

2024

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

DÖNEM I MİKROBİYOLOJİ ve KLİNİK MİKROBİYOLOJİ Uygulama Kitapçığı 2024 – 2025

"Gözlem alanlarında, şans yalnızca hazırlıklı zihni tercih eder."

*Louis Pasteur
(1822 - 1895)*

Hazırlayan:

İSÜTF-MÖTEP

Laboratuvar Kurulu

İSÜ | İSTİNYE
ÜNİVERSİTESİ
İ S T A N B U L

Revizyon No: 2024-v0.¹

ÖNSÖZ

Sevgili Öğrenciler,

Bu laboratuvar el kitabı, tıbbi mikrobiyoloji alanında temel deneyleri, prosedürleri ve laboratuvar prensiplerini anlamanıza ve uygulamanıza yardımcı olmak için hazırlanmıştır. Mikrobiyoloji, birçok yönüyle insan sağlığı ile yakından ilişkili olan mikroorganizmaların yapısını, işlevini ve rollerini inceleyen bir bilim dalıdır. Bu alan sayesinde bulaşıcı hastalıklar, tanı yöntemleri ve tedavi stratejileri hakkında bilgi ediniriz. Bu nedenle, laboratuvar çalışmaları mikrobiyolojik kavramları anlamada ve pratik beceriler geliştirmede hayati bir rol oynar.

Laboratuvar oturumlarımızda mikroskopi, boyama, kültür yöntemleri ve antibiyotik duyarlılık testleri gibi temel mikrobiyolojik tekniklerle uğraşacaksınız. Bu kılavuz, laboratuvarda uyulması gereken kuralları, kullanılan ekipmanları, deneylerin teorik temellerini ve her prosedür için detaylı adımları sunmaktadır. Bu rehberlik, laboratuvar çalışmalarınızı güvenli ve etkili bir şekilde yürütmenize yardımcı olacaktır.

Laboratuvarda disiplinli, dikkatli ve özenli çalışmak önemlidir. Her deneyin sonunda, verilerinizi analiz etmeniz ve sonuçlarınızı bilimsel düşünce ve etik değerlerle uyumlu bir şekilde değerlendirmeniz beklenmektedir. Edindiğiniz her bilgi ve geliştirdiğiniz her beceri, sizi geleceğin bilgili ve yetenekli bir hekimi olmaya bir adım daha yaklaştıracaktır.

Bu el kitabının laboratuvar çalışmalarınızda size rehberlik edeceğini ve mikrobiyolojiye olan ilginizi artıracığını umuyoruz. Yolunuz her zaman bilimin ışığıyla aydınlansın.

Başarılar dileriz,

İstinye Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ÖĞRENİM ÇIKTILARI ve DEĞERLENDİRME YÖNTEMİ

KURUL ADI	DENEYİN ADI	ÖĞRENİM ÇIKTISI	DEĞERLENDİRME YÖNTEMİ
Mikroorganizma, Kan-İmmün Sistem	Laboratuvar Güvenliği ve Mikroskopi	Mikrobiyoloji laboratuvarında uyulması gereken kuralları söyleyebilir	ÇSS, AUS*, BD*
		Mikrobiyoloji laboratuvarında atıkların yönetimini açıklayabilir	ÇSS, AUS*, BD*
		Mikrobiyolojide kullanılan alet ve araçların neler olduğunu ve ne için kullanıldığını açıklayabilir	ÇSS, AUS*, BD*
		Mikroskobun kısımlarını anlatabilir ve preparat inceleme yöntemlerini açıklayabilir	ÇSS, AUS*, BD*

ÇSS: Çoktan Seçmeli Sınav, AUS: Açık Uçlu Soru, BD: Boşluk Doldurma

*Mazeret sınavlarında uygulanır

LABORATUVARDA UYULMASI GEREKEN KURALLAR

1. Laboratuvar Önlüğü Giyin: Laboratuvara girerken her zaman temiz ve iliklenmiş bir laboratuvar önlüğü giyin. Laboratuvar önlükleri laboratuvar dışında giyilmemelidir ve uzun saçlar güvenli bir şekilde toplanmalıdır.
2. Yemek Yemeyin veya İçmeyin: Laboratuvarda yemek yemeyin, içmeyin veya ağzınıza bir şey koymayın. Laboratuvar faaliyetleri sırasında yüzünüze dokunmaktan kaçının.
3. Kullanımdan Sonra Temizleyin: Her oturumun sonunda, kullanılan tüm malzemeleri düzenli bir şekilde temizleyin ve belirlenen kişilere teslim edin.
4. Kimyasal Güvenliği: Özellikle belirtilmedikçe herhangi bir kimyasal veya biyolojik maddeye dokunmayın, koklamayın veya tatmayın.
5. Dökülmeleri Hemen Bildirin: Dökülme veya kırılmış kaplar durumunda, hemen laboratuvar sorumlusuna bildirin, dezenfektanla (örneğin, %10 hipoklorit) kaplayın, 15-30 dakika bekleyin ve talimatlara göre temizleyin.
6. Ekipman Sterilizasyonu: Halka, iğne ve diğer yeniden kullanılabilir ekipmanları her kullanımdan önce ve sonra, Bunsen brülörü alevi veya başka uygun bir yöntemle sterilize edin.
7. Ekipmanı Doğru Kullanın: Pipet, mikroskop ve terazi gibi ekipmanları sadece eğitim aldıysanız kullanın; her kullanımdan sonra ekipmanı kapatın.
8. Atıkların Doğru Atılması: Tüm atık malzemeleri belirtilen kaplara atın (örneğin, kesici aletler “kesici-delici” kutulara, enfekte materyaller “kırmızı tıbbi atık kutularına” ve enfekte olmayan atıklar “gri evsel atık kutularına”).
9. Yanıcı Maddeler: Yanıcı maddeleri (örneğin, alkol) açık alevlerden uzak tutun.
10. El Yıkama: Her oturumdan sonra ellerinizi sabun ve su ile iyice yıkayın ve gerekirse antiseptik sıvı kullanın.
11. Yoklama ve Raporlama: Her oturumdan sonra yoklama kağıdını imzalayın ve gerektiğinde sorumlu kişiye bir çalışma raporu sunun.
12. Son Kontroller: Çıkmadan önce tüm gaz, su muslukları ve mikroskop lambalarının kapalı olduğundan ve laboratuvar malzemelerinin dışarıya çıkarılmadığından emin olun.



a-Kesici ve delici atık kutusu b-Tıbbi atık kutusu

c-Evsel atık kutusu

Mikroorganizma, Kan-İmmün Sistem Kurulu

1. Laboratuvar Güvenliği ve Mikroskopi

LABORATUVAR: ANK-215

ÖĞRENİM ÇIKTISI
Mikrobiyoloji laboratuvarında uyulması gereken kuralları söyleyebilir
Mikrobiyoloji laboratuvarında atıkların yönetimini açıklayabilir
Mikrobiyolojide kullanılan alet ve araçların neler olduğunu ve ne için kullanıldığını açıklayabilir
Mikroskobun kısımlarını anlatabilir ve preparat inceleme yöntemlerini açıklayabilir

A- BİYOGÜVENLİK

İnsanların, özellikle sağlık çalışanlarının ve çevrenin potansiyel tehlike içeren enfeksiyöz mikroorganizmalar ile onlara ait genetik ve toksik çeşitli komponentlerine maruziyetini mümkün olan en alt seviyeye indirmek ya da tamamıyla ortadan kaldırmak için gerekli uygulamaların tümünü kapsamaktadır.

A.1. Enfeksiyöz Etken Risk Gruplarının Belirlenmesi (WHO):

- Organizmaların risk gruplarına göre sınıflandırılması enfeksiyöz ajanların bulaş riskine göre yapılmaktadır.
- ✓ Bir mikroorganizmanın hangi risk grubunda yer alacağı ve çalışmanın hangi seviyede yürütüleceği dört önemli faktöre bağlıdır:

1. Organizmanın patojenitesi
2. Bulaş yolu ve organizmanın konakçı dağılımı
3. Etkili korunma yollarının varlığı
4. Etkili tedavi yollarının mevcudiyeti

Buna göre mikroorganizmalar 4 gruba ayrılır (Tablo 1).

Tablo 1. Mikroorganizmaların risk grubuna göre sınıflandırılması

Grup-1	Risk grup 1'de bireysel ve toplumsal riski olmayan ya da bu riskin önemli ölçüde az olduğu mikroorganizmalar yer almaktadır. İnsanda enfeksiyona neden olmadığı kesinlikle bilinen mikroorganizmalar (<i>Bacillus subtilis</i> gibi) bu grupta yer alır.
Grup-2	Klinik mikrobiyolojide çoğu kez karşımıza çıkan ve insanlarda hastalık nedeni olduğu bilinen birçok mikroorganizma Risk Grup 2'de tanımlanmıştır. Genel olarak Risk Grup 2'deki mikroorganizmaların neden olduğu hastalıkların etkili tedavi/korunma yolları vardır ve toplum sağlığı açısından oluşturduğu risk sınırlıdır.
Grup-3	Toplumsal risk düşük ancak bireysel risk yüksek olmakla birlikte etkili tedavi ve korunma yollarının bulunduğu mikroorganizmalar Risk Grup 3'te yer alır.
Grup-4	Hem toplumsal hem de bireysel riskin yüksek buna karşılık etkili korunma ve tedavi yöntemlerinin genellikle bulunmadığı mikroorganizmalar ise Risk Grup 4'te yer almaktadır.

A.2. Laboratuvar Biyogüvenlik Seviyeleri

- Mikrobiyolojik risk grupları dikkate alınarak laboratuvarlar dört farklı güvenlik seviyesinde tasarlanmıştır (Tablo 2).

Tablo 2. Laboratuvar Biyogüvenlik Seviyeleri

Risk gruplarına karşılık gelen biyogüvenlik seviyeleri ve karşılık gelen kriterler

Biyogüvenlik Seviyesi	Laboratuvar Tipi	Uygulamalar	Güvenlik Malzemeleri (Primer Korunma)	Üniteler (Sekonder Korunma)
Temel Biyogüvenlik Seviye 1 (BGS-1)	<ul style="list-style-type: none">• Temel öğretim laboratuvarı• Araştırma laboratuvarı	<ul style="list-style-type: none">• Standart mikrobiyolojik uygulamalar	<ul style="list-style-type: none">• Gerekli değildir	<ul style="list-style-type: none">• Açık çalışma masaları
Temel Biyogüvenlik Seviye 2 (BGS-2)	<ul style="list-style-type: none">• Halk sağlığı laboratuvarı• Klinik mikrobiyoloji laboratuvarı• Araştırma laboratuvarı	<ul style="list-style-type: none">• BGS-1 uygulamalarına ilaveten• Sınırlanmış girişler• Biyogüvenlik el kitabı• Atıkların dezenfeksiyonunu ve tıbbi bakım politikalarını içeren bir el kitabı	<ul style="list-style-type: none">• Sınıf 1 veya Sınıf 2 BGK• Kişisel koruyucu ekipman (laboratuvar giysileri, eldiven, yüz koruyucular gibi)	<ul style="list-style-type: none">• BGS-1 ünitelerine ek olarak :• Kolay ulaşılabilir bir otoklav
Tecrit Biyogüvenlik Seviye 3 (BGS-3)	<ul style="list-style-type: none">• Özel tanı laboratuvarı• Araştırma laboratuvarı	<ul style="list-style-type: none">• BGS-2 uygulamalarına ek olarak :• Kontrollü girişler• Tüm atıkların dezenfeksiyonu• Laboratuvar giysilerinin makinalarda yıkanmadan önce dezenfeksiyonu	<ul style="list-style-type: none">• BGS-2 malzemelerine ek olarak :• Gerekli durumlarda gaz maskeleri	<ul style="list-style-type: none">• BGS-2 ünitelerine ek olarak :• Otomatik olarak kapanabilen çift kapılı girişler• Kirliliğin tekrar sirküle edilmediği sistemler• Laboratuvar içerisine negatif hava akımı sağlayan cihazlar
Maksimum Tecrit Biyogüvenlik Seviye 4 (BGS-4)	<ul style="list-style-type: none">• Çok tehlikeli patojen çalışma laboratuvarı	<ul style="list-style-type: none">• BGS-3 uygulamalarına ek olarak :• Laboratuvarlara girilmeden önce giysilerin değiştirilmesi• Laboratuvar çıkışında duş alınması• Ünitelerden ayrılmadan önce tüm materyallerin dezenfeksiyonu	<ul style="list-style-type: none">• BGS-3 malzemelerine ek olarak• Tüm prosedür ve aktiviteler için Sınıf 3 BGK veya tüm vücudu saran ve gerekli havayı sağlayan pozitif basınçlı personel giysileri ile Sınıf 1 veya Sınıf 2 BGK kombinasyonu	<ul style="list-style-type: none">• BGS-3 ünitelerine ek olarak :• İzole edilmiş alanlar ya da tamamen ayrılmış binalar• Kirliliğin uzaklaştırılmasını sağlayan ventilasyon veya dezenfeksiyon sistemleri

A.3. Biyogüvenlik Kabin Seviyeleri

Üç sınıf biyogüvenlik kabini vardır (Resim 2):

1-Sınıf I biyogüvenlik kabinleri (BSC-I): Sınıf I BSC'ler çalışan kişiyi ve çevreyi mikrobiyal infeksiyon riskinden korumaya yönelik tasarlanmış çalışma kabinleridir. Oda havası ön açıklıktan içeri, oradan da HEPA filtrelerden geçerek dışarıya atılır.

Çalışma yüzeyine doğrudan oda havasının girmesi dolayısıyla ürün koruma özellikleri yoktur. Ancak potansiyel olarak kirli/kirlenen havanın HEPA filtreden atılması personelin ve çevrenin korunmasını sağlar.

2. Sınıf II biyogüvenlik kabinleri (BSC-II): Bu tür kabinler daha kompleks yapıya sahiptirler. Personel ve çevre korunması yanında ürün korumaya yönelik olarak da tasarlanmış olmaları dolayısıyla daha yaygın olarak kullanılmaktadır.

Dış ortam oda havası doğrudan HEPA filtre/lere yönlendirilerek önce temizlenir. Böylece hem çalışma yüzeyi temiz kalır hem de personel ve çevre korunmuş olur.

✓ Risk grup 2-3 mikroorganizmalar ile çalışılırken kullanılması önerilmektedir.

3-Sınıf III biyogüvenlik kabinleri (BSC-III): : Esas itibariyle BSL-3 ve BSL-4 laboratuvarlarında risk grup 3 ve 4 mikroorganizmalarla çalışmaya yönelik tamamen kapalı bir sistem kabini olarak üretilmişlerdir. İç hava re-sirkülasyonu yoktur ve tam izolasyon sağlanmış durumdadır. Doğrudan dış ortam bağlantısı yapılır. Çalışma yüzeyine kabin ile kombine tasarlanmış oldukça dayanıklı lastik eldivenler yoluyla ulaşılır.

Biosafety Cabinets



Resim 2. Laboratuvar Biyogüvenlik Kabinleri

B- MİKROSKOP

B1. Mikroskopun parçaları

Mikroorganizmaların görülebilmeleri için büyütülmeleri ve gözle görülür hale getirilmeleri gereklidir. Bu amaçla mikroskop kullanılır. Mikroskopun çeşitli tipleri olup, öğrenci uygulama laboratuvarında kullanılanları ışık mikroskopudur.



- ❖ Bakteriler genellikle 1000 büyütmede incelenirler. Bu büyütme ise immersiyon objektifi ile elde edilir. İmmersiyon objektifinde immersiyon yağı kullanılır.
- ❖ İmmersiyon objektifi ile çalışılırken dikkat edilmesi gereken en önemli nokta, incelenecek boyalı alan en küçük büyütmede ($10 \times 10 = 100$ büyütme/saha) bulunmalı, daha sonra immersiyon objektifine geçilmelidir ($10 \times 100 = 1000$ büyütme/saha)

- İmmersiyon objektifi ile bakarken, mutlaka immersiyon yağı kullanılır.

- ✓ Lam-lamel arası preparatlarda ($10 \times 40 = 400$ büyütme/saha): Kondansatör aşağıda diyafram kısık
- ✓ Boyalı preparatlarda ($10 \times 100 = 1000$ büyütme/saha): Kondansatör yukarıda diyafram açık

B2. Islak (Lam-Lamel Arası) Preparat Hazırlanması

- Temiz bir lam üzerine bir damla SF (serum fizyolojik) damlatılır
- İncelenecek örnek (koloni, hasta materyali vb) streil edilip, havada soğutulmuş öze ile alınarak, SF damlasının yanında lam üzerinde iyice ezilir ve SF ile karıştırılarak iyice homojen dağılması sağlanır.

-Sıvı bir örnek incelenecekse pastör pipeti ile bir damla anılır ve temiz lam üzerine konulur, bunun üzerine direkt lamel kapatılır

- Üzerine lamel 45 derecelik bir açı ile yavaşça kapatılır, hava kabarcığının kalmamasına dikkat edilir
- Mikroskopta önce 10'luk objektive alan bulunur, sonra 40'luk objektive geçilir. Mikrovida ile ince ayar yapılır



KAYNAKLAR

1-Koneman E.W. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

2- Forbes B.A., Sahm D.F., Weissfeld A.S. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Mosby Elsevier, Missouri.

3-McPherson RA., Pincu MR. Henry's Clinical Diagnosis and management by Laboratory Methods. 24th ed. Elsevier