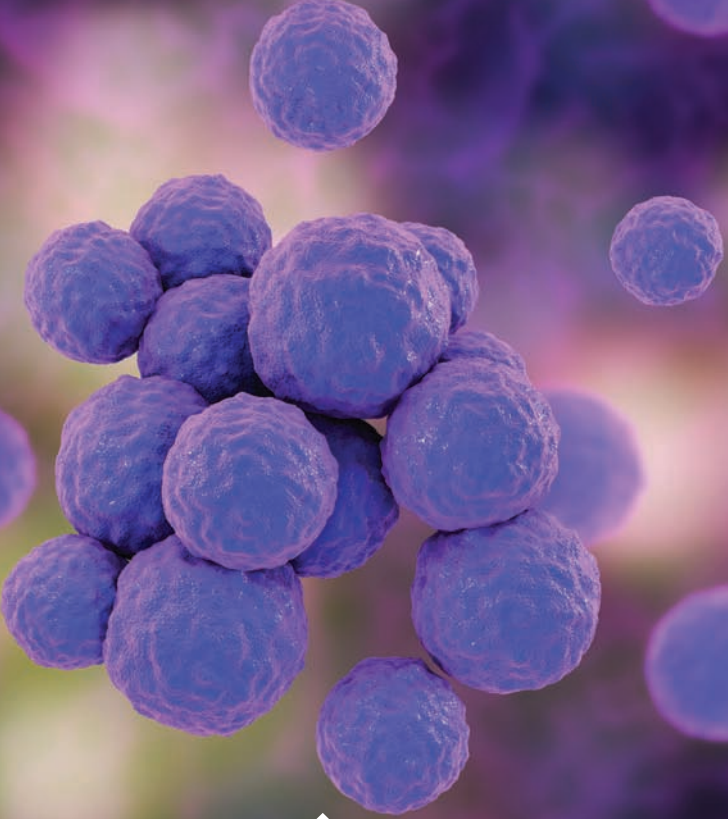


SAĞLIK BİLİMLERİ SERİSİ II

Klinik Mikrobiyoloji Uygulama Kitabı

Pelin Özmen



KAPADOKYA
ÜNİVERSİTESİ
YAYINLARI

Sağlık Bilimleri Serisi II

Klinik Mikrobiyoloji Uygulama Kitabı

YAZAR

Pelin Özmen



2019

Kapadokya Üniversitesi Yayınları: 10
Sağlık Kitapları Serisi: 2
ISBN: 978-605-80032-1-7 (basılı)
ISBN: 978-605-80721-3-8 (elektronik)
DOI: <https://dx.doi.org/10.35250/kun/9786058072138>
URL: <https://hdl.handle.net/20.500.12695/316>
© Ağustos 2019

KLİNİK MİKROBİYOLOJİ UYGULAMA KİTABI
YAZAR: PELİN ÖZMEN

© Copyright, 2021, KAPADOKYA ÜNİVERSİTESİ YAYINLARI
Sertifika No: 43348



Bu eser [Creative Commons "BY-NC-SA" \(Atıf-GayriTicari-AynıLisanslaPaylaş\) Lisansı](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/) ile lisanslanmıştır. Bu lisans, kullanıcıların eser sahibine atıf vermek koşuluyla eseri sadece ticari olmayan amaçlar için kullanmalarına ve uyarlamalarına izin verir. Buna ek olarak kullanıcıların eseri uyarlamaları halinde uyarlamayı aynı veya uyumlu bir lisans kapsamında başkalarıyla paylaşmaları koşulunu getirir.

Seri Editörü: Vesile Şenol
Hakemler: Selma Gökahmetoğlu
Redaktör: Berk İlke DüNDAR
Kapak Tasarımı: Nazile Arda ÇAKIR
Sayfa Tasarımı: Evren Demiryürek

Özmen, Pelin. *Klinik Mikrobiyoloji Uygulama Kitabı*. Nevşehir: Kapadokya Üniversitesi Yayınları.
156 s, 195x270 mm.
ISBN: 978-605-80721-1-4 (elektronik)
DOI: <https://dx.doi.org/10.35250/kun/9786058072138>
Anahtar Kelimeler: 1. Mikrobiyoloji, 2. Klinik Mikrobiyoloji, 3. Bakteriyoloji, 4. Mikoloji



KAPADOKYA
ÜNİVERSİTESİ

50420 Mustafapaşa, Ürgüp, Nevşehir
yayinevi@kapadokya.edu.tr
kapadokyayayinlari.kapadokya.edu.tr
0(384) 353 5009
www.kapadokya.edu.tr

Öğrencinin

Adı - Soyadı:

Öğrenci No:

Lab Grubu:

Önsöz	9
I Klinik Mikrobiyoloji - I	10
1 Mikroskop Kullanımı	13
2 Bakteri Morfolojisinin Mikroskopta İncelenmesi	21
3 Bakterilerde Hareket	25
4 Preparatların Tespiti (Fiksasyonu)	32
5 Bileşik (Diferansiyel) Boyama Teknikleri - 1	37
6 Bileşik (Diferansiyel) Boyama Teknikeri - 2	41
7 Ekim Yöntemleri - 1	44
8 Ekim Yöntemleri - 2	50
9 Saf Kültür Eldesi	54
10 İdentifikasyona Giriş	58
11 İdentifikasyon Testleri	63
12 Antibiyotik Duyarlılık Deneyleri	73
13 Antibiyogram Yorumlama	79

II Klinik Mikrobiyoloji-II Uygulamaları	83
1 Boğaz, Burun ve Kulak Kültürü	84
2 Değerlendirme Uygulaması - 1	92
3 Balgam Kültürü ve Tüberküloz Yönünden Örnek Yönetimi	98
4 Değerlendirme Uygulaması - 2	106
5 Üst ve Alt Solunum Materyallerinden İzole Edilmiş Patojenlere Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Yapılması	112
6 Tam İdrar Tektiki ve Kültür	115
7 Değerlendirme Uygulaması - 3	124
8 Gaita Kültürü	127
9 Parazitolojik İnceleme Yöntemleri - I	134
10 Parazitolojik İnceleme Yöntemleri - II	139
11 Kan ve Doku Parazitlerini İnceleme Teknikleri	146
12 Mikolojik İnceleme Teknikleri	150
Kaynaklar	156

ŞEKİL LİSTESİ

1.1	Işık mikroskobu.	15
1.2	Lam-lamel arası preparat hazırlama.	19
2.1	Şekillerine göre bakterilerin sınıflandırılması.	21
3.1	Halka ve iğne öze.	29
3.2	Öze çeşitleri ve öze kullanımı	30
4.1	Isı ile preparat tespiti.	32
5.1	Gram boyama.	38
6.1	EZN boyama ile <i>M.tuberculosis</i>	41
8.1	Ekim Yöntemleri.	51
8.2	Katı besiyerinde azaltma yöntemi ile ekim.	52
10.1	Katalaz testi.	59
10.2	Tüpte koagülaz testi 0.,1.,2.,3. ve 4. saat	59
11.1	Oksidaz testi.	63
11.2	IMVIC testi.	65
11.3	Voges-Proskauer testi.	65
11.4	Safrada erime testi.	68
12.1	Koloni seçimi.	76
12.2	Agarlı petrilere inokulum yapılması.	77
12.3	Antimikrobiyal disklerin yerleştirilmesi.	77
13.1	Test sonuçları ve zon çapının değerlendirilmesi.	79

13.2 S.aureus zon çapı belirleme.	80
3.1 Pürülan balgamın değerlendirilmesi.	99
3.2 Balgamın işlenmesi.	103
4.1 Optokin duyarlı pnömokok ve dirençli viridans streptokoklar.	107
4.2 X ve V faktörün her ikisine de ihtiyaç duyan H.influenza kolonileri disklerin zonlarının kesiştiği yerde daha yoğun görülmektedir.	110
5.1 Pnömokok antibiyogramı.	113
6.1 İdrar sedimentiden hazırlanmış preparatta lökosit, eritrosit, bakteri ve maya hücreleri.	118
6.2 Kalsiyum oksalat kristali.	119
6.3 İdrar stripi.	120
7.1 EMB agarda <i>E. coli</i> kolonileri.	124
7.2 <i>Proteus vulgaris</i> yayılmacı koloniler.	126
8.1 <i>Giardia lamblia</i> trofozoiti (Giemsa).	127
8.2 SS agarda farklı patojenlerin görünümü.	128
8.3 Üreaz testi.	131
8.4 TSI besiyerinde şekerlere etki, gaz oluşumu ve HS pozitifliği.	132
9.1 Gaitanın kıvamına göre trofozoit ve kist bulunma ilişkisi.	136
10.1 Sedimentasyon yöntemi.	139
10.2 Doymuş tuzlu suda flotasyon tekniği.	140
11.1 Periferik kan alma.	146
11.2 İnce yayma preparatı hazırlama.	148
12.1 Laktofenol pamuk mavisi ile boyalı preparatta hif yapıları.	150
12.2 <i>Candida albicans</i>	151

TABLO LİSTESİ

1.1	Mikroskop türleri ve özellikleri	14
1.2	Işık mikroskobu kullanım basamakları	16
3.1	Preparat hazırlama basamakları	28
4.1	Basit boyama işlemi basamakları	35
5.1	Basit boyama işlemi basamakları	39
6.1	EZN Boyama yöntemi ile preparat boyama basamakları	42
7.1	Sıvı besiyerine sıvı örnek ekim basamakları	46
7.2	Sıvı besiyerine katı örnek ekimi basamakları	48
8.1	Sıvı besiyerine katı örnek ekimi basamakları	50
9.1	Saf kültür elde etme basamakları	55
10.1	Katalaz testi basamakları	60
10.2	Katalaz testi basamakları	61
13.1	Stafilokoklar için önerilen zon çapı yorumlama standartları	80
3.1	Akciğer tüberkülozu tanısında kullanılan örneklerin alınmasına ilişkin özellikler	101
4.1	Haemophilus'ların X ve V faktör gereksinimleri	109

Sevgili öğrenciler,

İçinde yaşadığımız dönem bilgi çağıdır. Bu bilgilerden yararlanmak ve yeni bilgilerin üretilmesi, bilgilere ulaşmak kadar önemlidir.

Hiç şüphesiz, teorik bilgiye ne zaman pratik kazandırılırsa, o zaman güçlü bir anlam ifade eder. Fakat teorik bilgi olmadan da pratik için laboratuvara girmek son derece anlamsız ve verimsiz olacaktır. Bu nedenle kitapta, öğrencinin deneye başlamadan önce ihtiyaç duyabileceği kadar teorik bilgiye yer verilmiştir. Ayrıca deneyi yapmaktaki amacın, deney materyallerinin, bulunan sonuçların ne anlama geldiğinin ve deneyin püf noktalarının tartışılıp yorumlanması öğrenciye bırakılmıştır. Bu kitabın hazırlanmasında, birçok bilim adamının değerli bilgilerinden faydalanılmış olmakla beraber, alandaki laboratuvar tecrübelerinden kazanılan bilgiler ve deneyimler esas alınmıştır.

Bu kitapta, klinik mikrobiyoloji laboratuvarları ve laboratuvar çalışmaları anlaşılır bir dil kullanılarak anlatılmaya çalışılmıştır. Laboratuvar araç gereçleri ve uygulamalar ile ilgili temel bilgilerin verilmeye çalışıldığı ve basit örneklerle pekiştirildiği bu kitabın, ilgili alandaki öğrenci arkadaşlarımıza yararlı olacağını umuyoruz.

Saygılarımla

Pelin ÖZMEN

2019

Kısım I

Klinik Mikrobiyoloji - I

MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARINDA GENEL ÇALIŞMA KURALLARI

1. Laboratuvarda çalışabilmek için laboratuvar çalışma kuralları ve güvenlik kuralları bilinmelidir.
2. Laboratuvarlara zamanında gelinmeli ve ilgili deney sisteminin başında hazır bulunulmalıdır. Geç gelen öğrenci derse alınmayacaktır.
3. Laboratuvara sadece laboratuvarda çalışanlar girmelidir.
4. Laboratuvar önlüğü olmayan ya da uygulama kitabı yanında olmayan öğrenci laboratuvar derslerine giremeyecektir.
5. Kişisel temizlik kurallarına titizlikle uyulmalıdır.
6. Laboratuvarda besin maddesi bulundurulmamalıdır.
7. Çalışma esnasında kapı ve pencereler açılmamalıdır.
8. Hijyen açısından laboratuvarda bulunmaması gereken her türlü malzeme uzaklaştırılmalıdır.
9. Çalışma öncesi ve sonrasında tezgâhlar dezenfekte edilmelidir.
10. Mikroorganizma kültürlerine çıplak elle temas edilmemeli, kültür tüplerinin kapakları açık bırakılmamalı, kültürler ve laboratuvar materyelleri laboratuvar dışına çıkarılmamalıdır.
11. Laboratuvarda bulunan çöp tenekelerinin içine kırmızı tıbbi atık amblemlili atık poşetleri konmalıdır.
12. Dezenfeksiyonda ticari olarak satın alınabilen ürünler tercih edilmeli, prospektüse göre öngörülen konsantrasyonlar hazırlanmalıdır.
13. Her türlü oluşabilecek laboratuvar kazası, laboratuvar sorumlusuna bildirilmelidir.

14. Laboratuvar araçları önlük cebinde taşınmamalı, tüpler sporlarda muhafaza edilmeli, masa veya tezgâh üzerine rastgele bırakılmamalıdır.
15. Laboratuvardan ayrılmadan önce su ve gaz vanaları kapatılmalıdır.
16. Steril olup olmadığından emin olamadığınız malzemeler kullanılmamalıdır.
17. Mikroskop her kullanımdan önce ve sonra daha önceden hazırlanmış çözeltilerle temizlenmeli ve temiz bırakılmalıdır.
18. Direkt olarak mikroorganizmalar ile temas eden pipet, lam, lamel gibi malzemeleri kullandıktan sonra uygun bir dezenfektan çözelti bulunan özel kaplarda bekletilmelidir.
19. Kitabınızın uygulama sonlarında yer alan "Sonuç-Rapor" kısmını doldurarak, uygulama sorumlusuna imzalatmanız ve deney takiplerinin düzenli olarak yapılması önemlidir.
20. Laboratuvarda size ait olmayan hiçbir şeye dokunmamalı ve hiçbir şeyin yeri değiştirilmemelidir.

BÖLÜM 1

MİKROSKOP KULLANIMI

Bakteriler gözle görülemeyen canlılar olup mikroskop adı verilen aletlerle gözümüzün görebileceği büyüklüğe erişirilir. Mikroskop, merceklerden yapılmış olan ve küçük cisimleri büyüterek görmelerini sağlayan bir alet olarak tanımlanır. Kelime olarak latince MICROS (=küçük) ve SKOPE (=gözlemek) kelimelerinin birleştirilmesinden meydana gelmiştir. 1674 yılında tek mercekli basit bir mikroskobu Anton van Leeuwenhoek bulmuş, günümüze kadar ise geliştirilerek birçok farklı çeşidi kullanılmaya başlanmıştır.

Mikroskoplar;

- a. Işık (optik) Mikroskobu,
- b. Elektron Mikroskobu olarak iki sınıfta toplanırlar.

Işık Mikroskobu

Işık mikroskobunda büyütme optik mercekler sistemi ile sağlanır. Başlıca ışık mikroskobu çeşitleri şunlardır:

1. Aydınlık Alan Mikroskobu (Adi Işık Mikroskobu),
2. Karanlık Alan Mikroskobu,
3. Ultraviole (UV) Mikroskobu,
4. Flouresans Mikroskobu,
5. Faz Kontrast Mikroskobu,
6. Stero Mikroskop.

Elektron Mikroskobu

Elektron mikroskobunda büyütme elektron ışınları ile sağlanır. Elektron mikroskopları;

1. Transmission Elektron Mikroskobu (TEM),
2. Scanning Elektron Mikroskobu (SEM) olmak üzere iki çeşittir.

Mikroskop Tipi	Max. Büyütme	İncelenen Örneğin Özelliği	Mikrobiyolojide Kullanım Alanı
Adi ışık mikroskobu	1000-2000	Boyanmış / boyanmamış örnekler	Bakteri, Mantar, Protozoon morfolojilerinin incelenmesi
Karanlık alan mikroskobu	1000-2000	Boyanmamış örnekler	Bazı spesifik morfoloji gösteren spiroket gibi mikroorganizmaların canlı olarak incelenmesi
Faz-kontrast	1000-2000	Boyanmamış örnekler	Hücrelerdeki canlı yapıların kontrast oluşturarak incelenmesi
Elektron mikroskobu	200.000-400.000	Cansız yapılar	Virüslerin ve diğer mikroorganizmaların ince yapılarının incelenmesi, organellerin ayrıntılı incelenmesi

Tablo 1.1: Mikroskop türleri ve özellikleri

Mikroskobun Bölümleri

Bir ışık mikroskobu, temel olarak mekanik, aydınlatma ve optik bölümlerden oluşur. Mekanik Bölüm: Bu kısım tüp, kol, tabla ve ayaklardan oluşur. Taşıyıcı olarak görev yapar. Tüp silindirik şeklinde bir parça olup üst tarafta oküleri, alt tarafta ise objektifleri taşır. Kol mikroskobu ve tablayı tutmaya yarar. Tabla dört köşe veya yuvarlak olup ortası deliktir. İncelenecek lam tablaya konur ve delik kısmı gelen ışınları geçirir. Ayak kısmı genelde U ve V şeklinde olup ağırdır.

Mekanik kısım;

1. Ayak,
2. Tabla,
3. Makro ve mikrovida,
4. Objektif tablası ve
5. Tüp bölümlerinden oluşur.



Şekil 1.1: Işık mikroskobu (Shutterstock.com'dan alınan lisansla kullanılan görsel).

Aydınlatma

Aydınlatma aracı elektrik lambası olabilir. Preparatı aydınlatmak ve iyi bir ışık ayarı için kondansatör kullanılır.

Kondansör, ışığı obje üzerinde odaklayarak yoğunlaştırır, ışığın dağılmasıyla görüntünün bozulmasını önler ve çözünürlüğü artırır, ısınan lambayı hassas olan optik bölümlerden ve kullanıcıdan uzak tutar.

Diyafram, ışık kaynağından gelen ışık demetinin çapını kontrol etmek için kullanılır, ışık kaynağının üstünde ya da kondansörün altında yer alır. Işığın şiddetini azaltmak için değil, en iyi kontrast ve rezolüsyon elde edilecek ışık çapını ayarlamak için kullanılır.

Optik Kısım

Optik kısmı oküler ve objektifler oluşturur.

Oküler, tüp içinde objektif tarafından oluşturulan görüntüyü büyütür. Görünür (zahiri) görüntüyü hazırlar. Objektifin ışık kusurlarını düzeltir. Oküler genel olarak 10x büyütme olur.

Objektifler, mikroskopta ilk büyütme yapan optik kısımdır. Çok sayıda merceğin bir araya gelmesiyle oluşur. Objektifin işlevi, objeden gelen ışık demetlerini toplamak ve büyümüş gerçek görüntü oluşturmaktır.

Objektif çeşitleri 10x objektifi küçük büyütme objektifi; 40x orta büyütme objektifi; 100x ise immersiyon objektifi olarak adlandırılır.

]

Sıra	İşlem Basamakları
1	İlk olarak incelemeye küçük büyütme (10x) objektif ile başlanır.
2	Küçük büyütme objektif gözetleme pozisyonuna getirilir ve yavaşça lamın üzerine indirilir.
3	Makrovida ile objektifler yükseltılarak görüntü odaklanır.
4	Mikrovida ile görüntü netleştirilir. Diyafram ışık şiddetini ayarlar.
5	Rovellerin döndürülmesi ile 10x'luk objektiften mikroskoptaki görüntü orta büyütme (40x) objektifte odaklanır.
6	Görüntü net değilse, makrovida ile objektifler aşağıya indirilerek veya mikrovida ile oynanarak görüntünün netleşmesi sağlanır.
7	Orta büyütme objektif lama kesinlikle temas etmemelidir. Makro ve mikro vidanın seri ve sert hareketlerle kullanılması net görüntü eldesini zorlaştırır. Bu durumda işlem basamakları tekrar edilmelidir.
İmmersiyon objektifi (100x) kullanarak alan bulma	
8	Bu basamak orta büyütme (40x) objektif ile yapılan işlemler ile aynıdır.
9	Boyalı preparatları incelerken, çözünürlüğü artırmak için lam ile objektif arasına immersiyon yağı damlatılır.
10	İmmersiyon objektifi ile incelemede ilk önce objektif lamın üzerinde 1 cm kadar yükseltilir.
11	Roveller çevrilerek 100x'lük objektif (immersiyon objektifi) ayarlanır.
12	Lamın tam ortasına bir damla immersiyon yağı damlatılır.
13	Objektif yağ ile temas edene dek yavaş hareketlerle indirilir.
14	Makro ve mikro ayar vidaları çok küçük hareketler yapılmalıdır. Görüntü elde edildiğinde optimum ışıklandırma için diyafram aralığı ayarlanır.

Tablo 1.2: Işık mikroskobu kullanım basamakları

Mikroskobun Temizliği

Oküler ve objektifler kullanılmadan önce ve kullanıldıktan sonra mutlaka temizlenmelidir. İmmersiyon objektifine bulaşmış yağ kalıntılarını ve tabla üzerindeki döküntüleri temizlemek için %30 Ksilen + %70 Etanol çözeltisi hazırlanarak silme işlemi yapılmalıdır. Mikroskop temizlendikten sonra roveler çevrilerek en küçük büyütme objektifte bırakılmalıdır. Toz, nem gibi fiziksel etmenlerden uzak tutmak için mikroskobun üzeri bir muhafaza örtüsü ile örtülmelidir.

Uygulama - 1

Amaç

Mikroskobun bölümlerinin öğrenilmesi, mikroskop kullanma becerisinin kazanılması.

Öğrenim Hedefleri

1. Mikroskobun kullanıma hazırlanması,
2. Mikroskobun bölümlerinin kavratılması,
3. Mikroskopta kaba ayar, ince ayar ve görüntü çalışılması.

Araç - Gereç

1. Lam,
2. Lamel,
3. %0,9'luk FTS,
4. Mikroskop.

1. Basamak: Kullanmadan Önce Yapılacaklar

Aşağıdaki kurallara dikkatle uyulmalıdır.

1. Mikroskop, bir elle tutacak bölümünden, diğer elle ayak kısmının altından desteklenerek daima iki elle taşınmalıdır.
2. Temiz ve toz bırakmayan bir temizleme beziyle mikroskop temizlenir. Çalışma öncesinde ve sonrasında objektifler ve oküler mutlaka temizlenmelidir. Optik sisteme zarar verebilecek sert bez veya kâğıt mendil kullanılmamalıdır.
3. Lamın konulacağı tabla kaba ayar vidası (makrovida) ile en alt seviyeye getirilir.
4. Mikroskobun fişi prize takılır.

2. Basamak: Kullanım Esnasında Yapılacaklar

1. En küçük objektif tablaya dik konuma getirilir. Objektifin yerine oturduğundan emin olunmalıdır.
2. Okülerden bakıldığında parlak yuvarlak bir alan görülmelidir.

3. Hazırlanan preparat tablanın üzerine bir pensetle yerleştirilir. İncelenecek numunenin bulunduğu taraf tablanın ortasında bulunan deliğin üzerine yürütgeç yardımıyla getirilir.
4. İncelenecek materyalin özelliğine ve preparasyonun tipine göre (nativ, boyalı vs.) ışık miktarı değişeceğinden, bu özelliklere göre ışık ayarı yapılmalıdır.
5. Makro vida ile preparat tablası yavaş hareketlerle yukarıya, görüntü oluşana dek, kaldırılır.
6. Görüntü elde edilince yürütgeç yardımıyla alan taraması yapılır.
7. İstenilen görüntü bulununca görüntünün çizimi yapılmalıdır. Şekli çizilen objenin (hücre, mikroorganizma, vs.) altına mikroskobun büyütme gücü (MB), yani hangi objektif ile incelendiği ve inceleme ortamı (İO) yazılır. İnceleme ortamı, lam-lamel arası, boyalı, kalın damla, asılı damla gibi adlar olabilir. En küçük objektifte inceleme tamamlandıktan sonra 10x objektife geçilir.
8. Alanda görüntü yakalandıysa sadece mikro vida yardımıyla görüntü netleştirilir. Ama görüntü yoksa çok dikkatli ve yavaş hareketlerle makro vida kullanılabilir.
9. Görüntü netleştirildikten sonra yürütgeç yardımıyla alan taranır ve istenilen görüntü bulunur. Çizimi yapılır.
10. 40x objektife geçilirken objektif daha dikkatli bir şekilde hareket ettirilerek tablaya dik konuma getirilir.
11. 40x objektifte çalışırken sadece mikrovida kullanılarak görüntünün netlik ayarı yapılır, görüntü çizilir.
12. 100x objektife geçerken yine sadece ince ayar vidası kullanılır. Objektif yerleştirilmeden önce bir damla immersiyon yağı konur.
13. Çalışma bittikten sonra en küçük objektif tablaya dik konuma getirilir.
14. Lam tabladan çıkarılır ve tabla aşağı seviyeye indirilir.
15. Objektif ve oküler temizlenir. İmmersiyon yağı kullanılmışsa, 100x objektif kalıntılardan iyice temizlenmelidir.
16. Mikroskobun fişi prizden çıkarılır.

Çalışma 1: Dil Epiteli İnceleme: Lam-Lamel Arası Preparat Hazırlama Çalışması



Şekil 1.2: Lam-lamel arası preparat hazırlama (Shutterstock.com'dan alınan lisansla kullanılan görsel).

Lam-Lamel Arası Preparat Nasıl Hazırlanır?

Amaç

Dil epitel hücrelerinin adi ışık mikroskopunda incelenmesi.

Araç - Gereçler:

Mikroskop, lam, lamel, beher, su, pastör pipeti, metilen mavisi, kurutma kâğıdı.

Yöntem

1. Lamın ortasına bir damla serum fizyolojik (%0,09 NaCl) su damlatınız.
2. Temiz bir lamel alınız. Lamelin bir kenarını, dilinize çok fazla bastırmadan, arkadan öne doğru çekiniz. Bu işlemi birkaç kez tekrarlayınız.
3. Lamelin kenarındaki kazıntı materyalini suyun içinde süspanse ediniz.
4. Bir damla metilen mavisi damlatarak dikkatlice lameli kapatınız.
5. 4x/5x, 10x ve 40x objektiflerde inceleyiniz.

10x ve 40x objektiflerde elde ettiğiniz görüntüleri çiziniz.

Sonuç - Yorum

MB:.....

İO:.....

MB:.....

İO:.....

Sonuç - Yorum

Öğretim

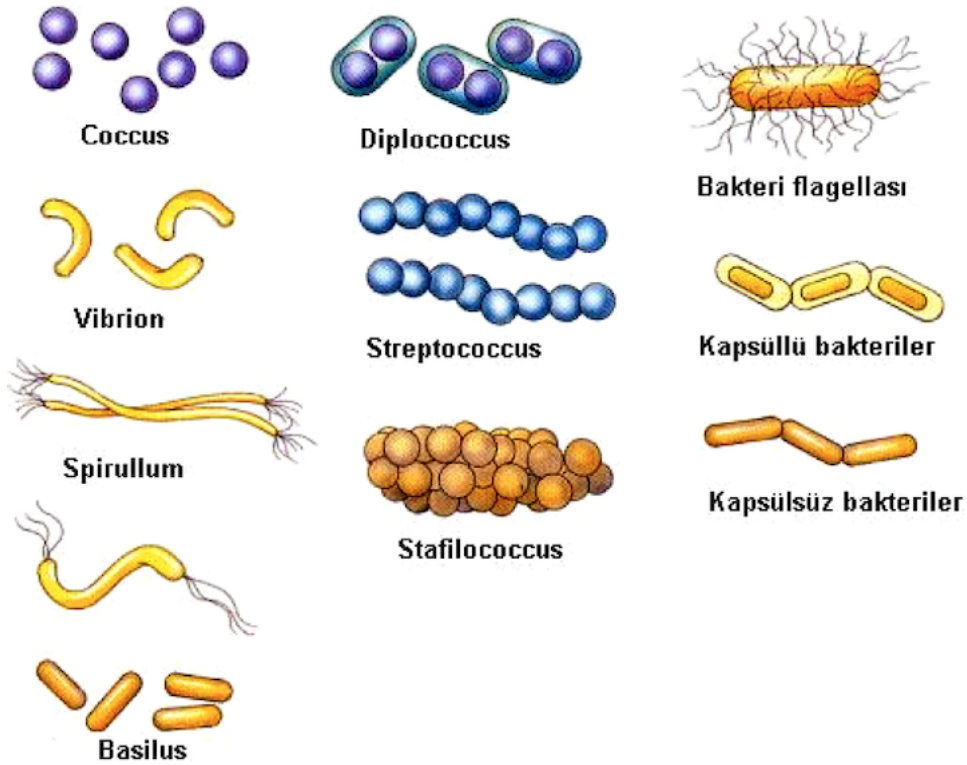
Üyesi:

İmza:

BÖLÜM 2

BAKTERİ MORFOLOJİSİNİN MİKROSKOPTA İNCELENMESİ

Prokaryotlar âleminin büyük bir kısmını bakteriler oluşturmaktadır. Geçmişten günümüze dek mikrobiyoloji biliminin gelişmesiyle milyonlarca bakteri türü keşfedilmiş ve hâlen de edilmeye devam etmektedir. Farklı türlerin sahip olduğu farklı özellikler, yaşam koşulları, üreme özellikleri, fiziksel ve kimyasal etmenlere karşı oluşturmuş oldukları farklı tepkileri ve en nihayetinde de morfolojik çeşitliliği beraberinde getirmiştir. Ancak ışık mikroskopunda sadece morfolojik farklılıkları ayırt etmek mümkündür.



Şekil 2.1: Şekillerine göre bakterilerin sınıflandırılması (Nazile Arda Çakır tarafından yapılan çizim).

Uygulama - 2

Amaç

Bakteri morfolojisinin mikroskopta incelenmesi.

Öğrenim Hedefleri

1. Kok, basil ve/veya spiral formda bakterilerin ayırt edilmesi,
2. Mikroskopta 10x, 40x büyütmede alan bulabilme becerisinin kazandırılması.

Araç-Gereçler

1. Lam,
2. Lamel,
3. Mikroskop,
4. Pastör pipeti,
5. Yoğurt suyu,
6. Et suyu.

Çalışma-1: Et Suyu Bakterileri

Amaç

Et suyunda üremiş bakterilerin adi ışık mikroskobunda incelenmesi.

Araç ve gereçler

Mikroskop, lam, lamel, pastör pipeti, kurutma kâğıdı, bekletilmiş et suyu.

Metod

Bir hafta oda ısısında bekletilmiş et suyunu lamın üzerine bir iki damla damlatınız. Lameli kapatınız. En küçük objektifte görüntü alanını bulduktan sonra 10x ve 40x objektiflerde inceleyiniz. 40x objektifte gördüklerinizi çizin ve yorumlayınız.

MB:.....

İO:.....

Sonuç - Yorum

Öğretim

Üyesi:

İmza:

Çalışma-2: Yoğurt Suyu Bakterileri**Amaç**

Yoğurt suyunda üremiş bakterilerin ve mayaların ışık mikroskobunda incelenmesi.

Araç ve gereçler

Mikroskop, lam, lamel, pastör pipeti, kurutma kâğıdı, yoğurt suyu.

Metod

Bir hafta oda ısısında bekletilmiş yoğurt suyu temiz bir lamın üzerine bir iki olacak şekilde damlatılır. Üzerine lamel kapatılır. 4x/5x objektifte görüntü alanını bulduktan sonra 10x ve 40x objektiflerde incelenir. 40x objektifte gördüklerinizi çiziniz ve yorumlayınız.

MB:.....

İO:.....

Sonuç - Yorum

Öğretim

Üyesi:

İmza:

Tek hücreli canlılarda iskelet ve hareket sistemi yoktur. Ancak hücreye şekil ve destek veren bazı yapılar bulunmaktadır.

Tek hücreli canlılarda hareket; sitoplazma veya hücre zarından köken alan bazı özel yapılarla sağlanır. Hareketin gerçekleştirilmesi ya bulunan ortamla beraber pasif olarak ya da özel yapılarla aktif olarak sağlanabilir.

a) Pasif Hareket: Canlının bulunduğu ortamın hareket etmesiyle gerçekleşen yer değiştirme hareketidir. Örneğin; birçok bakteri ve tek hücreli canlı yaşadıkları suyun hareketi ile yer değiştirebilir. Yine aynı şekilde havada asılı kalan partiküllere tutunarak mekanik olarak yer değişikliği yapabilirler. Bu da bir pasif harekettir. Atrik bakteriler bulunduğu ortamla birlikte pasif hareket eder.

b) Aktif Hareket: Bazı tek hücreli canlılarda hareketin sağlanmasında hücre zarından köken alarak özelleşmiş yapılar iş görür. Bu şekilde canlının bir uyarana bağlı olarak ve enerji harcayarak yer değiştirmesine *taksis hareketi* denir.

Taksis hareketleri; yalancı ayaklar (pseudopodalar), silller veya kamçı kullanılarak gerçekleştirilebilir. Yapılan hareket uyarının yönüyle aynı doğrultuda ise *pozitif taksis*, uyarının zıt doğrultusunda ise *negatif taksis* adını alır.

Örneğin; fotosentetik bir organizmanın ışığa doğru gitmesi pozitif fototaksis, amipin ısı kaynağından kaçması *negatif termotaksis*, bir başka tek hücrelinin besin kaynağına doğru gitmesi ise *pozitif kemotaksis* olarak adlandırılır.

Mikroorganizmaların vücutlarında yer alan hareket organellerine göre özelleşmiş hareket çeşitleri şu şekildedir:

1. Ameboid hareket: Rhizopodalar grubunda incelenen amip gibi bazı tek hücrelilerde, sitoplazmada bulunan ve kontraksiyonu sağlayan proteinler sayesinde yalancı ayaklar yani pseudopodlar oluşturulur. Bu şekilde oluşturulan yalancı ayaklar sayesinde beslenme ve hareket fonksiyonları gerçekleşir. Yalancı ayak oluşturma insan vücudundaki lökositlerde ve yine birtakım mantar benzeri protistalarda görülür.

2. Silia hareketi: Terliksi hayvan (Paramecium) gibi tek hücrelilerde görülen hareket şeklidir. Bunlarda hücre yüzeyinden çıkan çok sayıda küçük silia, eşzamanlı hareket ederek canlının yer değiştirmesi sağlanır.
3. Flagella hareketi: Öglena ve bazı tek hücrelilerde, bazı hareketli bakterilerde, sperm hücrelerinde hücre zarından uzanan bir veya birkaç tane flagella (kamçı) ile hareket sağlanır. Flagellin adlı protein birimlerden oluşmuş kamçılar su içinde burgu hareketi yaparak canlının yer değiştirmesini sağlar.

Uygulama - 3

Çalışma 1: Hareket Testi

Amaç

Bakterilerde hareketin izlenmesi.

Öğrenim hedefleri

1. Bakterilerdeki hareket tipleri olan aktif ve pasif hareketin kavranması,
2. Flagella hareketinin Brownian hareketinden ayrılması.

Araç-Gereç

1. Lam,
2. Lamel,
3. Sıvı kültür,
4. Vazelin ya da oje,
5. Mikroskop.

Lam-lamel arası preparatın incelemesi

1. Temiz lam üzerine sıvı kültürden bir damla konarak lam-lamel arası preparat hazırlanır.
2. Önce 10x'luk objektifle alan bulunur.
3. 40x'lık objektifle incelemeye devam edilir.
4. Aktif hareket ya da brownian hareketi (pasif hareket) yönünden inceleme yapılır.

MB:.....

İO:.....

Sonuç

Aktif hareket

Pasif Hareket:.....

Çalışma-2: Boyama için Preparat Hazırlanması

Amaç

Mikrobiyolojik tetkiklerde ön işlemlerin kavranması.

Öğrenim Hedefleri

1. Bir boyalı preparatı, boyama işlemine almadan önce yapılacakların kavranması,
2. Öze kullanımının kavranması.

Araç-Gereç

1. Lam-lamel,
2. Katı besiyeri,
3. Sıvı besiyeri,
4. Öze,
5. Mikroskop,
6. %0,9'luk FTS.

Katı ve sıvı besiyerinden preparat hazırlanır. Kullanılanın lam temiz ve çiziksiz olması boyama kalitesini etkileyeceğinden bu hususlara dikkat edilmelidir.

Metod

Sıra	İşlem Basamakları	Basamakları	İşlem Kontrolü
1	Klinik bir sıvı numuneden (idrar, BAL, vs.) ya da inoküle edilmiş sıvı kültürden bir öze dolusu örnek alınır.		
2	Temiz bir lama ince bir tabaka hâlinde yayılır.		
3	Eğer katı veya yarı katı besiyerinde üremiş kolonilerden preparat hazırlanması isteniyorsa, tek düşmüş bir koloniye öze ucuyla değdirmek suretiyle örnek alınır ve lam üzerine konan bir damla fizyolojik tuzlu su içinde homojen bir şekilde süspansedilerek yayılır.		

Tablo 3.1: Preparat hazırlama basamakları

Öze nedir ve nasıl kullanılır?

Öze, nikel-krom veya platinden yapılmış, numunelerin aktarılmasında kullanılan ve ucunda yuvarlak bir tel bulunan sap kısmı ısıya dirençli bir malzemedir. Bu telin

uzunluğu ortalama 5 cm, ucundaki çemberin çapı ise 3-4 mm olmalıdır. Uç kısmı halka şeklinde kıvrılmış platin veya paslanmaz telden, sapı da metal veya bakalitten oluşur. Bu tip özeler halka öze denir.

Mikrobiyolojik çalışmalarda üç tip öze kullanılmaktadır:

1. Tek kullanımlık steril plastik özeler; yuvarlak uçlu öze veya iğne öze kullanım amaçları aynıdır. Numune transferi ve ekim işlemlerinde kullanılır.
2. Halka metal özeler; çok az miktarda numuneyi aktarma işleminde, daha çok mikroorganizmaları besiyerine aktarıp yaymak veya preparat hazırlamada kullanılır.
3. İğne özeler; özeye benzer, fakat telin ucu yuvarlatılmamış, düz bırakılmıştır. İğne öze, besiyerine daldırma veya çizme yöntemleriyle ekim yapmak ve saf kültür eldesi için pasaj almada kullanılır.

Öze ile çalışma esnasında dikkat edilmesi gerekenler:

1. Öze kalem gibi tutulmalı, uç kısmı bek alevinin mavi kısmına dik olacak şekilde, ucu tamamen kor hâline gelene dek tutulmalıdır. Bu sırada öze alev içerisinde sallanmamalıdır.



Şekil 3.1: Halka ve iğne öze (Yazarın kendi çektiği fotoğraf).



Şekil 3.2: Öze çeşitleri ve öze kullanımı (Yazarın kendi çektiği fotoğraf).

2. Daha sonra öze alev çatısı altında tutularak 10-15 saniye kadar soğuması için beklenmelidir. Öze ucunun henüz sıcakken numune içine daldırılması ya da koloni üzerine değdirilmesi örnekteki mikroorganizmaları öldürebilir.
3. Özenin ucu numune içine daldırılarak hafifçe karıştırılır. Böylece çözelti, öze ucundaki halkaya dolar. Sıvı örnek bu şekilde halkaya dolmamışsa öze ucunda hata vardır. Kıvrımlarının düzeltilmesi gerekebilir.
4. Öze ucu tüpün iç ve dış cidarlarına değdirilmeden çıkartılmalıdır.
5. Eğer katı bir besiyerindeki koloniden aktarma yapılacaksa, öze ucu belirlenen bölgesine hafifçe sürtülerek örnek alınır.
6. Özeyle alınan materyal katı veya sıvı besiyerine ekilir.
7. Daha sonra ekim işlemi tamamlanınca, öze ucu dik bir şekilde tutulur ve bek alevinde steril edilir.

Sonuç - Yorum

1. Sıvı kültürden preparat hazırlandı mı?.....(2 ADET HAZIRLANACAK)
2. Katı besiyerinden preparat hazırlandı mı?.....(2 ADET HAZIRLANACAK)

Öğretim

Üyesi:

İmza:

BÖLÜM 4

PREPARATLARIN TESPİTİ (FİKSASYONU)

Preparatın tespiti (fiksasyon) şu şekilde yapılır: Mikroorganizmanın ölmesi ancak hücresel yapıların minimum düzeyde zarar görmesi amacıyla tespit işlemi uygun yöntemler seçilerek yapılmalıdır.

Tespit işleminde materyalin lama yapışması ve boyama esnasında yıkarken kaybedilmemesi hedeflenir. Bu işlem sırasında mikroorganizma enzimleri inaktive olur ve mikroorganizmalar ölür. 3 çeşit fiksasyon yöntemi vardır:

1. Isı ile fiksasyon: Bakteriyolojide en sık kullanılan yöntemdir. Preparatın bir ucundan temiz bir pensle ya da elle tutularak bek alevinin, lamın numune olmayan tarafını yalması sağlanır. Bu işlem 3 kez tekrarlanır.



Şekil 4.1: Isı ile preparat tespiti (Yazarın kendi çektiği fotoğraf).

2. Kimyasal yolla fiksasyon: Mikrobiyoloji laboratuvarında tüm preparatlar ısıyla tespit edilemez. Isıyla tespit edildiğinde bozulabilecek kan ve doku gibi örnekler kimyasal yolla tespit edilmelidir; lamın üzerini örtecek şekilde %95'lik etanol ya da metanol konur ve 10 dakika (metil alkolle 3-4 dakika, eter-alkolle 10-15 dakika, aseton-alkolle 5 dakika) bekletilerek tespit işlemi yapılır.

3. Havada kurutarak tespit: Preparatı oda ısısında en az 2-3 saat, hemen işleme alınmayacaksa 18-24 saat bekleterek kurutmak gerekir. Ancak uzun süreli ve pek güvenli bir yöntem olmadığı için tercih edilmez.

Uygulama-4

Çalışma-1: Boyama Öncesi Preparat Fiksasyonu

Amaç

Mikrobiyolojik analiz öncesi hazırlık işlemlerinin öğrenilmesi.

Öğrenme Hedefleri

1. Fiziksel ve kimyasal yolla tespit yöntemlerinin kavranması.

Araç-Gereç

1. Uygulama-3'te hazırlanmış preparatlar,
2. %95'lik etanol,
3. Bunzen beki.

Metod

1. Isı ile fiksasyon: Preparatlar 45 derecelik açıyla tutularak 3 kez alevden geçirilir.
2. Kimyasal fiksasyon: %95'lik etanolde 10 dakika preparatlar bekletilir daha sonra kurutularak boyanma işlemine geçilir.

Boyama: Bakterileri görünür hâle getirerek incelemek için birtakım boyalar kullanmak gerekir. Boyasız preparasyonlarda bakteri morfolojisini tanımlamak ve bakteriye özellik katan yapıları ortaya koymak güçtür. İstenilen amaca uygun olan boyayı kullanarak bakterinin hücre duvar yapısı, hücre dışı uzantıları (kirpik, flagella vs), kapsül, spor oluşturma gibi özellikleri tanımlanarak identifikasyonun ilk basamağı olan mikroskopi aşamasında birçok veri eldesi sağlanmış olur.

Boya Çeşitleri

Doğal kökenli veya yapay-sentetik kökenli boyalar olarak mikrobiyolojide kullanılan boyaları ikiye ayırabiliriz:

1. Doğal Boyalar: Biktisel ve hayvansal kökenli olan bu boyalar daha çok histopatolojik incelemelerde kullanılır. Hematoksilen, carmin gibi boyalar hücre içi yapıları boyadıklarından söz konusu boyaların sitolojideki yeri önemlidir.

2. **Sentetik Boyalar:** Anilin boyaları da denilen bu grup genelde tuz yapıdadır. Asidik (anyon) ve bazik köke (katyon) sahiptir. Bu boyalar, boyaya rengini veren kromofor grup yani boyayıcı kısım (bazik kök-katyon, +) ve renksiz olan oksokrom grup yani boyama özelliği olmayan kısım (asit kök-anyon, -) olmak üzere iki gruptan meydana gelir.

Boyalar boya molekülünün elektrik yüküne ve pH durumuna göre asidik, bazik ve nötr boyalar olarak gruplara ayrılır.

a. Bazik boyalar: Bazik boyaların kromofor grubu pozitif yüklüdür. Bakterinin vücut yüzeyindeki ve çekirdeğindeki fosfat grupları nedeniyle negatif yüklü olması bu iki zıt grubun birleşmesiyle yani boyanma ile sonuçlanır. Genelde bakteriyolojide bazik boyalar bu özelliğinden dolayı sıklıkla tercih edilir. En yaygın kullanılan bazik boyalara metilen mavisi, bazik fuksin, kristal viyole ve safranin örnek verilebilir.

b. Asit boyalar: Asit boyaların kromofor yani boyayıcı kısmı negatif yüke sahiptir. Bakteri yüzeyi ve nükleusu negatif elektrik yük taşıdığından asidik boyalarla boyanma gerçekleşmez. Bu boyalar zıt boyama dediğimiz zemin boyama amacıyla kullanılır. Asit fuksin, pikrik asit, malaşit yeşili, orange G, eosin ve nigrosin asidik boyalara örnektir.

c. Nötral boyalar: Bazik ve asidik boyaların uygun oranda karışımları sonucu nötral hâle gelen boyalardır. Bu boyalar özellikle kan yaymaları, doku ve gaitada protozoon incelemesi için hazırlanmış preparatların boyanmasında kullanılır. Nötral boyalar; Giemsa, Wright, May-Grünwald, Leishman'dır.

Bakterileri Boyama Yöntemleri

1. Basit Boyama: Bu yöntemde tek çeşit boya ile boyama yapılır ve daha çok bazik boyalar kullanılır. En çok kullanılan metilen mavisi ile yapılan boyama yöntemidir. Basit boyama işleminde metod genellikle aynı olup sadece kullanılacak boya ve bu boyanın etki süresi değişir.

Çalışma-2: Basit Boyama

Amaç

Basit boyama tekniğinin öğrenilmesi.

Öğrenim Hedefleri

1. Basit boyama yapabilme.
2. Boyalı preparatta 100x'lük objektifte inceleme yapabilme.

Araç-Gereç

1. Çalışmada fikse edilen preparatlar,
2. Metilen mavisi, karbol fuksin, kristal viyole,
3. Filtre kâğıdı,
4. İmmersiyon yağı,
5. Mikroskop.

Metod

Sıra	İşlem Basamakları	Basamakları	İşlem Kontrolü
1	Preparat hazırlanır (yayma, kurutma, tespit).		
2	Temiz bir lama ince bir tabaka hâlinde yayılır.		
3	Boya dökülerek preparat distile suyla yıkanır.		
4	Preparat kurutulur.		
5	Mikroskopta immersiyon objektifiyle incelenir.		

Tablo 4.1: Basit boyama işlemi basamakları

İmmersiyon objektifi ile incelediğiniz görüntüyü çiziniz.

MB:.....

İO:.....

Sonuç - Yorum

Öğretim

Üyesi:

İmza:

BÖLÜM 5

BİLEŞİK (DİFERANSİYEL) BOYAMA TEKNİKLERİ - 1

Boyama işleminde birden çok boyanın kullanıldığı ve bakterilerin yapı ve morfolojilerine göre farklılık gösteren sonuçları ortaya koyan tekniklerdir.

Bileşik boyama yöntemleri arasında en yaygın olanlar gram boyama ve asit fast boyama teknikleri (EZN, Kinyoun vs), spor boyaları, flagella ve kapsül boyama yöntemleridir.

Gram Boyama Yöntemi

Bakterilerin hücre duvar yapılarının biyokimyasal düzeydeki farklılıklarına göre sınıflandırılmasına yardımcı olan tekniktir. 1884'te Hans Christian Gram tarafından geliştirilmiş ve günümüze kadar gelmiştir. Gram boyama yönteminde, önce kristal viyole boyası sonra lugol uygulanması ile boyanabilen tüm bakteriler boyayı alır. Etanol ile dekolarizasyon işlemini takiben; bir kısım bakteriler boyadıkları rengi bırakmaz, bir kısmı ise boyayı bırakarak renksizleşir. Bu bakterileri görünür hâle getirmek için zıt boya olan sulu bazik fuksin ya da safranin uygulanır. İmmersiyon objektifi ile incelenen preparatta; ilk boyayı alan bakteriler mor renkte görünür ve genel olarak gram pozitif diye adlandırılır. Son boyayı alan bakteriler ise kırmızı-pembe renkte görünür ve gram negatif olarak adlandırılır.

Eski kültürlerde antibiyotikler ya da otolitik enzimler nedeniyle gram pozitif bakterilerin duvar bütünlüğü bozulabileceğinden boyanmada sorunlar yaşanabilir. Bu nedenle taze kültür dediğimiz 24 saati geçmemiş kültürden hazırlanan preparatlarda mikroorganizmalar daha doğru boyanırlar.

Gram boyama yönteminin sağladığı yararlar şunlardır:

1. Mikroorganizmaların hücre duvar yapılarındaki farklılığa göre 2 ana grupta sınıflandırılmasını sağlarlar (gram pozitif ve gram negatifler).
2. İdentifikasyonun en önemli basamağı olan morfolojik özellikler hakkında bilgi verir.
3. Örneğin doğru alınıp alınmadığı ve örnek yönetimi hakkında bilgi verir.
4. Aerop kültürde üretilmeyen mikroorganizmaların gram boyama ile saptanması enfeksiyon etkeninin anaerob olabileceğini düşündürür.

Uygulama - 5

Çalışma: Gram Boyama yöntemi ile preparat boyama

Amaç

Diferansiyel boyama tekniğinin öğrenilmesi.

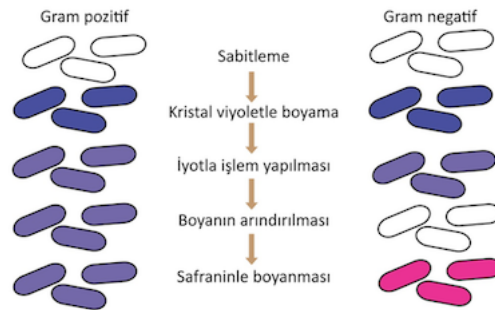
Öğrenim Hedefleri

1. Bakterilerin hücre duvarlarındaki farklı yapıların kıyaslanabilmesi,
2. Bakteri sınıflandırılmasının temel ayrımının yapılabilmesi.

Araç-Gereç

1. Lam,
2. Kültür,
3. %0,9'luk FTS,
4. Kristal viyole,
5. Lugol,
6. %96'luk Etil alkol,
7. Sulu fuksin,
8. Filtre kâğıdı,
9. Mikroskop.

Metod



Şekil 5.1: Gram boyama (Nazile Arda Çakır tarafından yapılan çizim).

Sıra	İşlem Basamakları	Basamakları	İşlem Kontrolü
1	Kültürden preparat hazırlayınız.		
2	Preparatı fikse ediniz.		
3	Preparatın üzerine jansiyan moru ya da kristal viyole damlatarak 2-3 dakika bekletiniz.		
4	Preparatı yıkayınız.		
5	Preparata lugol (iodin solüsyonu) damlatıp en az 1 dakika bekleyiniz.		
6	Lugölü döküp %96'lık etanol ile dekolare ediniz. Yıkayınız.		
7	Sulu fuksin damlatarak 30 saniye bekletiniz.		
8	Yıkayınız.		
9	Preparatı havada kurutunuz.		

Tablo 5.1: Basit boyama işlemi basamakları

İmmersiyon objektifi ile incelediğiniz görüntüyü çiziniz.

MB:.....

İO:.....

Sonuç - Yorum

Öğretim

Üyesi:

İmza:

BÖLÜM 6

BİLEŞİK (DİFERANSİYEL) BOYAMA TEKNİKLERİ - 2

Asit Fast Boyama Teknikleri

EZN (Ehrlich-Ziehl-Neelson) Boyama Yöntemi

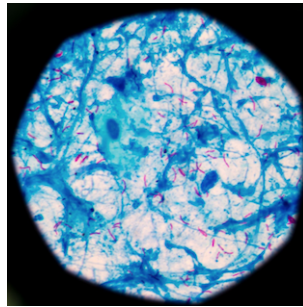
Mycobacterium tuberculosis'in neden olduğu tüberküloz=verem hastalığının tanımlanmasında, başta balgam gibi örneklerden, basil aranmasında kullanılan yaygın, ucuz ve etkili bir boyama yöntemidir.

Mycobacterium'lar, hücre duvarlarında bulunan uzun zincirli yağ asitleri sayesinde, asit ve alkole rezistans (dayanıklı) bakteriler olmalarından dolayı asit-fast boyama teknikleriyle boyanabilirler.

Mycobacterium grubunda yer alan bakteriler şunlardır:

1. *Mycobacterium tuberculosis complex*
2. *Mycobacterium leprae*
3. *Atipik mycobacterium (Mycobacteria Other Than Tuberculosis=MOTT)*

Asit-Fast boyama teknikleriyle aside dirençli yapıları olan protozoon okistleri (*Cryptosporidium*, *Isospora* gibi) ve hidatik kist etkeni *Echinococcus granulosus* protoskoleksleri de boyanarak incelenebilir.



Şekil 6.1: EZN boyama ile *M.tuberculosis* (Shutterstock.com'dan alınan lisansla kullanılan görsel).

Uygulama-6

Çalışma: EZN Boyama yöntemi ile preparat boyama

Amaç

Diferansiyel boyama tekniklerinin kavranması.

Öğrenim Hedefleri

1. Tüberküloz etkeninin tanısında kullanılan yöntemi öğrenmek,
2. Aside dirençli mikroorganizmaları inceleyebilmek.

Araç-Gereç:

1. Lam,
2. Klinik numune (idrar, balgam vb.),
3. İğne öze,
4. Pamuk,
5. Karbol fuksin,
6. %3'lük HCL-alkol,
7. Metilen mavisi,
8. Filtre kâğıdı,
9. Mikroskop.

Metod

Sıra	İşlem Basamakları Basamakları	İşlem Kontrolü
1	Tespit edilmiş preparat boyama eşeline alınır. Bir parça pamuk uçsuz özeye sarılıp alttan ısıtma işlemi için alkole daldırılıp yakılır.	
2	Preparat karbol fuksin (Ziehl fuksin) boyası ile boyanır, alttan hazırlanan pamuklu gereç ile ısıtılarak boyayı alması sağlanır. Alev arada çekilerek boyanın kaynamamasına dikkat edilir. 3 dakika tekrarlanır, yıkanır.	
3	Alkol-asit karışımı ile dekolarize edilir, yıkanır.	
4	Metilen mavisinde 1 dakika boyanır, yıkanır ve dik olarak bekletilerek kurutulur.	
5	İmmersiyon objektifi ile incelenen preparatta, tüberküloz basilleri kırmızı renkte, diğer bakteri, hücrel elemanlar ve zemin mavi renkte boyanmıştır.	

Tablo 6.1: EZN Boyama yöntemi ile preparat boyama basamakları

İmmersiyon objektifi ile incelediğiniz görüntüyü çiziniz.

MB:.....

İO:.....

Sonuç - Yorum

Öğretim

Üyesi:

İmza:

Sıvı Besiyerine Ekim

Ekimle İlgili Terimler

- Ekim (inokülasyon): Üremiş mikroorganizma içeren ortamlardan ya da mikroorganizma varlığının araştırıldığı klinik materyallerden amaca göre değişiklik gösteren birtakım tekniklerle alınan örneklerin, besiyeri adı verilen üreme ortamlarına aktarılması işlemidir.
- Kültür: Besleyici ortamda üretilmiş mikroorganizmaların tümüne kültür adı verilir.
- İnokulum: Besiyerine ekimi yapılan mikroorganizmaya inokulum denir.
- İdentifikasyon (tanıma): Saf kültür olarak ayrılmış bir mikroorganizmanın tür düzeyinde adlandırılması için yapılan işlemlerin tümüdür.
- İzolasyon (ayırma): Birden fazla mikroorganizma cinsinin bulunduğu bir kültürde, hedeflenen bir mikroorganizmayı diğerlerinden ayırt etmek için saf kültür oluşturarak ayırma işlemidir.

Kültür tipleri

- Saf kültür: Aynı türden oluşmuş mikroorganizma kolonilerinin oluşturduğu kültür.
- Karışık kültür: İki veya daha fazla türde mikroorganizma içeren kültüre verilen ad.
- Sıvı kültür: Agar içermeyen sıvı besiyerlerinde oluşturulan kültürdür.
- Katı kültür: Agar oranı %1,5-3 oranında olan besiyerlerinde oluşturulan kültürdür.

Sıvı Besiyerine Ekimler

Sıvı besiyerleri; tüp, balon, şişe gibi cam laboratuvar gereçlerinde hazırlanır. Klinik numune; idrar, BOS ve diğer vücut sıvıları ise ekim işleminde otomatik pipet, pastör pipeti ve eküvyon gibi araç gereçler kullanılır.

Sıvı ve katı örneklerin ekiminde kullanılan en yaygın sıvı besiyerleri şunlardır:

-Alkali peptonlu su	-Löfler buyyonu
-Brain -Hearth İnfüzyon Broth	- Selenif – F
-Buyyon	-Thioglycolate'lı besiyeri

Uygulama - 7

Çalışma-1: Sıvı Besiyerine Sıvı Örnek Ekimi

Amaç

Sıvı besiyerine ekimin kavranması.

Öğrenim Hedefleri

1. BOS, idrar vb. vücut sıvılarının analizlerini yapabilmek ,
2. Ekim yöntemlerini kavrayabilmek.

Araç-Gereçler

1. Sıvı numune,
1. Öze,
2. Sıvı besiyeri,
2. Bunzen beki.

Metod

Sıra	İşlem Basamakları	Basamakları	İşlem Kontrolü
1	Homojen karışımı sağlanan örnek tüpü sol ele, öze ise sağ ele alınır.		
2	Öze alevde yakılarak sterilize edilir.		
3	Örnek tüpünün ağzındaki tıkaç ya da pamuk çıkarılırken örnek tüpü aleve yakın tutularak eğilir. Bu şekilde tüpün içine havadan geçebilecek kontaminantlar engellenmiş olur.		
4	Tıkaç ya da pamuk çıkarılır çıkarılmaz tüpün ağız kısmı alevden geçirilir. Aseptik koşullar sağlanır. Tıkaç ya da pamuk sağ elin serçe ve yüzük parmağı arasına sıkıştırılır, tezgâha bırakılmaz.		
5	Örnek tüpü hafifçe eğilir; örnek hangi aparatla transfer edilecekse (öze, pipet vs.) tüp kenarlarına ve iç yüzeylerine dokundurmadan örnek tüpü içine yavaşça, dik şekilde daldırılır.		
6	Öze ucu sıvı örnek içinde karıştırılmak suretiyle dolaştırılır ve öze, tüp iç cidarına hiç değdirilmeden dışarı çıkarılır.		
7	Bu işlemler sonucunda bir öze dolusu örnek alınmış olur.		
8	Örnek tüpünün ağzı alevden geçirilir ve pamuk tıkacı ya da tüp, serçe ve yüzük parmağından alınarak tekrar tüp ağzına takılır.		
9	İşi biten örnek tüpü tüp sporuna konur.		
10	Sonraki aşamada sıvı besiyerini içeren tüp sol ele alınarak, tüpün en alt kısmından tutularak pamuk tıkacı, alev etrafında, öze tutan sağ elin parmakları ile kavranarak çıkartılır.		
11	Öze tüpten çıkarılır ve tekniğine uygun steril edilerek sapı alta gelecek şekilde taşıyıcı spora yerleştirilir.		
12	Ekim yapılmış sıvı besiyeri içeren tüpün yine aynı şekilde ağız kısmı alevden geçirilip tıkacı kapatılır ve tüp,tüp sporuna yerleştirilir.		

Tablo 7.1: Sıvı besiyerine sıvı örnek ekim basamakları

Görev

Sıvı besinyerine sıvı numune ekimi yapıldı mı?.....

Numune çeşidi:.....

Besiyeri çeşidi:.....

Öğretim

Üyesi:

İmza:

Çalışma - 2: Sıvı Besiyerine Katı Örnek Ekimi

Amaç

Katı örnek ya da katı besiyerinden pasaj yaparak sıvı besiyerine ekim.

Öğrenme Hedefleri

Sıvı besiyerine ekim tekniklerini kavramak.

Araç - Gereç

1. Öze,
2. Sıvı besiyeri,
3. Katı besiyeri kolonisi,
4. Bunzen beki,.

Metod

Sıra	İşlem Basamakları	Basamakları	İşlem Kontrolü
1	Katı örneğin bulunduğu numune kabı sol ele, öze ise sağ ele alınır. Öze alevde steril edilir.		
2	Örnek kabı, eğilerek ve ağzı aleve yakın tutularak havadan bulaşabilecek kontaminantlar engellenir.		
3	Katı numuneyi almak için iğne öze, luplu özenin halka kenarı ya da eküvyon kullanılabilir.		
4	Yeterli miktarda örnek alındıktan sonra, numune kabı, çalışma tezgâhı üstüne bırakılır. Sol ele steril sıvı besiyerini içeren tüp alınır.		
5	Tüpün en alt kısmından tutularak pamuk tıkacı, alevde uzaklaşmamaya dikkat edilerek, öze tutan sağ elin parmakları ile kavranarak çıkartılır.		
6	Sıvı besiyeri tüpünün ağzı alevden geçirilir.		
7	Örnekle dolu öze; tüp iç yüzeyine değdirilmeden, sıvı besiyeri tüpünün içine daldırılarak ekim yapılır. Bunun için, sıvı besiyerinin en üst yüzeyine katı numune değdirilerek tüp iç cidarında süspanse edilir. Böylece homojen bir dağılım sağlanmış olur.		
8	Öze ucu besiyerinden çıkarılarak tekrar örneğin yayıldığı bölgeye temas ettirilir. Özeye, bu bölgede sürtme hareketleri yaptırılır ve örnek besiyerine doğru yıkanarak inokülasyon sağlanır.		
9	Öze tüpten çıkarılır ve alevde steril edilerek yerine konur.		

Tablo 7.2: Sıvı besiyerine katı örnek ekimi basamakları

Görev

Sıvı besinyerine katı numune ekimi yapıldı mı?.....

Numune çeşidi:.....

Besiyeri çeşidi:.....

Öğretim

Üyesi:

İmza:

Katı Besiyerine Ekim

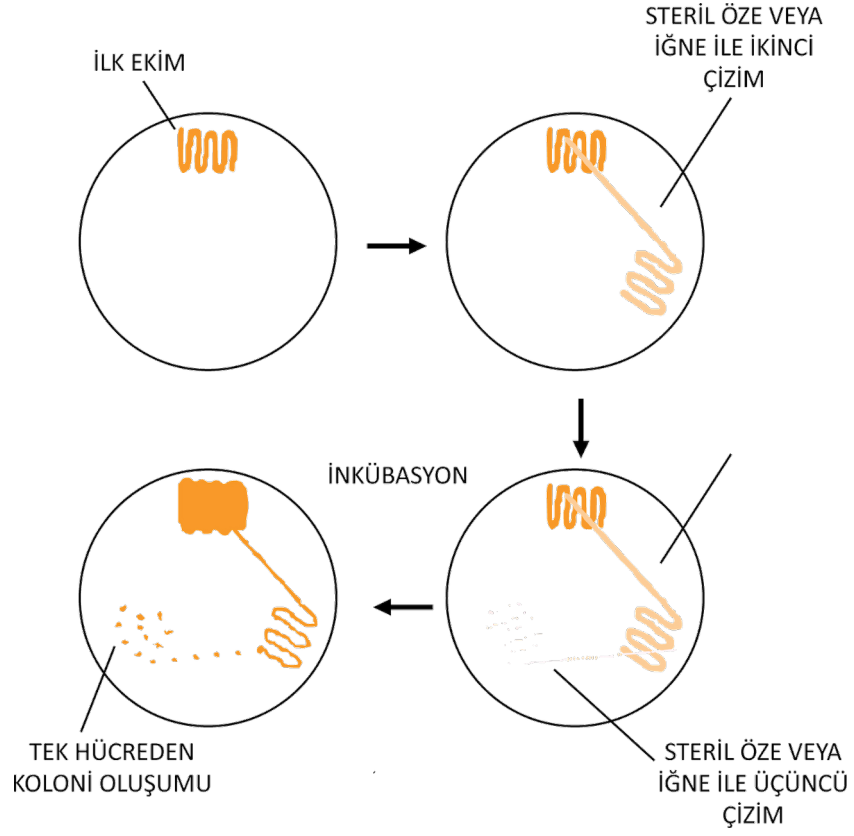
Katı besiyeri üç ya da dört eşit bölgeye ayrılır. Klinik numune ile temas eden öze bu bölgelere sırayla sürülerek ekim yapılır. İnkübasyon sonrası, ilk bölgeden son bölgeye doğru numune miktarı azaldığından, üremiş mikroorganizma miktarının da azaldığı görülür. Ekim esnasında bölgeler arasında özenin alevde yakılması, son sürme alanında üremiş bakteri kolonilerinin tek tek düşmesini sağlar.

Özellikle karışık kültürlerde identifikasyonu sağlayabilmek adına bu şekilde ekim yapıldığında daha kısa sürede ve daha sağlıklı sonuç almak mümkün olmaktadır. Bu şekilde uygulanan sürme yöntemine **tek koloni düşürme** ya da **azaltma yöntemi** denir.

Sıra	İşlem Basamakları	Basamakları	İşlem Kontrolü
1	Avuç içine yerleştirilen petri kabı aynı elin işaret ve başparmaklarıyla açılır.		
2	Numune ile dolu öze ucu bu aralıktan içeri sokulur ve agar yüzeyine değdirilir. Örnek bu bölgede hafifçe ezilerek birkaç mm çapında yayılır.		
3	Öze ile ilk yayılma alanından başlayarak sürme işlemine geçilir.		
4	Bu işlem değişik şekillerde gerçekleştirilebilmektedir. Ancak tek düşmüş koloni elde edebilmek için en ideal olanı 4 ayrı bölgenin çizilmesidir.		
5	Sürme yapılırken özenin agar yüzeyinde uygun açı ile tutulmasına ve katı besiyerini delmemesine özen gösterilmelidir.		

Tablo 8.1: Sıvı besiyerine katı örnek ekimi basamakları

1. Steril öze ile klinik numuneden parça alınır.
2. Petride 1. bölgeye sürülür ve öze alevde yakılır.
3. Aynı işlem 2.,3. ve 4. bölgelere de uygulanır ve her bölgeye ekim sonrası öze alevde yakılır.
4. 4. bölgeye ekip işlemi tamamlandıktan sonra öze alevde steril edilir.



Şekil 8.1: Ekim Yöntemleri (Nazile Arda Çakır tarafından yapılan çizim).

Uygulama - 8

Çalışma: Katı Besiyerine Azaltma Yöntemi ile Ekim

Amaç

Klinik örneklerin ekimi ve saf kültür eldesi için azaltarak ekim.

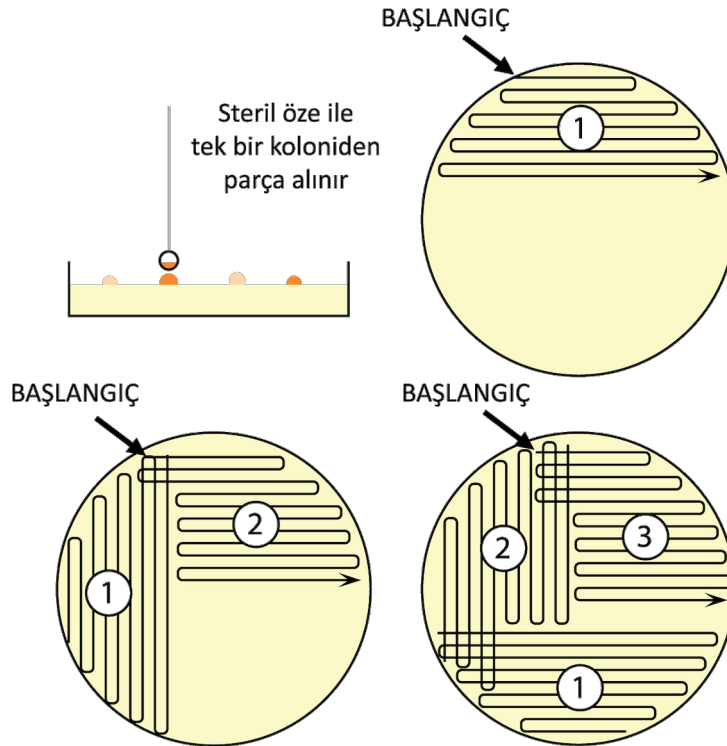
Öğrenim Hedefleri

Karışık kültürleri azaltma yöntemiyle ekerek saf kültüre yaklaşma aşamalarının öğrenilmesi.

Araç-Gereç

1. Klinik numune (idrар, balgam, boğaz sürüntüsü vb.),
2. Öze,
3. Katı besiyeri (koyun kanlı agar, çikolata agar, EMB).

Metod



Şekil 8.2: Katı besiyerinde azaltma yöntemi ile ekim (Nazile Arda Çakır tarafından yapılan çizim).

Görevler

Ekimi yapılan numune:.....

Besiyeri tip:.....

İnokülasyon günü ve saat:.....

İnkübasyon süresi:.....

İnkübasyon sonucu:.....

Öğretim

Üyesi:

İmza:

Her mikroorganizmanın metabolik ve fizyolojik ihtiyaçlarını karşılayabilmesi için yaşam ortamı olarak kullanılan besiyerleri, ekim işleminden sonra üretilmesi hedeflenen mikroorganizmaya uygun şartlarda inkübe edilirse, üreme gerçekleşir. Böylece kültür eldesi sağlanmış olur.

Kültür Çeşitleri ve Tanımları

Saf Kültür

Doğada her yerde mikroorganizmalar, birçok farklı türle bir arada bulunur. Buradan alınan örnekler besiyerine ekilerse, birçok bakteri türü bir arada üretilir. Birden fazla bakteri türünün ürettiği kültürler *karışık kültürler* denir. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında enfeksiyon etkeni olarak izole edilecek mikroorganizmalar ile flora bakterisi dediğimiz çoğunlukla saprofit ya da opportunist patojenlerin birbirinden ayırt edilmesi önemlidir. Bu nedenle özellikle florası olan bir ortamdan alınmış klinik numunelerde karışık kültürlerde üremiş mikroorganizmaların etken kabul edilebilecek özelliğe sahip olanlarının ayrıca pasajlanarak üretilmesi gerekir. Bir koloniden alınan ve üretildiğinde morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve genel özellikleri birbirinin aynı olan bakteri kültürüne *saf kültür* adı verilmektedir. Özellikle florası olan bir ortamdan alınmış herhangi bir klinik numunede (balgam, yara sürüntüsü, gaita, burun sürüntüsü gibi) etken olarak kabul edilen türü üretebilmek için o bölgenin flora üyelerinden izole edilmesi gerekir. Saf kültür, önce katı besiyerinde oluşmuş her farklı koloniden başka bir sıvı veya katı ağara ekim yapılarak elde edilir. Azaltma yöntemi yapılarak tek düşmüş koloniler elde edilmeli ve burdan saf kültür eldesine geçilmelidir.

Stok Kültür

Saf kültür eldesinden sonra laboratuvarında yapılacak diğer çalışmalarda kullanılmak üzere mikroorganizma stok kültürlerde saklanır. Mikroorganizmaların canlılığı-

nın korunması, devamlılığı için yeni besiyerlerine ekilmesi gerekmektedir. Saf bir kültürden kültürün başka besiyerlerine ekim yapılması veya deney hayvanlarına inokule edilmesi işlemine *pasaj* denir.

Sıra	İşlem Basamakları	Basamakları	İşlem Kontrolü
Birinci aşama:			
A	Koloni izolasyonu	Karışık kültürden hedeflenen türü izole etmek ve üretmek gerekir.	
1		Klinik numuneden ekim yapılarak karışık kültür üretilir.	
2		Bir miktar kültür öze ile alınır, mikroorganizma hücrelerinin daha rahat yayılarak ayrı ayrı koloni oluşturmaları için petri kutusuna azaltma yöntemi ile ekim yapılır. Bu sırada bir önceki sürme alanına değmemeye özen gösterilir. Petri kutusunun arka yüzeyine cam kalemi ile dört bölge işaretlenerek önceki sürme alanlarına yeniden ekim yapmama sağlanabilir.	
3		Petrinin üzerine hastaya ya da izolata ait bilgiler yazılarak ters çevrilir, önerilen sıcaklık ve sürede etüvde inkübasyon sağlanır.	
4		İnkübasyon sonrasında tek düşmüş koloniler seçilir ve seçim yaparken tipik koloni görünümünde olmalarına ve diğer kolonilerle birleşik, karışık ve dağılmış olmamalarına dikkat edilir. Petrinin 4. bölgesinden tek düşen mikroorganizma hücresi çoğalarak saf koloniyi oluşturur.	
5		Eğer tek düşmüş koloniler yoksa, daha az inokulum içeren bir ekim yapılarak kültürün seyrelmesi sağlanır.	
B İkinci aşama: Saf kültür eldesi			
1		Bunun için, izole koloni iğne öze ile önce sıvı bir besiyerine aktararak canlandırma işlemi yapılır.	
2		Tüp üzerine izolata ait bilgiler yazılır ve uygun sıcaklık ve sürede inkübe edilmek üzere etüve konur.	
3		İnkübasyon tamamlanınca sıvı kültürden katıya örnek pasajlanır ve inkübe edilerek saf kültür elde edilir.	
C Üçüncü aşama:			
C	Saflık kontrolü	Karışık kültür olmadığının teyid edilmesi gerekir.	
1		Elde edilen kültürden azaltma tekniği kullanılarak petri kutusundaki agarlı besiyerine ekim yapılır ve inkübasyona bırakılır.	
2		İnkübasyon sonucunda besiyeri yüzeyinde oluşan tek düşmüş koloniler şekil, yapı, büyüklük, renk vb. özellikleri yönünden incelenir. Tüm koloniler aynı özellikleri göstermiyorsa kültür karışık olabilir.	

Tablo 9.1: Saf kültür elde etme basamakları

Kültürleri Muhafaza Etme

İzole edilen saf kültürlerin orijinal morfolojilerini ve genetik özelliklerini kaybetmemesi için dondurma ve kurutma gibi muhafaza yöntemleri geliştirilmiştir.

Kültürler buzdolabı ısısında (+4C'de) korunmalıdır. Bazı fakültatif anaeroplara, tüpte yüksek miktarda agar içeren besiyerlerinde üretildikten sonra buzdolabında saklanır.

Kültürler; derin dondurucuda 18 ilâ 20°C'de de muhafaza edilebilir. Suyunu kaybetmiş liyofilize kültürler daha uzun süre yaşayabilir.

Kültürleri daha uzun süre koruyabilmek adına petri kutularının ya da tüplerin ağız kısımlarının hava ile teması engellenmelidir. Bu amaçla kapaklar parafilm ile kaplanmalıdır. Ağız vida kapaklı tüplerde parafilm gerek yoktur.

Uygulama - 9

Çalışma: Saf Kültür Eldesi

Amaç

Karışık örnekten saf kültür elde etmek.

Öğrenim Hedefleri

1. Klinik numuneden etken izole edebilme,
2. İdentifikasyona hazırlık öncesi saf kültür temin edebilme.

Araç-Gereç

1. Katı besiyerinde üremiş karışık kültür,
2. Öze,
3. Bunzen beki,
4. Kanlı agar,
5. EMB agar.

Görevler

Saf kültür için ekim yapılan besiyeri:.....

İnkübasyon süresi:.....

Saf kültür oluştu mu?.....

Oluşmadı ise neden oluşmadı? Yorumlayınız.....

Öğretim

Üyesi:

İmza:

Saf Üremiş Kültür Özelliklerinin İncelenmesi

Saf üremiş kültürden identifikasyon için yapılacak ilk basamak gram boyama için preparat hazırlamadır.

Bunun için;

1. Temiz bir lam üzerine bir öze dolusu kültür aktarılarak ince bir tabaka hâlinde yayılır.
2. Preparat havada kuruduktan sonra fikse edilir (Lamin numune içermeyen tarafı 3 kez Bunzen beki alevinden geçirilir).

Preparatın taze kültürden hazırlanmış olmasına dikkat edilir. 24 saatten fazla beklemiş kültürlerde morfolojik ve boyanma özellikleri bakımından problem yaşanabilir.

Boyama sonucu elde edilen verilere göre bakterinin gram (+) veya gram (-) olması identifikasyonda izlenecek yol haritasını belirler.

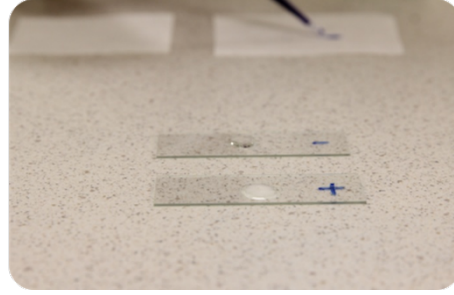
Gram (+) bakteriler için;

1. Basamak Test

Katalaz Testi

Stafilokokları, diğer sık izole edilen gram pozitif koklardan ayırt etmek için yapılan en önemli fizyolojik test katalaz testidir. Katalaz, streptokokların dışında birçok aerop ve fakültatif anaerop bakteri tarafından üretilen bir enzimdir.

Katalaz testinde, bir lam üzerine damlatılan %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) çözeltisinde süspanse edilen bakteri örneği, eğer bakteride bu enzim pozitif ise oksijen (O_2) ve suya (H_2O) dönüşür. Lam üzerindeki bakteri-reaktif karışımında bir köpürme meydana gelir. Stafilokoklarda katalaz pozitif, streptokoklarda ise katalaz testi negatif sonuçlanır.

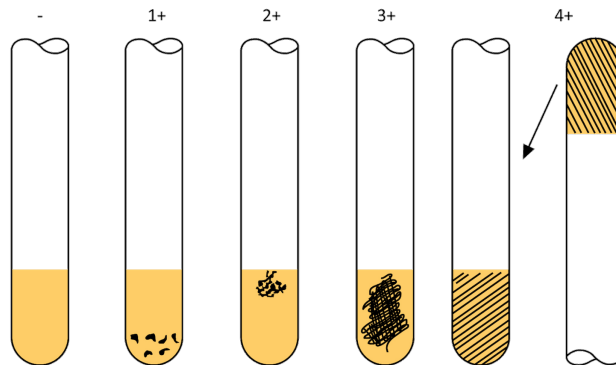


Şekil 10.1: Katalaz testi (Yazarın kendi çektiği fotoğraf).

2. Basamak test

Koagülaz Testi

Staphylococcus aureus, plazmayı pıhtılaştırıcı koagülaz üretir. Plazmanın pıhtılaşması, izolattaki koagülaz enziminin varlığını ortaya koyar. Koagülaz hücre tarafından ortama salındığı için “serbest koagülaz” olarak da bilinmektedir. Ayrıca, serbest koagülazdan farklı olarak “bağlı koagülaz” da vardır. *S.aureus*’un hücre duvarında “bağlı koagülaz” veya “kümelenme (clumping) faktörü” olarak adlandırılan bir fibrinojen bağlayıcı yüzey reseptörü bulunur. Hücre duvarında bu faktörü taşıyan bakteriler, direkt olarak plazmanın fibrinojeni ile etkileşerek aglütine olur. Bu reaksiyon lam testi ile gözlenebilir. Özetle; bağlı koagülaz lam testinde bakterinin aglütinasyonu şeklinde, serbest koagülaz ise tüp testinde pıhtı oluşumu şeklinde gösterilir. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında en yaygın tercih edilen koagülaz testi lam testidir. Uygulanması kolay ve hızlıdır. Ancak, bu faktör *S.aureus*’un bazı suşlarında bulunmayabilir. Bu nedenle lam testi ile yalancı negatiflik gelişebilir. Dolayısıyla, doğrulama için tüp testinin yapılması gerekir.



Şekil 10.2: Tüpte koagülaz testi 0, 1, 2, 3 ve 4 saat (Nazile Arda Çakır tarafından yapılan çizim).

Uygulama - 10

Çalışma - 1: Saf Kültürden Preparat Hazırlama

Metod

Bkz.Uygulama - 3; Çalışma - 2.

Çalışma - 2: Preparatın Gram Boyama İle Boyanması

Metod

Bkz. Uygulama-5; Çalışma-1.

Çalışma - 3: Katalaz Testi

Amaç

Gram (+) bakteri identifikasyonu testlerinin kavratılması.

Öğrenim Hedefleri

1. Stafilokoklar ile Streptokoklar arasındaki ayrımsal testlerin öğrenilmesi.

Araç - Gereç

1. Saf kültür,
2. Öze,
3. %3'lük H₂O₂ çözeltisi,
4. Lam.

Metod

Sıra	İşlem Basamakları	Basamakları	İşlem Kontrolü
1	Bir damla %3'lük hidrojen peroksit çözeltisi temiz bir lama damlatılır.		
2	Şüpheli koloni öze ile alınarak çözelti içinde süspans edilir.		
3	Köpürme gelişimi izlenir.		

Tablo 10.1: Katalaz testi basamakları

DİKKAT!!!

Katalaz testi için örnek alınacak besiyeri, kan içermeyen bir besiyeri olmalıdır. Çünkü, katalaz enzimi, eritrositlerde de bulunduğundan dolayı kanlı agardan alınmış bir örnekle çalışıldığında yalancı pozitiflik verebilir.

Çalışma-4: Plazma Koagülaz Testi**Amaç**

Gram (+) bakteri identifikasyonu testlerinin kavratılması.

Öğrenim Hedefleri

Staphylococlar ile streptococlar arasındaki ayrımsal testlerin öğrenilmesi.

Araç - Gereç

1. Saf kültür,
2. Plazma,
3. Öze.

Metod

Sıra	İşlem Basamakları	Basamakları	İşlem Kontrolü
1	Şüpheli koloni	0,5 ml plazma içine ekilir.	
2	İnokulum,	37°C'lik etüvde bekletilir.	
3	Saat başı incelenerek	4 saat içerisinde fibrin ya da pıhtı oluşumu izlenir. İnceleme yaparken tüpün çalkalanmaması gerekir.	
4	Eğer plazmada pıhtılaşma yoksa	geçikmiş koagülaz aktivitesi olasılığı için oda sıcaklığında 24 saat bekletilerek yeniden izlenebilir.	

Tablo 10.2: Katalaz testi basamakları

Görevler:

1. Saf kültürden preparat hazırlandı mı?.....
2. Preparat fiksasyonu yapıldı mı?.....
3. Hangi fiksasyon yöntemi kullanıldı ?.....

4. Gram boyama ile boyanan preparatın immersiyon objektifi ile incelenmesi yapıldı mı? Gördüklerinizi çiziniz.

MB:.....

İO:.....

Sonuç - Yorum

5. Katalaz testi sonucu:

Yorum:

6. Plazma koagülaz testi sonucu:

Yorum:

Öğretim

Üyesi:

İmza:

BÖLÜM 11

İDENTİFİKASYON TESTLERİ

Oksidaz Testi

Oksidaz testi, sitokrom oksidaz enzimi üretiminin pozitifliğini ortaya koyan bir başka metabolik testtir. Sitokrom oksidaz enzimine sahip bakteriler, fenilendiamin bileşiklerini oksitleyerek koyu mavi renkli indofenole dönüştürür. Sitokrom sistemi sadece, son hidrojen alıcısı olarak oksijeni kullanabilen aerop mikroorganizmalarda bulunur. Son ürün olarak açığa su veya hidrojen peroksit çıkar. Oksidaz testi özellikle non fermentatif gram negatif bakterilerin ilk identifikasyon testidir. *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Moraxella*, *Campylobacter* ve *Vibrio*'lar oksidaz pozitif bakterilerdir.



Şekil 11.1: Oksidaz testi (Yazarın kendi çektiği fotoğraf).

Uygulama - 11

Çalışma - 1: Oksidaz Testi

Amaç

Bakterileri identifikasyonunun temel testlerinin öğrenilmesi.

Öğrenim Hedefleri

1. Aerop bakterilerdeki sitokrom oksidaz enzim etkinliğinin ölçülmesi.

Araç - Gereç

1. Enterobacteriaceae ailesinden bir türün saf kültürü,
2. Aerop mikroorganizma saf kültürü,
3. Kovacs Oksidaz ayıracağı,
4. Filtre kâğıdı,
5. Petri kabı,
6. Eküvyon ya da öze.

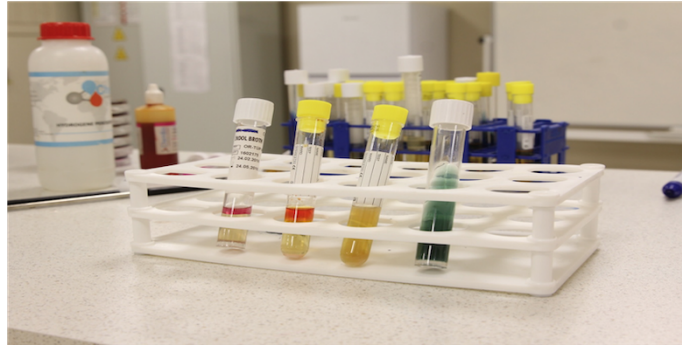
Metod

1. Boş petri kabına bir parça filtre kâğıdı konur ve üzerine Kovacs Oksidaz reaktifinden 2-3 damla damlatılır.
NOT: Ticari oksidaz stripleri kullanılıyorsa, striplerin 1-2 damla steril SF ile ıslatılması önerilir.
2. Şüpheli koloniden oksidaz enzim etkinliği araştırılacak örnek iğne öze kürdan ile alınır; şeridin reaktif damlatılmış kısmına sürülür.
3. 10 saniye içinde mavi-mor rengin oluşup oluşmadığı izlenir.

IMVIC Testleri [Indol, Metil Red (Metil Kırmızısı), Voges-Proskauer, Citrat]

İndol testi, triptofanaz enziminin varlığını ortaya koyan IMVIC seri testinin ilk deneyidir. Triptofanaz enzimine sahip bakteriler bu substratı içeren besiyerlerinde üreyerek bu aminoasidi parçalar ve indol açığa çıkar. İndol pozitifliğinde, ortama eklenen aldehit içeren bir indikatör reaktif indolle reaksiyona girer ve indikatöre

göre pembe/kırmızı (benzaldehit reaktifi) veya mavi-yeşil (sinnamaldehit reaktifi) renkli maddeler oluşturur.



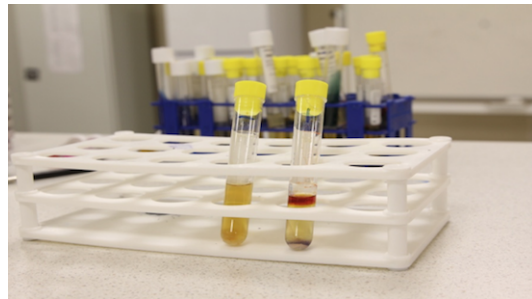
Şekil 11.2: IMVIC testi (Yazarın kendi çektiği fotoğraf).

İndol testi için hızlı test ve tüp testi olmak üzere iki yöntem vardır. **Hızlı test**, indolün direkt olarak triptofan içeren besiyerinde üremiş koloniden saptandığı bir yöntemdir. Diğeri ise geleneksel **tüp testi olup** bir gece inkübasyon gerektirir. Ancak zayıf pozitifliklerin bile yakalandığı daha duyarlı bir testtir.

Voges-Proskauer (MR-VP) Testleri

Tüm fermentatif Enterobacteriaceae ailesi **Embden - Meyerhof yolunu** kullanarak glikozdan pirüvat oluştururlar. Bazı bakterilerse bu son ürünü daha da yıkarak formik, laktik, asetik asit gibi daha güçlü asidik ürünler meydana getirirler. Bu nedenle, ortam pH'ı 4.4' ün altına iner. Metil Red (metil kırmızısı) testi bir bakterinin glikoz fermentasyonu sonucu oluşturduğu son ürünlerin asidik olup olmadığını ortaya koyan bir testtir. İndikatör olarak metil kırmızısı kullanılır. Glikozlu buyyona inokule edilen örnekler, son ürün olarak asidik metabolitler açığa çıkarıyorsa MR indikatörü pH 5'in altında kırmızı, 5,8'in üstünde sarı renk verir. Voges Prouskauer (VP) testi ise özellikle enterik bakterilerde glikoz fermentasyonu ile nötral son ürünler oluşturup oluşturmadığını saptayan bir başka identifikasyon testidir.

Pürivik asidin daha ileri metabolize edilmesi durumunda mikroorganizmalar **butilen - glikol** yolunu kullanarak asetil metil karbinol ve butandiol oluştururlar; bu son ürünler nötral olduklarından ortamın pH'ını yükseltir ve pH 6'nın üzerine çıkar. İnkübasyondan sonra bakterilerin butanediol fermentasyon yeteneğinde olup olmadıkları bu test ile araştırılır. Asetil metil karbi-



Şekil 11.3: Voges-Proskauer testi (Yazarın kendi çektiği fotoğraf).

nol, potasyum hidroksid (KOH) varlığında okside olarak diasetil meydana getirir. Bu ürün ise alfa naftol (kreatin, arginin veya kreatinin) ile reaksiyona girdiğinde kırmızı renk oluşturur.

Sitrat Kullanım Testi

Bakterilerin sitratı tek karbon (enerji) kaynağı olarak kullanıp kullanmadığını ortaya koyan bir testtir. Sitrat kullanım testi için örneğin Simmon's sitrat agara ekilmesi gerekir. Tüpte yatık hazırlanan bu besiyeri karbon kaynağı olarak sadece sitrat içerir; azot kaynağı olarak da amonyum tuzları bulunur.

Sitratı tek karbon kaynağı olarak kullanan mikroorganizmalar inorganik amonyum tuzlarını da tek azot kaynağı olarak kullanırlar ve açığa alkali ürünler çıkar, pH yükselir (pH>7.6). Besiyerinde bulunan bromtimol mavisi indikatör görevi görür ve ortam pH'ı 7'nin üstüne çıkınca besiyeri rengi Prusya mavisi rengine döner. Özellikle Enterik gram negatif çomakların tanımlanmasında önemli bir testtir.

Salmonella, *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* ve *Providencia* sitrat pozitif iken *Escherichia*, *Shigella*, *Morganella* ve *Yersinia* sitrat negatiftirler. *Proteus*'larda ise sitrat değişken özellik gösterir.

Çalışma-2: İdentifikasyon Testleri

Amaç

Bakterilerin identifikasyonunda kullanılan temel testlerinin öğrenilmesi.

Öğrenim Hedefleri

1. Enterobacteriaceae ailesinin identifikasyon testlerinin kavranması,
2. IMVIC ve sitokrom oksidaz testlerinin uygulanması.

Araç-Gereç

1. Saf kültür,
2. Eküvyon,
3. Filtre kâğıdı,
4. Petri kabı, tek kullanımlık – spot indol testi için,
5. pH metre,
6. Pastör pipeti.

Metod**Spot indol test**

- Filtre kâğıdı yöntemi: Boş bir petri kabına yerleştirilen filtre kâğıdına 1-2 damla indol ayırıcı damlatılır. Şüpheli koloniden alınarak filtre kâğıdına sürülür.
- Eküvyon yöntemi: Eküvyon yardımıyla şüpheli koloni alınır ve üzerine indol ayırıcı damlatılır.
- Plak yöntemi: Besiyerinde üremiş şüpheli koloninin üzerine bir damla indol ayırıcı damlatılır. Karışık kültürlerde bu yöntem tercih edilmemelidir. Tek düşmüş saf kolonilere plak yöntemi yapılmalıdır.

Görevler

1. Oksidaz testi yapıldı mı?
2. Sonuç - yorum:
3. IMVIC Testleri yapıldı mı?

Indol Metil Kırmızı Voges-Proskauer Sitrat

Kullanılan Besiyerleri neler:.....

Kullanılan Reaktifler neler:.....

Sonuç - Yorum

İdentifiye ettiğiniz bakterinin genel özelliklerini tanımlayınız.

Öğretim

Üyesi:

İmza:

Hemoliz Testi

Bazı bakteriler sahip oldukları çeşitli tipteki hemolizin enzimleri ile kandaki hemoglobini farklı derecelerde hemoliz etme yani parçalama yeteneğine sahiptirler. Bakterilerin hemoliz yeteneği kanlı agar besiyeri kullanılarak test edilebilmektedir.

Hemoliz testi, daha çok streptokok ve stafilokokları kendi içlerinde ayırmak için kullanılmaktadır. Streptokoklar kanlı agar besiyerinde alfa-, beta- ve gama-hemolitik reaksiyon verirler. Alfa-hemolitik streptokokların kanlı agar besiyerinde oluşturdukları kolonilerin etrafında, kenarları keskin hatlı olmayan, bulanık ve yeşilimsi bir zon oluşur. Beta-hemolitik streptokoklar, aynı besiyerinde tam hemoliz yaparak kolonilerin etrafında düzgün bir hatla çevrilmiş temiz ve berrak bir hemoliz zonu oluşturur. Gama-hemolitik streptokoklar ise hemolizin enzimine sahip olmayan, kanlı agar besiyerinde hemoliz oluşturmayan streptokoklardır.

Kanlı agar besiyerine 18-24 saatlik bakteri kültüründen tek koloni düşürülecek şekilde öze ile sürülerek ekim yapılır ve optimum sıcaklıkta 1-7 gün süre ile inkübe edilir. Besiyerinde gelişen koloniler, etrafında oluşturduğu hemoliz zonu yönünden her gün incelenir.

Üre Testi

Üre broth besiyerine öze ile inokülasyon yapılarak optimum sıcaklıkta 24 saat süre ile inkübasyona bırakılır. Besiyeri rengi hafif kırmızıdan sıklamden pembeye dönerse pozitif, bir değişiklik olmazsa negatif olarak değerlendirilir. Üre testi sırasında bir başka üre broth besiyerine pozitif kontrol olarak *Proteus*, bir başka besiyerine de negatif kontrol olarak *E. coli* inoküle edilir, ayrıca bir tüp üre broth besiyeri inoküle edilmeden boş olarak kullanılır. İnkübasyon sonunda 4 tüpün rengi kontrol edilir. İnkübe edilmemiş tüp sarımsı kırmızı renkte, pozitif kontrol kırmızı renkte, negatif kontrol sarı renkte olmalıdır.

Safrada Erime Deneyi



Şekil 11.4: Safrada erime testi (Yazarın kendi çektiği fotoğraf).

Streptococcus pneumoniae'ı diğer alfa-hemolitik streptokoklardan ayırmak için kullanılan bir testtir. Safra tuzu (sodium deoxycholate, sodium taurocholate) bakterinin erimesine neden olan, indirekt etkili bir maddedir; otolitik enzim sentezini aktive ederek etkisini gösterir. Test aktif üreme fazın-

daki, 18-24 saatlik katı veya sıvı kültürler ile tüpte yapılır. Katı besiyeri için %2'lik, tüp testi için %10'luk sodyum deoksikolat hazırlanır.

Sıvı kültürle yapılan deneyde bakteri tercihen uygun buyyon besiyerinde 0.5-1 McFarland bulanıklığında süspanse edilir. Biri kontrol olan 2 tüpe 0.5 ml konur; birinin üzerine safra çözeltisi, diğerine fizyolojik tuzlu su aynı miktarda ilâve edilerek 35°C'de 2 saat bekletilir. Tüplerde erime meydana gelmesi pozitiflik olarak yorumlanır ve alfa hemoliz yapmış şüpheli kolonilerin *Streptococcus pneumonia* olarak identifiye edilmesini sağlar.

Uygulama - 12

Çalışma-1: Safrada üreme deneyi

Amaç

S.pneumoniae'nın identifikasyon testlerinin kavranması.

Öğrenim Hedefleri

1. Alfa-hemolitik streptokoklarda ayırıcı tanının yapılabilmesi.

Araç-Gereç

1. Öze,
2. Test tüpleri,
3. %10'luk safra tuzu çözeltisi,
4. %2'lik safra tuzu çözeltisi,
5. Pastör pipeti,
6. Lam (direkt lam testi yapılacaksa),
7. Gram boya veya metilen mavisi boya (direkt lam testi yapılacaksa),
8. Vorteks,
9. Etüv.

Metod

Direkt Plak Testi (Spot Test)

1. Safrada erime testinin besiyeri üzerinde uygulanan şeklidir. Ancak kültürün %5 koyun kanlı agarda son 18-24 saatte üremiş olmasına dikkat edilmelidir.
2. Bir damla %10'luk safra tuzu çözeltisi besiyerinde üremiş şüpheli kolonilerin üzerine damlatılır.
3. Agar-yüzü yukarı bakacak şekilde plak, 35°C'de 15-30 dk bekletilir. Besiyeri yüzeyinde erime olup olmadığı izlenir.

Tüp Testi

1. Bir tüpe 0.5 ml FTS konur.

2. McFarland'ın 1 nolu şişesinin koyuluğunda bir bakteri süspansiyonu hazırlanır. Süspansiyon vortekslenerek homojenize edilir.
3. İki tüpe alınır; hazırlanan bakteri süspansiyonu 0,25'şer ml konur. Tüplerin biri test için diğeri kontrol amaçlı kullanılacaktır.
4. Test tüpüne 5 damla %2'lik safra çözeltilisi, kontrol tüpüne 5 damla FTS eklenir.
5. 35°C'de 2 saat inkübe edilir. Her yarım saatte bir bulanıklığın kaybolup kaybolmadığı izlenir. Berraklaşan tüplerdeki suşlar, safrada erime testi pozitif olarak bildirilir.

Görevler

1. Kültürün gram ile boyaması yapıldı mı?.....

Sonuç-Yorum:

2. Katalaz testi yapıldı mı?.....

Sonuç-Yorum:

3. Hemoliz yönünden değerlendirildi mi?.....

Sonuç-Yorum:

4. Safrada erime testi yapıldı mı?

Sonuç-Yorum:

5. İdentifiye edilen bakterinin özelliklerini tanımlayınız.

Öğretim

Üyesi:

İmza:

Antibiyotikler ve Mikroorganizmalara Etkisi

Antibiyotik, doğal yollarla bazı bakteri ve mantar türleri tarafından üretilen, mikroorganizmaların üremesini durdurucu (bakteriyostatik) ve öldürücü etki gösteren (bakterisidal) ve enfeksiyon hastalıklarını tedavi eden kemoteropötiklerdir. Bir antibiyotikte olması gereken en önemli özellik, seçici toksik etki gösterip göstermediğidir. Bu özellik, konak üzerinde toksik etkinin minimumda kalması ancak mikroorganizmanın hedeflenen bölgesine optimal derecede etki göstermesiyle ilişkilidir. Hedef bölge, mikroorganizmanın üremesini ya da yaşamsal faaliyetlerini durdurucu nitelikte bölgelerdir. Hücre duvarı, sitoplazmik membran, ribozomlar ve diğer yapılar hedef bölge olabilir.

Mikroorganizmaların klinik numunelerden izolasyonu ve identifikasyonu yapıldıktan sonra hangi antibiyotiğe karşı duyarlı ve hangilerine dirençli olduklarını saptamak gerekir. Bu amaçla yapılan teste **antibiyotik duyarlılık testi (antibiyogram)** denir.

Bakteri hücre duvar sentezini engelleyen antibiyotikler: Hücre duvarı sentezi henüz tamamlanmamış bakterileri etkileyerek duvar bütünlüğünün oluşmasını engeller. Hücre duvarı yıkıma uğramış bir bakteri ölür. Bu grup antibiyotiklere beta laktam antibiyotiklerden penisilinler ile sefalosporinler, ayrıca sikloserin, vankomisin, basitrasin gibileri örnek verilebilir.

Bakteri membran permeabilitesini bozan antibiyotikler: Bakterinin sitoplazmik membran geçirgenliğini bozarak hücre içinde bulunan maddelerin hücre dışına çıkmasını sağlarlar. Çoğunlukla öldürücü yani bakterisidal etki oluşturur. Hücre duvarına etkili antibiyotiklerden farklı olarak gelişmesini tamamlamış bakterileri de etkiler. Örnek: polimiksin, gramisidin, nistatin, ketokonazol, flukonazol vb.

Bakteri hücresinin protein sentezini önleyen antibiyotikler: Bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe ederek bakterisid ve bakteriyostatik etki oluşturur. Aminoglikozidler, tetrasiklinler, tigesiklin, kloramfenikol, fusidik asit gibi birçok örnek verilebilir.

Bakteri hücresinin DNA ve m-RNA sentezini bozan antibiyotikler: Çoğu memeli hücrelerine de etkili (sitotoksik) olup antineoplastik olarak kullanılırlar. Memeli hücrelerine etkili olmayan kinolonlar ve rifamisinler antibiyotik olarak kullanılırlar.

Bakteri hücresi metabolizmasını bozan antibiyotikler: Bakteri metabolizması için gerekli olan bir maddenin sentezini önleyerek etkili olur. Örneğin dapson, sulfonamid, etambutol, trimetoprim, izoniazid vb. antibiyotikler bu gruba dâhil edilebilir.

Antibiyotik Duyarlılık Testi Yaparken Dikkat Edilecek Hususlar

Doğru antibiyotiğin seçilmesi

Öncelikle enfeksiyon etkeninin kültürle belirlenmesi gerekir. Daha sonra etken bakterinin, antibiyotiklere direnç ve duyarlılık durumunun araştırılması gerekir. Etken, izole edilmiş ve kimliği ortaya konmuşsa yani tür bazında identifiye edilmişse antibiyotik duyarlılık testi yapılarak bu enfeksiyonu tedavi edecek uygun antibiyotik bulunur.

Antibiyotik duyarlılık testleri saf kültürden yapılmalıdır. Asla karışık kültürden antibiyogram yapılmaz.

Besiyeri Seçimi

Antibiyotik duyarlılık testlerinde en yaygın kullanılan besiyeri Müller-Hinton agarıdır. Ancak bazı farklı özelliklere sahip bakteriler ya da zor üreyen mikroorganizmalar için zenginleştirilmiş alternatif besiyerleri de bulunmaktadır.

Antibiyogramda kullanılacak bir besiyerinin ideal özellikleri şunlardır:

- Optimal ph 7,2-7,4 arasında olmalıdır.
- Agar kalınlığı 4 mm'yi geçmemelidir. Çok ince ya da çok kalın dökülmüş besiyerinde antibiyotik disklerinin difüzyon hızı değişebilir ve zon çapında yalancı pozitiflikler/negatiflikler gelişebilir.
- Besiyerinin kontamine olup olmadığı kontrol edilmeli, steril olmasına dikkat edilmelidir.
- Besiyeri yüzeyi yırtık, çatlak ve delik olmamalıdır. Kurumuş besiyerleri işleme alınmamalıdır.
- Buharlaştırma sonrası petri içinde su birikimi varsa bunların giderilmesi gerekir.
- Besiyerleri torbasız olarak muhafaza ediliyorsa +4°C'de 2 hafta, torbada saklanıyorsa +4°C'de 8-10 hafta dayanabilir.

Antibiyotik duyarlılık testi yaparken kullanılacak antimikrobiyal diskler için önemli hususlar

Kullanım öncesi buzdolabı ısısında ya da daha düşük sıcaklıkta saklanmalıdır.

Soğuk zincire uyulmalıdır. Buzdolabından çıkarılan ambalajların oda ısısına getirildikten sonra kullanılmasına dikkat edilmelidir. Ambalajlarından çıkarıldıktan sonra kuru ve soğuk ortamda muhafaza edilmelidir. Nemden uzak tutulmalıdır.

Antibiyotik Duyarlılık Test Yöntemleri

Antibiyogram, genellikle katı besiyerinde ***difüzyon*** ve hem katı hem de sıvı besiyeri yapılabilen ***dilüsyon*** yöntemleriyle yapılır. Bunlardan başka kantitatif ölçüm yapan ***E-Test*** ve ***direnç saptayan otomatize sistemler*** ile de antibiyotik duyarlılık testi yapılır. Bu testlerle bir antimikrobiyal maddenin belli bir test mikroorganizması üzerine etkisi minimal inhibitör konsantrasyonu = MİK (Minimal Inhibitory Concentration = MIC) belirlenebildiği gibi, söz konusu herhangi bir mikroorganizmanın belli bir antibiyotiğe karşı duyarlılığı ya da direnç gelişimi ortaya konulabilir.

Günümüzde antibiyogramların bildirilmesi ve yorumlanmasında yaygın olarak "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI) (Eski adıyla NCCLS) standartları ile EUCAST "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing" kriterleri kullanılmaktadır.

Kirby - Bauer Disk Difüzyon Yöntemi

Disk difüzyon yöntemi, kolay, pratik ve özellikle hızlı üreyen aerop ve fakültatif anaerop bakteriler için önerilen, rutin laboratuvarların sık tercih ettiği bir testtir.

Bu test ile antibiyotiğin inhibe edici etkisi kalitatif olarak ölçülür. Disk etrafında bakterinin üremediği bölgeye zon adı verilir. Zon çapı mm olarak ölçülür. Sonuçlar duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak raporlanır. Disk etrafında inhibisyonun zonu oluşmuyorsa, bakterinin o ilaca karşı dirençli olduğu yorumu yapılır. Yani antibiyotik bakteri üremesini baskılayamamıştır.

Uygulama - 13

Çalışma: Kirby - Bauer Disk Difüzyon Yöntemi

Amaç

Antibiyotik duyarlılık deneylerinin öğrenilmesi.

Öğrenim Hedefleri

1. Bakterilerin antibiyotiklere direnç ve duyarlılık durumlarının araştırılması,
2. Kalitatif yönde sonuç verebilme.

Araç - Gereç

1. İdentifiye edilmiş suş,
2. Çeşitli antibiyotik diskleri,
3. Müller - Hinton agar,
4. Eküvyon,
5. Öze,
6. FTS,
7. McFarland Standardı.

Metod

Koloni Seçimi

Hastalık etkeni olarak izole edilip identifiye edilmiş saf kültürün taze kolonilerinden 3-4 tanesi seçilir. Kolonilerin alınmasında eküvyon ya da öze kullanılabilir.



Şekil 12.1: Koloni seçimi (Yazarın kendi çektiği fotoğraf).

İnokulum Süspansiyonunun Hazırlanması

%0,9'luk steril serum fizyolojikte süspanse edilen inokulum kullanılabilir. FTS yerine Müller Hinton Broth da tercih edilebilir.

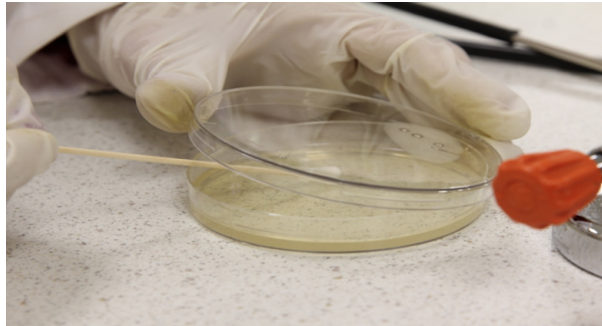
İnokulumun Standardizasyonu

Hazırlanan inokulumun standart bir bulanıklığa sahip olması gerekir. Bunun için sıvı besiyerinde bulunan bakteri sayısını belirlemek amacıyla hazırlanan Mc Farland standartlarına göre hazırlanmış olması önemlidir. Mc Farland'ın baryum klorür ve sülfürik asit karışımı içeren tüplerinin belli oranlarda dilüe edilmesiyle hazırlananan türbitide setinin 0,5 nolu olanı 108 cfu/ml bakteri sayısına işaret olan bulanıklığa eşittir. Antibiyogram öncesi hazırlanan süspansiyonların bu bulanıklığa yakın olması, doğru sonuca ulaştırır.

Çok yoğun hazırlanmış süspansiyonlara steril SF eklenerek türbitide ayarı yapılır.

İnokulasyon

Kullanılacak besiyerine -ki bu sıklıkla Müller Hinton agardır- hazırlanan süspansiyondan öze ile 2 damla bırakılır. Otoklavlanmış yavrulu tüple ya da steril eküvyonla, tüm agar yüzeyine süspansiyon yayılır. Petriyi döndürerek tüm besiyerine homojen dağılım sağlanmalıdır.

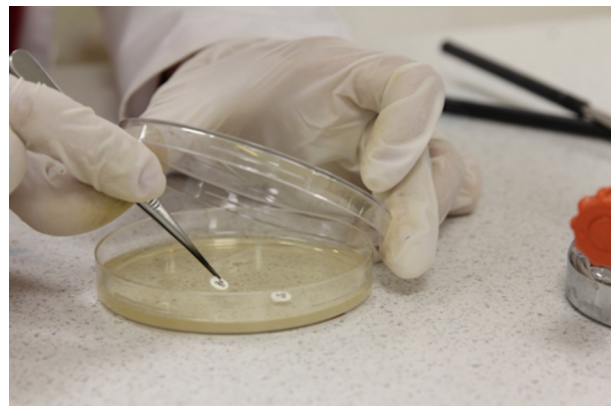


Şekil 12.2: Agarlı petrilere inokulum yapılması (Yazarın kendi çektiği fotoğraf).

Antimikrobiyal Disklerin Yerleştirilmesi

Antimikrobiyal diskleri buzdolabından çıkarılır ve oda ısısına geldikten sonra inokülüm yapılmış besiyerine dizilmelidir. Etki mekanizmaları farklı disklerin tercih edilmesi gerekir.

Petri çapının büyüklüğüne göre en fazla 8-12 arası disk yerleşebilir. İki disk arasında yaklaşık 2-2,5 cm aralık olmalıdır ve petrinin kenarından 1,5 cm



Şekil 12.3: Antimikrobiyal disklerin yerleştirilmesi (Yazarın kendi çektiği fotoğraf).

uzak olacak şekilde steril bir pens ya da otomatik dispenser yardımıyla agara yerleştirilmelidir.

Mueller - Hinton Besiyerinin İnkubasyonu

İdentifiye edilmiş mikroorganizmanın oksijen toleransına göre uygun inkübasyon ortamı sağlanarak 18-24 saat etüvde 37°C'de inkübe edilir.

Görevler

1. Kirby - Bauer disk difüzyon yöntemi yapıldı mı?.....
2. Kullanılan suş:.....
3. Hangi antibiyotikler kullanıldı?.....
4. Neden:.....

Öğretim

Üyesi:

İmza:

Inhibisyon Zonlarının Değerlendirilmesi

Duyarlılığı test edilen mikroorganizmaya karşı antibiyotik etkili ise üremenin bas-
kılındığı bir inhibisyon zonu oluşur. Diskleri dâhil ederek inhibisyon zon çapları
milimetrik cetvelle ölçülür. EUCAST ve CLSI standartlarına göre her mikroorganiz-
manın hangi antibiyotiğe duyarlı ve dirençli olduğunu saptamak gerekmektedir.

Test Sonuçlarının Denetlenmesi

Sonuçların doğruluğunu belirleyebilmek için test tekrarlarında da birbirine ya-
kın zon çapları elde edilmelidir. Kalite kontrolde kullanılan standart suşlar ile
denetlenerek sonuçlar kontrol edilir. Bu suşlarla beklenen sonuçlar elde edilemezse
antibiyotik duyarlılık testlerinin yeniden yapılması gerekir.

Zon Çapının Tanımlanması

1. Duyarlı (Susceptible, S): Enfeksi-
yonun, önerilen dozda o ilaç ile
başarılı bir şekilde tedavi edilebi-
leceğini gösterir.
2. Orta Duyarlı (Intermediate, I): İla-
cın normalden yüksek dozda kul-
lanıldığında klinik olarak etkili
olacağını gösterir.
3. Dirençli (Resistant, R): Tedavide
kullanılmaması gerektiğini ifade
eder.



Şekil 13.1: Test sonuçları ve zon çapının değerlendirilmesi (Yazarın kendi çektiği fotoğraf).

Antibiyotikler	Suşlar	Zon Çapı (mm)		
		Dirençli	Orta Duyarlı	Duyarlı
Oksasilin (1µg)	<i>S. aureus</i>	≤10	11 - 12	≥13
	<i>S. lugdunensis</i> dışındaki KNS'ler	≤17	-	≥18
Sefoksitin (30 µg)	<i>S. aureus</i> ve <i>S. lugdunensis</i>	≤21	-	≥22
	<i>S. lugdunensis</i> dışındaki KNS'ler	≤24	-	≥25
Seftizoksım (30 µg)		≤14	15 - 19	≥20
Moksalaktam (30 µg)		≤14	15 - 22	≥23

Tablo 13.1: Stafilokoklar için önerilen zon çapı yorumlama standartları



Şekil 13.2: S.aureus zon çapı belirleme (Shutterstock.com'dan alınan lisansla kullanılan görsel).

Uygulama-14

Çalışma: İnhibisyon Zonlarının Değerlendirilmesi

Amaç

Antibiyotik duyarlılık deneyinin kalitatif yorumlaması.

Öğrenim Hedefleri

1. Antibiyotiklere duyarlı, ara duyarlı ve dirençli kavramlarının öğrenilmesi,
2. Antibiyogram yorumlayabilme becerisinin kazandırılması.

Araç - Gereç

1. Önceden hazırlanmış antiyogram örneği,
2. Siyah karton,
3. Milimetrik cetvel.

Metod

1. İnhibisyon zonlarını diskleri dâhil ederek ölçünüz.
2. Elde edilen verileri duyarlı, dirençli ve orta duyarlı olacak şekilde standart tabloyu kullanarak değerlendiriniz.

Görevler

1. Zon çapları ölçüldü mü?

Antibiyotik	Ölçülen zon çapı (mm)	Sonuç
-------------	-----------------------	-------

2. Bu sonuca göre hastamıza hangi antibiyotikler verilebilir?

.....

3. Hangi antibiyotikler verilmemelidir?

.....

Öğretim

Üyesi:

İmza:

Kısım II

Klinik Mikrobiyoloji-II Uygulamaları

Bu bölümde klinik numunelerin mikrobiyolojik yönden örnek yönetimi, değerlendirilmesi ve klinik yorumlama becerisinin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarlarının çalışma alanı olan enfeksiyon ajanının identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılık direnç gelişimine dair araştırma teknikleri kullanılarak sistemler üzerinden numuneler çalışılacaktır.

Boğaz Kültürü

Özellikle kış aylarında klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarına en sık gelen numunelerin başında boğaz kültürü gelir.

Boğaz kültüründe etken olarak sıklıkla izole edilen en önemli patojen A grubu Beta Hemolitik Streptokoklardır. Akut farenjit etkeni olan bu bakteriler, *streptococcus pyogenes* olarak izole edilir. İkinci olarak etken olarak kabul edilebilecek tür; *corynebacterium diphtheriae* olup membranöz farenjit etkenidir.

Bunların dışında, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* gibi etkenler de boğaz kültüründen izole edilebilecek bakterilerdir.

Çalışma - 1: Boğaz Kültürünün Alınışı

Amaç

Boğaz kültürü alma tekniğinin öğrenilmesi.

Öğrenim Hedefleri

1. Üst solunum yolu patojenlerinin izolasyonunun sağlanabilmesi,
2. Hastadan doğru teknikle numune alınabilmesi.

Araç - Gereç

1. Dil basacağı (abeslang),
2. Steril eküvyon (silgiç).

Metod

1. Hastanın ağızını iyice açması ve hastaya derin bir soluk alması söylenir. Bu amaçla dil basacağı da kullanılabilir.
2. Eküvyonun ucu, ağız içinde hiçbir yere değdirilmeden, doğrudan her iki bademciğe ve arka yutağa, varsa iltihaplı yerlere de sürülür.
3. Eküvyon ağız içinde hiçbir yere değdirilmeden çıkarılır ve tüpün içine batırılır.
4. Mümkünse işlem başka bir eküvyonla da tekrarlanır.
5. En kısa sürede laboratuvara gönderilerek ekim yapılması sağlanır.

DİKKAT!!!

Bu işlem, öğürme refleksi oluşturabileceğinden, mümkün olan en kısa sürede yapılmalıdır.

DİKKAT!!!

Eküvyonla numune alma işlemi tamamlandıktan sonra eküvyonu hastanın ağızından çıkarırken dile, dişe ve yanak içlerine dokunmamak, flora bakterilerinin patojen bakterilerle karışmasına engel olur.

Çalışma - 2: Ekim**Araç - Gereç**

1. Koyun kanlı agar,
2. Eküvyon,
3. Öze.

Metod

1. Hastadan alınmış numune besiyeri plağının 1/4'lük kısmına eküvyonu sürme tekniği ile ekilir.
2. Besiyerinde kalan 3/4'lük kısım ise öze ile azaltma tekniği kullanılarak ekilir. 37⁰C'de 24 saat inkübe edilir.
3. İkinci numune ile gram boyanmak üzere preparat hazırlanır.

Görev

1. Hastadan doğru teknikle numune alındı mı?.....
2. Ekim yapıldı mı?.....
3. Preparat hazırlanıp gram ile boyandı mı?.....
4. Gram boyama ile boyadığınız preparatta gördüklerinizi çiziniz.

MB:.....

İO:.....

Sonuç - Yorum

Öğretim

Üyesi:

İmza:

Burun Kültürü

Burun kültürü daha çok gıda sektöründe çalışan kişilerin portör muayenelerinde ve sağlık çalışanlarında da taşıyıcılık yönünden istenen bir tahlildir.

Burun florasının en önemli üyeleri, *corynebacterium*'lar, stafilokoklar ve streptokoklardır. Doğrudan burun mukozası enfeksiyon etkenleri arasında; *S.aureus*, viral kaynaklı rinitlere ikincil enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkarken; yenidoğanda *E.coli*, *P.aeruginosa*, *C.albicans*, *Acinetobacter* ve *Moraxella* lokalize lezyonlardan izole edilebilir. Yine özgül enfeksiyon etkenlerinden *Klebsiella pneumoniae subsp. ozonae*, *Corynebacterium diphtheriae* ve *Mycobacterium leprae* burun sürüntülerinden izole edilen mikroorganizmalardır.

Çalışma - 3: Burun Kültürünün Alınışı

Amaç

Burun kültürü alma tekniğinin öğrenilmesi.

Öğrenim Hedefleri

1. Üst solunum yolu patojenlerinin izolasyonunun sağlanabilmesi,
2. Hastadan doğru teknikle numune alınabilmesi.

Araç - Gereç

1. Steril eküvyon (silgiç).

Metod

1. Steril eküvyon, burun deliğine yan duvarlarından sokularak 2-2,5 cm içeriye doğru sürülür.
2. Eküvyon çevrilererek nazal mukozadan/burun zarından örnek alınır.
3. Eğer lepra şüphesi varsa eküvyon bastırılarak örnek alınması önerilir.
4. Eküvyon %1'lik glikozlu buyyona konur.

DİKKAT!!!

Eküvyon, steril serum fizyolojik ile ıslatıldıktan sonra sürülürse daha iyi örnek alınır.

Çalışma - 4: Ekim

Araç - Gereç

1. Koyun kanlı agar,
2. EMB agar,
3. Öze.

Metod

1. Hastadan alınmış numune besiyeri plağının 1/4'lük kısmına eküvyonu sürtme tekniği ile ekilir.
2. Besiyerinde kalan 3/4'lük kısım ise öze ile azaltma tekniği kullanılarak ekilir. 37⁰C'de bir gece inkübe edilir. Aynı işlem diğer burun deliği için tekrar edilir.
3. Ekim işleminden sonra her iki eküvyonla gram boyama için preparat hazırlanır.

Görev

1. Hastadan doğru teknikle numune alındı mı?.....
2. Ekim yapıldı mı?.....
3. Preparat hazırlanıp gram ile boyandı mı?.....
4. Gram boyama ile boyadığınız preparatta gördüklerinizi çiziniz.

MB:.....

İO:.....

Sonuç - Yorum

Öğretim

Üyesi:

İmza:

Kulak Kültürü

Dış kulak yolu pH'ı 4,5-5 arası olup mikroorganizmaların yaşaması için uygun olmayan bir ortam yaratmaktadır. Kulak temizliği sırasında travmatize edilerek doku bütünlüğünün bozulması ve steril olmayan aletlerin kullanılması, suyla sık temas sonucu pH'ın nötre kayması gibi sebeplerden dolayı enfeksiyon gelişebilir. Islaklık, mikroorganizmaların, özellikle mantarların yerleşmesine zemin hazırlar. Dış kulak yolu deri ile kaplı olduğu için enfeksiyonlarında saptanan mikroorganizmalar genellikle deri florası kaynaklıdır. *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* ve *Corynebacterium* cinsine ait türler bu bölgede baskın olarak bulunan bakterilerdendir. Daha az olarak da *propionobacterium acnes* gibi anaerob bakteriler bulunmaktadır. *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* ve *Moraxella catarrahalis* gibi orta kulak enfeksiyonlarına neden olabilen patojenler, kulak zarı hasarı olmayan kişilerin dış kulak yolu kültürlerinden az sayıda üretilmektedir. Dış kulak yolundan izole edilen fungal ajanlar ise; *Aspergillus*, *Candida*, *Phycomyces*, *Rhizopus*, *Actinomyces* ve *Penicillium* cinslerine ait türlerdir. Fungal otitlerin büyük bir çoğunluğundan *Aspergillus* türleri, çocuklardaki dış kulak yolu enfeksiyonlarından ise en fazla *Candida albicans* sorumlu tutulmaktadır. Bu enfeksiyonlarda patojen ve olası patojen mikroorganizmaların bilinmesi uygun tedavinin belirlenmesinde ve başarısında en önemli katkıyı sağlar.

Çalışma - 5: Kulak Kültürü

Araç - Gereç

1. Eküvyon,
2. Kanlı agar,
3. EMB agar,
4. Öze.

Metod

1. Dış kulakta bulunan lezyondan materyal almak için önce deri antisepsisi sağlanır.
2. Sonra yine steril bir lanset/iğne vb. araçla lezyon açılır ve eküvyonla örnek alınır.

Orta kulaktan akıntı örneği almak için;

1. Dış kulak yolu öncelikle steril SF ile silinmelidir ki flora ile kontaminasyon engellenebilsin.
2. Eküvyon yardımıyla çok ilerlemeden örnek alınır.
3. Eküvyon glikozlu buyyon içerisine konur.

Görev

1. Hastadan doğru teknikle numune alındı mı?.....
2. Her iki besiyerine ekim yapıldı mı?.....
3. Preparat hazırlanıp gram ile boyandı mı?.....
4. Gram boyama ile boyadığınız preparatta gördüklerinizi çiziniz.

MB:.....

İO:.....

Sonuç - Yorum

Öğretim

Üyesi:

İmza:

BÖLÜM 2

DEĞERLENDİRME UYGULAMASI - 1

A grubu beta hemolitik Streptokok tayini

Staphylococcus aureus tayini

Pseudomonas aeruginosa tayini

A Grubu Beta Hemolitik Streptokok Tayini

Streptococcus pyogenes, boğaz ve deride kolonize olan ve akut farenjitin en sık rastlanılan bakteriyel etkenidir. Bu bakterinin bazı suşları sekel olarak akut romatizmal ateş ve akut glomerulonefrit oluşturduğu için tıbbi açıdan önemlidir. *S.pyogenes* streptolizin O (SO) ve streptolizin S (SS) olmak üzere iki farklı hemolizin üretir. SO oksijene duyarlıdır ve kolesterol varlığında inhibe olur. SO insan için immunojen olup antistreptolizin O antikollarının oluşumuna (ASO) neden olur. İnsanda ASO titresinin yüksek bulunması 3-4 hafta içerisinde geçirilmiş faringeal *S.pyogenes* enfeksiyonunu gösterir. *S.pyogenes*'e bağlı deri enfeksiyonlarından sonra ASO yükselmez çünkü derideki kolesterol tarafından SO etkisiz hâle getirilir.

DİKKAT!!!

Farinks dışındaki hastalık materyallerinin gram boyama incelemesinde lökositler ve zincir yapmış gram (+) kokların görülmesi tanı için önemlidir.

Üst solunum yolu ve ağız florasında çok sayıda diğer farklı tür streptokokların olması nedeni ile bu örneklerin gram boyaması yapılmaz.

Streptokok enfeksiyonlarının tanısında kullanılan en güvenilir yöntem; kültürdür.

S.pyogenes koyun kanlı agarda geniş bir beta hemoliz zonu ile çevrili koloniler oluşturur. Bu bakterilerin basitrasine duyarlı ve trimetoprim sulfametoksazole dirençli olmaları tanı için değerlidir.

Çalışma - 1: Boğaz Kültüründe *S.pyogenes* Değerlendirmesi**Araç-Gereç**

1. Bacitrasin, SXT, P, E diskleri
2. Kanlı agar

Metod

1. Üremiş şüpheli kolonilerden B ve SXT disklerine antibiyotik duyarlılık testi Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi protokolüne göre yapılır (bkz. Kısım I Bölüm 12).
2. Antibiyotik direncine göre tür belirlenir.

Görev

1. Kanlı agarda üremiş koloniler var mı?.....
2. Beta-hemoliz zonu var mı?.....

Sonuç - Yorum

Öğretim

Üyesi:

İmza:

***Staphylococcus aureus* Tayini**

Stafilokoklar dış ortam koşullarına göstermiş oldukları direnç sayesinde birçok ortamdan izole edilebilirler. Bu mikroorganizmalar hareketsiz, sporsuz, katalaz-pozitif, üzüm salkımı şeklinde kümeler yapan gram pozitif koklardır. İnsanlarda en sık deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarına yol açarlar, burun, boğaz, vagen, rektum ve perine gibi çok sayıda bölgede kolonize olabilirler. Bulaşma yolu hava ve direkt temastır. Son zamanlarda toplum kaynaklı enfeksiyonlardan sıklıkla izole edilen bakterilerin başında metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşları gelmektedir. Birçok hastane enfeksiyonu MRSA taşıyıcısı olan sağlık personeli kaynaklıdır. Sağlık personeli ile otelcilik veya gıda sektörü çalışanlarından her yıl 1 kez olmak kaydı ile burundan *S.aureus* taşıyıcılığı yönünden kültür alınmalıdır.

Mikroskobi

Stafilokoklar kültürden veya klinik numunelerden hazırlanan preparatlarda, gram pozitif, sporsuz, 0.5-1.5 µm çapında yuvarlak, tek tek, diplokok, tetrad kümeleri olarak, kısa zincir yapmış koklar olarak veya üzüm salkımı şeklinde düzensiz kümeler oluşturmuş koklar olarak görülebilirler.

Direkt bakıda ön rapor 'üzüm salkımı şeklinde gram pozitif koklar görüldü' şeklinde verilebilir. Stafilokoklar enfeksiyon yerinden aseptik şekilde alınan örneklerde çok sayıda polimorfonükleer lökosit ile birlikte görülürler.

Kültür

Kanlı agarda ve çikolata agar plaklarına ekim yapılır. Hemoliz olarak beta hemoliz varlığı, altın sarısı pigment varlığı, katalaz testi pozitifliği incelenir. Daha sonra şüpheli koloni alınarak koagülaz testi yapılmalıdır. Böylece *S.aureus*, diğer *Staphylococ* türlerinden ayırt edilmiş olur. Koagülaz (+) sonuç, *S.aureus*, (-) sonuç *S.epidermidis* ya da *S. saprophyticus* olarak değerlendirilebilir.

Çalışma-2: Burun Kültüründe *S.aureus* Değerlendirilmesi

Araç - Gereç

1. Kanlı plakta üremiş şüpheli koloniler,
2. H₂O₂,
3. Plazma,
4. Lam,
5. Deney tüpü.

Metod

Bkz. Kısım-1 Bölüm 9

Görev

1. Şüpheli kolonilere gram boyama yapıldı mı?.....
2. Şüpheli koloniler etrafında beta-hemoliz zonu var mı?.....
3. Katalaz testi yapıldı mı?.....Sonuç:.....
4. Koagülaz testi yapıldı mı?.....Sonuç:.....

Sonuç - Yorum

Öğretim

Üyesi:

İmza:

***Pseudomonas aeruginosa* Tayini**

Pseudomonaslar, doğada yaygın olarak bulunan ve günümüzde fırsatçı enfeksiyonlarla hastane enfeksiyonlarına yol açan oldukça dirençli bakterilerdir. *Pseudomonas aeruginosa* toplum ve hastane kökenli enfeksiyonların etiyolojik ajanlarının başında gelmektedir. Normal flora üyesi olarak sağlıklı bireylerin gastrointestinal sistem, boğaz, burun mukozası ile koltuk altı, perine gibi nemli deri yüzeylerinde nadiren kolonize olur. *P. aeruginosa* suşlarında beta laktam halkayı bozan enzim etkinliği, aktif efflux sistemi, porin kaybı ve hedef bölgede özgül bağlanmayı engelleyici mutasyonlar gibi mekanizmalarla antimikrobiyal ilaçlara direnç geliştirmiştir. Aktif pompa direnci ile imipenem hariç tüm beta laktamlara ve kinolonlara direnç kazanabilen *Pseudomonas aeruginosa*, tedavide sorun oluşturmaktadır. Yanlış ve uygun olmayan antibiyotik kullanımı ve doğru tedavinin gecikmesi nedeniyle gelişen uzamış hastanede yatış süresi mortalite oranını arttırmaktadır.

Mikroskobi

Klinik numuneden ya da üremiş kültürde gram negatif basiller şeklinde görülürler.

Kültür

Pseudomonas aeruginosa zorunlu aerop, monotrik flagellalı bir bakteri olup toprakta, bitkilerde, hayvanlarda ve suda yaygın olarak bulunur. *P.aeruginosa*'nın 42°C'de üreyebilmesi, onu diğer *Pseudomonas* türlerinden ayırır. *P.aeruginosa* mavi-yeşil renk veren piyosiyanın pigmenti sayesinde klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında identifikasyonu en kolay yapılan türlerdendir.

Pseudomonaslar tek bir karbon kaynağı varlığında dahi kolay ürerler ve laktoz negatif R tipi bazen de mukoid koloniler oluştururlar. Triptofan 2-aminoasetofenon üretmeleri nedeniyle beyaz sabun kokusu benzeri bir koku üretirler. Bazı suşlar kanı hemoliz eder. Sitokrom oksidaz enzimleri pozitifdir.

Çalışma-3: Kulak Kültüründe *Pseudomonas aeruginosa* Değerlendirilmesi

Araç-Gereç

1. Kanlı agar,
2. EMB agar,
3. Çikolata agar,
4. Besiyeri plaklarında üremiş şüpheli koloniler.

Görevler

1. Besiyeri plağında üremiş M tipi koloni var mı?.....
2. Şüpheli koloniden gram boyama yapıldı mı?.....
3. Gram boyama ile gördüklerinizi çiziniz ve yorumlayınız.
4. Besiyerinde pigment oluşumu gözlendi mi?.....
5. Kolonilerde tipik sabun kokusu var mı?.....

Sonuç - Yorum

Öğretim

Üyesi:

İmza:

BÖLÜM 3

BALGAM KÜLTÜRÜ VE TÜBERKÜLOZ YÖNÜNDEN ÖRNEK YÖNETİMİ

Balgamın Mikrobiyolojik Değerlendirilmesi

Alt solunum yolu enfeksiyonlarında incelenecek örnekler; balgam, transtrakeal aspirasyon (TTA), bronkoalveolar lavaj (BAL), bronş yıkama sıvısı, bronş fırçalama örneği, bronş biyopsi örnekleri, akciğer aspiratı ve akciğer biyopsisi örnekleridir. Alt solunum yolları, bronşiol ve alveoller normal koşullarda flora taşımaz, sterildir. Toplumun her kesimini etkileyen alt solunum yolu enfeksiyonları başlıca; akut bronşit, kronik bronşitin akut alevlenmeleri ve pnömonidir. Toplumdan edinilmiş pnömoniye sıklıkla; *S.pneumoniae*, *M.pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* ve *S.aureus* neden olur.

Nozokomiyal pnömoniye ise daha çok gram (-) bakteriler (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *E.coli* ve *K.pneumoniae*) neden olur.

Balgam, pnömonilerin laboratuvar tanısında kullanılan en sık ve ilk değerlendirilen örnektir.

DİKKAT!!!

Orofarengeal kontaminasyon balgamın tanı değerini düşürür.

10x objektifle yapılan direkt mikroskopik balgam incelemesinde her alanda yassı epitel hücre sayısı 10 veya <10, lökosit sayısı >25 ise balgam kaliteli balgamdır.

Çalışma-1: Balgamın Mikrobiyolojik Değerlendirilmesi

Araç-Gereç

1. EMB agar
2. Saboraud agar
3. Kanlı agar
4. Çikolata agar
5. Gram boya seti
6. EZN boya seti



Şekil 3.1: Pürülan balgamın değerlendirilmesi (Yazarın kendi çektiği fotoğraf).

Metod

1. Materyal makroskobik olarak değerlendirilir.
2. Materyalin en mukoid ve pürülan görülen kısmından öze ile alınarak kanlı agar, çikolata agar ve EMB agar ile Saboraud agara ekim yapılır.
3. Saboraud besiyeri aerob ortamda, diğer ekim yapılmış petripler %CO₂'li ortamda 24-48 saat inkübe edilir.
4. Mantar enfeksiyonu şüphesi varsa, mantar kültürü yapılır.
5. Materyalden gram ve EZN boyama yapılarak incelenir.

Görevler

1. Balgamın makroskobik özelliklerini tanımlayınız.
.....
2. Direkt gram preparatını inceleyerek kaliteli balgam kriterlerine uyup uymadığını açıklayınız.
3. Balgamın EZN preparatını inceleyiniz. Sonucu belirtiniz.
.....
4. Doğru besiyerlerine ekim yapınız. İnkübasyonu başlatınız.

Kullanılan besiyerleri:.....

Sonuç - Yorum

Öğretim

Üyesi:

İmza:

Tüberküloz Yönünden Örnek Yönetimi

Tüberküloz, sadece akciğerleri değil birçok farklı organ ve sistemleri etkileyebilen sistemik bir enfeksiyon hastalığıdır. Dolayısıyla tüberküloz tanısı birçok farklı numune ile koyulabilir. Hastalığın tanısında akciğer veya akciğer dışı olmak üzere ve floralı veya steril alanlardan farklı tipte örneklerden yararlanılmaktadır. Numune kapları steril olmalıdır ve vidalı kapaklı, sızdırmaz olmasına dikkat edilmelidir.

Örnek Türü	Endikasyon	Örnek Alma Özelliği
Balgam	AC tüberkülozunda en sık tercih edilen materyaldir.	Sabah aç karnına ve 3 gün üst üste alınmış balgam gerekmektedir. Örnek miktarı en az 3-5 ml olmalıdır.
Uyarılmış (indüklenmiş) balgam	Hasta balgam çıkaramıyorsa ve ayakta tedavi ediliyorsa	Aerosol hâldeki 10 ml %3-10'luk hipertonic tuzlu su 15-30 dk boyunca hastaya yavaşça solutulur, derin ve kuvvetli öksürük ile yaklaşık 10 ml balgam örneği alınır.
BAL Bronş lavajı veya bronşiyal fırçalama örneği Trakeal aspirat	İndüklenmiş ya da normal balgam veremeyen, ayakta takip edilemeyen hastalar	5-10 ml bronş lavajı/BAL örneği < 5 ml serum fizyolojik içerisine alınan fırçalama örneği Trakeal aspirat <3 ml
Endotrakeal aspirat	Başka şekilde örnek veremeyen yoğun bakım hastaları	En az 3 ml olmalı
Açlık Mide Suyu	Koma halindeki hastalarla balgam veremeyen çocuklardan alınır.	Üst üste 3 gün, sabah aç karnına, hasta yatağından kalkmadan, gastrik tüp ile 25-50 ml steril su veya serum fizyolojik (SF) verilip aspire edildikten sonra en az 5 ml örnek alınır.
Akciğer doku örneği	İnvazif olmayan teknikler ile tanı konulamayan akciğer tüberkülozu şüphesi olan olgular	Aseptik şartlarda kazeöz lezyondan alınan en az 1 gr doku biyopsisi , Açık akciğer biyopsi doku örneği 2-3 ml'lik steril SF içine alınır.
Larinks sürüntüsü	Tüm örnek alma yöntemleri ile örnek alınamadığı durumlarda	Eküvyon ile sürüntü alınarak 2-3 ml'lik steril SF içine konur.

Tablo 3.1: Akciğer tüberkülozu tanısında kullanılan örneklerin alınmasına ilişkin özellikler

Örneklerin İşlenmesi

Örneklerin işlenmesinde kullanılan yöntemlerin uygulama basamakları:

1. Dekontaminasyon
2. Homojenizasyon
3. Nötralizasyon
4. Konsantrasyon

1. Dekontaminasyon

Steril olmayan örnekler önce bu aşamadan geçmelidir. Örnek içerisindeki mikobakterilerin canlılığı korunurken, kontaminant mikroorganizmaların NaOH, oksalik asit vb. kimyasal maddeler ile uzaklaştırılması ve sayıca azaltılması işlemidir. Steril örnekler bu aşamaya alınmaz, direkt olarak homojenize edilebilir.

2. Homojenizasyon

Örnekte bulunan basilleri bir araya toplama işlemidir. NaOH veya N asetil L sistein (NALC) kullanılır. Bu maddeler örnekteki mukusu eriterek basillerin ortaya çıkmasını sağlar. Basiller örnek içinde homojen bir şekilde dağılır.

3. Nötralizasyon

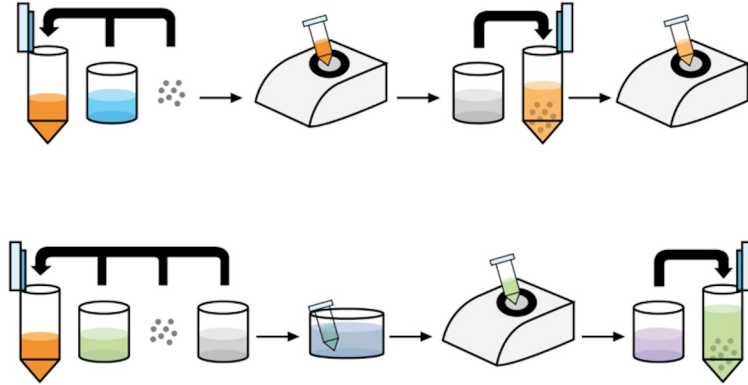
İlk iki aşamada kullanılan kimyasal maddeler nedeniyle pH'ın düzenlenmesini sağlayan aşamadır. Mikobakterilerin yaşadığı optimal pH olan 6,8'in elde edilmesi hedeflenir.

4. Konsantrasyon

Santrifüleme aşaması olup örnekteki basil sayısını konsantre ederek tanıyı kolaylaştırır.

NALC-NaOH yöntemi

En sık tercih edilen yöntemdir. NaOH mukolitik olması nedeniyle homojenizasyonu sağlar; ayrıca dekontaminant özelliğindedir. NALC de mukolitik özellikte olup homojenizasyona yardımcı olarak kullanılır. Sodyum sitrat ise örnekte bulunabilecek ağır metal iyonlarını bağlayarak NALC'nin inaktive olmasını önlemek amacıyla kullanılır. Santrifüj işlemi sırasında ortaya çıkabilecek ısı artışı tüberküloz basilinin ölümüne neden olabileceği için soğutmalı santrifüj kullanılması önerilir.



Şekil 3.2: Balgamin işlenmesi (Nazile Arda Çakır tarafından yapılan çizim).

Çalışma - 2: Tüberküloz Yönünden Örnek Yönetimi

Araç - Gereç

1. %4 NaOH (500 ml),
2. %2,9 sodyum sitrat dehidrat veya %2,6 sodyum sitrat anhidroz (500 ml),
3. NALC (5 gr),
4. pH 6,8 fosfat tampon/steril distile su,
5. 50 ml'lik burgu kapaklı, konik tabanlı, polipropilen yapıda steril tek kullanımlık tüp,
6. 3 ml'lik dereceli tek kullanımlık, steril pastör pipeti,
7. 100-200-500-1000 ml hacimli, burgu kapaklı, kapak dâhil otoklavlanabilir şişeler,
8. 10-20 ml'lik burgu kapaklı şişeler,
9. 50 ml'lik tüpün yerleştirilmesine uygun mümkünse soğutmalı santrifüj cihazı,
10. Vorteks cihazı.

Metod

1. %4 NaOH ve %2,9 sodyum sitrat dehidrat veya %2,6 sodyum sitrat anhidroz solüsyonları karıştırılarak steril edilir ve saklanır. NaOH final konsantasyonu %2'dir.
2. Kullanmadan önce NALC eklenir. Bu karışım günlük hazırlanmalıdır.
3. 50 ml'lik plastik tüp üzerine örneğin numarası yazılarak 5-10 ml örnek veya konsantre edilmiş örnek tüplere konur.
4. Üzerine eşit hacimde NALC-NaOH karışımı ilâve edilir.
5. Tüplerin ağızları sıkıca kapatılır ve 5-20 saniye vortekslenir.
6. Dekontaminasyon için tüpler, 20-25°C'de 15 dakika dik konumda bekletilir.
7. Bu süre zarfında tüpler ara sıra el ile çalkalanır veya mümkünse mekanik karıştırıcıda çalkalanır.
8. Tüpler 50 ml tamamlanana kadar fosfat tampon çözeltisi veya distile su ile doldurulur.
9. Karışım vortekslenir.
10. Tüpler, 3000 × g'de 15 dakika santrifüj edilir.
11. Üst sıvı, uygun bir dezenfektan içeren atık kabına dökülür.
12. Çökelti üzerine 1-2 ml fosfat tampon solüsyonu veya %0,85 NaCl çözeltisi eklenir.
13. Elde edilen çökelti karışımından bir damla alınarak lama yayılır ve uygun besiyerlerine ekim yapılır.

Görevler

1. NALC-NAOH yöntemine göre örnekler işlendi mi?.....
2. Elde edilen sedimentten preparat hazırlandı mı?.....
3. Preparat doğru boya ile boyandı mı?.....

Sonuç - Yorum

Öğretim

Üyesi:

İmza:

Streptococcus pneumoniae tayini

Haemophilus influenza tayini

***Streptococcus pneumoniae* tayini**

S.pneumoniae, birbirine bakan yüzleri düz, uçları sivri, mum alevi ya da lanset şekilli gram pozitif diplokoklardır. Buyyon ve jeloz gibi adi besiyerlerinde güç ürerler. %5 CO₂'li ortamda ve kan, serum gibi maddelerle zenginleştirilmiş besiyerlerinde ürer. Optimal üreme ısısı 37°C 'dir. Kanlı agarda alfa - hemoliz yaparlar.

Pnömokoklar; pnömoni, menenjit, lobar pnömoni, mastoidit, otitis media, sinüzit, eklem iltihapları gibi çok sayıda farklı enfeksiyonun etkeni olarak klinik örneklerden izole edilebilirler.

Kültür

Pnömokoklar rutinde kullanılan koyun kanlı agar ve çikolata agar gibi besiyerlerinde kolay ürer. Üremek için özel koşullara ve spesifik besiyeri bileşenlerine ihtiyaç duymazlar.

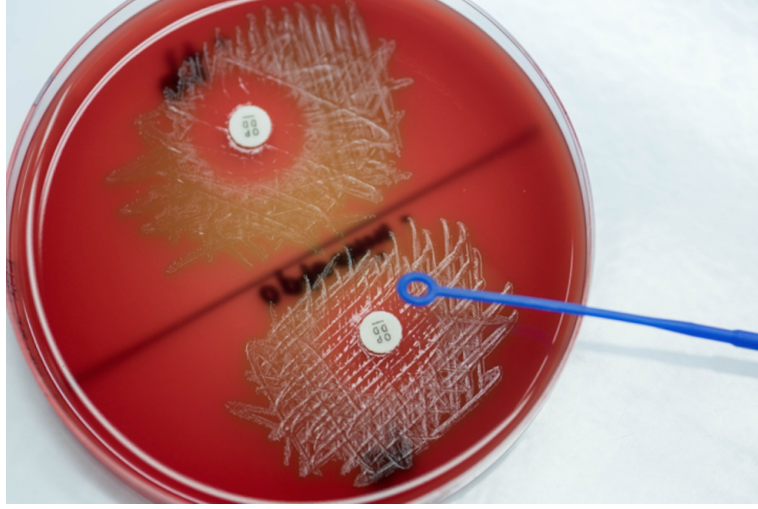
Tanımlama testleri

Numuneler ekilip 18-24 saat 37°C'de inkübe edilir ve ilk ürediği besiyerinde alfa hemolizli koloniler görülürse koyun kanlı agara pasaj alınır. Aşağıda sıralanan birinci basamak testler uygulanır.

1. Gram boyama (bkz. Kısım 1 , Bölüm 6, Uygulama - 5),
2. Katalaz testi (bkz. Kısım 1, Bölüm 11, Uygulama - 10),
3. Optokin duyarlılık testi.

Gram boyamada gram pozitif diplokoklar, tek tek düşmüş koklar ve lanset şeklinde diplokoklar görülebilir. Daha çok klinik numunelerden hazırlanmış direkt yaymalarda mum alevi görünümü tipik pnömokok morfolojisine rastlanır.

Gram boyama ve kültür özellikleriyle streptokok olduğu yönünde düşünülen bakterilere katalaz testi yapılarak Stafilokok şüphesinden uzaklaşmak gerekir. Streptokoklar katalaz negatiftir.



Şekil 4.1: Optokin duyarlı pnömokok ve dirençli viridans streptokoklar (Shutterstock.com'dan alınan lisansla kullanılan görsel).

Genel olarak ise alfa - hemolitik streptokokların tanımlamasında kullanılır. *S.pneumoniae* izolatları optokine duyarlıdır.

Çalışma - 1: Solunum Yolu örneklerinden *S.pneumoniae* İzolasyonu

Araç-Gereç

1. Koyun kanlı agar,
2. Eküvyon,
3. SF,
4. Hidrojen peroksit,
5. Lam,
6. Optokin diski.

Metod

1. Kanlı agara ekim yapılır.
2. Optokin diski ekim yapılmış besiyerinin merkezine yerleştirilir ve 35°C'de 18-24 saat inkübe edilir.
3. >14 mm inhibisyon zonunun görülmesi *S. pneumoniae* tanısını doğrular.

Görevler

1. Şüpheli kolonilerde hemoliz zonu gözlemlendi mi?.....
Boyama sonucunu yorumlayınız:.....
2. Şüpheli koloniler gram boyama ile boyandı mı?.....
Boyama sonucunu yorumlayınız:.....
3. Katalaz testi yapıldı mı?.....
Testin sonucunu yorumlayınız:.....
4. Optokin testi yapıldı mı?.....
Testin sonucunu yorumlayınız:.....

Sonuç - Yorum

Öğretim

Üyesi:

İmza:

***Haemophilus influenzae* tayini**

Hemofil grubu bakteriler çok zor üreyen, kan ve kan ürünlerine ihtiyaç duyan, küçük, pleomorfik, gram negatif, sporsuz bakterilerdir. Bu bakteriler çoğalmak için ısıya dirençli X faktörüne (hemin) ve ısıya duyarlı V faktörüne (NADP) gereksinim duyarlar.

H. influenzae zor ürer ve kolay ölür. Adi besiyerlerinde genellikle zor ürediği için solunum yolu örneklerinde mutlaka ekim yapılacak besiyerlerinden bir ya da birkaçı zenginleştirilmiş besiyeri değildir. Rutin laboratuvarlarda bu ihtiyaca cevap veren en yaygın besiyeri çikolata agardır. At kanı ya da koyun kanı ile hazırlanan bu besiyerinde ısıtılarak lizise uğramış eritrositlerden büyüme faktörlerinin açığa çıkması sağlanır. *H. influenzae* çikolata agarda, büyük, düzgün yüzeyli, konveks, renksiz, S tipi koloniler oluşturur. Kapsüllü suşlarda M tipine yakın morfoloji izlenebilir.

H. influenzae, büyüme faktörleri içermeyen koyun kanlı agarda üreyemez. *Haemophilus*'ları koyun kanlı agarda üretmek için, *S.aureus* ile yapılan çizgi ekim veya X ve V faktörleri içeren disklerin besiyeri yüzeyine difüze olmasıyla üreme gerçekleşebilir.

DİKKAT!!!

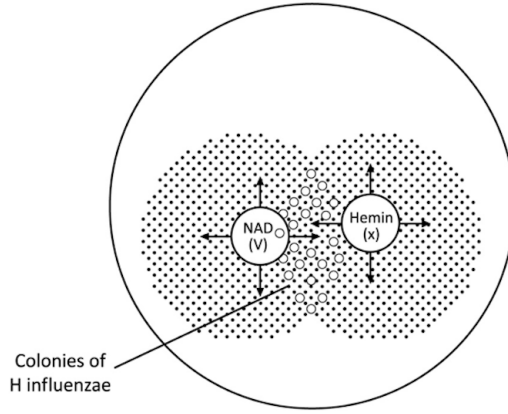
Haemophilus influenza ile Staphylococcus aureus arasındaki satelit ilişkisi nedir? araştırınız.

X ve V faktör gereksinimlerine göre tanımlama

Hemin ve NAD varlığında üreyebilen *H. influenzae* bu özelliği ile birçok *Haemophilus*'dan ayrılır.

tür	X faktör gereksinimi	V faktör gereksinimi	beta - hemoliz
<i>H. influenzae</i>	+	+	-
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+
<i>H. parahaemolyticus</i>	-	+	+
<i>H. parainfluenzae</i>	-	+	-

Tablo 4.1: Haemophilus'ların X ve V faktör gereksinimleri



Şekil 4.2: X ve V faktörün her ikisine de ihtiyaç duyan H.influenza kolonileri disklerin zonlarının kesiştiği yerde daha yoğun görülmektedir (Nazile Arda Çakır tarafından yapılan çizim).

Çalışma-2: Solunum Yolu Örneklerinden *Haemophilus spp.* Türlerinin İzolasyonu

Araç-Gereç

1. Koyun kanlı agar,
2. Çikolata agar,
3. Oksidaz ayıracı,
4. Bacitrasin diski.

Görevler

1. Şüpheli kolonilerden gram ile boyama yapıldı mı?.....
2. Gördüklerinizi çiziniz ve yorumlayınız.

3. Oksidaz testi yapıldı mı?.....
4. Sonuç - yorum:
5. Bacitrasin direnci araştırıldı mı?.....

Sonuç - Yorum

Öğretim

Üyesi:

İmza:

BÖLÜM 5

ÜST VE ALT SOLUNUM MATERYALLERİNDEN İZOLE EDİLMİŞ PATOJENLERE ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİNİN YAPILMASI

Antibiyotikler birçok bakteri ve mantar türü tarafından doğal olarak üretilen ya da farmasötik olarak yarı sentetik ve sentetik olarak hazırlanabilen antimikrobiyal maddelerdir. Antibiyotiklerin mikroorganizmalar üzerine etkisi kullanılan konsantrasyonlara bağlı olarak iki türlüdür:

1- Bakteriostatik (üremeyi durdurucu) etki: Bu etki sonucunda bakteriler üreyemez ancak canlılığını sürdürür. Eğer bakterinin antibiyotiğe maruziyeti kısa süre içinde sonlanırsa üreme devam edebilir.

2- Bakterisid (öldürücü) etki: Bakterinin yaşamsal faaliyetleri antibiyotik maruziyeti sonrası sona erer; yani bakteri ölür. Bakteri antibiyotikli ortamdan ayrılarak uygun bir üreme ortamına aktarıldığında ya hiç üremez ya da zayıf bir üreme göstererek ölür. Yoğunluk ve maruziyet zamanına göre antibiyotikler bakterilere önce bakteriyostatik etki yapar. Antibiyotik konsantrasyonu ve maruziyet süresi arttıkça bu etki bakterisidal etki yönüne kayar.

Günümüzde antibiyotik direnci önemli bir sorundur. Bu sorunun sebebi ise, antibiyotiklerin bilinçsiz ve gelişigüzel kullanımlarıdır. Buna bağlı olarak da tedavide güçlükler yaşanmaktadır. Gelişigüzel antibiyotik kullanımını önlemek adına enfeksiyon olgularında antibiyotik duyarlılık testinin yapılması şarttır. Antibiyotik duyarlılık testi bir antibiyotiğin, enfeksiyon etkeni olarak izole edilmiş bakteriye karşı in-vitro etkinliğini saptamak amacıyla uygulanan testtir.

Yöntemlerine göre 5'e ayrılır:

1. Disk difüzyon testleri
2. Dilüsyon testleri
 - a. Agar dilüsyon testleri
 - b. Broth dilüsyon testleri
 - c. Makrodilüsyon (tüp dilüsyon) yöntemi
 - d. Mikrodilüsyon yöntemi

3. Gradient strip testleri (E-test, MICE)
4. Otomatize yöntemler
5. Moleküler yöntemler

***Staphylococcus* türleri için antibiyogram ipuçları**

Kullanılan besiyeri: Müller-Hinton

İnkübasyon koşulları: 35⁰C'de normal atmosferde 18-20 saat

Oksasilin ve sefoksitin için 24 saat inkübe edilmelidir.

DİKKAT!!!

Oksasilin ve penisilin duyarlılık sonuçları ile tüm beta laktam antibiyotiklere ilişkin sonuç verilebilir.

Oksasiline dirençli → Tüm beta laktamlara DİRENÇLİ
Oksasiline ve }
Penisiline duyarlı } → Tüm beta laktamlara DUYARLI

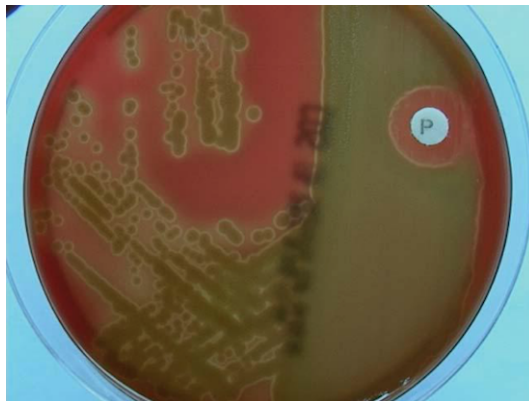
Pnömonokok antibiyogramı için ipuçları

Kullanılan besiyeri: %5 koyun kanlı Müller Hinton

İnkübasyon koşulları: 35⁰C'de 24 saat inkübasyon

Oksasilin zonu ≥20 mm ise penisiline duyarlı

Pnömonokok antibiyogramında; P, OX, E, SXT, DA, LEV, OFX, TET, VA, RF, C kullanılmalıdır.



Şekil 5.1: Pnömonokok antibiyogramı (Shutterstock.com'dan alınan lisansla kullanılan görsel).

**Çalışma - 2: Solunum Yolu Örneklerinden İzole Edilen Türlerle Kirby -
Bauer Disk Difüzyon Yöntemiyle Antibiyotik Duyarlılık Testi Yapılması****Araç - Gereç**

1. Müller Hinton agar,
2. Eküvyon,
3. Steril SF,
4. Uygun antibiyotik diskleri.

Görevler

1. Klinik örneklerden izole ettiğiniz suşlara antibiyotik duyarlılık deneyi yapıldı mı?
.....
2. Hangi antibiyotikler denendi?
.....
3. Duyarlı olduğu saptanan antibiyotikleri yazınız.
.....
4. Dirençli olduğu saptanan antibiyotikleri yazınız.
.....

Öğretim

Üyesi:

İmza:

İdrar kültüründe istenen örnek orta akım idrarıdır. İlk gelen idrarın bir kısmı ile son kısım dışarı atılır ve ortadaki volüm klinik numune olarak numune kabına toplanır. İlk olarak idrarın makroskopik incelemesi yapılır. Bunun için idrarın miktar, bulanıklık ve renk gibi özellikler yönünden değerlendirilmesi gerekir.

Sağlıklı bir idrar, açık sarı ve berrak olmalıdır. Eğer idrar bulanık ise enfeksiyon ya da ürolithiasis düşünülür. Kanlı bir idrar üriner sistem enfeksiyonlarını ya da mesane tümörünü akla getirmelidir.

İdrarın miktarı da önemlidir. Ortalama 50 ml olarak steril kap içine verilen idrar idealdir. Ancak bebek ve çocuklarda bu miktar daha az olabilir.

Kültürde sıklıkla *Esherichia coli*, *Proteus* türleri gibi bakteriler üretildiğinden gram negatif bakterilerin üretildiği bir seçici besiyeri (Endo Agar, MacConkey Agar gibi) ve zenginleştirici bir besiyeri (kanlı agar) tercih edilmelidir.

İdrar hastanın kliniğine ve profiline göre çeşitli yollardan alınabilir:

1. Normal Yolla İdrar Alınması

Doğru bilgilendirilmiş bir hasta doğru bir örnek verir. Bu da klinik mikrobiyoloji laboratuvarının örnek yönetimi aşamasında en önemli basamaktır.

Kadınlarda vulva/perine bölgesi, sabunlu su ile önden arkaya doğru yıkanır. Sonra steril suyla ıslatılmış pet ile durulandıktan sonra kuru spançla kurulanır. İlk gelen idrarın yaklaşık 10-20 ml'si dışarı, sonra gelen orta idrarın 100-150 ml kadarı steril idrar kabına alınır. Geri kalan idrar ise dışarıya/tuvalete yapılır. İdrar miktarı en az 40 ml olmalıdır. Erkeklerde de dış genital bölge önden arkaya olacak şekilde temizlenerek orta akım idrarı toplanır. İdrar kontrolü olmayan çocuklarda, aynı şekilde temizlenen perineye steril idrar torbası yapıştırılarak idrar örneği alınır ancak bu tip örnek alırken kontaminasyon gelişimi çok kolay olduğundan idrar torbası en geç yarım saat içerisinde laboratuvara ulaştırılmalıdır.

Kültür için idrar alırken şu noktalara dikkat edilmelidir.

Temizlikte alkol ya da iyot bazlı antiseptiklerin kullanılması kültürün sonucunu etkiler. Bu nedenle sabunlu su ile temizlik yeterlidir.

Laboratuvara gönderilen idrar hemen ekilmeli, hemen ekilemiyorsa buzdolabına konmalıdır.

İdrar kültüründe ml'de üreyen koloni sayısının önemi, enfeksiyonun tanımlanmasında önemli bir parametre olduğundan bu kurala mutlaka uyulmalıdır. Çünkü bakteriler idrar oda ısısında çok kısa sürede üreyebilmektedirler. İdrar kültürü için sabah idrarı tercih edilmeli ve idrar, ağzı kapaklı steril kaplara alınmalıdır.

Virolojik kültürler için idrar, daima steril kapta ve buz aküsü ile laboratuvara gönderilmelidir.

DİKKAT !!!
Sonda ile idrar torbasına alınan idrardan asla kültür yapılmaz
DİKKAT !!!
Kültür için idrar yatak sürgüsünden asla alınmamalıdır.

2. Suprapubik Aspirasyon Yöntemi ile İdrar Alınması

Genelde infant ve 2 yaşından küçük çocuklarda uygulanan bir yöntemdir. Deneyimli personel tarafından yapılmalıdır. Üriner sistem enfeksiyonunun anaerob bir etken tarafından oluşturulduğu düşünüldüğünde tercih edilmelidir.

3. Kateterizasyon/Sondayla İdrar Alınması

Kendi başına idrar veremeyen yatağa bağımlı hastalarda foley sonda ile idrar alınabilir. 10cc'lik ya da 20cc'lik steril enjektörler yardımıyla idrar, foley sondadan örnek kabına aktarılır. Sonda ile örnek alımından önce üretra ağzı ya da vajenin sabunlu su ile temizlenmeli ve steril bir su ile durulanmalıdır. Alınan ilk idrar dışarı atılır, çünkü sonda üretradan geçerken üretradaki organizmaları alabilir.

İdrarın Makroskobik Muayenesi

İdrarda:

- pH
- Ürobilinojen
- Glikoz
- Bilurubin
- Protein
- Nitritler
- Keton

Kimyasal yöntemlerde araştırılır. Ancak günümüzde uygulanmakta olan *Dipstick* yöntemler kimyasal yöntemlerin yerini almıştır. Dipstick yöntemlerle idrardaki kan reaksiyonlarının tespiti ile eritrosit, lökosit esteraz tayini ile de lökositlerin varlığı saptanabilmektedir.

İdrar analizinde mutlaka mikroskopik muayene yapılmalıdır.

Böylece;

- Lökositler, eritrositler, epitelial hücreler, renal tübüler hücreler, oval yağ damlacıkları,
- Bakteriler, trikomonas vajinalis, spermatozoalar,
- Ürate, oksalat, kalsiyum fosfat, sistin kristalleri,
- Hiyalen, granüler, eritrosit, lokosit, geniş mumsu silendirler, dejenere tübüler hücreler içeren geniş kahverengi silendirler, lipid damlacıkları içeren silendirler tespit edilebilir.

Görünüm: Normal idrar, içindeki ürokromdan dolayı açık sarı renktedir. İdrarın konsantrasyonunun artması ile renk daha koyulaşır. Çeşitli ilaçlarla diğer patolojik metabolitler, idrarda renk değişikliklerine ve değişik kokulara sebep olabilir

İdrarın Mikroskopik Analizi

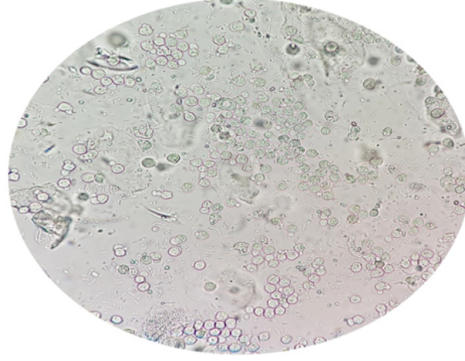
Usulüne uygun alınmış 12 ml idrar numunesi konik santrifüj tüplerinde 5 dakika 1500-2000 devirde (rpm) (450g) santrifüje edilir. Daha sonra tüpün üst tarafındaki idrar atılır (pipetle veya dikkatlice yan yatırılarak). Altta kalan çöküntü üzerine birkaç damla idrar konur ve karıştırılır. Tüpten doğrudan doğruya veya pipet yardımı ile lama bir damla konur. Genellikle lam üzerindeki idrar boyanmadan, mikroskop ayarı yapılarak önce 10, daha sonra 40 büyütme ile saha taranır.

Eritrositler

Glomerüller dâhil olmak üzere, üretra kanalına kadar olan her yerden idrara eritrositler geçebilir. İdrarda bir mikroskop sahasında 2 veya 3'ten fazla eritrosit patolojik kabul edilmelidir. Eritrositler bikonkav ve 7µm çapındadır. Hipertonik idrarda kenarı tırtıllaşır. Hipotonik idrarda eritrositler şişer. Renal parankimden kaynaklanan eritrositlerde şekil bozukluğu mevcuttur (dismorfik). Eritrositler ince uzun veya kabarcıklı hâlde olabilir. Faz kontrast mikroskop tetkiki ile bu ayrıntılar açıkça ortaya konulur.

Lökositler

Eritrositlerden daha büyüktür. Ortalama 12 µm çapındadır ve sitoplazmalarında granüller vardır. Polimorf nükleuslu hücreler üriner inflamasyonu gösterir. Bunlar intra parankimal hastalık olarak glomerulonefrit veya interstisyel nefrittir.



Şekil 6.1: İdrar sedimentinden hazırlanmış preparatta lökosit, eritrosit, bakteri ve maya hücreleri (Shutterstock.com'dan alınan lisansla kullanılan görsel).

Renal Tübüler

Epitelial Hücreler, Polimorfonükleer lökositlerden daha büyüktür. Proksimal tübüler hücreler oval veya yumurta şeklindedir. Küboid distal hücrelerden daha büyüktürler. Ancak hücrelerin büyüklüğü idrarın osmolaritesi ile değişiklik gösterir. Tübüler hücreler daha çok tübüler hasarlarda veya akut tübüler inflamasyonlarda veya interstisyel nefritlerde görülebilir.

Silendirler

Silendirlerin, immünfloresans çalışmalarda yapısının üriner bir mukoprotein olan Tamm-Horsfall'dan oluştuğu gösterilmiştir. Tamm-Horsfall mukoproteini nefronun Henle Kulpu'nun çıkan kalın kısmı ve sonraki yapılardan salgılanır. Silendirler distal tübülüslerde ve toplayıcı segmentlerde oluşur.

Hiyalen Silendirler

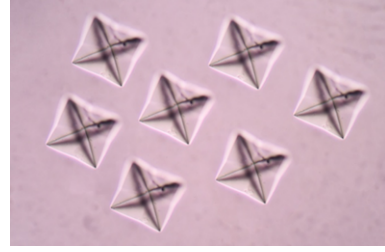
Sadece mukoproteinden ibarettir. Işığın kırma indeksi idrarinkine çok yakındır, dikkatli araştırmak gerekir. Birçok patolojik durumda görülebileceği gibi, konsantrasyon normal idrarda da görülür.

Mumsu Silendirler

Mumsu silendirler veya geniş silendirler, hiyalin silendirlerden daha refraktif indekse sahip hiyalin materyalden oluşur. Dolayısıyla mumsu görünümündedir. Hiyalin silendirlerden daha kırılmalıdır. Geniş silendirler atrofik ve dilate tübülüsler içerisinde kronik parankimal hastalıklar sonucu gelişir.

Eritrosit Silendirleri

Eritrosit silendirleri kanamanın böbrek pankerimininden kaynaklandığını gösterir. Glomerulonefritlerin önemli bir belirleyicisidir. Tübülointerstisyel hastalıklarda nadiren görülür. Normal kişilerde egzersizlerden sonraki hematuri ile beraber oluşabilir. Taze idrarda eritrosit silendirleri kahverengiye çalan bir renktedir. Boru şeklinde bir yapı içinde eritrositler seçilebilir. Zamanla renk kaybolur, granüler silendirden ayrılması zorlaşır. Eritrosit silendirleri, dismorfik eritrositler (eritrositlerde kabarcık, tomurcuklanma, yer yer membran kaybı, şekil değişikliği ve küçülme) ve proteinuri ile birlikte bulunur.



Şekil 6.2: Kalsiyum oksalat kristali (Shutterstock.com'dan alınan lisansla kullanılan görsel).

Bakteri, Mantar ve Diğer İnfeksiyöz Ajanlar

Basil veya kokkal yapıdaki bakteriler, boyanmamış idrarda görülebilir. Santrifüje edilmemiş idrarda her geniş alan mikroskop sahasında görülen bir mikroorganizma mm^3 'te 10^5 ilâ 10^6 mikroorganizmaya eşdeğerdir. İdrarda görülebilen kandidalar eritrositlere benzer, ancak bikonkav görülmez, yeşilimsi küreler şeklinde görülür. Trikomonas vajinalis gözyaşı damlası şeklinde ve flagellidir.

Çalışma - 1: İdrarın Makroskobik ve Mikroskobik Değerlendirilmesi

Araç-Gereç

1. Steril idrar kabı,
2. İdrar stripi,
3. Lam-lamel,
4. Santrifüj,
5. Mikroskop.

İdrar Stribi

İdrarın dansitometrik özellikleri strip tekniği ile değerlendirilir. İdrar tahlili stripleri genel sağlık değerlendirmesinde kullanılabilir, metabolik veya sistemik böbrek fonksiyonlarını etkileyen hastalıkları, endokrin bozukluklar ve hastalıkları ile üriner sistem hastalıklarının tanı ve takibinde yardımcı olur.



Şekil 6.3: İdrar stripi (Yazarın kendi çektiği fotoğraf).

İdrar stripi üzerindeki reaktifler; glukoz, keton, protein, bilirubin, kan, pH, dansite, nitrit gibi idrarın kimyasal yönden değerlendirilmesini sağlayan parametrelerden oluşur.

Bu değerlendirmede bütün olgular bize üriner sistem rahatsızlıkları ile ilgili önemli bilgiler vermektedir. Kültür yönünden değerlendirilmek adına ekim ve preparat hazırlama işlemlerinden sonra idrar

santrifüj edilerek tortu oluşup oluşmadığına bakılmalıdır. Sedimentin mikroskobik değerlendirmesinde kristal, epitel hücreler ve lökosit-eritrosit gibi hücresel elemanlar araştırılır.

Görevler

1. İdrarın makroskobik olarak değerlendirmesini yapınız.

.....

2. İdrar stripi ile değerlendirme yapıldı mı?

.....

3. Sonuçları değerlendiriniz.

.....
.....

4. İdrar sedimenti incelendi mi?

.....

5. Sonuçları değerlendiriniz.

.....

Öğretim
Üyesi:
İmza:

İdrar Kültürü

İdrar normalde steril bir vücut sıvısıdır. Ancak perine, prostat, üretra veya vajende yerleşen mikroorganizmalar ile kolayca kontamine olabilir. İdrar yolları enfeksiyonlarının etyolojik ajanları genellikle hastanın kendi bağırsak florasına ait olan bakterilerle sınırlıdır. *Esheria coli*, *Enterococcus spp.*, *Klebsiella-Enterobacter spp.* ve *Proteus spp.* gibi izolatlar hastanede yatan hastalar veya poliklinik hastalarından elde edilenlerin çoğunluğunu oluştururlar.

Bakteri sayılarının önemi, hastalığın durumuna dayandığından, idrardaki bakteri sayılarının anlamlı olması ve tedavi gerekliliği için genellikle farklı kriterler tanımlanmıştır.

Bakteriüri yanında piyüri enfeksiyona karar vermede önemli bir faktördür.

DİKKAT!!!

Bakteriüri - piyüri tanımlarını araştırınız.

Koloni Sayma Yöntemi ile Ekim

1. Kalibre edilmiş öze kullanılmalıdır. (0,001 ml ekimi için ayarlı öze ile inokulasyon sonrası üremiş her bir koloni 10^3 ile çarpılmalıdır.)
2. Kalibre öze dik tutulur. İyi karışmış ancak santrifüj edilmemiş idrar örneğinin yüzeyinden biraz aşağısına daldırılır.
3. Bir öze dolusu idrar besiyerine aktarılır.
4. Özeyi kullanarak petrinin ortasına yukardan aşağıya düz çizgide idrar ekimi yapılır ve buna 90^0 açılarla seri geçişlerle ekim tamamlanır.

Çalışma - 2: İdrar Kültürü Ekimi

Araç-Gereç

1. Çikolata, Kanlı ve EMB agar,
2. Kalibre öze,
3. Lam,
4. Gram boya seti.

Görevler

1. Koloni sayma yöntemine göre ekim yapıldı mı?

.....

2. İdrardan gram boyama yapıldı mı?

.....

3. Gördüklerinizi çizerek yorumlayınız.

.....

4. Kültür sonucunu yorumlayınız, koloni sayısını hesaplayınız.

.....

Öğretim

Üyesi:

İmza:

Esherichia coli Tayini
Proteus spp. Tayini

***Esherichia coli* tayini**



Şekil 7.1: EMB agarda *E. coli* kolonileri (Yazarın kendi çektiği fotoğraf).

Enterobacteriaceae ailesinin kolonizasyonu en sık gastrointestinal sistemde iken en sık enfeksiyon oluşturduğu yer üriner sistemdir. Üropatojenik *E. coli* suşlarında en önemli virulans faktörlerinden biri adhezyonu sağlayan P fimbriadır. Sıklıkla O4, O6, O75 suşları ile enfeksiyon oluşur.

E. colinin laboratuvar tanısında kültür en önemli yol göstericidir. Kan kan

kültürü besiyerine; diğer örnekler ise Kanlı, Endo, EMB, Mac Conkey ve SS agara ekilir. EMB besiyerinde laktozu fermente eden *E. coli*, parlak yeşil refle verir.

Kanlı agarda hemoliz yapar. IMVIC testleri (++--) dir. Laktozdan asit, glikoz, maltoz, mannitol ve ramnozdan asit ve gaz oluşturur, H₂S(-)'dir.

Çalışma - 1: İdrarda *E. coli* Tayini

Araç - Gereç

1. EMB agar
2. Indol besiyeri
3. Metilen Kırmızısı besiyeri
4. Clark Lubs besiyeri

Görevler

1. İdrarda koloni sayımı yapıldı mı?

Sonuç-Yorum:.....

2. Şüpheli kolonilerden gram boyama yapıp incelendi mi?

.....

3. IMVIC testleri yapıldı mı?

Sonuç-Yorum:.....

DİKKAT!!!

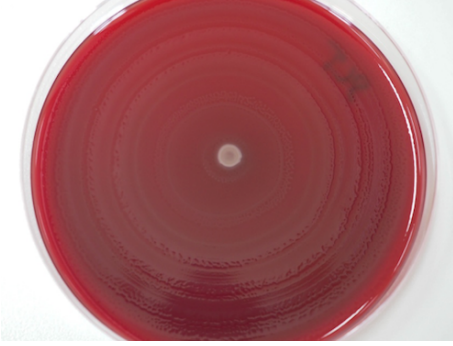
IMVIC testleri için Bkz: Kısım - 1 Bölüm 11

Öğretim

Üyesi:

İmza:

Proteus Spp. Tayini



Şekil 7.2: *Proteus vulgaris* yayılmacı koloniler (Shutterstock.com'dan alınan lisansla kullanılan görsel).

Proteus'lar Gram negatif kokobasil görünümüne sahip bakteriler olup sporsuz ve kapsülsüz peritrik kirpikli mikroorganizmalardır. İnsan dışkıında flora bakterisi olarak bulunur; bu nedenle lağım sularından ve bu suların karıştığı topraktan sıklıkla izole edilir. Üriner sistem enfeksiyonlarından sorumlu olup persistan enfeksiyonlara yol açabilir, bakteriyemilere neden olabilir. Ayrıca menenjit, sepsis ve lokalize enfeksiyonlardan da sorumludur.

İdentifikasyonu için üre pozitifliği, laktoza etki etmemesi, glikozdan asit ve gaz oluşturması ve besiyerine yayılması tanı koydurur.

Görevler

1. İdrarda koloni sayımı yapıldı mı?

Sonuç-Yorum:.....

2. Şüpheli kolonilerden gram boyama yapıp incelendi mi?

.....

3. Besiyerinde yayılma gözlemlendi mi?

.....

4. Üreaz testi yapıldı mı?

.....

Sonuç-Yorum:.....

Öğretim

Üyesi:

İmza:

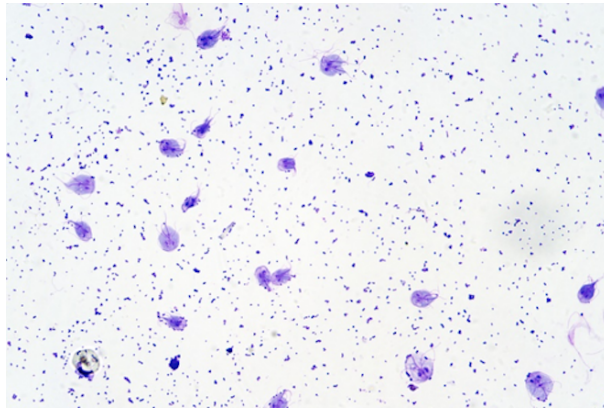
İshallerin sebebinin araştırılmasında klinik tablonun patojen bir bakteri tarafından meydana getirilip getirilmediğini araştırın kültürdür. Ayrıca başta gıda sektörü olmak üzere insan sağlığı ile ilişkili olabilecek iş kollarında çalışanlar için yapılan portör araştırmalarında da gaita kültüründen yararlanılır.

Dışkı örneklerinin incelenmesinde makroskopik ve mikroskopik inceleme ile kültür yapılmaktadır. Dışkının makroskopik incelemesinde renk, koku ve içinde kan/mukus varlığı araştırılır.

Örneğin *Shigella spp.*'nin neden olduğu basilli dizanteride ve *Entamoeba histolytica*'nın neden olduğu amipli dizanteride dışkıda kan bulunmaktadır. Mikroskopik incelemede ise serum fizyolojik (SF) ile veya lugolle hazırlanan direkt preparatlar ile boyalı preparatlar kullanılmaktadır.

SF veya lugolle hazırlanan direkt preparatlarda protozoaların trofozoit ve kist formları ile helmint yumurtaları aranır.

Dışkının Gram boyaması ile polimorfonükleer lökositlerin görülmesi *Shigella*, *Campylobacter* ve *Enteroinvaziv E. coli* lehine bir durumdur.



Şekil 8.1: Giardia lamblia trofozoiti (Giemsa) (Shutterstock.com'dan alınan lisansla kullanılan görsel).

Giemsa ile boyanırsa lökositler ve protozoa trofozoitleri görülür.

Trickrom boyama; protozoon kist ve trofozoitlerini saptamada pratik bir yön-

temdir.

Dışkının aside dirençli boyama yöntemi ile incelenmesi ise *Cryptosporidium* ve *Cyclospora* tanısında yardımcı olabilir.

Dışkının bakteriyolojik incelemesi için kültür *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* başta olmak üzere *Vibrio*, *Aeromonas*, *Yersinia* türleri için yapılmaktadır.

Salmonella - *Shigella* türlerinin saptanması amacıyla dışkı örnekleri SS agar, EMB agar, Selenit F besiyerlerine ekilir.

SS agar

İçeriğinde laktoz, safra tuzları, sığır eti özütü, ferrik sitrat, sodyum tiyosülfat ve indikatör olarak brillant yeşili ile nötral kırmızı bulunur. Bu maddeler birçok flora bakterisinin üremesini inhibe eder. H₂S üretimi, tiyosülfat ve ferrik sitrat varlığı ile görünür hâle gelerek, koloni merkezinde siyah presipitat oluşumunu sağlar. Nötral kırmızı indikatörü, laktoz fermentasyonu sonucu oluşan asit varlığında kırmızı-pembe koloni oluşumunu görünür hâle getirirken, laktoz negatif bakterilerde şeffaf saydam koloni gelişir. *Salmonella* ve *Shigella* kolonileri SS agarda şeffaf koloni meydana getirir. Pembe-kırmızı koloniler *E. coli* olarak tanımlanırken, pembe-beyaz ya da krem renkli olanlar *Enterobacter aerogenes* kolonileridir. Bu besiyerinde *Salmonella* kolonilerinin *Shigella* kolonilerinden ayrımı besiyerinde koloni etrafındaki renk değişiminin *Salmonella*'da H₂S varlığından dolayı siyah presipitat oluşması, *Shigella*'da ise H₂S negatifliğinden dolayı sadece şeffaf koloni oluşması ile yapılır.



Şekil 8.2: SS agarda farklı patojenlerin görünümü (Shutterstock.com'dan alınan lisansla kullanılan görsel).

Selenit F Broth

Protein kaynağı olarak pepton, sodyum selenit ve sodyum fosfat içerir. Bu besiyeri *Salmonella* ve bazı *Shigella* türleri için bir zenginleştirme besiyeridir. Hazırlanmış besiyerinin rengi berrak sarımsı olup 25°C'de pH'ı 7,0 ± 0,2'dir.

Dehidre besiyeri uzun süre depolandığında hazırlanmış besiyeri rengi kırmızımsı olur ancak bu durum besiyeri performansını etkilemez.

Besiyeri bileşimindeki selenit genellikle inkübasyonun ilk 6-12 saatinde enterik koliformların ve enterokokların gelişimini baskılar. İnkübasyon 37⁰C'de 24 saat yapılabileceği gibi kimi araştırmacılara göre 43⁰C inkübasyon sıcaklığı daha iyi sonuç vermektedir. İnkübasyonun ilk 12 saati sonunda ve 24 saat sonunda uygun katı besiyerine ekim yapılır.

Çalışma - 1: Gaita Örneklerinin İncelenmesi

Araç - Gereç

1. Kaşıklı gaita kabı,
2. SS agar,
3. EMB agar,
4. Selenit F broth,
5. Lam-lamel.

Metod

1. Gaita, makroskopik olarak incelenir.
2. %0,09'luk Serum fizyolojik ve Lugol damlatılarak hazırlanmış preparatlar ile gaita mikroskopik olarak incelenir. Lökosit, eritrosit, protozoon trofozoit/kist yapıları ve helmint yumurtası yönünden araştırılır.
3. SF broth'a çalkalama yöntemi ile ekim yapılır.
4. SS, EMB agara SF broth'tan 30 dakika sonra pasaj alınır.

Görevler

1. Gaitayı makroskopik olarak tarif ediniz.

.....

2. Gaita mikroskobisi:

Trofozoit/Kist:..... Lökosit/eritrosit:.....

Yumurta/şekli eleman:.....

1. Gaita, Selenit F broth'a ekildi mi?

.....

2. Selenit F broth dan katı besiyerlerine pasaj alındı mı?

.....

Sonuç - Yorum

Öğretim

Üyesi:

İmza:

Gaita Kültürü Değerlendirme

Salmonella

Salmonella cinsi bakteriler gastroenterit ve tifonun da aralarında yer aldığı pek çok hastalığın etkenidirler. *Salmonella typhi* sadece insanda patojendir. Diğer serotiplerse hayvanlarda ve besinlerde (örneğin yumurta ve kümes hayvanlarının etleri) bulunabilirler. Bulaşma fekal-oral yollaadır.

Shigella

Shigella türleri şigeloz (basilli dizanteri) etkenidir. İnsandan insana dışkıyla bulaşılır. Sinekler ve kontamine su ve besinler de bulaşmada rol oynarlar. Hastalığın oluşması için gerekli infeksiyon dozu düşüktür (200'den daha az bakteri bile yeterlidir). *S.dysantheria* basilli dizanteri etkenidir.

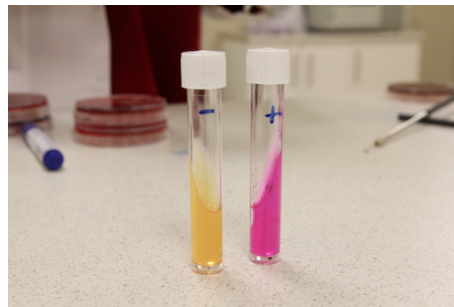
DİKKAT!!!

EMB agarda laktozu kullanmamış şeffaf koloniler *Salmonella* ve *Shigella* olabileceğini, SS agarda siyah koloni olması *Salmonella*, sarı koloni olması *Shigella* olabileceği düşündürür.

Biyokimyasal Testler

Üre Testi

Bir öze dolusu koloni alınıp Ürea broth besiyerine ekilir ve 35⁰C'de 48 saat inkübe edilir. *Salmonella* üreaz (-) bir bakteri olduğundan, inkübasyon sonunda besiyeri sarı-turuncu renkte kalır. Üreaz enzimi (+) olan bakteriler bu besiyerine inokule edildiklerinde besiyeri kırmızı-pembe dönüşür.



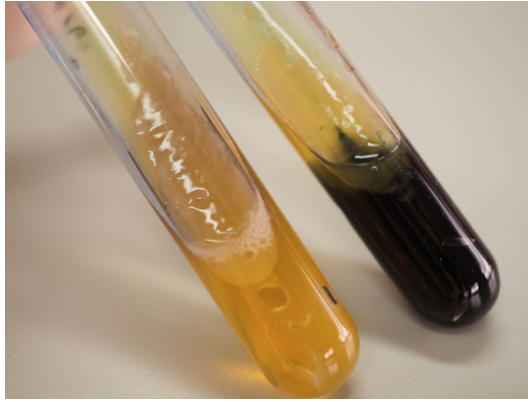
Şekil 8.3: Üreaz testi (Yazarın kendi çektiği fotoğraf).

Triple-Sugar-Iron (TSI) Testi

TSI agar yatık besiyeri yüzeyine sürme ve dibe daldırma tekniği ile ekim yapılır. Besiyeri 35⁰C'de 24 - 48 saat inkübe edilir.

İnkübasyon tamamlandıktan sonraki değerlendirmede;

- Dip kısım sarı ise glikozun kullanıldığı ve siyah renk oluşumu H₂S oluştuğunu,
- Yüzeyin kırmızı olarak kalması laktoz ve sakkarozun kullanılmadığını,
- Besiyerinde hava boşluklarının oluşması ve besiyerinin dip kısmından yukarı doğru itilmesi glikozdan gaz oluşturulduğunu ifade eder. Bu özellikler Salmonella şüphesini doğrular.



Şekil 8.4: TSI besiyerinde şekerlere etki, gaz oluşumu ve HS pozitifliği (Shutterstock.com'dan alınan lisansla kullanılan görsel).

Shigella Tanısında Biyokimyasal Testler

Dışkıının kanlı ve mukuslu bölümlerinden alınan örnekler flora bakterilerini baskılayan zenginleştirici sıvı besiyerlerinden birine ekilir. **Selenit F Broth** ya da **Gram Negatif (GN broth)** besiyeri bu amaçla tercih edilen sıvı besiyerleridir. Buradan katı besiyeri olarak **Endo, EMB, MacConkey, SS, Hektoen Agar** gibi seçici-ayrıt edici besiyerlerine azaltma yöntemi ile ekim yapılır.

Besiyerinin 37⁰C'de 18-24 saatlik inkübasyonu sonrası şeffaf koloniler, laktoz negatif olarak kabul edilir ve bu kolonilerden pasaj alınır. Yarı katı besiyerinde hareketsiz üreme göstermesi ve koloniden yapılan gram boyama neticesinde gram negatif basil görülmesi Shigella tanısına yaklaşıttır.

TSI agar da laktoz negatif üreme, glikozdan asit oluşturup gaz oluşunun gözlenmemesi ve H₂S(-)'liği Shigella'nın önemli biyoşimik özelliklerindedir.

Üre ve **ONPG** testleri negatif, **IMVIC** testleridir (D-, +, -, -).

İdentifikasyonda son işlem olarak serotip A, B, C, D polivalan aglütinan serumlarla aglütinasyon işlemi yapılmasıdır.

Görevler

1. Gaita kültüründe üreyen şüpheli kolonilerin özellikleri nasıldır?

.....

2. Salmonella-Shigella şüpheli koloniler var mı?

.....

3. Üreaz testi yapıldı mı?

.....

4. TSI agara pasaj alındı mı?

.....

Sonuç - Yorum

Öğretim

Üyesi:

İmza:

BÖLÜM 9

PARAZİTOLOJİK İNCELEME YÖNTEMLERİ - I

Parazitolojik yönden dışkının muayenesi, bağırsakta enfeksiyon oluşturan protozoon kist ve trofozoitlerinin ya da helmint yumurta veya larvalarının birtakım metodlar kullanılarak incelenmesi temeline dayanır. Hastadaki parazit elemanın her gün aynı yoğunlukta ve dışkının her bölgesine eşit miktarda dağılmamış olması, dışkının yoğunlaştırma metodlarıyla incelenmesini zorunlu kılar.

Parazitolojik incelemelerde örnek yönetimi tanıya giden yolda en önemli basamaktır. Örneğin, uygun şekilde alınmış olması, laboratuvara mümkün olan en kısa sürede ulaştırılmış olması ve uygun fiksatifte gönderilmesi tanı başarısını artırır.

Parazitolojide doğru tanıyı verebilmek için, laboratuvara gönderilen gaita numunesinin maksimum 15-20 dakika içinde incelemeye alınması önemlidir. Özellikle protozoon trofozoitlerinin canlılığını, hareketini görebilmek bu süreler aşıldığında mümkün olmamaktadır. Ayrıca, parazitlerin verilen her numunede eşit sayıda ve konsantrasyonda bulunmaması, yaşam döngüsünde farklı formlarda bulunmaları gibi gerekçelerden dolayı tek bir numune verilmesi tanıyı koymada güçlük yaratabilir. Bu sebeplerde dolayı, genellikle üç gün üst üste alınan numuneler sağlıklı sonuç vermede tercih edilmelidir.

Doğru ve güvenilir bir tanı için örneklere gerekli ve uygun bir prosedürün uygulanmış olması da önemlidir. İdeal olarak rutin dışkı muayenesinde tanı başarısını sağlayacak uygun bir inceleme için taze ve/veya fiksatifte gelen bütün dışkı örneklerinden;

1. Direkt mikroskopi,
2. Boyalı mikroskopi ve
3. Yoğunlaştırma (konsantrasyon) işlemi sonrası mikroskopi yapılarak incelenmesi ve rapor edilmesi gerekmektedir.

Dışkı Örneği Alma

Şekilli (katı) dışkı, ceviz büyüklüğünde (25-35 g.), sulu dışkı ise en az 5 yemek kaşığı (25 ml) hacminde alınmalıdır. Dışkı örneği, numune kabının özelliğine göre

bir aparat vasıtasıyla dışkı kabına katarılır. Kaşıklı gaita kapları bu işlem için önerilebilir. Bebek dışkılarında, çocuk bezinin laboratuvara ulaştırılması yeterlidir. Dışkı örneğinin klozet içinden alınmaması da önemli bir ayrıntıdır. Dışkıdaki trofozoit ve diğer parazit elemanları hasar görebilir, inceleme esnasında görüntülenemeyebilir.

Antibiyotik kullanmış olan hastadan yaklaşık 10 gün sonra numune istenmelidir. Çünkü antibiyotik kullanımı bağırsak florasında azalmaya neden olur ve flora ile beslenen parazitlerin sayısı azalır. Bu durum tanıyı güçleştirebilir. Gaitada antijen arama testleri yapılacaksa, örneklerin fiksatifte gönderilmemesi, taze dışkıda inceleme yapılması gerekir.

DİKKAT!!! Gaita veremeyecek kadar küçük bebeklerde, numune çocuk beziyle laboratuvara gönderilebilir. Bezden örnek alınırken, bezin iç yüzeyinden örnek alınmaz; emici yapı paraziter formları da içine almış olabilir. Bu nedenle; ters bağlanmış bebek bezi numune olarak kabul edilmeli ve öncesinde hasta yakınına bu hususta bilgilendirme yapılmalıdır.

Dışkı Örneğinin Laboratuvara Taşınması

Dışkı en kısa sürede laboratuvara ulaştırılmalı ve incelemeye alınmalıdır. Fiksatif içinde gelen dışkı örnekleri, vidalı kapaklı kaplara konmalıdır. En sık tercih edilen fiksatifler Polivinil Alkol (PVA), Schaudinn fiksatif, sodyum asetat-asetik asit-formol (SAF), mertiolat-iyot-formol (MİF) çözeltileridir.

Örneklerin Laboratuvara Kabulü

Aşağıdaki durumlarda gaita örneği reddedilip hastadan yeniden numune istenmelidir.

- İstem formu olmayan ya da numune kabı üzerinde barkod, protokol no, hasta ID gibi hastaya ait bilgileri içeren kodlar bulunmayan örnekler.
- Medikal amaçlı olmayan kaplara konulmuş, dışarıya sızmış, bulaşmış örnekler.
- Miktar olarak yetersiz, çok beklemiş örnekler.
- İdrarla karışık verilen örnekler.

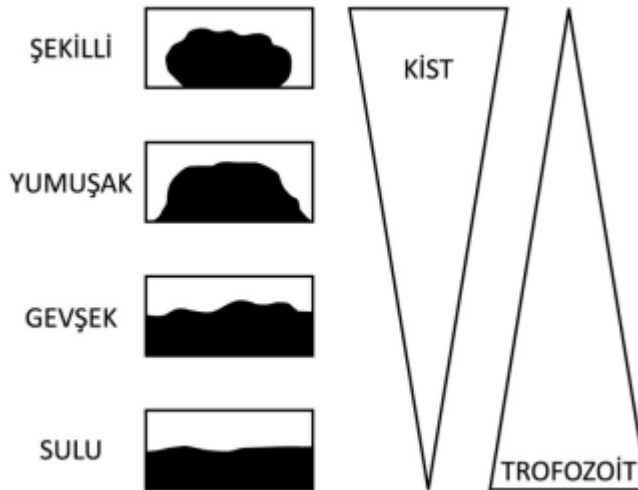
Çalışma-1: Dışkı Örneğinin Nativ-Lugol (helmint ve protozoa) İncelemesi

Araç - Gereç

1. Lam-lamel,
2. Serum fizyolojik,
3. Lugol solusyonu.

Metod

1. Öze ya da kürdan yardımıyla pirinç tanesi büyüklüğünde dışkı alınır, lam üzerine konur.
2. Üzerine 1-2 damla serum fizyolojik damlatılır.
3. Serum fizyolojik ile karıştırıp homojen hâle getirilir.
4. Lam-lamel arası preparat hazırlanır.
5. Aynı lama 1 damla lugolle preparat hazırlanıp lamelle kapatılır.
6. Mikroskopta incelemeye hazır hâle getirilir.
7. Hazırlanan preparatlar kısık ışıktaki 10X ve 40X objektifler kullanılarak protozoon trofozoit ve kistleri, helmint yumurta ve larvaları açısından araştırılır.



Şekil 9.1: Gaitanın kıvamına göre trofozoit ve kist bulunma ilişkisi (Nazile Arda Çakır tarafından yapılan çizim).

Görevler

1. Gaitanın makroskobisini tarif ediniz.
.....
2. Nativ inceleme sonuçlarını yazınız.
Trofozoit:
Kist:
Helmint Yumurtası:
Parazite ait yapı:.....
Lökosit:
Eritrosit:
3. Lugol preparatı inceleme sonuçlarını yazınız
Trofozoit:
Kist:
Helmint yumurtası:
Parazite ait yapı:
Lökosit:
Eritrosit:
4. Gördüğünüz hücre, trofozoit/kist, yumurta yapılarının şeklini çiziniz.

Sonuç - Yorum

Öğretim

Üyesi:

İmza:

Yoğunlaştırma Yöntemi

Yoğunlaştırma yöntemleri kullanıldığında dışkı örneğinde yer alan helmint yumurta ve larvaları ile protozoo kistleri daha kolay saptanabilir. Dışkının farklı bölgelerine dağılmış bulunan parazit elemanları biraraya getirilmiş olur ve tanı başarısı artar.

Çöktürme veya yüzdürme yöntemlerinden en az birini kullanmak parazit elemanı saptama şansını yükseltir.

Çöktürme (Sedimentasyon) Yöntemi

Dışkıdaki birçok parazit bu yöntemle çökebilir ancak dışkı artığı (debris) çok fazla olduğu için parazitlerin görülmesini engelleyebilir.

En sık kullanılan formol-etil asetat yöntemidir. Etil-asetat debris ve yağları çözerek çökeltiden uzaklaştırmayı sağlar. Birçok farklı parazit, bu yöntem ile yakalanabilir. Bu nedenle ilk sırada tercih edilen bir yöntemdir.

Bu yöntemle taze dışkı ya da fiksatifte gönderilen dışkılar çalışılabilir.



Şekil 10.1: Sedimentasyon yöntemi (Yazarın kendi çektiği fotoğraf).

Yüzdürme (Flotasyon) Yöntemi

Yöntemin özelliği çok yoğun bir ortam sağlayarak daha az yoğun parazit yumurta ve kistlerinin yüzdürülmesidir. Bu amaçla yoğun sıvı olarak doymuş tuzlu su (1 lt suda 375 gr. tuz kullanılarak) tercihen kaya tuzu ile hazırlanır. Ya da %33'lük çinko sülfat ($ZnSO_4$) kullanılır.

Çinko sülfat özellikle protozoon kistlerinin teşhisinde kullanılmalıdır. Debrisin oluşmaması, dışkı artıklarıyla paraziter elemanların tanısının gölgelenmemesi olumlu yanlarıdır. Ancak, parazitlerden daha fazla yoğunluğa sahip kimyasal maddelerin kullanıldığı için oluşan hipertonic çözelti parazit şekillerinin bozulmasına yol açarak tanıyı güçleştirebilir. Ayrıca birçok sestod ve trematod yumurtası ağırlığından veya kapaklı olmasından dolayı yüzemeyerek dibe çökebilir.



Şekil 10.2: Doymuş tuzlu suda flotasyon tekniği (Yazarın kendi çektiği fotoğraf).

Çalışma-1: Bekleterek Çöktürme

Hazırlanan dışkı süspansiyonu süzgeçten süzülüp kendi hâline bırakılarak çöktürülür.

Araç - Gereç

1. Mikroskop,
2. Lam-lamel,
3. Huni,
4. Cam baget veya plastik çubuk,
5. Fizyolojik tuzlu su,
6. Çift katlı gazlı bez ya da çay süzgeci,
7. Dışkı örneği.

Metod

1. Gaita örneğinden fındık büyüklüğü kadar alınarak bir tüpe konur.
2. Üzerine bir miktar fizyolojik tuzlu su eklenip bir cam baget veya plastik çubukla karıştırılarak ezilir.
3. Süspansiyon bir tüpe süzülür.
4. Süzüntü bir süre (30 dakika) kendi hâline bırakılır.
5. Üstte kalan sıvı yavaşça dökülür.
6. Tüpün dibinde kalan sedimentten (çöküntüden) bir damla alınır.
7. Temiz bir lam üzerine konur ve lamel kapatılır.
8. Mikroskopta incelemeye hazır hâle getirilir.

Çalışma-2: Formol-etil Asetat Çöktürme Yöntemi

1. Taze dışkıdan bezelye tanesi kadar alınarak 10 ml %10'luk formolde ezilerek 30 dakika bekletilir.
2. Süspansiyon iki tabaka gazlı bezden geçirilerek (veya bir çay süzgecinden) başka bir kaba süzülür, süzüntü 15 ml'lik konik tüplere aktarılarak üzerine SF tamamlanır.

3. Solüsyon 500 g'de 2-3 dakika santrifüj edilir. 0,5-1 ml'lik sediment ayrılır, üst sıvı atılır. Eğer üst sıvı hâlâ bulanıksa, bu kısım atılır ve çökelti tekrar 10-12 ml SF ile sulandırılarak santrifüj edilir; üst sıvı berraklaşana dek bu işlem tekrarlanır.
4. Sediment üzerine 1-2 damla %10'luk formol eklenerek karıştırılır daha sonra toplam hacim 10 ml olmana dek formolle tamamlanır.
5. Süspansiyona 3 ml etil asetat ya da eter eklenir, tüpün ağzı kapatılarak 30 saniye kuvvetle çalkalanır.
6. Süspansiyon 400-500 g'de 2-3 dk santrifüj edilir.
Tüp santrifüjden çıkarıldığında 4 tabaka görülür:
 - En üstte özgül ağırlığı en hafif olan etil asetat (veya eter) tabakası,
 - Tüpün duvarlarına yapışmış bir dışkı artığı tabakası (dışkı tıkaçı),
 - Formol tabakası,
 - İnceleme işleminin yapılacağı sediment.
7. Dışkı tıkaçını uzaklaştırmak için bir çubuk yardımı ile tıkaç tüpün kenarlarından sıyrılır ve üstteki 3 tabaka ani bir hareketle tüp ters çevrilerek dökülür.
8. Sedimente 1-2 damla serum fizyolojik eklenerek karıştırılır.
9. Nativ preparat ve lugollü preparat hazırlanarak direkt mikroskopik inceleme yapılır.

Çalışma-3: Doymuş Tuzlu Suda Yüzdürme Yöntemi

1. Geniş ağızlı bir dışkı kabına doymuş tuzlu sudan bir parmak boşluk kalana kadar eklenir. Üzerine konan süzgecin tuzlu suya dalması gerekmektedir.
2. İncelenecek dışkıdan ceviz büyüklüğünde bir miktar alınır ve süzgece yerleştirilir.
3. Dışkı süzgeç içinde ezilerek suya dağıtılır, süzgeç alınır.
4. Dışkı kabının üzerine, kabın çapına göre iki-üç lamel atılır ve 15 dk su yüzeyinde yüzmesi için bekletilir.
5. Lameller pensle toplanarak lam üzerine yerleştirilir.

Görevler:

1. Bekleterek çöktürme yöntemi uygulandı mı?

.....

2. Nativ inceleme sonuçlarını yazınız.

Trofozoit:

Kist:

Helmint Yumurtası:

Parazite ait yapı:

Lökosit:

Eritrosit:

3. Lugol preparatı inceleme sonuçlarını yazınız.

Trofozoit:

Kist:

Helmint Yumurtası:

Parazite ait yapı:

Lökosit:

Eritrosit:

4. Gördüğünüz hücre, trofozoit/kist, yumurta yapılarının şeklini çiziniz.

5. Formol-etil asetat çöktürme yöntemi uygulandı mı?

.....

6. Nativ inceleme sonuçlarını yazınız.

Trofozoit:

Kist:

Helmint Yumurtası:

Parazite ait yapı:

Lökosit:

Eritrosit:

7. Lugol preparatı inceleme sonuçlarını yazınız.

Trofozoit:

Kist:

Helmint Yumurtası:

Parazite ait yapı:

Lökosit:

Eritrosit:

8. Gördüğünüz hücre, trofozoit/kist, yumurta yapılarının şeklini çiziniz.

9. Doymuş tuzlu suda yüzdürme yöntemi uygulandı mı?

.....

10. Nativ inceleme sonuçlarını yazınız.

Trofozoit:

Kist:

Helmint Yumurtası:

Parazite ait yapı:

Lökosit:

Eritrosit:

11. Lugol preparatı inceleme sonuçlarını yazınız.

Trofozoit:

Kist:

Helmint Yumurtası:

Parazite ait yapı:

Lökosit:

Eritrosit:

12. Gördüğünüz hücre, trofozoit/kist, yumurta yapılarının şeklini çiziniz.

Sonuç - Yorum

Öğretim

Üyesi:

İmza:

BÖLÜM 11

KAN VE DOKU PARAZİTLERİNİ İNCELEME TEKNİKLERİ

Plasmodium sp, Leishmania sp, Toxoplasma gondii, Trypanosoma sp ve mikrofilaryalar gibi pek çok parazit yaşam döngülerinin bazı dönemlerinde kanda saptanabilirler. Bunlardan Plasmodiumların neden olduğu sıtma ve Leishmaniaların neden olduğu şark çıbanı ya da iç organları tutan kala azar Türkiye’de bildirim zorunlu hastalıklar arasındadır. Tüm bu parazitler retikuloendotelial sistem hücrelerini tutarak enfeksiyonlara yol açar.

Bu kan parazitlerinin tanımlanması, boyalı ince yayma ve kalın damla kan preparatlarının incelenmesi ile yapılır. Bu preparatlar tam kandan ya da antikoagülanlı venöz kandan veya Trypanosoma sp ve mikrofilaryaları yoğunlaştırma yöntemleri sonucu elde edilen çökeltiden hazırlanır ve Giemsa boyası gibi nötral boyalarla iyi boyanırlar. Plasmodium’lar için antijenleri testleri ve tür düzeyinde tayin yapabilen hızlı tanı testleri ile moleküler yöntemler de kullanılmaktadır (Özbilgin & Yereli, 1997).

Çalışma-1: Periferik Kan Örneği Alma



Şekil 11.1: Periferik kan alma (Yazarın kendi çektiği fotoğraf).

Periferik kan parmak ucundan, kulak memesi veya bebeklerde topuktan alınabilir. Periferik kan örneğinden kalın damla ve ince yayma preparatları hazırlanabilir ya da kapiller tüpe örnek almak için damla damla toplanabilir.

Araç - Gereç

1. Alkollü pamuk,
2. Steril lanset,
3. Lam-lamel.

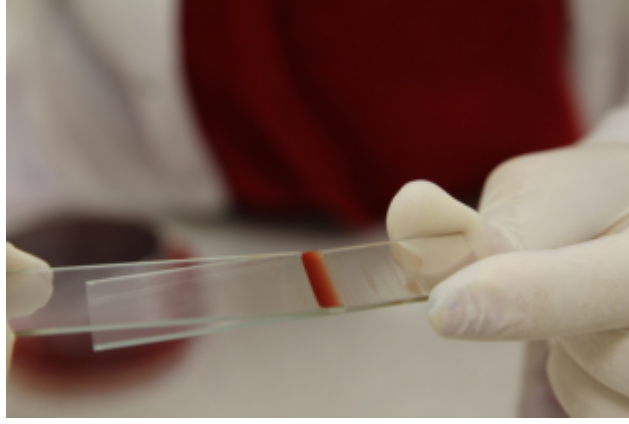
Metod

1. Cilt antisepsisi alkollü pamukla parmak ucu silinerek sağlanır.
2. Genellikle dördüncü parmağın distal falanks volar yüzü, kanı alacak kişinin baş ve işaret parmağı arasında sabitlenir.
3. Steril lanset ile parmak ucu delinir.
4. Kanın serbest bir şekilde akabilmesi için deliğin yeterince derin olmasına dikkat edilmeli, parmak serbest bırakılmalıdır.

DİKKAT!!! Kan çıkarmak için parmak sıkılırsa, örnek, doku aralığına sızan sıvı ile seyreceği için düşük parazitemili hastalarda paraziti saptamak zorlaşabilir.

Çalışma-2: İnce Yayma Preparatının Hazırlanması

1. Delinen parmakta toplanmış ikinci kan damlası, lamın kenarından bir santim kadar mesafede orta bir noktaya alınır.
2. Lam sol elin baş ve işaret parmakları arasında, kan damlası işaret parmağının bulunduğu tarafta olacak şekilde, düz bir şekilde tutulur.
3. Sağ elin baş ve işaret parmakları arasına alınan diğer bir lam, kan damlasının ön kısmına işaret parmağına bakan 45°'lik bir açı yapacak şekilde değiştirilir.
4. Kanın bu ikinci lamın iki köşesine kadar yayılması için kısa bir süre beklenir ve açı 45°'de sabitlenmesi şartıyla ikinci lam sol tarafa sürülür.
5. Lamelin peşinden sürüklenen kan içindeki hücreler bozulmadan ince bir tabaka hâlinde yayılır ve preparatlar havada kurutulmaya bırakılır.
6. Fiksasyon işlemi kimyasal yolla tercihen metanol ile yapılır.



Şekil 11.2: İnce yayma preparatı hazırlama (Yazarın kendi çektiği fotoğraf).

Çalışma-3: Giemsa Boyama Yöntemi

Kan ve kemik iliği yaymalarında en yaygın kullanılan nötral boyalardan biri de Giemsa boyasıdır. Özellikle sıtmada eritrosit içine yerleşmiş olan Plasmodium formlarının ayırılmasında başarıyla kullanılır. Ayrıca, yine parazitolojide diğer kan protozoonlarının (özellikle hemoflajellatların), mikroflaryaların tanısında, Chlamydia sp şüpheli örneklerde inklüzyon cisimciklerinin aranmasında da yararlanılır.

Metod

1. Stok çözeltiden 40 ml Giemsa boyası alınarak boya düzeneğine (cam şale) konur.
2. İkinci bir şalenin içine de 40 ml tamponlu su konur; üzerine 20 µL Triton 100X eklenir.
3. Yaymalar Giemsa boyası içeren şalede 50-60 dakika bekletilir.
4. Süre dolunca tamponlu suya 3-4 defa batırıp çıkarmak suretiyle preparat durulanır.

Görevler:

1. Periferik kandan ince yayma preparatı hazırlandı mı?
2. İnce yayma preparatı Giemsa ile boyandı mı?
3. Hangi objektifte incelediniz?.....

4. Gördüklerinizi çiziniz:

Sonuç - Yorum

Öğretim

Üyesi:

İmza:

BÖLÜM 12

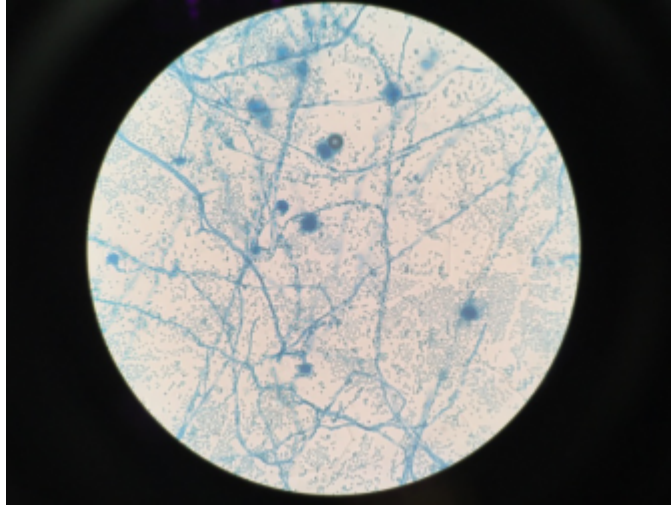
MİKOLOJİK İNCELEME TEKNİKLERİ

Mantarların yaptığı enfeksiyon hastalıklarına *mikoz* adı denir.

Doğada saprofit olarak bulunan, normal flora üyesi olarak yaşayan mantarlar, morfolojik olarak iki temel formda bulunur: Küf ve Maya.

Küfler, doğada ve florada yaygın olarak bulunan mantarlar olup kolonileri türe göre değişen görünüm ve renk gösterir. Mikroskopik elementleri olarak yine türe göre değişen bölmeli (septalı), bazen bölmesiz (septasız) hifler, mikroskop altında ip-likli yapılar olarak izlenir. Küflerin laboratuvar tanısında eşeysiz sporlarının değişik dizilişler göstermeleri önem arz eder. Eşeyli sporlar ise, daha çok sınıflandırmada yardımcı olur. *Aspergillus* ve *Penicillium* küf mantarlarına örnek olarak verilebilir.

İnsanlarda çeşitli yerleşim gösteren fırsatçı enfeksiyonlar yapabilir.



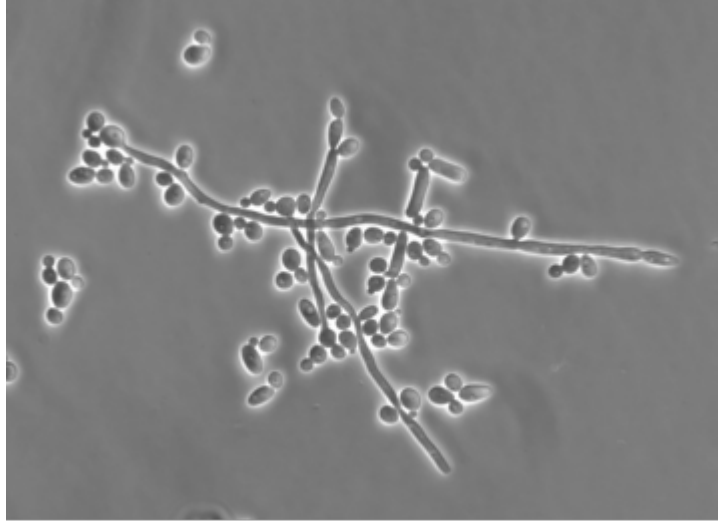
Şekil 12.1: Laktofenol pamuk mavisi ile boyalı preparatta hif yapıları (Shutterstock.com'dan alınan lisansla kullanılan görsel).

Mayalar, yuvarlak, oval, silindirik ve şişe şeklinde olabilen tek hücreli ökaryotik mantarlardır. Mikroskop altında bakterilerden 2 ilâ 10 kat daha büyük görülürler. Gram boyalı preparatlarda gram pozitif boyanırlar. İnsanlarda hastalık yapabilen maya mantarlarına en tipik örnek *Candida* cinsi mayalardır.

Candidalar:

Deri kıvrımlarında, genital bölge mukozasında ayrıca ağız florasında bulunan ve özellikle immun sistemi baskılanmış hastalarda derin ve yüzeysel mantar enfeksiyonlarına yol açarlar.

Candidalar, gerçek hif oluşturmaz, yuvarlak veya oval, yer yer tomurcuklanma gösteren bir yapıya sahip olup identifikasyonu zor değildir. Candidalar, Saburaud dekstroz agarda (SDA) hem 37⁰C'de hem de oda ısısında ürer ve kirli beyaz, mat, ekşi kokulu koloni yapar. Organizmada aktif enfeksiyon etkeni olduğu zaman; Tween 80'li mısır unlu agarda (Corn-meal agar) klamidospore oluşumu, germ tüp ve pseudo hif oluşturma gibi özellikleriyle tanı konulur (Ecemiş, 2010).



Şekil 12.2: *Candida albicans* (Shutterstock.com'dan alınan lisansla kullanılan görsel).

Çalışma-1: Mikolojik Preparat Hazırlama**Araç - Gereç**

1. Kıl, deri tırnak gibi keratinize dokudan alınan örnekler,
2. %10'luk KOH veya NaOH solüsyonu,
3. Lam-lamel,
4. Bistüri,
5. Pens,
6. Cımbız,
7. Vazelin.

Metod

1. Temiz bir lam üzerine bir miktar klinik numune konur.
2. Örneğin üzerine bir damla %10'luk KOH veya NaOH solüsyonu damlatılır.
3. Temiz bir lamelle kapatılır.
4. Numunedeki keratinize dokuların erimesi ve mantar elemanlarının daha kolay görünebilmesi için düşük ısı ile lamın muamele edilmesi sağlanır.
5. Preparatın kurumasının önlenmesi için istenirse lamelin kenarları sıvı vazelin ile kapatılabilir.

Mikolojik Preparatın Boyanması

Mantarlar da bakteriler gibi gram boyama ile boyanabilirler. Ancak mantar elemanlarının daha etkili ve spesifik boyanması için mikoloji laboratuvarında laktofenol pamuk mavisi kullanılır. Bunun dışında metilen mavisi, kapsüllü Cryptococlar için çini mürekkebi gibi boyalar tercih edilmelidir.

Çalışma-2: Laktofenol Pamuk Mavisi Yöntemi ile Boyama**Araç - Gereç**

1. Lam-lamel,
2. Whatman kâğıdı,
3. Vazelin,
4. Laktofenol pamuk mavisi boyası,
5. %70'lik alkol.

Metod

1. Temiz bir lam üzerine bir damla alkol konur.
2. Kültürden iğne öze ile küçük bir parça alınarak alkolün içinde süspanse edilir.
3. Örneğin üzerine bir damla Laktofenol pamuk mavisi damlatılır.
4. Karışım üzerine hava kabarcığı olmayacak şekilde temiz bir lamel kapatılır.
5. Mikroskobik incelemede mantar elementleri açık mavi renkte görülür.

Görevler:

1. Mikolojik preparat hazırlandı mı?

.....

2. Preparat boyandı mı?

.....

3. Mantar elemanları görüldü mü?

.....

4. Gördüklerinizi çiziniz.

Sonuç - Yorum

Öğretim

Üyesi:

İmza:

Çalışma-3: Germ Tüp (Çimlenme Borusu) Deneyi

Araç - Gereç

1. Serum,
2. Lam-lamel,
3. Şüpheli candida kolonisi.

Metod

1. 1 ml serumun içine şüpheli candida kolonisi ekilerek, 37⁰C'de 2 saat inokule edilir.
2. Etüvden çıkarılan süspansiyondan 1 damla alınarak temiz bir lama damlatılır.
3. Lam-lamel arası preparat hazırlanır, 10X ve 40X objektifte incelenir.
4. Ana hücreden tomurcuklanmış çimlenme borusu varlığı açısından araştırma yapılır.

Görevler:

1. Serumda candida ekimi yapıldı mı?

.....

2. İnokulasyon sonrası preparat hazırlandı mı?

.....

3. Çimlenme borusu görüldü mü?

.....

4. Gördüklerinizi çiziniz.

Sonuç - Yorum

Öğretim

Üyesi:

İmza:

BAŞUSTAOĞLU, A. ve YILDIRAN, Ş.T. (2007), Aerop Bakterilerin Biyokimyasal Yöntemlerle Tanımlanması, L. S. Garcia içinde *Klinik Mikrobiyoloji Yöntemleri El Kitabı*, NASM Press, Washinton DC.

ECEMİŞ, T. (2010), Sistemik ve Fırsatçı Mantarlar, M. Altındiş içinde, *Hemşireler İçin Mikrobiyoloji*, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.

HART, T. ve SHEARS, P. (2001), *Tıp Mikrobiyolojisi Renkli Atlas*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.

ÖZBİLGİN, A. ve YERELİ, K. (1997), Kan İnceleme Yöntemleri, M. Özcel, & N. Altıntaş içinde, *Parazit hastalıklarında tanı*, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, (15): 63-96.

TÖRECİ, K. (2008), Antibakteriyal Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları, H. Leblebicioğlu, G. Usluer, & S. Ulusoy içinde, *Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler*, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara.