



İletişim adresleri

"Güven Kulekçi" gkulekci@istanbul.edu.tr, "Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti" tmc@tmc-online.org

Anaerop Haber Nisan 2015 sayısının konu başlığı : *Laboratuvar donanım ve sarf malzemeleri*

ANAEROP LABORATUVAR ÇALIŞMALARINDA ANAEROP KABİN KULLANIMI

Prof. Dr. Mehmet BAYSALLAR

Uzm. Biyolog Sinem KAYA

GATA ve Askeri Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

e-posta adresi: mbaysallar@gata.edu.tr

Anaerop bakteriler, ortamda oksijen bulunmadığında üreyebilen mikroorganizmalar olarak kabaca tanımlanmalarına rağmen, çeşitli anaerop bakterilerin oksijene olan ilgileri farklı olmaktadır. Buna göre anaerop bakteriler, oksijene olan duyarlılıkları değişkenlik gösteren, üreyebilmeleri için ortamdaki serbest oksijenin uzaklaştırılmasına ihtiyaç duyan, normal atmosfer koşullarında ve %5-10 karbondioksitli ortamda katı besiyerinde üreyemeyen bakterilerdir.

Anaerop bakterilerin mikrobiyolojik tanısı yapılırken, klinik örneklerin ilk olarak işleme alınması ve inkübasyonu, eğer mevcut ise anaerop kabinde başlar. Eğer işlem anaerop kabinde yapılmıyorsa, ekimi yapılmış besiyerlerinin uzun süre havaya maruz kalmamaları için ekim sonrası derhal anaerop ortama kaldırılmaları gerekir.

Anaerop bakterilerin bakteriyolojik incelenmesinde kullanılan çeşitli sistemler vardır. Bu sistemlerden birisi olan anaerop kabinler, %80-85 N₂, %5 H₂, %5-10 CO₂ atmosfer karışımının kullanıldığı sistemlerdir (Şekil 1). Anaerop kabinler anaerop kültür çalışmalarının her adımında (besiyeri hazırlama, kültür, inokülasyon, inkübasyon, identifikasyon ve antimikrobik duyarlılık çalışmaları) kullanılan ideal sistemlerdir. Ancak az sayıda kültürün yapıldığı laboratuvarlarda jarlar ve anaerop torbalar gibi alternatif sistemler tercih edilmelidir.

Anaerop kabinlerde anaerop gaz karışım tüpü kullanılıyorsa, tavsiye edilen gaz karışım oranları %5 hidrojen (H₂), %5 karbondioksit (CO₂) ve %90 azot (N₂) olmalıdır ve karışım tüpü içerisindeki H₂ seviyesi %5'i geçmemelidir. Eğer üç anaerop çalışma bölgesi (yükleme odası, uygulama bölümü, inkübatör) kullanılıyorsa tüplerden bir tanesi karışım gazı, diğeri ise %100 azot (N₂) içermelidir (Şekil 2). Gaz tüplerinin kabinle olan bağlantısı gaz regülatörleri (manometre) (Şekil 3) ile sağlanarak, çalışılmak istenen basınç ayarlaması yapılır. GATA Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda kullanılmakta olan Bactron IV anaerop kabin; yüklem odası (örneklerin ve anaerop kültür uygulamalarında kullanılmak üzere uygulama bölgesine aktarılması istenen malzemelerin yerleştirildiği bölüm), kabin (anaerop kültür uygulamalarının yapıldığı bölüm) ve inkübatör olmak üzere üç bölümden oluşmaktadır (Şekil 1).

Yükleme odası

Kabin içi uygulama bölümü

İnkübatör



Şekil 1. Anaerop Kabin (GATA Tıbbi Mikrobiyoloji A.D Bakteriyoloji Laboratuvarı)



Azot tüpü

Karışım tüpü

Şekil 2. Anaerop kabin uygulamalarında kullanılan gaz tüpleri



Şekil 3. Gaz tüpü basınç regülatörü ve miktar göstergesi

Resazurin veya metilen mavisi indikatörü ile kabin ortamının anaerop atmosfer kontrolü yapılır. Kontrol için, kabin içerisinde çalışma esnasında kağıda emdirilmiş indikatörler üzerine bir damla su ilave edilerek üzerindeki renk değişimi kontrol edilir (Şekil 4a, 4b). İndikatörün renk değiştirmesi durumunda çalışma kabini anaerop şartları sağlamış durumdadır ve kullanıma hazırdır.



Şekil 4a. Atmosfer ortamında resazurin indikatörü
(indikatör kırmızı renkte)



Şekil 4b. Anaerop ortamda resazurin indikatörü
(indikatör renksiz)

Anaerop kabinlerin önemli bir bileşeni olan katalizör kartuşlar kabin içerisindeki oksijenin gaz karışımındaki hidrojen ile reaksiyona girmesini hızlandırmakta ve oksijenin uzaklaştırılması sağlanmaktadır. Bunun için palladium kaplı alüminyum pelletlerden oluşan katalizörler kullanılmaktadır (Şekil 5).

Bir kartuş mutlaka kabin içerisinde takılı olmak zorundadır. İkinci kartuş tekrar aktiflenerek kullanıma hazır bir şekilde bekletilmelidir. Yeniden aktifleme işlemi için kartuşlar 1,5 veya 2 saat süresince 160°C'de (320°F) günlük olarak tutulmalıdır. Aylık periyotlar ile üzerinden anaerop gaz geçirerek katalizörlerin işlevinin kalite kontrolü yapılır. Bu kontrol şu şekilde yapılır; karışım tüpünün basıncı gaz regülatörü kullanılarak 1-2 -in. Hg atmosferine kadar düşürüldükten sonra hortum bağlantısı tüpten çıkarılır ve tüp vanasından katalizör kartuş üzerine karışım gazı püskürtülür. Eğer ısınma gerçekleşiyorsa katalizörler çalışma için hazır demektir. Eğer ısınmıyorsa, 180°C'den 200°C'ye kadar ısıtılır, tekrar üzerinden gaz geçirilir. Bu şekilde katalizörün etkinliğini düşüren sülfid bileşiklerinin uzaklaştırılması sağlanacaktır. Katalizörlerin aktiflenme işlemi için fırın kullanılabilir. Bir katalizör, yükleme odası içerisindeki oksijen seviyesini tamamen düşürmek için de kullanılabilir.

**Katalizör
Kartuş**



Şekil 5. Katalizör kartuş

Anaerop kabinin bakım ve temizliği üretici firma tarafından tavsiye edilen yöntemlerle yapılarak ünitelerin zarar görmesi engellenir. Bakım;

- 1.Yeniden aktiflendirilmiş katalizörün kabindeki katalizörle değiştirilmesi,
- 2.Anaerop ortam indikatörlerinin değiştirilmesi,
- 3.Kabinin dezenfekte edilmesi,
- 4.Kolluk ve sızdırmazlık parçalarında yıpranma veya aşınmanın kontrol edilmesi, var ise değiştirilmesi,
- 5.İnkübatör sıcaklığının kontrol edilmesi,
- 6.Gaz tüpleri üzerindeki manometrelerin basınç ve gaz miktarı açısından kontrol edilmesi,
- 7.Yoğunlaşan suyun (Şekil 6) kabin dışına çıkarılması gibi adımlardan oluşmaktadır.

**Kabin içerisinde
yoğunlaşan su**



Şekil 6. Kabin içerisinde yoğunlaşan suyun toplanması

Anaerop kabin (BACTRON IV Anaerobic Chambers-Shel Lab) mekanik olarak üç farklı bölmeden oluşmaktadır.

- 1.Yükleme odası
- 2.Kabin içi uygulama bölgesi
- 3.İnkübatör

1. YÜKLEME ODASI: Kullanılmak üzere kabin içi uygulama bölümüne aktarılması istenen malzeme ve örneklerin yerleştirildiği bölümdür (Şekil 7).



Şekil 7. Yükleme odası

Yükleme odasının kabin içerisine açılması için aşağıdaki iki yöntemden birisi izlenir.

A) Elle Döngü (Elle Gaz/Vakum Anahtarı)

Kontrol paneli (Şekil 8) üzerinde ‘Manual Gas/Vacuum Cycling’ anahtarı bulunmaktadır. Bu anahtar üç kademelidir:

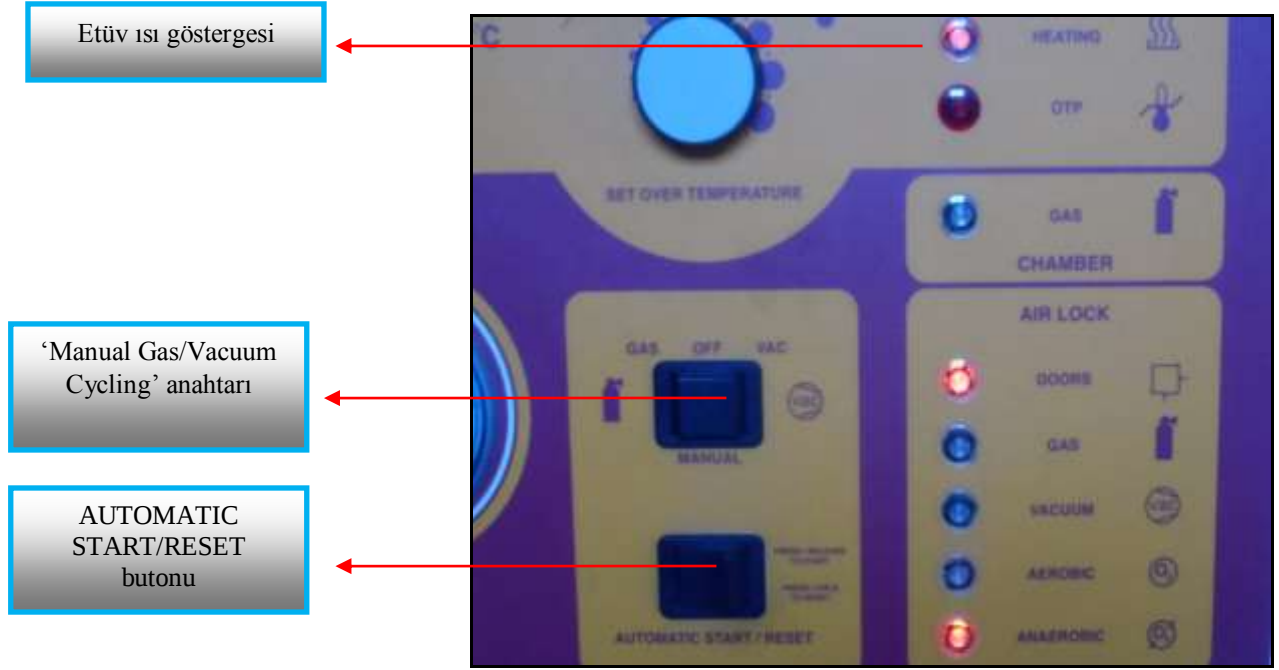
- Gas/VAC anahtarı VAC konumuna getirilir ve basınç göstergesinden (Şekil 9) 17-20-in. Hg atmosferine ulaşması sağlanır.
- Gas/VAC anahtarı GAS konumuna getirilir ve göstergedeki 4-in. Hg basınç seviyesine ulaşana kadar gaz verilir. Bu işlem en az üç defa uygulanır ve en sonunda doldurma işlemi 0-in. Hg seviyesine kadar uygulanır.
- Bu döngüler sonunda yükleme odası anaerob hale gelir ve kontrol paneli üzerindeki ‘Anaerobic’ gösterge ışığı yanar konuma gelir. Artık yükleme odası içerisindeki basınç ile kabin içi basınç eşit olduğundan yükleme odasının iç kapağı açılabilir konuma gelir. Bu işlemler sonucunda yükleme odasındaki malzeme ve örnekler yükleme tepsisi ile kabin içi uygulama bölümüne alınabilir.

B) Otomatik Döngü

Elle yapılan döngünün otomatik olarak yapılmasıdır. Bu işlem için AUTOMATIC START/RESET butonuna basmak yeterlidir. İptal için START/RESET butonu beş saniye süresince basılı tutulur.

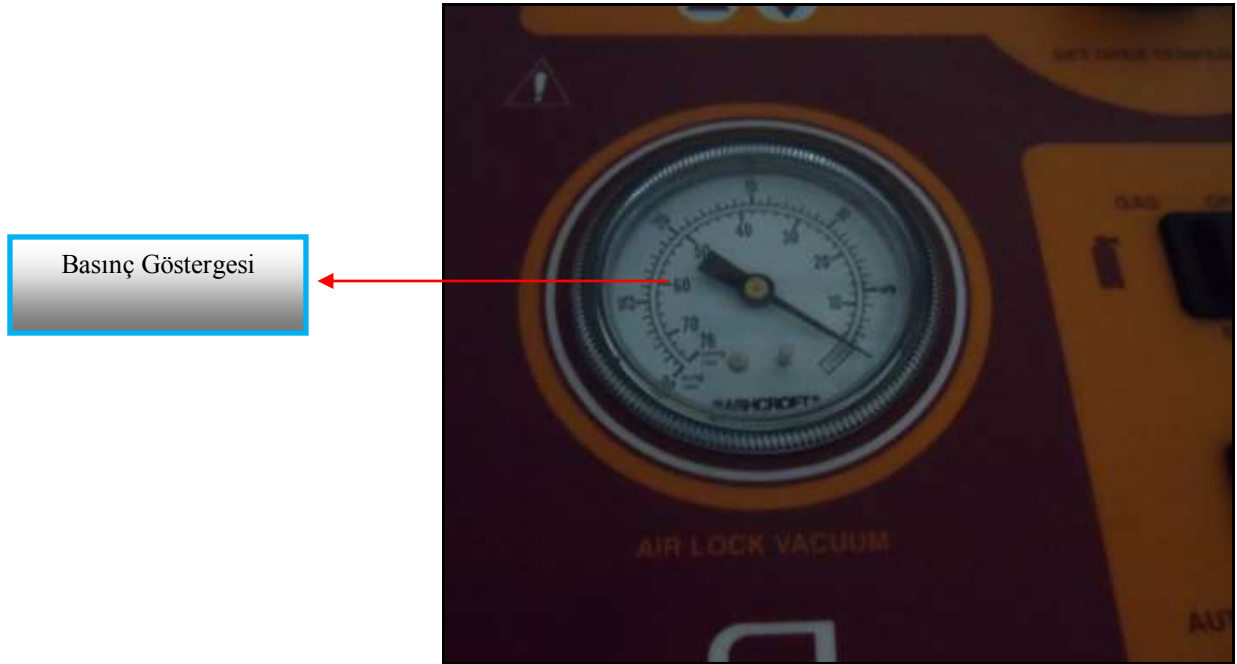
2. KABİN İÇİ UYGULAMA BÖLGESİ: Kabin uygulamaları esnasında anaerobik kabin içerisine girilmesi şu basamaklarda gerçekleşir:

- Kollar eldiven içerisine sokulur.
- Ayakla Vakum pedalına basılarak kollar eldivenlerin içerisinde iken vakumu alınır. Gaz pedalına (Şekil 10) basılarak içeriye gaz verilir. Bu işlem en az üç kez tekrarlanır.
- Üçüncü kez gaz pedalına basarak gaz verildikten sonra kabindeki eldiven kapakları açılır.
- Gaz pedalına basarak içeriye gaz verilecek şekilde eller uygulama bölümüne sokulur (Şekil 11).



Şekil 8. Kontrol paneli

Yükleme odası anaerop atmosfer içerip, kapıları kapalı olduğu sürece 'Doors' ışığı aktiftir. Anaerop kabinde gaz akışı sırasında ve kabinde gaz kaçağı olması durumunda 'Gas' ışığı aktif hale gelir. Etüv ısısı 36,5-37.0 °C'de stabil olduğu sürece 'Heating' göstergesi yanıp sönmektedir.



Şekil 9. Yükleme odası üzerindeki basınç göstergesi



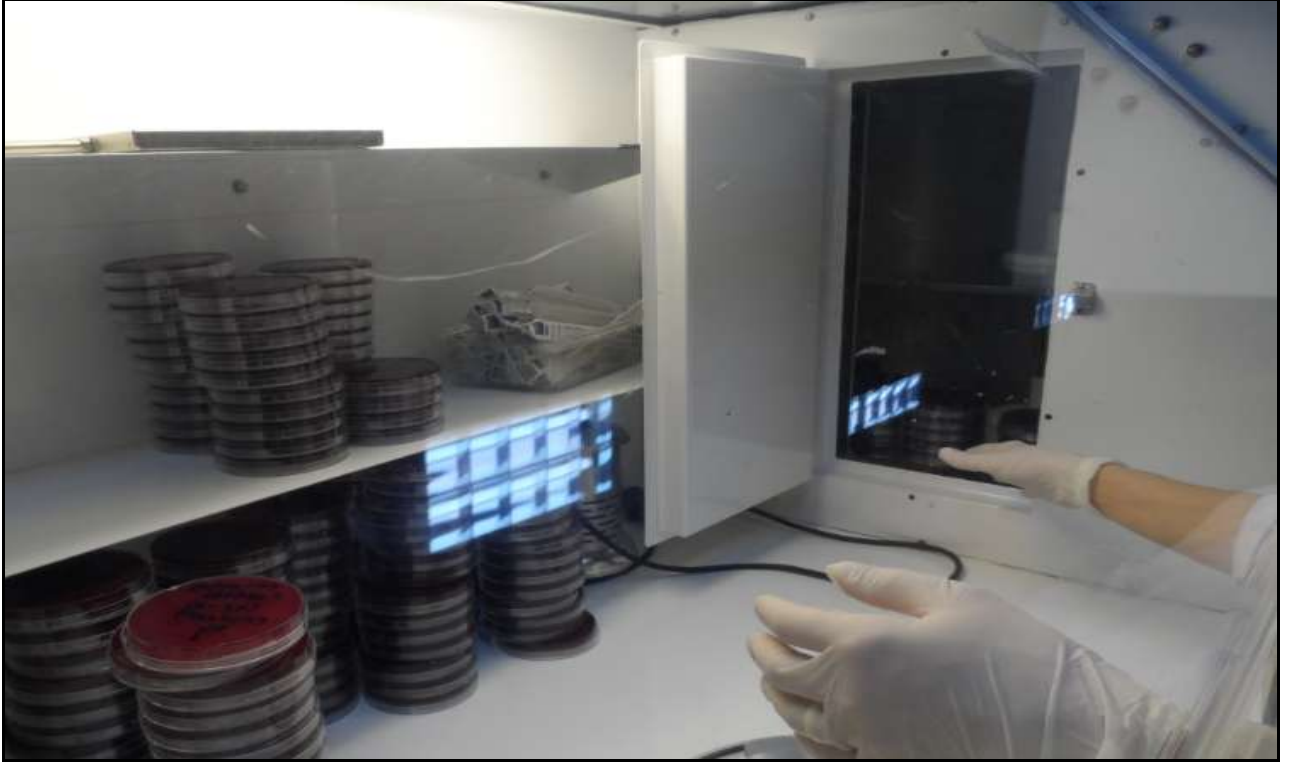
Şekil 10. Vakum/Gaz pedalı



Şekil 11. Kabin içi uygulama bölgesi

Kabinden çıkmadan önce GAZ ayak pedalına basılarak eldivenlere gaz verilir ve kapaklar kabinden çıkmadan önce gaz akışında iken kapatılır. Kapaklar kapatıldıktan sonra içerideki atmosfer dış ortamdaki atmosferden izole edilmiş olur.

- 3. İNKÜBATÖR:** Anaerop ve fakültatif anaerop mikroorganizmaların üremesi için gerekli sıcaklık koşullarının sağlandığı (36.5 °C) bölmedir (Şekil 12).



Şekil 12. Kabin İnkübatörü

KAYNAKLAR

1. Torun, M., M. Anaerop bakteri infeksiyonları: Kültürde sorunlar. Klimik 2003, XI. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi. İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Ve Klinik Mikrobiyoloji AD, İstanbul.), s: 25-28
2. Summanen, P.,H., McTeague, M., Väisänen, M.-L., Strong, C.,A., and Finegold, S., M. Comparison of recovery of anaerobic bacteria using the anoxomat, anaerobic chamber, and gaspak jar systems. Anaerobe (1999) 5, 5-9
3. Bactron IV Anaerobic Chamber (The Shel Lab) Kullanma Kılavuzu