerinde üreyen kolonilerden Gram (+) basiller görülmesi halinde *P. larvae*'den şüphelenilir.

**Carbol fuchsin ile boyama:** Larvalardan hazırlanan sürme preparatlar, alevde tespit edildikten sonra % .0.2'lik carbol fuchsin ile 30 sn boyanır. Preparat çeşme suyunda yıkanır ve kurutulur. Mikroskopta 1.3x0.6 µm. büyüklüğünde, oval, kenarları belirgin *P. larvae* sporları görülmesi ile teşhis konur.

**Nigrosin boyama:** 1-2 öze dolusu nigrosin boya ve şüpheli koloniler bir lam üzerinde iyice karıştırılarak yayılır ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılır. Mikroskopta zikzak şeklinde basillerin görülmesi *P. larvae* için tipiktir.

### 7.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR):

PCR için OIE tarafından önerilen AFB-F 5'-CTT-GTG-TTT-CTT-TCG-GGA-GAC-GCC-A-3', ve AFB-R 5'-TCT-TAG-AGT-GCC-CAC-CTC-TGC-G-3' primer çifti ile 16S rRNA gen bölgesinden 1106 bp'lik bir amplikonu hedefleyen bir PCR protokolü uygulanabilir. 25 µl toplam hacim olacak şekilde, 3.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 µl 1 x Taq buffer, 3.2'şer pmol forward ve reverse primer, 100µM dNTP, 1 U/ µl Taq polimeraz ve 5 µl örnek DNA ile, Thermocycler'da 94°C'de 5 dakikalık 1 döngü, 94°C'de 1 dakika-63°C'de 1dakika ve 72°C'de 1 dakikalık 40 döngü, sonrasında 72°C'de 5 dakikalık bir döngüyü içeren bir PCR protokolü kullanılabilir.

## 8. İLGİLİ DOKÜMANLAR /KAYNAKLAR VE EKLER

1. OIE (2008). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals Chapter. 2.2.2. American Foulbrood of Honey Bees, pg. 395-404.
2. Ohe Von Der W., Schütze K, Lienau F. W. (1997): Routine diagnosis of suspicious bee brood material in the laboratory for its confirmation. LAVES Institut für Bienenkunde Celle, 29221 Celle, Germany.
3. Alippi A.M. (1997).Bee Disease Diagnosis. Chapter: Bacterial Diseases; American Foulbrood, pg: 31-46
4. Hachiro S and Knox DA (2000). Diagnosis of Honey Bee Diseases. U.S. Department of Agriculture Handbook No:690, pg:3-9
5. WHO Laboratory Biosafety Manual - Third Edition, 2004. [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_2004\\_11/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/).

## 9. REVİZYON

Revizyon No	Tarih	Revizyon Yapılan Madde	Revizyon Nedeni

