



# Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

AKADEMİK KADRO

**Prof.Dr. Berrin ÖZÇELİK** Anabilim Dalı Başkanı

**Doç.Dr. Melahat KURTULUŞ**

**Arş.Gör.Dr.Özlem OYARDI**

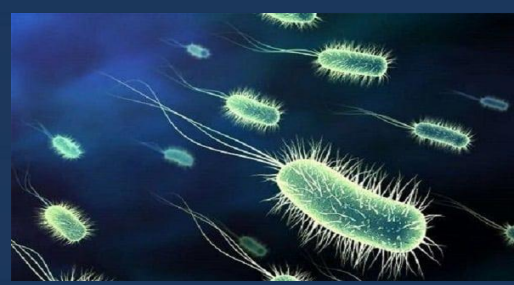


UZAKTAN EĞİTİM UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ

telefon 0(312) 202 82 00 • eposta [guzem@gazi.edu.tr](mailto:guzem@gazi.edu.tr) • adres Gazi Üniversitesi Rektörlük Binası No:6/1

[guzem.gazi.edu.tr](http://guzem.gazi.edu.tr) • [uzaktanegitim.gazi.edu.tr](http://uzaktanegitim.gazi.edu.tr) • [lms.gazi.edu.tr](http://lms.gazi.edu.tr)

# ARAŞTIRMA ALANLARI



<http://www.hfs.com.tr/virus-olcum-cihazi/>

- İdentifikasyon, kültür, uygun çözücülerin hazırlanması ve kullanımı, suşların boyanma teknikleri,
- Biyoaktivite testleri; minumum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) testleri: yeni sentez ve bitkisel ekstraktlarda aktivite tayinleri; anti bakteriyel aktivite, antifungal aktivite, antidermatofitik aktivite, antiviral aktivite, antiprobiyotik, antibiyofilm
- Antimikrobiyal duyarlılık: Bakteriyel-/Fungal; direnç-duyarlılık, hücre kültürü, sitotoksisite
- Sterilizasyon, Dezenfeksiyon
- Aşılar
- Probiyotik mikroorganizmalar ve işlevleri
- Mikrobiyolojik analiz, disk diffüzyon/agar dilüsyon testleri,
- İnfeksiyon kontrolü, hijyen
- ABO-kan grupları, DNA izolasyonu, agaroz jel elektroforez, polimeraz zincir reaksiyonu konularında değerlendirme ve uygulama
- Hastalık etkeni patojenlere yönelik tedavi ve korunma yolları ile ilgili güncel bilgiler, Eczanede uygulamalar,
- İnfeksiyon etkeni mikroorganizmalar, patojenite, virulans, sterilizasyon, dezenfeksiyon, hijyen, laboratuvar testleri, bağışıklık sistemi, aşılar, antimikrobiyal ilaçlar, direnç, mikrobiyal genetik, bakterilerde genetik transfer ve tedavi



<https://ekog.org/2020/04/22/molekuler-biyolojide-vazgecilmez-bir-yontem-polimeraz-zincir-reaksiyonu-pcr/>

# İdentifikasyon, Kültür, uygun Çözücülerin hazırlanması ve kullanımı, Suşların Boyanma Teknikleri



- Moleküler teknikler ile bakterinin DNA / RNA analizi yapılır

Belli mikroorganizmalar için spesifik olan bir gen veya nükleik asit parçasının saptanır Duyarlılık ve özgüllükleri yüksektir

## - Fenotipik İdentifikasyon

Bakterinin gözlenebilen fiziksel ve metabolik özelliklerine göre yapılır

**En sık kullanılan fenotipik özellikler:**

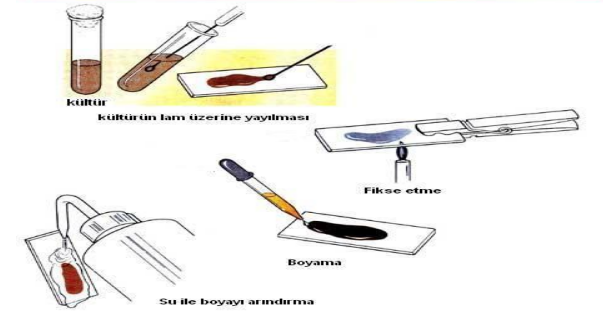
Mikroskopik morfoloji ve boyanma özellikleri

Makroskopik (koloni) morfoloji

Üreme için gerekli çevresel gereksinimler

Antimikrobiyallere Duyarlılık  
Direnç

Nutrisyonel gereksinimler  
metabolik özellikle



/  
ve

- Üreme özellikleri, mikroskopik morfoloji ve tek test sonuçları (ör. Katalaz) bakterileri genel gruplara ayrılabilir

- Ancak ileri tanımlama için metabolik özelliklerin yer aldığı şemaların Kull.

TANIMLAMA  
VE ARASTIRMA MERKEZİ



guzem.gazi.edu.tr • uzaktanegitim.gazi.edu.tr • lms.gazi.edu.tr



DISTANCE EDUCATION  
APPLICATION & RESEARCH CENTER



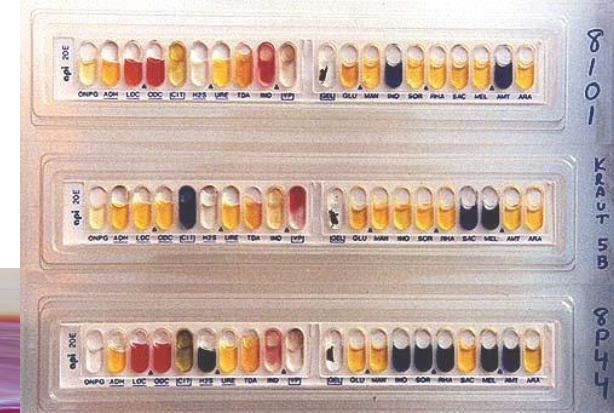
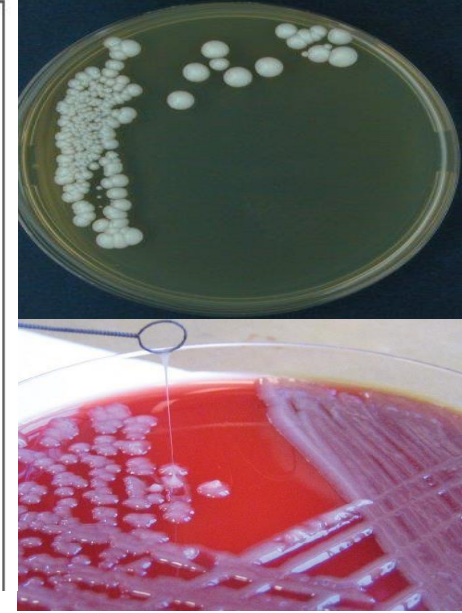
# İdentifikasyon, hazırlanması ve teknikleri ve kültür, kullanımı, uygun suşların çözücülerin boyanma



İdentifikasyon sistemleri başlıca 4 komponenti içerirler:

- Uygun testin ve inokülasyonun seçilmesi
- Substrat kullanımı veya üreme inhibitörleri ile etkileşim için inkübasyon
- İnkübasyon sırasında oluşan metabolik aktivitenin belirlenmesi
- Metabolik profillerin analizi – bilinen bir veri tabanı ile karşılaştırma
- Morfolojik ve Kültürel özelliklerin belirlenmesi/ metabolik testler/ Serolojik Testler

| Bakteriler | Laktozu kullanabilme | B vitamini gereksinimi | Antibiyotiğe Dirençlilik | Tuza dirençlilik (%) |
|------------|----------------------|------------------------|--------------------------|----------------------|
| A          | +                    | Yok                    | 4 ppm                    | % 3                  |
| B          | -                    | Yok                    | 5 ppm                    | % 2                  |
| C          | +                    | Var                    | 4 ppm                    | % 1                  |
| D          | -                    | Var                    | 3 ppm                    | % 5                  |
| E          | -                    | Yok                    | 3 ppm                    | % 2                  |
| F          | +                    | Yok                    | 3 ppm                    | % 3                  |
| G          | +                    | Yok                    | 3 ppm                    | % 2                  |

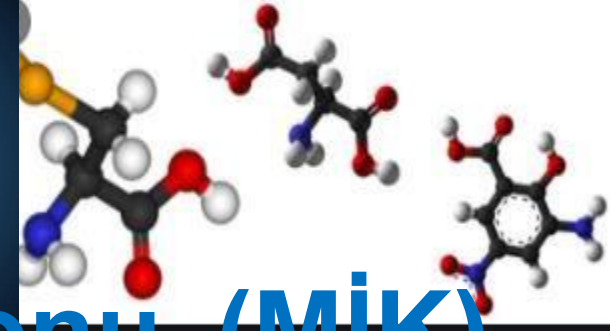
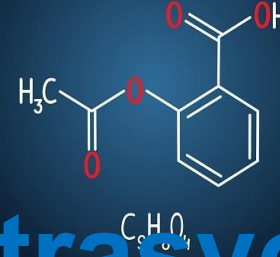




# Biyoaktivite Testleri

- Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) testleri:
- Yeni sentez ve bitkisel ekstrelerde aktivite tayinleri;
- Antibakteriyel aktivite,
- Antifungal aktivite,
- Antidermatofitik aktivite,
- Antiviral aktivite,

Acetylsalicylic acid



•Antiprobiyotik,

•Antibiyofilm

<https://www.saglikaktuel.com/bitki-ansiklopedisi-gelincik-nedir-faydalari-nelerdir-1530.htm>



# Steril Kabinler



Şekil . Laminar Flow kabin



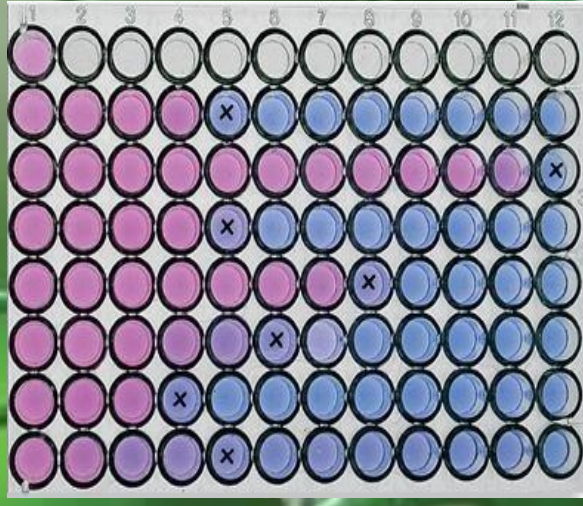
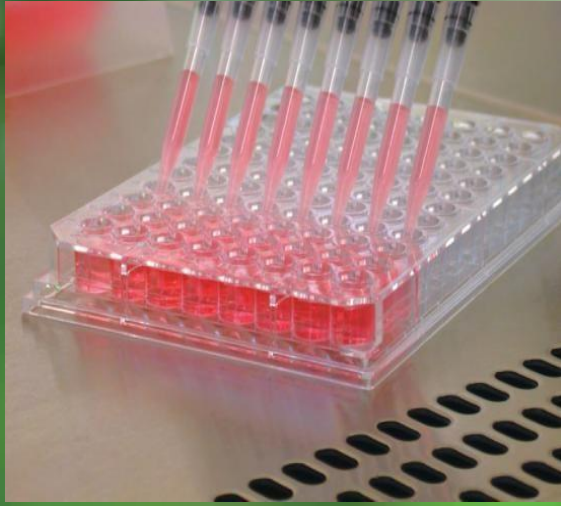
Şekil . Anaerobik kabin



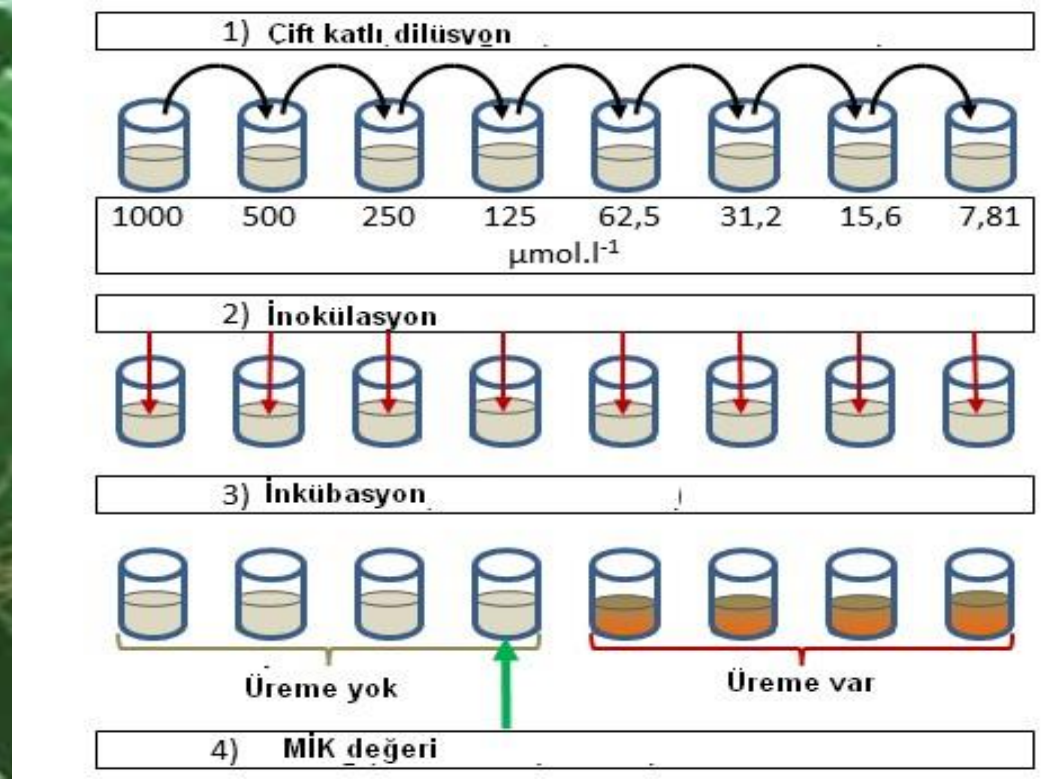
# Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Bakteriyel yoğunluk McFarland 0,5'e göre bulanıklık karşılaştırılarak ayarlanır. Bunun için 0,5 McFarland solüsyonu hazırlanır. Çizelgede McFarland standardı hazırlamak için gerekli baryum klorür ( $\text{BaCl}_2$ ) ve sülfürik asit ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) miktarları görülmektedir.

| McFarland standart no. | % 1.0 (wt/vol) $\text{BaCl}_2$ (veya % 1.175 (wt/vol) ( $\text{BaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )) (ml) | % 1.0 (vol/vol) $\text{H}_2\text{SO}_4$ (ml) | Bakteriyel süspansiyonunda denk gelen yaklaşık hücre sayısı ( $\text{CFU ml}^{-1}$ ) | Biyofilm oluşumu için kullanılan inokulumda yaklaşık hücre sayısı |
|------------------------|--|--|--|---|
| 0,5                    | 0,050  | 9,950  | $1,5 \times 10^8$  | $5,0 \times 10^6$   |
| 1,0                    | 0,100  | 9,900  | $3,0 \times 10^8$  | $1,0 \times 10^7$   |
| 2,0                    | 0,200  | 9,800  | $6,0 \times 10^8$  | $2,0 \times 10^7$   |
| 3,0                    | 0,300  | 9,700  | $9,0 \times 10^8$  | $3,0 \times 10^7$   |



Şekil. Mikrodilüsyon







## Agar Difüzyon

**-Disk Yöntemi:** Disk difüzyon yöntemi günümüzde antimikrobiyal duyarlılığın belirlenmesinde en çok tercih edilen yöntemlerin başında gelmektedir. Disk difüzyon yönteminin avantajları son derece ucuz olması ve karmaşık ekipmanlara ihtiyaç olmamasıdır. CLSI gibi kurumlar tarafından yayınlanan kriterler kullanılarak yorumlanabilir olması yanı sıra dezavantajları otomatize sistemlerin geliştirilememiş olması ve her bakteriye uygulanamamasıdır.

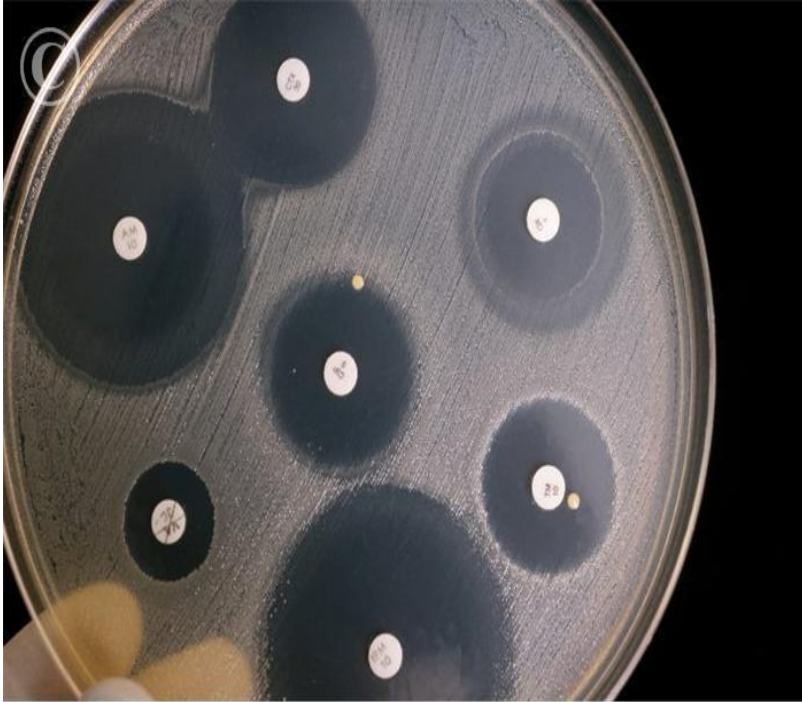
**-Kuyu Yöntemi:** Bu yöntemde daha önceden inokule edilmiş agar pleytlere 6 mm çapında kuyular açılır. Daha sonra bu kuyulara hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki test maddeleri doldurulur.

**-Silindir Yöntemi:** Bu metotta, ateşe dayanıklı cam, camla kaplanmış porselen, alüminyum veya paslanmaz çelik malzemeden yapılmış, dış çapı  $8 \pm 0,1$  mm, iç çapı  $6 \pm 0,1$  mm ve uzunluğu  $10 \pm 0,1$  mm olan silindirler kullanılır.

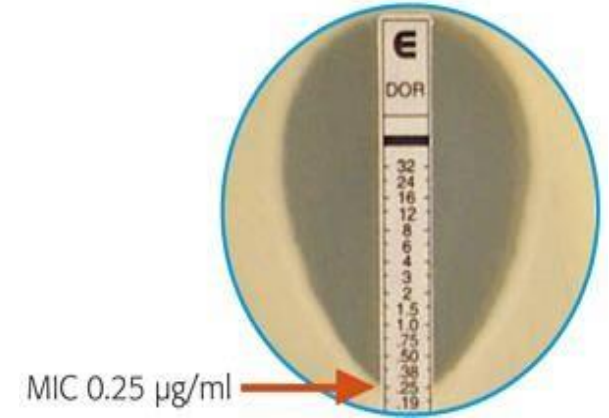
**-Beta-Laktamaz Direnç Testi:** Bu testler renk değişimi reaksiyonlarıdır ve beta laktamların hidrolizine bağlı ortaya çıkan ürünlerin saptanması esasına dayanır.

**-Nitrosefin Testi:** Nitrosefin bir sefalosporin antibiyotiktir. Nitrosefin emdirilmiş kâğıt diskler şeklinde ticari olarak bulunabilir. Nitrosefin hidroliz olduğunda rengi sarıdan kırmızıya dönüşmektedir. Test edilecek bakteri tek koloni ekimi yapılarak üretilir. Mikroskop lamının üzerine bir damla saf su damlatılıp nitrosefin içeren diskler yerleştirilir. Öze ile saf bir koloni alınıp üzerine sürülür ve 5. dakika ve 1. saatteki renk değişimine bakılır. Sarıdan kırmızıya olan renk değişimi pozitif sonuç verir yani beta laktamaz üretimi olduğunu gösterir.





202025 [RM] © www.visualphotos.com



<http://www.biomerieux-diagnostics.com/sites/clinic/files/styles/large/public/etest-applicator-tray.jpg>

| Antimikrobiyal                  | <i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC 29213 | <i>Enterococcus faecalis</i><br>ATCC 29212 | <i>Escherichia coli</i><br>ATCC 25922 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>ATCC 27853 | <i>Escherichia coli</i><br>ATCC 35218 |
|---------------------------------|--|--|---------------------------------------|---|---------------------------------------|
| Amikasin                        | 1-4  | 64-256                                     | 0,5-4                                 | 1-4   | -                                     |
| Amoksisilin/<br>Klavulanik asit | 0,12/ 0,06-0,5/<br>0,25                    | 0,25/<br>0,12-1,0/ 0,5                     | 2/ 1-8/ 4                             | -   | 4/ 2-16/ 8                            |
| Ampisilin                       | 0,5-2 (e)                                  | 0,5-2                                      | 2-8                                   | -   | -                                     |
| Karbenisilin                    | 2-8  | 16-64                                      | 4-16                                  | 16-64                                       | -                                     |
| Sefaklor                        | 1-4  | -  | 1-4                                   | -   | -                                     |
| Sefamandol                      | 0,25-1                                     | -  | 0,25-1                                | -   | -                                     |
| Sefepim                         | 1-4  | -  | 0,016-0,12                            | 1-8   | -                                     |
| Sefiksim                        | 8-32                                       | -  | 0,25-1                                | -   | -                                     |
| Sefotetan                       | 4-16                                       | -  | 0,06-0,25                             | -   | -                                     |
| Sefoksitin                      | 1-4  | -  | 1-4                                   | -   | -                                     |
| Seftazidim                      | 4-16                                       | -  | 0,06-0,5                              | 1-4   | -                                     |
| Sefalotin                       | 0,12-0,5                                   | -  | 0,25-1                                | -   | -                                     |
| Kloramfenikol                   | 2-8  | 4-16                                       | 2-8                                   | -   | -                                     |
| Siprofloksasin                  | 0,12-0,5                                   | 0,25-2                                     | 0,004-0,016                           | 0,25-1                                      | -                                     |
| Klaritromisin                   | 0,12-0,5                                   | -  | -                                     | -   | -                                     |
| Klinafloksasin                  | 0,008-0,06                                 | 0,03-0,25                                  | 0,002-0,016                           | 0,06-0,5                                    | -                                     |
| Klindamisin                     | 0,06-0,25                                  | 4-16                                       | -                                     | -   | -                                     |
| Eritromisin                     | 0,25-1                                     | 1-4  | -                                     | -   | -                                     |
| Gentamisin (a)                  | 0,12-1                                     | 4-16                                       | 0,25-1                                | 0,5-2                                       | -                                     |
| İmipenem                        | 0,016-0,06                                 | 0,5-2                                      | 0,06-0,25                             | 1-4   | -                                     |

|                           |                 |               |                   |              |          |
|---------------------------|-----------------|---------------|-------------------|--------------|----------|
| <b>Kanamisin</b>          | <b>1-4</b>      | <b>46-64</b>  | <b>1-4</b>        | <b>-</b>     | <b>-</b> |
| <b>Levofloksasi<br/>n</b> | <b>0,06-0,5</b> | <b>0,25-2</b> | <b>0,008-0,06</b> | <b>0,5-4</b> | <b>-</b> |
| <b>Linezolid</b>          | <b>1-4</b>      | <b>1-4</b>    | <b>-</b>          | <b>-</b>     | <b>-</b> |
| <b>Meropenem</b>          | <b>0,3-0,12</b> | <b>2-8</b>    | <b>0,008-0,06</b> | <b>0,5-4</b> | <b>-</b> |
| <b>Metisilin</b>          | <b>0,5-2</b>    | <b>&gt;16</b> | <b>-</b>          | <b>-</b>     | <b>-</b> |
| <b>Mezlosilin</b>         | <b>1-4</b>      | <b>1-4</b>    | <b>2-8</b>        | <b>8-32</b>  | <b>-</b> |

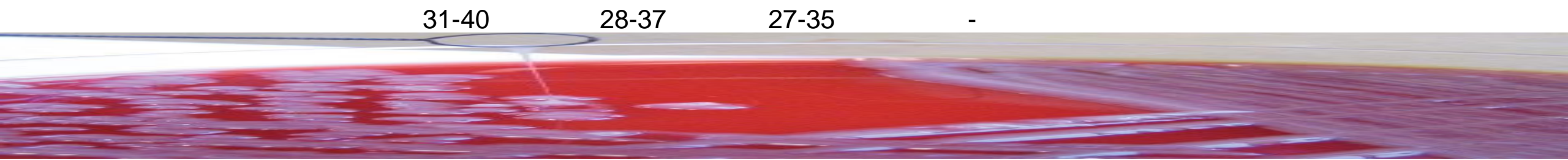
MİK (µg/mL)



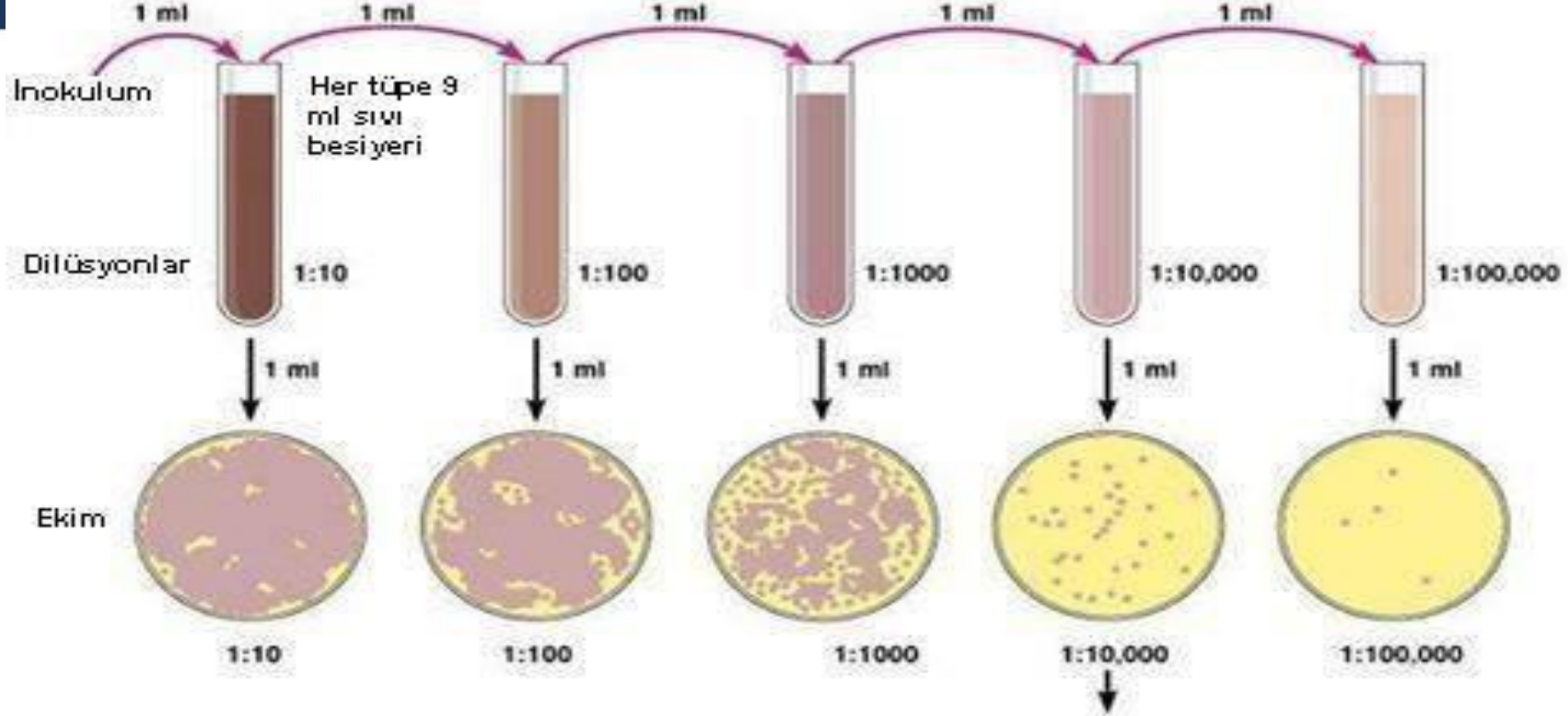
| Antimikrobiyal                | Disk içeriđi | <i>E. coli</i><br>ATCC<br>25922 | <i>S. aureus</i><br>ATCC<br>29213 | <i>P. aeruginosa</i><br>ATCC<br>27853 | <i>E. coli</i><br>ATCC<br>35218 |
|-------------------------------|--------------|---------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|
| Amikasin                      | µg/ml        | 20-26                           | 20-26                             | 19-26                                 | -                               |
| Amoksisilin / Klavulanik asit | 20/10 µg/ml  | 19-25                           | 28-36                             | -                                     | 18-22                           |
| Ampisilin                     | µg/ml        | 16-22                           | 27-35                             | -                                     | -                               |
| Karbenisilin                  | µg/ml        | 23-29                           | -                                 | 18-24                                 | -                               |
| Sefaklor                      | µg/ml        | 23-27                           | 27-31                             | -                                     | -                               |
| Sefamandoil                   | µg/ml        | 26-32                           | 26-34                             | -                                     | -                               |
| Sefepim                       | µg/ml        | 29-35                           | 23-29                             | 24-30                                 | -                               |
| Sefiksim                      | µg/ml        | 23-27                           | -                                 | -                                     | -                               |
| Sefotetan                     | µg/ml        | 28-34                           | 17-23                             | -                                     | -                               |
| Sefoksitin                    | µg/ml        | 23-29                           | 23-29                             | -                                     | -                               |
| Seftazidim                    | µg/ml        | 25-32                           | 16-20                             | 22-29                                 | -                               |
| Sefalotin                     | µg/ml        | 15-21                           | 29-37                             | -                                     | -                               |
| Kloramfenikol                 | µg/ml        | 21-27                           | 19-26                             | -                                     | -                               |
| Siprofloksasin                | µg/ml        | 30-40                           | 22-30                             | -                                     | -                               |

|               |       |   |       |   |   |
|---------------|-------|---|-------|---|---|
| Klaritromisin | µg/ml | - | 26-32 | - | - |
| Klinalflosa   | µg/ml |   |       |   |   |

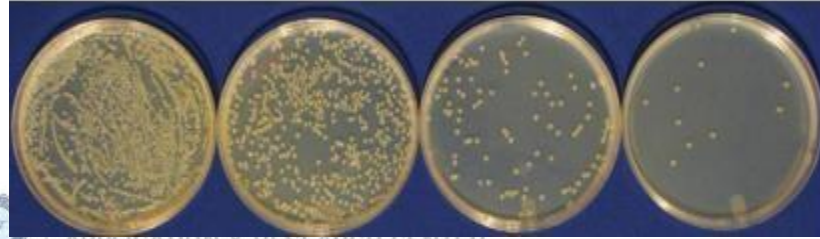
Disk  
Difüzyon



# FARMASÖTİK FORMLARIN MİKROBİYOLOJİK ANALİZİ

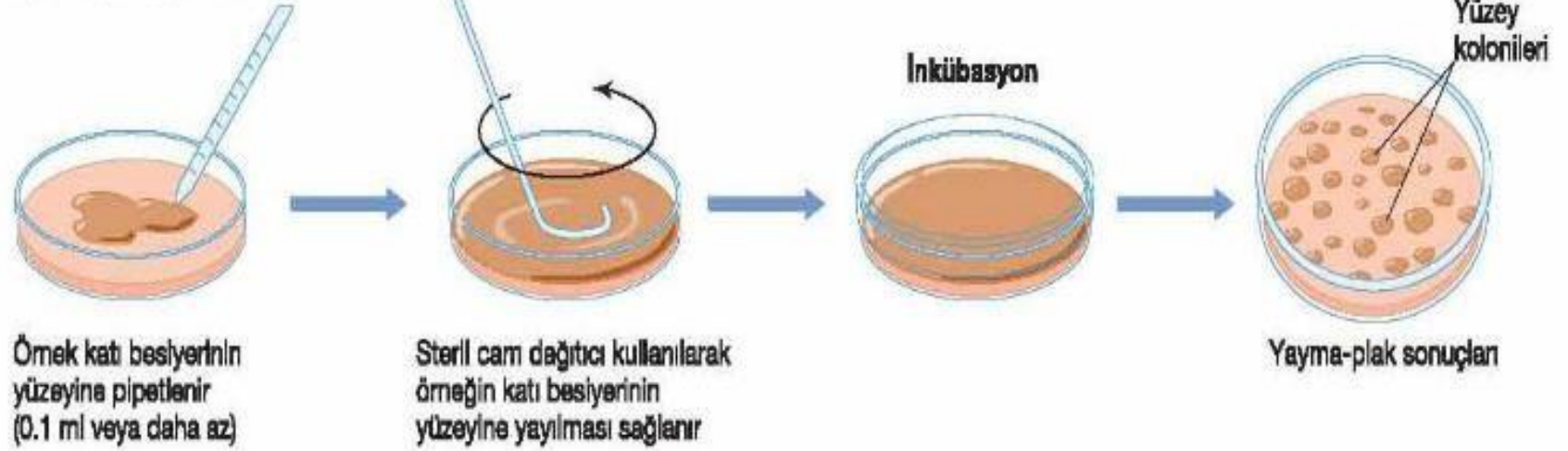


Hesaplama: Pleyttteki koloni sayısı X örneğin dilüsyonunun çarpmaya göre tersi = ml'deki bakteri sayısı  
Örneğin, 1/10,000 dilüsyondaki pleytte 32 koloni sayılmış ise, örneğin ml'sindeki bakteri sayısı  $32 \times 10,000 = 320,000$  'dir.

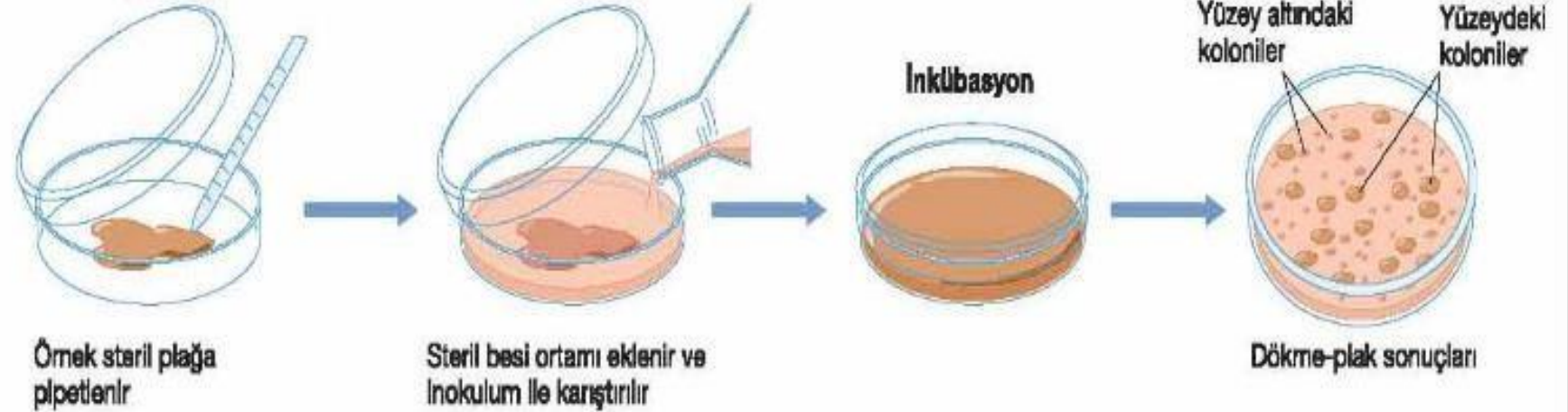




### Yayma-plak yöntemi

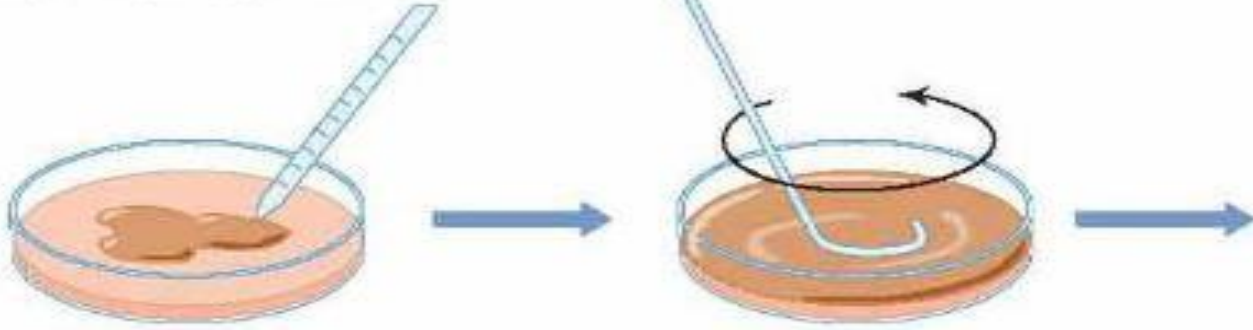


### Dökme-plak yöntemi



• **Şekil 6.10 Canlı hücre sayımı.** Canlı hücre sayımında kullanılan iki yöntem. Her birinde, ekim yapılmadan önce örneğin seyreltilmesi gerekir. Dökme plak yönteminde kolonilerin agar yüzeyinde olduğu kadar agarın içerisinde de oluştuğuna dikkat ediniz.

## Yayma-plak yöntemi



Örnek katı besiyerinin

Steril can  
ğın k  
yine.

Dö

Ö  
pl

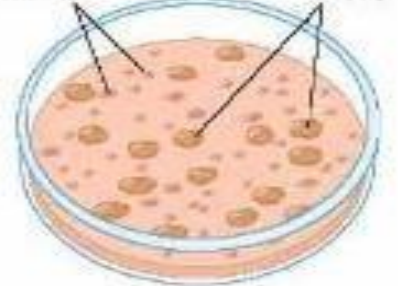
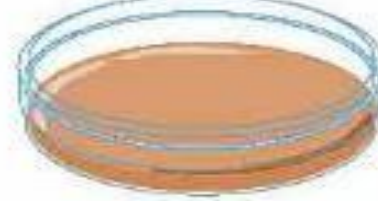


il besi ortamı eklenir ve  
ulum ile karıştırılır



<http://www.apekmedical.com/products/category/mikrobiyolojik-laboratuvar-urunleri>

**İnkübasyon**



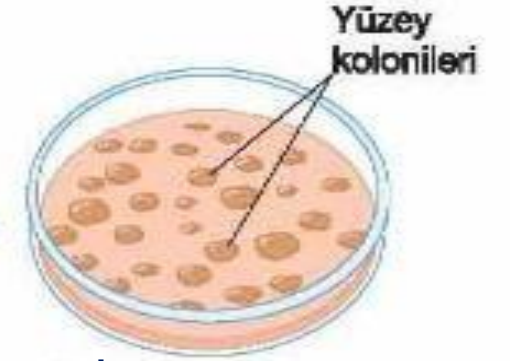
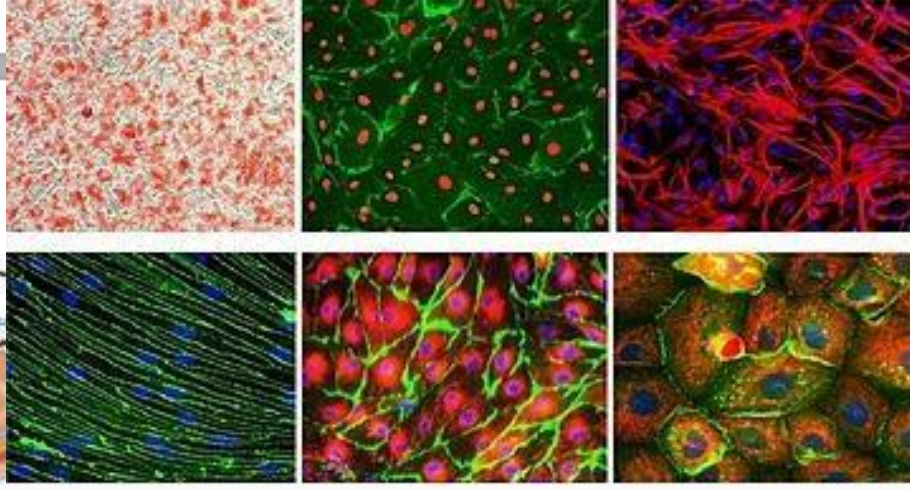
**Dökme-plak sonuçları**

[http://www.emdmillipore.com/INTERSHOP/static/WFS/Merck-Site/-/Merck/en\\_US/Freestyle/BI-Bioscience/Cell-Culture/cell-culture-images/millex\\_w\\_needle.jpg](http://www.emdmillipore.com/INTERSHOP/static/WFS/Merck-Site/-/Merck/en_US/Freestyle/BI-Bioscience/Cell-Culture/cell-culture-images/millex_w_needle.jpg)

• **Şekil 6.10 Canlı hücre sayımı.** Canlı hücre sayımında kullanılan iki yöntem. Her birinde, ekim yapılmadan önce örneğin seyreltilmesi gerekir. Dökme plak yönteminde kolonilerin agar yüzeyinde olduğu kadar agarın içerisinde de oluştuğuna dikkat ediniz.



## Yayın Plak Yöntemi



## Hücre Kültür Ortamı İçin Kullanılan Cihazlar

- Laminar steril çalışma kabini (Hood)

- CO2 inkübatörü

- İverted mikroskopu

- Santrifüj

- Vakum hattı

- Otoklav

- Sıvı azot tankı



Dökme-plak sonuçları

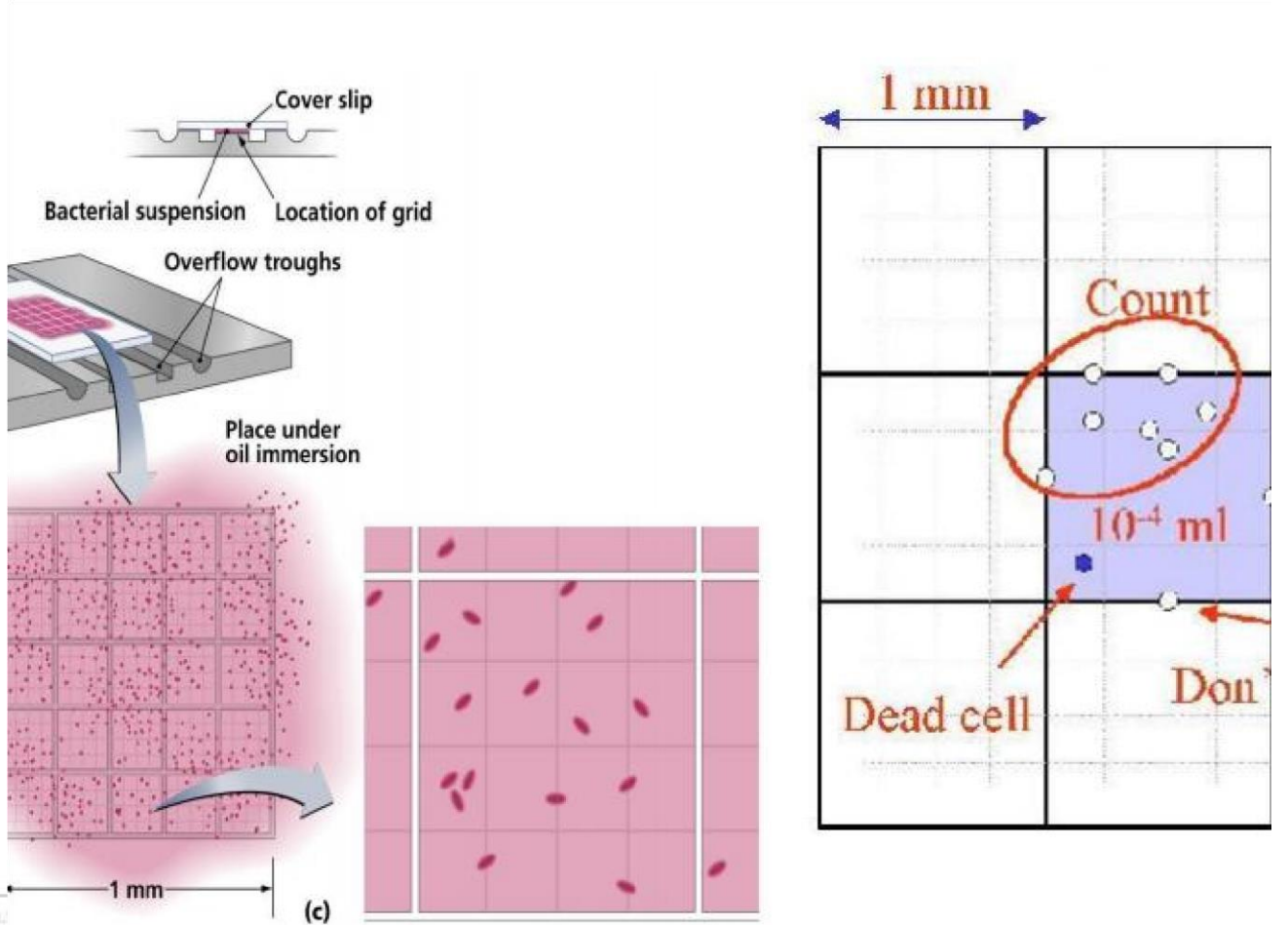
● **Şekil 6.10 Canlı hücre sayımı.** Canlı hücre sayımında kullanılan iki yöntem. Her birinde, sayı yapmadan önce örneğin seyreltilmesi gerekir. Dökme plak yönteminde kolonilerin agar yüzeyinde olduğu kadar agarın içerisinde de oluştuğuna dikkat ediniz.





Hücre sayılarının hesaplanması 1 ml kültür medyumunda sulandırılan hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak ependorf tüpe aktarılır ve üzerine 90 µl Tripan Blue boyası konarak karıştırılır.

Bu karışım Toma Lamına aktarılır, toma lamından 5 bölme sayılır, bulunan sayı sulandırma miktarı x50.000 sayısı ile çarpılır. Sonuç olarak 1 ml medyumda kaç milyon hücre olduğu bulunur.

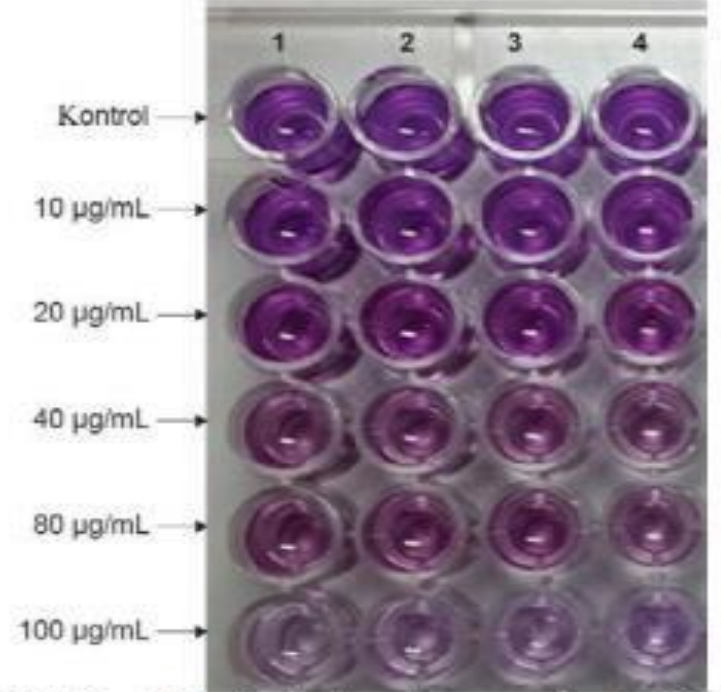


# Sitotoksite Testleri

## MTT, XTT, WST (WST-1, WST-8)

Tetrazolyum halkasının canlı ve mitokondriyal fonksiyonları bozulmamış hücrelerdeki mitokondriyal dehidrojenaz enzimi ile formazana dönüşmesi esasına dayanır.

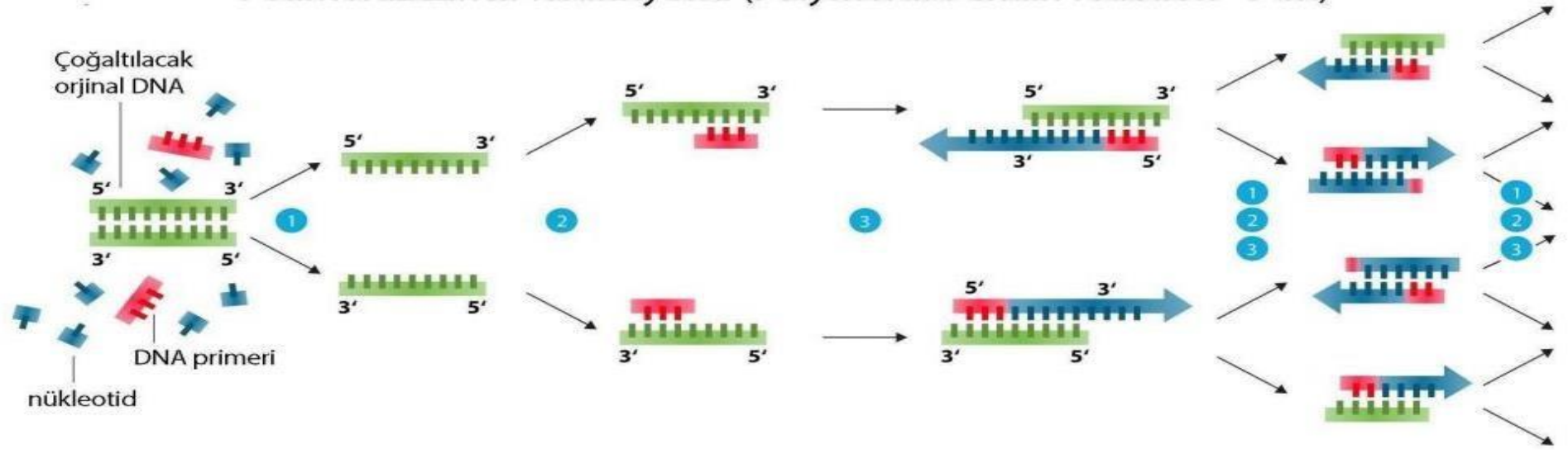
MTT: soluk sarı renk → mavi-mor renk  
XTT: soluk sarı renk → turuncu renk  
WST-1: açık kırmızı renk → koyu kırmızı renk  
WST-8: soluk sarı renk → turuncu renk



Şekil 2. MTT testinde oluşan renk değişimi (Aravinthan ve ark., 2015).

<https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/320938>

## Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase chain reaction - PCR)



- 1 Denatürasyon 94-98 °C
- 2 Bağlanma 37-65 °C
- 3 Uzama 72 °C

<https://ekog.org/2020/04/22/molekuler-biyolojide-vazgecilmez-bir-yontem-polimeraz-zincir-reaksiyonu-pcr/>

# Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

# Agaroz Jel Elektroforezi

