

2024

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

DÖNEM II 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.

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 ediniz. 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.

Laboratuvarında 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
Sindirim- Metabolizma	Mikrobiyolojik inceleme ve bakterilerin üretilmesi	Klinik örneklerin mikrobiyolojik inceleme yöntemlerini açıklayabilir	ÇSS, AUS*, BD*
		Klinik örneklerden veya bu örneklerden üretilmiş kültürlerden mikroskopik inceleme yaparken kullanılan boya ve boyama yöntemlerini sayabilir	ÇSS, AUS*, BD*
		Gram boyama yönetimi anlatabilir ve uygulayabilir	ÇSS, AUS*, BD*
		Kültür için kullanılan besiyerlerini tanımlayabilir ve özelliklerini açıklayabilir,	ÇSS, AUS*, BD*
	Bakterilerin identifikasyonu	Klinik örneklerden enfeksiyon etkeni olarak yaygın izole edilen Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin tanımlanmasında kullanılan mikrobiyolojik teknikleri anlatabilir	ÇSS, AUS*, BD*
		Klinik mikrobiyoloji laboratuvarında yaygın olarak kullanılan seçici ve ayırt edici besiyerlerini ve bakterilerin ayırt edilmesini sağlayan karakteristik üreme özelliklerini tanımlayabilir	ÇSS, AUS*, BD*
Bakterilerin tanımlanmasında kullanılan biyokimyasal testleri sayabilir ve bu testlerin sonuçlarını yorumlayabilir		ÇSS, AUS*, BD*	
Biyolojik Etkenler- Savunma- Enflamasyon	Dermatofitlerin ve bazı fırsatçı mikoz etkeni mantarların incelenmesi	Mantarların laboratuvar tanısında kullanılan spesifik mikrobiyolojik yaklaşımları ve testleri listeleyebilir.	ÇSS, AUS*, BD*
		Mikolojide yaygın kullanılan besiyeri ve boyaları sıralayabilir	ÇSS, AUS*, BD*
		Dermatofitlerin ve yaygın fırsatçı mikoz etkenlerinin mikroskopik morfolojilerini ayırt edebilir	ÇSS, AUS*, BD*
Yaşamın Evreleri-I	Parazitlerin Mikrobijolojik Tanısı	Parazitlerin laboratuvar tanısında kullanılan mikroskopik yöntemleri anlatabilir	ÇSS, AUS*, BD*
		Parazitlerin laboratuvar tanısında mikroskopik inceleme ile parazit kist, trofozit ve yumurtalarının değerlendirilmesini yapabilir	ÇSS, AUS*, BD*

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

*Mazeret sınavlarında uygulanılır

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

SİNDİRİM-METABOLİZMA KURULU

1. MİKROBİYOLOJİK İNCELEME VE BAKTERİLERİN ÜRETİLMESİ

Laboratuvar: ANK-215

ÖĞRENİM ÇIKTISI
Klinik örneklerin mikrobiyolojik inceleme yöntemlerini açıklayabilir
Klinik örneklerden veya bu örneklerden üretilmiş kültürlerden mikroskopik inceleme yaparken kullanılan boya ve boyama yöntemlerini sayabilir
Gram boyama yönetimi anlatabilir ve uygulayabilir
Kültür için kullanılan besiyerlerini tanımlayabilir ve özelliklerini açıklayabilir

Uygulamalar

- 1-Preparat hazırlama ve Gram boyası ile boyama
- 2- Gram boyalı preparatların mikroskopta incelenmesi
- 2-Katı besiyerinde koloni morfolojilerinin incelenmesi
- 3-Katı ve sıvı besiyerlerine ekim yöntemleri

❖ MİKROBİYOLOJİK İNCELEME YÖNTEMLERİ

Mikrobiyolojik inceleme yöntemleri şunları kapsamaktadır:

- A-Makroskopik inceleme
- B-Mikroskopik inceleme
- C-Kültür

A-Makroskopik inceleme

Mikrobiyolojik inceleme için laboratuvara gönderilen örneklerin makroskopik incelenmesi yönlendirici olabilmektedir. Klinik örneğin görünümü, rengi, kokusu mukus ve kan varlığı gibi özellikleri, örneğin hangi kısmının işleme alınacağı, hangi testlerin uygulanması gerektiği, olası etken konusunda yol göstericidir. Ayrıca örneğin kalitesi konusunda da bilgi vermekte, gerek görülürse örneğin işleme alınmadan reddedilmesiyle malzeme ve iş gücü kaybını da önlemektedir.

B-Mikroskopik inceleme

Mikroorganizmalar çeşitli boyalarla mikroskopik olarak gözlenebilir bir duruma gelirler ve büyüklük, şekil, spor, kapsül ve iç yapıları hakkında da gerekli bilgiler elde edilebilir. Bazı mikroorganizmalar farklı boyanma özelliklerine göre tanımlanabilirler. Bu nedenle, bakterilerin identifikasyonunda boyanma özellikleri kritik önem taşır.

Hem klinik örnekten hem de bu klinik materyalden üretilmiş kolonilerden boyama yapılarak, daha ileri tanımlamada kullanılacak testler belirlenir ve tanımlama işlemleri sürdürülür.

Mikrobiyolojide bu amaçla kullanılan çeşitli boyama yöntemleri geliştirilmiştir.

B.1.Mikrobiyolojide Kullanılan Temel Boyama Yöntemleri

B.1.1. Preparat hazırlama

Mikroskopik inceleme için preparatlar klinik örneklerden veya in vitro kültürden hazırlanabilir.

- Temiz lamlar kullanınız.
- Mikroskop lamalarını etiketleyiniz. Lamaları sadece köşelerinden tutunuz.
- Aseptik teknikler kullanarak örneği öze, eküvyon çubuğu veya uygun bir alet ile lamın ortasına aktarınız. Preparatın çok kalın olmamasına dikkat ediniz.
- Preparatın kurumasını bekleyiniz ve uygun yöntem ile tespit ediniz.

B. 1.2. Tespit Yöntemleri

Amaç: Klinik materyalin ve kültürden elde edilen mikroorganizmaların lama yapışmalarını sağlamak ve boyanma esnasında akıp gitmelerini önlemektir.

B.1.2.1. Fiziksel tespit:

- Preparat kuruyana kadar oda ısısında bekletilir.
- Lamın altını 3-4 kez alevden geçirerek ısı ile tespit edilir.

B.1.2.2. Kimyasal tespit:

Bu tespit yöntemi direkt dokudan hazırlanan preparatlarda ökaryotik hücre yapısının bozulmasını önlemek için yapılır.

- Alkol eter karışımı
- Metanol ile 3-5 dakika tespit
- Aseton: Özellikle floresan mikroskopi için hazırlanan preparatlar asetonda 5 dakika tutularak tespit edilebilirler
- Absolü alkol ile 8-10 dakikada tespit yapılabilir.

B.1.2.Boyama Yöntemleri

B.1.2.1. Basit Boyama Yöntemleri:

Bu yöntemlerde genellikle tek bir boya eriyiği kullanılarak boyama yapılır. Mikroorganizmaların morfolojisinin incelenmesi amaçlanır. Basit boyama yöntemi ile hazırlanan ıslak preparatlar (wet-mount), 40X'lik objektif ile incelenmelidir. Metilen mavisi, laktofenol pamuk mavisi , lugol, çini mürekkebi vb boyalar bu amaçla kullanılır.

- **Metilen Mavisi ile Boyama:** Herhangi bir bazik boya kullanılarak yapılan basit boyamada bakterinin morfolojisi, büyüklüğü ve dizilimi hakkında bilgi edinmenin yansıra özellikle direkt materyalden hazırlanan preparatın incelenmesiyle materyalin uygun alınıp alınmadığı hakkında da fikir edinilir. Bu boya kullanılarak yapılan basit boyamada *Corynebacterium diphtheriae*'nın daha koyu boyanan metakromatik cisimcikleri gözlenebilir.

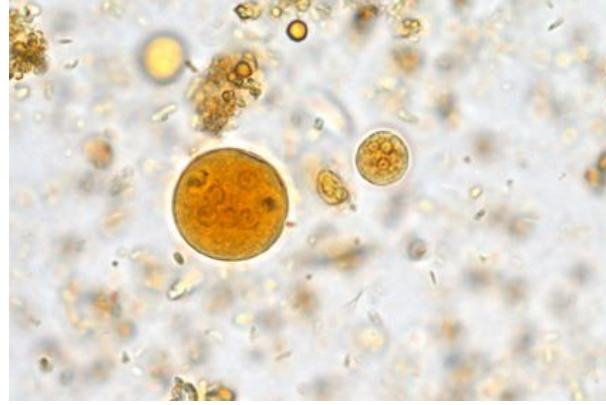


Şekil 1. Metilen mavisi ile boyanmış epitel hücreler



Şekil 2. Metilen mavisi ile boyanmış *C. diphtheriae*

- **Lugol ile Boyama:** Parazitlerin özellikle kist yapısının gösterilmesinde kullanılır. Bir damla lugol lama damlatılarak, üzerine örnekten alınan bir parça karıştırılır ve üstüne lamel kapatılarak mikroskopta 40X'lik objektif ile incelenir.



Şekil 3. Lugol ile boyanmış preparatta *Entamoeba* kistleri

B.1.2.2. Kompleks (Ayrırcı) Boyama Yöntemleri:

Kompleks (veya ayrırcı) boyama yöntemlerinde birden fazla boya eriyiği kullanılır ve hücre tiplerini ve hücresel yapıları ayırt edilmesi mümkün olur. En sık kullanılan kompleks boyama yöntemi Gram boyamadır.

- **Gram Boyama Yöntemi:**

Gram boyama yöntemi mikrobiyoloji laboratuvarında en sık kullanılan boyama yöntemidir. Bir primer boya ve karşıt boyanın kullanıldığı ayrırcı bir boyama yöntemidir. Primer boya olarak kristal viyole kullanılır. Preparatta bulunan hücrelere kristal viyole nüfuz eder. Sonrasında iyotlu bir solüsyon olan lugol eklenir. Lugol kristal viyole ile bir kompleks oluşturur. Lugol sabitleyicidir ve lugol eklenmesi atlandığında hücreler (Gram pozitif bakteriler bile) dekolorizasyon sonrasında primer boyayı kaybeder. Renk giderme (dekolorizasyon) işlemi genellikle %95 etanol kullanılarak yapılır. Dekolorizasyon sonrasında preparat karşıt boya (safranin veya sulu fuksin) ile muamele edilir. Renk giderme basamağı atlanırsa tüm hücreler primer boyanın renginde kalacaktır.

Renk giderme işlemi sonrasında primer boya olan kristal viyoleyi tutan organizmalar mor renkte görünür ve Gram pozitif olarak adlandırılır. Kristal viyole-lugol kompleksini dekolorizasyon sonrası hücre dışına veren organizmalar karşıt boyayı alarak pembe-kırmızı renkte görünür ve Gram negatif olarak adlandırılır.

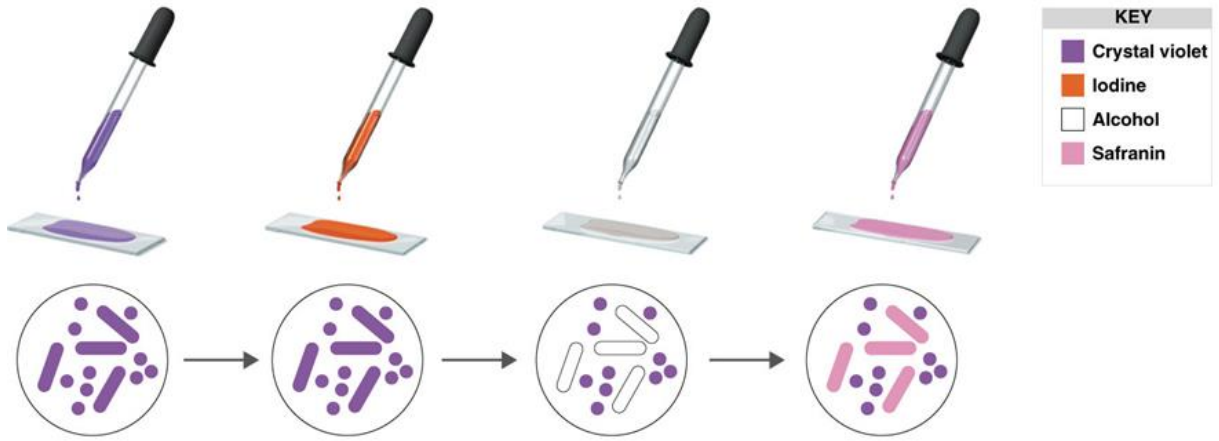
Kalın bir peptidoglikan tabakasına sahip olan bakteriler alkol ile renk giderme uygulandıktan sonra kristal viyole iyot kompleksini hücre dışına vermez. Bunun aksine ince bir peptidoglikan tabakasına sahip olanlar alkol ile muamele sonrasında kristal-viyole iyot kompleksini hücre içinde tutmaz ve karşıt boyanın rengini alır.

Gram boyama basamakları aşağıdaki şekilde özetlenmiştir:

	Boya/solüsyon	Süre
1. basamak	Kristal Viyole	1 dk
2. basamak	Lugol	1 dk
3. basamak	Etil alkol	10 sn (renksiz sıvı akıncaya kdr)
4. basamak	Safranin/ Sulu fuksin	30 sn

*Her basamak arasında distile su ile nazikçe yıkama yapılır.

Boyalı preparatlara immersiyon yağı damlatılır ve 100X'lik objektifte incelenir.



Şekil 4. Gram boyama yöntemi.

Genel olarak yaşlanmış (eskimiş) kültürden elde edilen preparatlar Gram negatif boyanma eğilimindedir.

C-Kültür

Klinik örnekler, olası etkenin özellikleri de düşünülerek çeşitli besiyerlerine ekilir ve şüphelenilen hastalık etkenine göre aerobik, anaerobik ya da mikroaerofilik koşullarda inkübasyona bırakılır. Ortamın ısı ve inkübasyon süresi de etkenlere göre değişir. Bakteriler genelde 37° C'de 24 saatte ürerlerse de bazı hastalık etkenleri için bu ısı ve süreler değişir.

Mikroorganizmaları üretmek için kullanılan besiyerleri de izole edilmesi istenen etkenin türüne göre değişir. Etken izole edildikten sonra saf kültürden çeşitli özellikleri incelenir ve identifikasyon için gerekli testler yapılır.

C.1.Morfolojik özellikler

Mikroorganizmanın morfolojik özellikleri incelenir.

C.1.1.Makroskobik morfoloji

Mikroorganizmanın katı ve sıvı besiyerlerinde gözle görülen özellikleri incelenir.

1-Katı besiyerinde: Etkenin besiyerinde oluşturduğu kolonilerin büyüklüğü, şekli, rengi, kokusu, kenarlarının durumu, kanlı agarda hemoliz oluşturup oluşturmadığı, hangi tipte koloni (S,R,M) oluşturduğu saptanır.

2- Sıvı besiyerinde: Mikroorganizmanın üreme durumu (zayıf, orta, yoğun), oksijene olan ihtiyacı (yüzeyde, dipte, yüzeye yakın ya da besiyerinin her bölgesinde üreme durumuna göre) dipte tortu oluşumu, üstte zar oluşumu, gaz oluşumu, granüler ya da homojen üreme, renk oluşumu vb özellikleri saptanır.

C.2. Mikrobiyolojide Kullanılan Besiyerleri

Besiyeri: Mikroorganizmaların üretilmeleri için gerekli maddeleri içeren hazırlanmış ortamlardır.

Besiyerleri, mikroorganizmaların üretilmesinde, benzerlerinden ayırt edilmesinde ve belirli özelliklerinin seçici olarak belirlenmesinde kullanılır. Besiyerleri farklı tipte mikroorganizmaların ihtiyaç duydukları genel gıda maddeleri ve üreme faktörlerine göre hazırlanır.

Besiyerleri sıvı, katı ve yarı katı olarak hazırlanabilir.

Besiyeri katılaştırıcı ajanı olarak agar-agar kullanılmaktadır.

C.2.1. Sık Kullanılan Besiyerleri

Koyun Kanlı Agar

-Seçici olmayan zengin besiyeridir.

Koyun kanlı agar (Şekil 5), besin içeriği açısından zengin bir besiyeridir ve güç üreyen bakteriler dahil çok çeşitli mikroorganizmanın üremesini destekler. Ayrıca bakterilerin hemolitik özelliklerine göre ayırt edilmelerini sağlar.

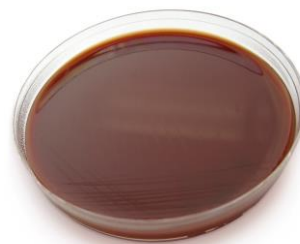
Çikolata agar

-Seçici olmayan zengin besiyeridir.

Çikolata agar (Şekil 6) güç üreyen bakterilerin izolasyonunda kullanılan zengin bir besiyeridir. Koyun kanının besiyerine yüksek sıcaklıkta iken eklenmesi ile eritrositlerin patlaması ve içeriğindeki üreme faktörlerinin açığa çıkması sağlanır. Besiyeri ismini çikolatamsı kahve renginden alır.



Şekil 5. Koyun kanlı agar



Şekil 6. Çikolata agar

MacConkey Agar

-Seçici ve ayırt edici besiyeri

Gram negatif çomakların izolasyonu ve ayırımında kullanılır. Besiyerinin seçicilik özelliğinden çoğu Gram pozitif bakteri üzerinde inhibitör etki gösteren kristal viyole ve safra tuzları sorumludur. Bu besiyeri aynı zamanda fermente edilebilen karbonhidrat kaynağı olarak laktoz ve pH indikatörü boya, nötral kırmızı içerir. Laktozu fermente eden bakteriler besiyeri pHsının düşmesine yol açar ve koloniler pembe, pembe-kırmızı renkte görünür. Laktozu fermente etmeyen bakterilerin kolonileri transparan veya sarımsı görünür.



Şekil 7. Mac Conkey Agar



Şekil 8. Mac Conkey Agar da laktozu fermente eden (sol) ve etmeyen (sağ) bakteri kolonileri.

Salmonella-Shigella (SS) Agar

-Seçici ve ayırt edici besiyeri

SS agar patojen enterik çomakların, özellikle de Salmonella ve Shigella türlerinin izolasyonunda kullanılır. Besi yerinde bulunana safra tuzları, sodyum sitrat ve parlak yeşil Gram pozitif bakterilerin üremesini inhibe eder. Besiyeri içeriğinde laktoz ve pH indikatörü boya laktozu fermente eden (pembe koloniler) bakterilerin laktozu fermente etmeyen bakterilerden (transparan koloniler) ayırt edilmesini sağlar. Bu besiyeri ayrıca sodyum tiosülfat ve demir sitrat içerir ve hidrojen sülfür (H₂S) üreten bakteriler merkezi veya tümü siyah olan koloniler oluşturur.



Escherichia coli

Salmonella

Shigella

Şekil 9.SS agarda farklı enterik çomakların oluşturdukları koloniler

Tiyoglikolat buyyon

-Zenginleştirici besiyeridir.

Tiyoglikolat buyyon anaerobik, mikroaerofilik, aerobik ve güç üreyen bakterilerin üremesini destekleyen sıvı besiyeridir. Anaeroplara için en sık kullanılan zenginleştirici besiyeridir. Et suyu, inçin kazein, maya, sığır eti özleri ve vitaminler dahil olmak üzere birçok besleyici faktör içerir.



Şekil 10. Tiyoglikolat buyyon

C.3. Ekim Yöntemleri

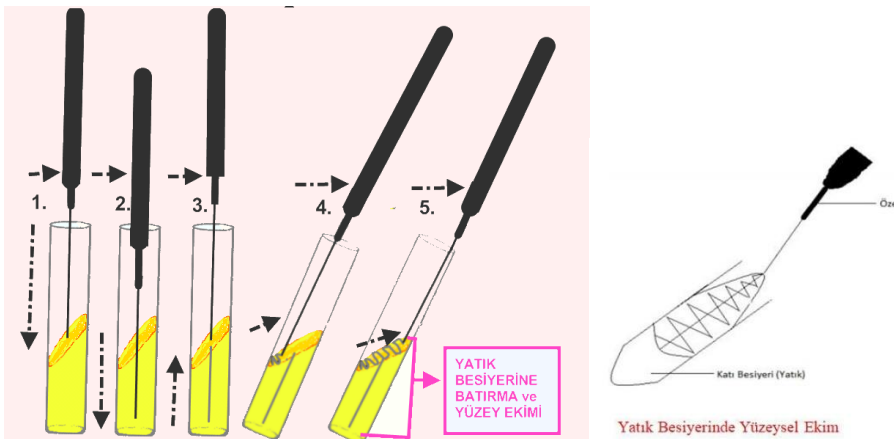
Ekim teknikleri besiyerinin katı, sıvı oluşuna göre farklıdır;

Sıvı besiyerine ekim: Bir öze ya da bir eküvyon çubuğu (swab) ile alınan örnek tüpün kenarına sıvıya yakın bir yerde önce ezilir, sonra sıvı ile karıştırılarak yapılır.

Katı besiyerlerine ekim: Tüp ya da petrideki besiyerinde olabilir.

Tüpte:

Yatık olarak dökülen besiyerine iğne öze ile ekim yapılır. İğne öze ile koloniden alınan örnek besiyerinin içine 2/3 oranında batırılır ve yatık yüzey taranarak ekim bitirilir.



Şekil 11. Eğri(yatık) besiyerine batırma ve yüzey ekimi.

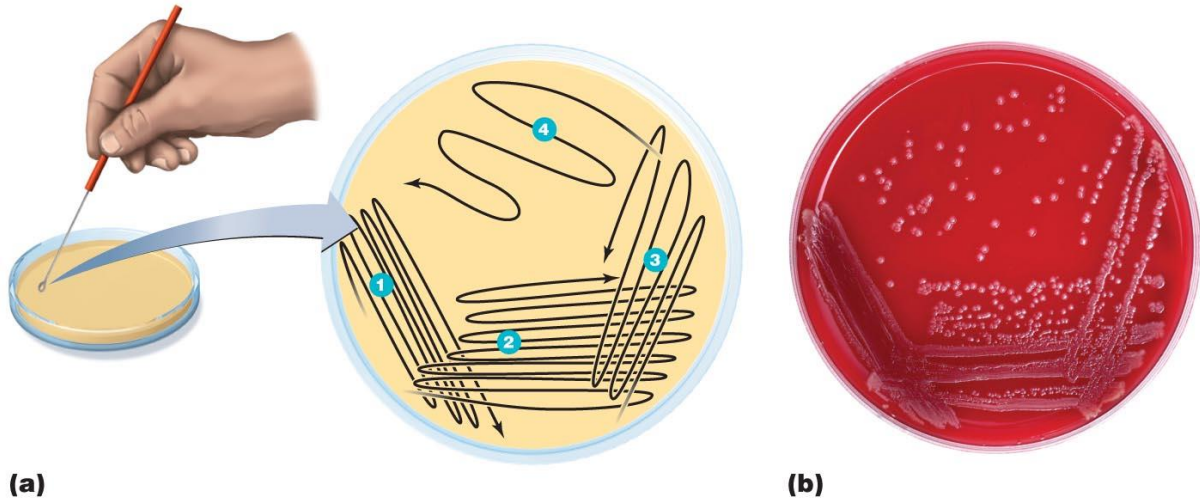
Petri kabına dökülmüş katı besiyerine ;

Azaltma (tek koloni), yayma veya sayım plağı şeklinde ekim yapılır.

Azaltma (tek koloni) ekim yönteminin prensibi:

Azaltma ekim (tek koloni veya seyreltme ekim de denir) yönteminin amacı birbirinden ayrı düşmüş koloniler elde etmektir. Kolonilerin birbirinden ayrı olması saf kültür elde etmek için önemlidir. Saf kültür, tek bir koloniden yapılan kültürlerdir. Bir kolonideki tüm hücreler aynı hücreden kaynaklandığından kolonideki tüm hücrelerin özelliklerinin (genotipik ve fenotipik) aynı olduğu düşünülür. Tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarında mikroorganizmaların identifikasyonu ve antimikrobiallere duyarlılığının belirlenmesinde sıklıkla saf kültürler ile çalışılır. Karışık bir kültür veya klinik örnekten ayrı düşmüş koloniler elde edilebilmesi için üremiş kültür veya klinik örnekten uygun miktarda halka öze veya uygun bir alet ile alınıp katı besiyeri üzerine öze üzerindeki mikroorganizma sayısı giderek azalacak şekilde birkaç adımda ekim yapılır. Bunun için besiyerinin bir bölgesinden diğerine geçmeden önce öze kızıl dereceye kadar yakılarak sterilize edilir. Böylelikle mikroorganizmalar agar plağı üzerindeki bir bölgeden diğerine aktarılırken sayıları azalmış olur. Son bölgeye ekim yapılırken öze üzerindeki mikroorganizma sayısı birbirlerinden ayrı düşmesine izin verecek düzeyde seyrelmiş olmalıdır.

Farklı türler çoğu zaman farklı koloni morfolojileri gösterir. Karışık bir kültürden tek koloni ekim yapıldığında (üreme gereklilikleri ve üreme hızları benzer ise) kültürdeki her mikroorganizma türüne ait koloniler görülecektir. Saf kültür almak için ayrı düşmüş tek bir koloni alınıp yeni bir besiyerine ekim yapılır.



Şekil 12. Azaltma ekim yöntemi (a) ve azaltma ekim yöntemi ile ekilmiş kültür(b)

Prosedür:

1. Agar plaklarını etiketleyiniz (Petri plaklarını kapakları yerine alt kısmına yazınız)
2. Aseptik teknikler kullanarak uygun bir alet ile klinik örnekten yeterli miktarda alıp agar plağının ilk ekim alanına inoküle edip yayınız.
3. Agar plağının kapağını boş olan eliniz ile açınız. Besiyerini hayalinizde 4 alana ayırıp birinci bölgeye öze ile aldığınız kültürü inoküle edip (zizzaklar yaparak) yayınız. (Şekil 12 a #1)
4. Agar plağının kapağını kapatınız.
5. Özeyi yakarak sterilize ediniz.
6. İkinci ekim alanını, öze ile birinci ekim alanında oluşturulan ilk ekim çizgilerinin uç kısımlarına

değecek şekilde zikzak ekim çizgileriyle oldurunuz, plağın kapağını kapatıp zenizi sterilize ediniz. (şekil 12 a #2)

7. Plak yüzeyinin 3. ve 4. ekim alanlarına da aynı yöntemle ekim yapınız. (şekil 12 a #3 ve 4)
- 8.
9. Özeyi sterilize ediniz.
10. Ekim yaptığınız kültür plaklarını bir gece 35-37°C 'de bir gece inkübe ediniz.
11. Ertesi gün kültürleri inceleyiniz (inkübasyon süresi ve koşulları mikroorganizmalar arasında farklılık gösterir)

2. BAKTERİLERİN İDENTİFİKASYONU

Laboratuvar: ANK-215

ÖĞRENİM ÇIKTISI
Klinik mikrobiyoloji laboratuvarında yaygın olarak kullanılan seçici ve ayırt edici besiyerlerini ve bakterilerin ayırt edilmesini sağlayan karakteristik üreme özelliklerini tanımlayabilir
Bakterilerin tanımlanmasında kullanılan biyokimyasal testleri sayabilir ve bu testlerin sonuçlarını yorumlayabilir

Uygulamalar:

- 1-Gram pozitif ve negatif bakterilere ait hazır preparatların incelenmesi
- 2-Agar besiyerinde bakteri kolonilerinin incelenmesi
- 3-Katalaz ve Koagülaz testleri
- 4-Oksidaz testi
- 5-Daha önce ekilmiş TSI seti değerlendirmesi

A. GRAM POZİTİF BAKTERİLER

A.1-GRAM POZİTİF KOKLARIN İDENTİFİKASYONU

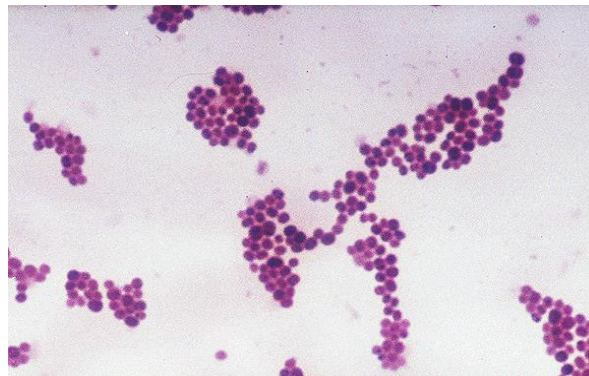
Gram pozitif koklar çok çeşitlidir doğada yaygın olarak bulunurlar. Klinik örneklerden izole edilen aerobik veya fakültatif anaerobik Gram pozitif kokların çoğu *Staphylococcus*, *Streptococcus*, ve *Enterococcus* cinsleri içerisinde yer alır.

Stafilokoklar

Stafilokoklar Gram pozitif, kok morfolojisinde, 0.5-1.5 µm çapında, hareketsiz, fakültatif anaerop, yüksek tuz konsantrasyonu (örneğin %10 sodyum klorür) içeren ortamlarda, 18-40°C'de üreyebilirler. Stafilokoklar genellikle deri ve mukozalarda bulunur.

Mikroskopi: Mikroskopta incelendiklerinde tek tek, ikili veya dördü gruplar oluşturmuş şekilde veya kısa zincirler halinde görülebilmekle birlikte sıklıkla üzüm salkımı şeklinde kümeler oluşturdukları gözlenir (Şekil- 1).

Kültür: Seçici olmayan besiyerlerinde büyük, beyaz veya altın sarısı pigmentli, S tipi koloniler yaparak 24 saat içinde hızla üremektedir (Şekil-2). Bazı türler (örn. *S. aureus*) hemolizin üretir ve kanlı agarda hemoliz özellikleri gözlenebilir (şekil 3). Yüksek tuz konsantrasyonlarını tolere edebildiklerinden %7.5 oranında NaCl içeren mannitol tuz agar (Mannitol Salt Agar: MSA) stafilokoklar için kullanılabilen seçici-ayırt edici besiyeridir.



Şekil 1. Gram pozitif koklar (X1000)



Şekil 2. *S.aureus* 'un altın sarısı pigmente sahip kolonileri (sol), ve koagülaz negatif bir stafilokok türünün oluşturduğu pigmentsiz (beyaz) koloni (sağ)

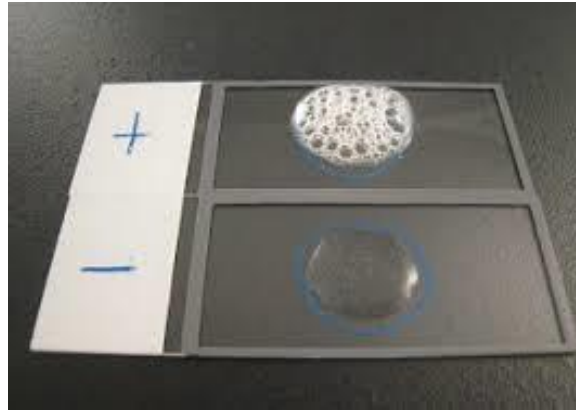


Şekil 3. *Staphylococcus aureus* 'un beta hemolitik kolonileri

İdentifikasyon testleri: Stafilokokların cins ve tür düzeyinde ayrımının yapılması için sık kullanılan testler aşağıda sıralanmıştır.

Katalaz testi: Katalaz enzimi hidrojen peroksitin (H_2O_2) katalaz enzimi tarafından su ve oksijene parçalanmasını sağlayan enzimdir. Stafilokoklar katalaz enzimi oluşturur ve bu özellikleri sayesinde streptokok ve enterokoklardan ayırt edilirler.

Prosedür: Temiz bir lam üzerine birkaç damla %3'lük H_2O_2 damlatılır. Koloniden öze yardımıyla bir miktar alınarak %3'lük H_2O_2 ile karıştırılır. Hava kabarcıklarının oluşması testin pozitifliği şeklinde yorumlanır. Hava kabarcıklarının olmaması negatif sonucu gösterir (Şekil-4).



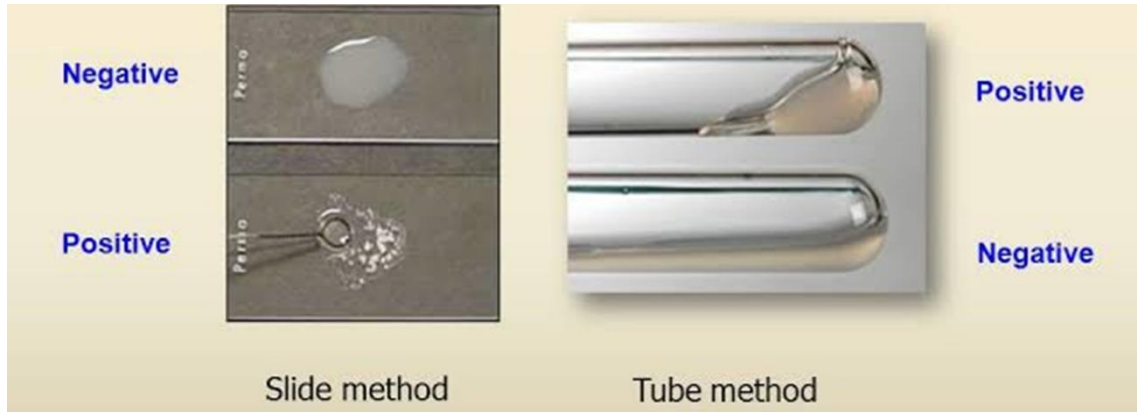
Şekil 4. Katalaz testi. Negatif (alt) ve pozitif (üst) reaksiyon

Koagülaz testi: Koagülaz, fibrinojeni fibrin oluşturmak üzere aktive ederek pıhtı gelişimine neden olan termostabil trombin-benzeri bir enzimdir. *S.aures*'u diğer stafilokok türlerinden ayırt etmede kullanılır. Bu enzim hücre tarafından ortama salındığı için "serbest koagülaz" olarak da bilinmektedir ve üretimi bir test tüpünde stafilokok inoküle edilmiş plazmanın pıhtılaşması ile gösterilebilir. *S. aureus*'un hücre duvarında ayrıca "bağlı koagülaz" veya "kümelenme (clumping) faktörü" olarak adlandırılan bir fibrinojen bağlayıcı yüzey reseptörü de bulunur. Bu faktörü taşıyan organizmalar doğrudan plazmanın fibrinojeni ile etkileşerek küme oluşturabildiğinden, lam testi ile gözlenebilir. Özetle; **bağlı koagülaz lam testinde** bakterinin aglütinasyonu şeklinde, **serbest koagülaz ise tüp testinde** pıhtı oluşumu şeklinde tespit edilebilir.

Kümelenme faktörü *S.aureus*'un bazı kökenlerinde olmayabileceğinden lam testi ile negatif sonuç elde edilebilir. Bazen de kümelenme faktörü kapsül polisakkaritleri tarafından maskelenebilmektedir. Bu nedenlerle lam testinin negatif sonuç vermesi halinde doğrulama için tüp testine başvurulması gerekir.

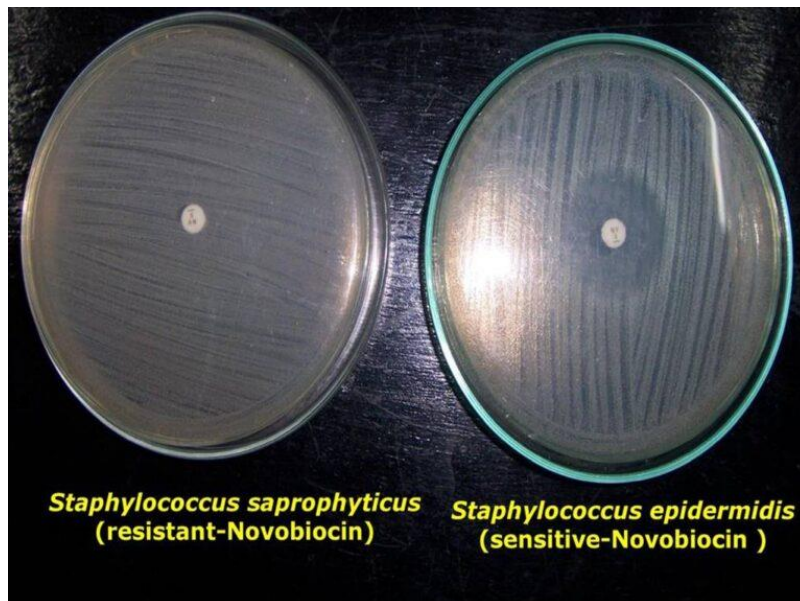
Prosedür -1 tüp testi: Tüp deneyi için 0.5-1 ml EDTA'lı tavşan plazması kullanılır. Plazma, taze buyyon kültürü veya katı besiyerinden alınan koloniler ile karıştırılır. Etüvde 37 °C'de 4 saate kadar bekletilir ve saat başı inceleme yapılır. Eğer plazmada bir değişiklik yoksa gecikmiş koagülaz aktivitesi olasılığı için 22-25°C'de 24 saat inkübasyonun ardından tekrar değerlendirme yapılır.

Prosedür- 2 lam testi: Temiz bir lamın bir tarafına küçük bir damla (10-15 µL) distile su (veya fizyolojik tuzlu su) diğer tarafına ise küçük bir damla (10-15 µL) EDTA'lı tavşan plazması konur. Bir öze ile test edilecek koloniden alınır; lamın üzerindeki sırasıyla su ve plazma ile nazikçe karıştırılır. Plazma içeren damlada hemen 10 saniye içinde gözle görülür bir kümelenme olup olmadığı incelenir. Su veya tuzlu su damlası negatif kontrol olarak kullanılır (bazı organizmalar otoagglütinasyona uğrar veya homojen bir şekilde emülsifiye edilemediklerinden yalancı pozitif sonuçlara neden olabilmektedir).



Şekil 5. Tüpte ve lamda koagülaz testinin pozitif ve negatif sonuçları

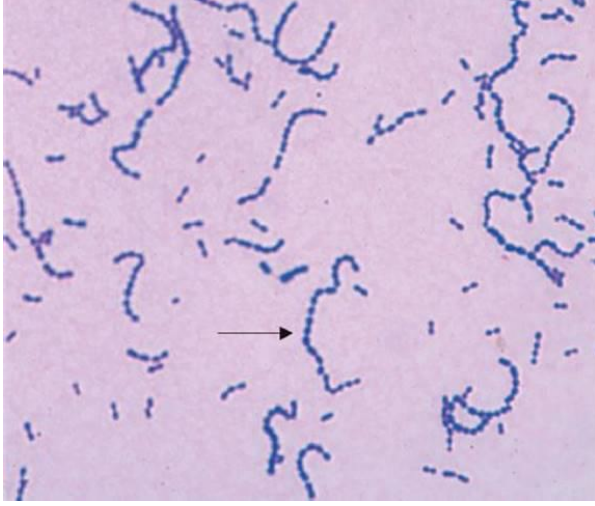
Koagülaz negatif stafilokok türlerinin konvansiyonel yöntemlerle tanımlanmasında çok çeşitli biyokimyasal testlerden yararlanır (ornitin dekarboksilaz testi, üreaz üretimi, aseton üretimi ve karbonhidrat fermentasyon testleri gibi). *S. saprophyticus*'un tahmini tanısında novobiyosin duyarlılığı araştırılır. Novobiyosine dirençli çeşitli stafilokok türleri mevcut olmakla birlikte insan infeksiyonlarından *S. saprophyticus* haricinde novobiyosine dirençli suşlar çok nadiren izole edildiğinden bu suşlar *S. saprophyticus* olarak kabul edilebilir (Şekil-6).



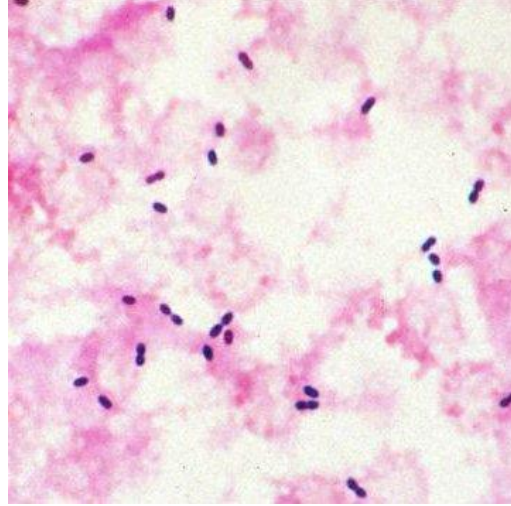
Şekil 6. Novobiyosin dirençli (sol) ve duyarlı (sağ) KNS.

Streptokok ve enterokoklar

İnsanlarda infeksiyonlara sebep olan katalaz enzimi oluşturmeyen başlıca Gram pozitif koklar streptokok ve enterokok türünden bakterilerdir. Çoğu tür fakültatif anaeroptur ve bazı türler üremek için ortamda CO₂ varlığına ihtiyaç duyarlar. Streptokokların besinsel gereksinimleri komplekstir ve izolasyonlarında sıklıkla kan ve serum ile zenginleştirilmiş besiyerleri kullanılır. Enterokoklar çevresel koşullara dayanıklıdır, ve basit besiyerinde ürerler, safra (%40) ve yüksek konsantrasyonda tuz (%6.5) varlığında bile üreyebilirler.



Şekil 7. Streptokokların mikroskobik görüntüsü



Şekil 8. *S.pneumoniae* 'nin mikroskobik görüntüsü



Figure 9. Beta (left), alpha (middle) and gamma (right) hemolysis

İdentifikasyon testleri:

Katalaz testi: Katalaz enzimi hidrojen peroksitin (H₂O₂) katalaz enzimi tarafından su ve oksijene parçalanmasını sağlayan enzimdir. Streptokoklar ve enterokoklar katalaz enzimi oluşturmaz ve bu özellikleri sayesinde stafilokoklardan ayırt edilirler.

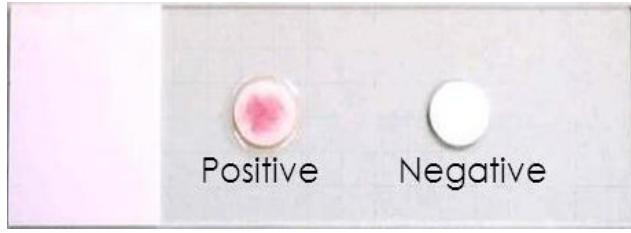
Streptokok türlerinin tanımlanmasında seçilecek identifikasyon testleri alfa, beta veya gama hemoliz oluşturmalarına göre belirlenir.

Pirolidonil-beta-naftilamid (PYR) Hidrolizi Testi (Şekil -10): *S. pyogenes*' in diğer beta hemolitik Streptokoklardan ayırt edilmesinde kullanılan bu test, bakteride PYR'yi hidrolize eden enzimin varlığının araştırılmasını temel almaktadır. PYR, pirolidonil peptidaz enzimi aracılığıyla beta-naftilamidin ürününe hidroliz olur ve ilgili reaktif (sinnamaldehit) eklendiğinde kırmızı renk alır.

S. pyogenes dışında enterokokların, bazı hayvan kaynaklı streptokok türlerinin ve diğer bazı bakteri türlerinin de PYR testinin pozitif olduğu unutulmamalıdır.

Basitrasin Duyarlılık Testi (Şekil-11): *S. pyogenes*, diğer beta hemolitik Streptokoklardan farklı olarak basitrasine duyarlılık gösterir.

Prosedür: *S. pyogenes* olabileceğinden şüphelenilen bakteriden 3-4 koloni alınarak kanlı agara pasajlanır. Daha sonra 0.04 U Basitrasin diski plağa yerleştirilir. 35°C' de %5 CO₂' li ortamda bir gece inkübe edilir. Diskin etrafında herhangi bir inhibisyon zonunun varlığı, test edilen bakterinin basitrasine duyarlı olduğunu düşündürür.



Şekil 10. PYR testi. Pozitif (sol), negatif (sağ) sonuç



Şekil 11. Basitrasin testi. İnhibisyon zonu oluşması duyarlılığı gösterir.

Christie Atkins Munch Peterson (CAMP) Testi (Şekil 12): Sıklıkla *S. agalactiae*'nın diğer beta hemolitik streptokoklardan ayırt edilmesi için yapılan bu test *S. aureus*' un yaptığı hemolizin *S. agalactiae* (ve diğer bazı bakteri) suşlarının oluşturduğu CAMP faktörü (diffuze olabilen bir ekstraselüler protein) tarafından artırılması esasına dayanmaktadır (sinerjik lizis).

Prosedür: Test edilecek suş ve *S. aureus* suşu kanlı agara 90° açıyla çizgi olarak ekilir. 36±1°C' de bir gece inkübe edilir. *S. aureus* beta hemolizini ve CAMP faktörü diffüzyon bölgesinde üçgen şeklinde artmış hemoliz görülmesi CAMP testinin pozitifliği şeklinde yorumlanır.



Şekil 12. CAMP testi.

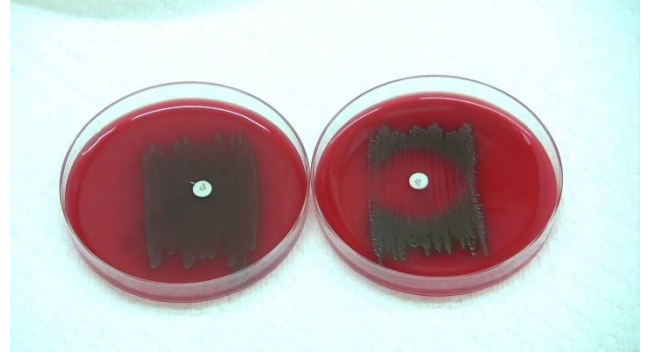
Alfa hemolitik streptokokların tanımlanması

Optokin Duyarlılık Testi: Bu test *S. pneumoniae*' nin diğer alfa hemolitik streptokoklardan ayırt edilmesinde kullanılır. *S. pneumoniae*'nin çoğu suşu optokine duyarlılık gösterirken viridans streptokoklar dirençlidir. Bununla birlikte optokine duyarlı *S. mitis* ve optokine dirençli *S. pneumoniae* suşlarının da olabileceği unutulmamalıdır.

Prosedür: Test edilecek mikroorganizmanın kültüründen birkaç koloni kanlı agara pasajlanır ve 5 µg optokin içeren disk üzerine yerleştirilir. Plak 35°C' de %5 CO₂' li ortamda bir gece inkübe edilir. *S. pneumoniae* suşlarında diskin (6 mm lik) etrafında ≥ 14 mm inhibisyon zonu oluşur. İnhibisyon zonu çapının 8-14 mm arasında olması suşun orta duyarlı olduğunu gösterir (belirsiz sonuç). Bu durumda suşun pnömokok olup olmadığının belirlenmesi için safrada erime testi uygulanmalıdır.

Safrada erime testi: Safrada (sodyum dezoksikolat) erime özelliği *S. pneumonia*'yı diğer α-hemolitik streptokokların tamamından ayırır. Optokine duyarlılığı azalmış suşların identifikasyonunda yararlıdır. Safra tuzlarının pnömokok hücrelerinde bulunan otolitik enzimleri (amidaz) aktive ettiği, böylece hücrelerin lizisini tetiklediği düşünülmektedir.

Şekil 13. Optokin duyarlılığı testi. Optokin dirençli (sol) ve optokin duyarlı (sağ) alfa hemolitik streptokok

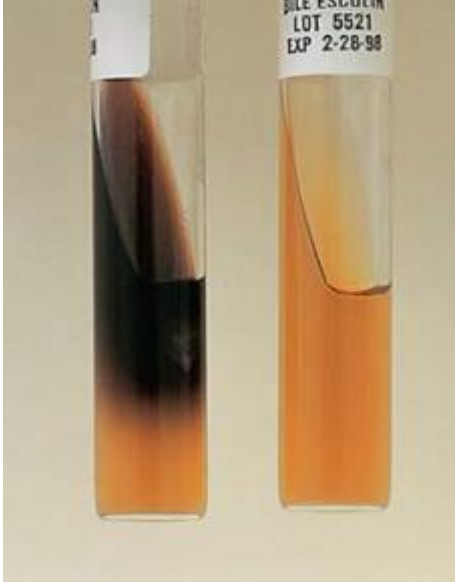


Enterokoklar ve D grubu streptokokların tanımlanması

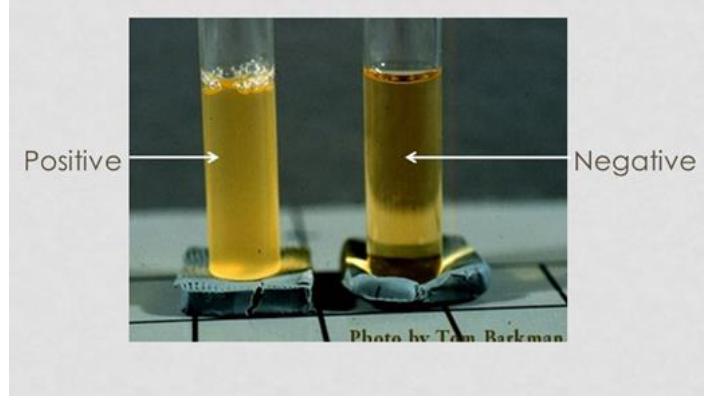
Safra Eskülin Testi: Safra eskülin agar, *Enterococcus* ve grup D Streptokok (*Streptococcus bovis*) türlerini diğer Streptokoklardan ayırt etmek amacıyla kullanılan seçici ve ayırıcı bir besiyeridir. Besiyerinde mevcut olan safra, *Enterococcus* ve grup D Streptokoklar dışındaki streptokokları ve diğer gram pozitif kokların üremesini baskılamaktadır. Besiyerinde mevcut olan eskülin ise söz konusu mikroorganizma tarafından hidrolize edilerek eskületin ve dekstroza ayrıştırılır. Eskületin besiyerinde kullanılan demir tuzu ile etkileşerek siyah-kahve renk oluşumuna neden olmaktadır.

Prosedür: Şüphelenilen koloniler safra eskülin agara pasajlanıp uygun koşullarda inkübe edildikten sonra siyah-kahve renk oluşturan kolonilerin gözlenmesi bakterinin safıralı ortamda üreyebildiği, eskülini hidroliz etme yeteneği olduğu, *Enterococcus* veya grup D Streptokok (*Streptococcus bovis*) olabileceği şeklinde yorumlanır.

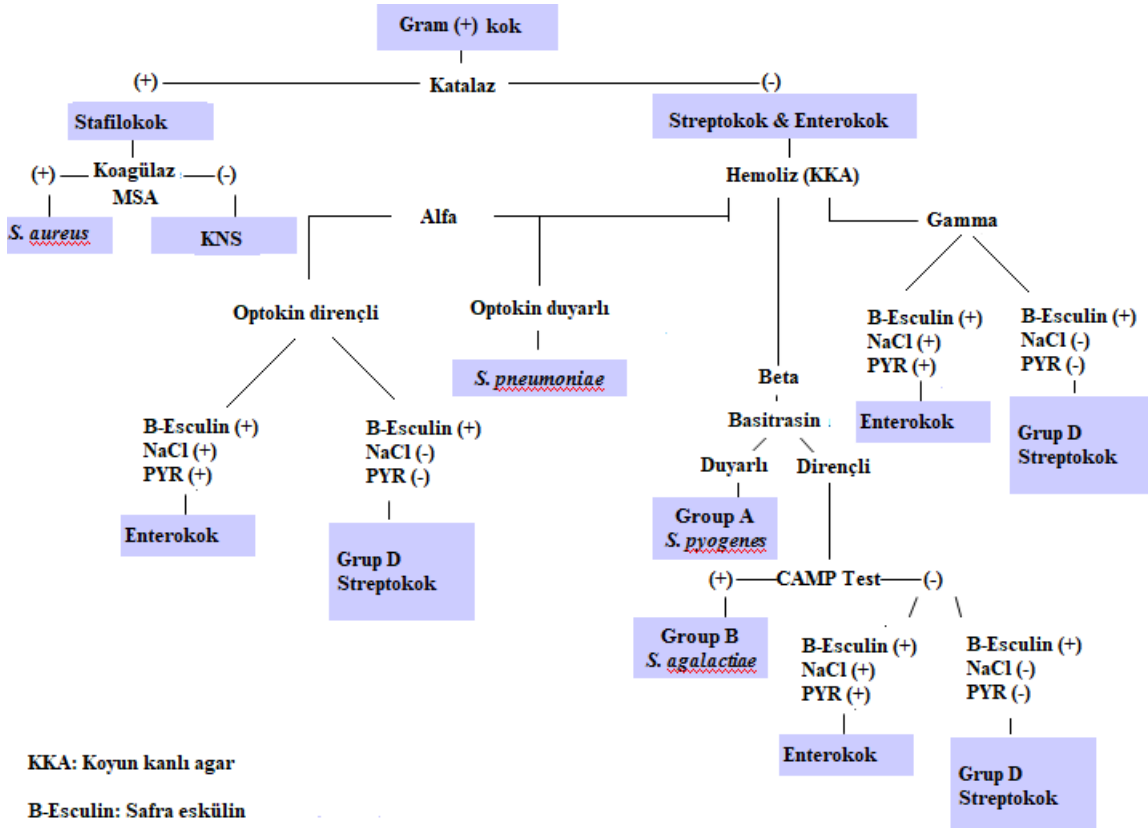
Enterokokların grup D Streptokoklardan ayırımında **PYR** ve **tuz tolerans** testinden yararlanır, her iki test de enterokok suşlarında pozitif, D grubu streptokoklarda ise negatiftir.



Şekil 14. Safra-eskülin testi. Pozitif (sol) ve negatif (sağ) sonuç.



Şekil 15. Tuz tolerans testi. 6.5% NaCl içeren besiyerinde üreyebilme pozitif (sol) olarak yorumlanır, eğer üreme gözlenmezse test sonucu negatiftir (sağ)



Şekil 26. Gram pozitif kokların identifikasyon şeması

B. GRAM NEGATİF BAKTERİLER

B.1. Gram Negatif Basillerin İdentifikasyonu

B.1.1. Enterobacteriaceae

Enterobacteriaceae ailesi doğada, toprak, su ve bitkilerde yaygın olarak bulunan aynı zamanda insan ve hayvanların gastrointestinal sisteminde kommensal olarak barınabilen geniş bir gram negatif çomak ailesidir. Bu ailenin üyeleri fakültatif anaerop, spor oluşturmeyen, glikozu fermente edebilen, katalaz enzimi üreten, oksidaz negatif bakterilerdir. Barsak ve barsak dışı infeksiyonlardan izole edilebilmektedir.

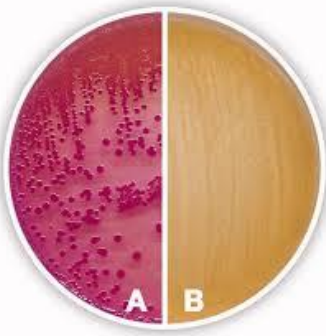
Üreme Özellikleri

Enterobacteriaceae üyeleri birçok besiyerinde 35 C'de 24 saat içerisinde ürer. Koyun kanlı agarda büyük, beyaz veya grimsi, konveks koloniler meydana getirirler, bazı türler hemoliz yapabilir. İzole edilen türe bağlı olarak mukoid koloniler oluşturması (örn. kapsüllü *Klebsiella* suşları), yayılma hareketi gözlenmesi (*Proteus* türleri) ve metalik refle vermesi (EMB agarda *E.coli*) gibi tipik özelliklerinden tanımlamada yararlanılır.

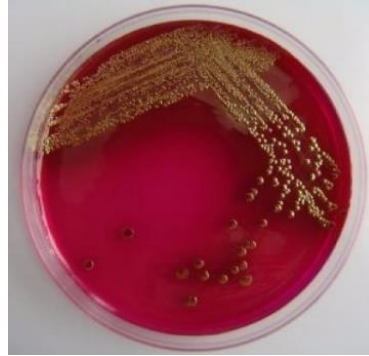
MacConkey agarda; besiyeri içeriğinde bulunan laktozu kullananlar (Laktoz +) pembe koloniler (*E.coli*), kullanmayanlar (laktoz -) şeffaf-sarımsı koloniler (*Salmonella*) meydana getirir (Şekil 17).

EMB agarda; *E.coli* metalik refle meydana getirir (Şekil 18).

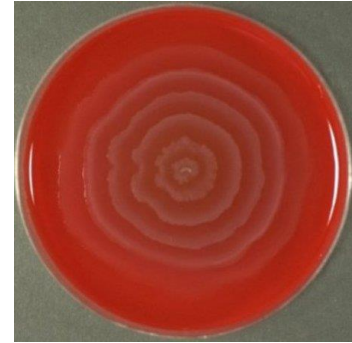
Proteus besiyeri yüzeyinde yayılma (swarming) hareketi yaparak ürer (Şekil 19).



Şekil 17: MacConkey besiyerinde **A:** Laktoz (+). **B:** Laktoz (-)



Şekil 18: EMB agarda refle oluşturan *E.coli*.



Şekil 19: *Proteus* yayılma (swarming) hareketi

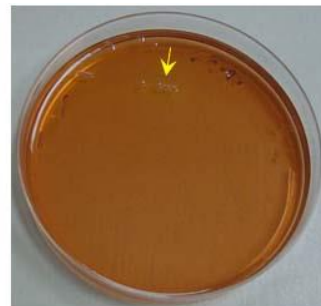
Salmonella-Shigella agarda (SS agar); *Salmonella* ortası siyah renkli koloniler meydana getirirken, *Shigella* şeffaf koloniler yapar.



Escherichia coli



Salmonella



Shigella

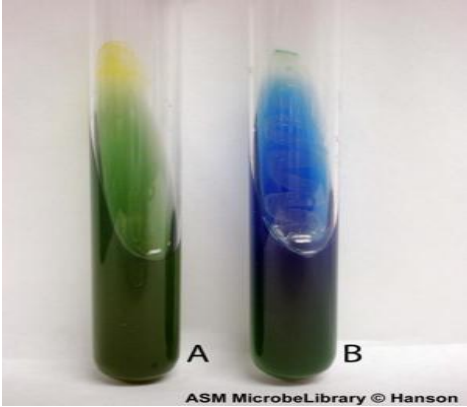
Şekil 20. SS agarda farklı enterik bakterilerin yaptığı koloniler

Biyokimyasal testler

Bu ailedeki bakterilerin tanımlanmasında karbonhidrat aktivitelerini belirleyen birtakım testler kullanılır. **TSI (Triple Sugar Iron: Üç şekerli demirli) besiyeri, hareket özelliği, IMVIC (İndol, Metil kırmızısı, Voges-Proskauer, Sitrat)** biyokimyasal testlerinden yararlanılmaktadır.

1-Sitrat besiyeri

Bakterilerin tek karbon kaynağı olarak sitratı kullanma yeteneklerinin değerlendirilmesi amacıyla yapılır. Besiyerinde tek karbon kaynağı olarak sitrat ve pH indikatörü boya olarak bromtimol mavisi (nötr pH: yeşil, alkali pH mavi) yer alır. Bakteri sitratı kullanıyorsa besiyerinde üreyip rengin maviye dönüşmesine sebep olur (Şekil 21).



Şekil 21: Sitrat testi. **A:** Negatif sitrat testi. **B:** Pozitif sitrat testi

2-TSI (Triple Sugar Iron) Testi:

Bakterinin glukoz, laktoz ve sukrozu fermentatif olarak kullanıp kullanmadığını ve hidrojen sülfür (H_2S) oluşturup oluşturmadığını belirlemek için kullanılır. Besiyeri içindeki fenol kırmızısı pH indikatörü, demir sülfat ise H_2S gazının ayırıcı olarak işlev görür. Karbonhidratların fermentasyonu sonucu oluşan asidik ürünler besiyerinin pH'sının azalmasına ve renginin değişmesine (kırmızıdan sarıya) neden olur. Besiyerinde karbohidrat olarak glukoz, laktoz ve sukroz yer almaktadır (glukoz miktarı laktoz ve sukroz miktarının 10'da biri kadardır). Fermentasyon sonucu organik asitler oluşur ve fenol kırmızısının rengi sarıya dönüşür. Bakteriler aynı zamanda, parçaladıkları proteinlerden alkali ürünler oluştururlar. Bu reaksiyonlar oksijen açısından bol olan yatık kısımda gerçekleşir. Nötr pH da besiyeri kırmızıdır, hafif alkali pH'da besiyerinin rengi pembemsi kırmızıya döner.

Değerlendirme:

Dip sarı & yatık kırmızı: Glukoz ferm. (+); Laktoz/sukroz ferm. (-); H_2S (-)

Dip sarı & yatık sarı: Glukoz ferm. (+); Laktoz/sukroz ferm. (+); H_2S (-)

Dip kırmızı & yatık kırmızı: Non fermentatif bakteri

Dip siyah & yatık kırmızı: Glukoz ferm. (+); Laktoz/sukroz ferm. (-); H_2S (+)

Dip siyah & yatık sarı: Glukoz ferm. (+); Laktoz/sukroz ferm. (+); H_2S (+)

*Gaz oluşumu varsa besiyeri içinde hava kabarcıkları oluşur ya da besiyerinde parçalanmalar meydana gelir.



Şekil 22: TSI besiyerine farklı bakterilerin ekilmesi ile oluşan çeşitli reaksiyonlar

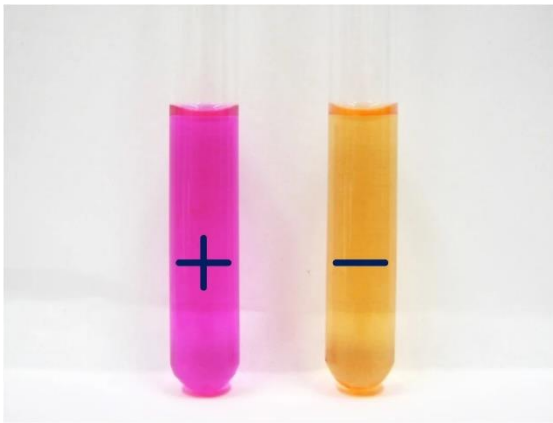
3-Üre agarda üreaz enziminin saptanması

Bakterilerin üreyi hidrolize etme yeteneklerini araştırmak için kullanılır. Üre hidrolizi sonucunda ortaya çıkan amonyak besiyeri renginin sarıdan pembeye dönmesini sağlar (Şekil 23).

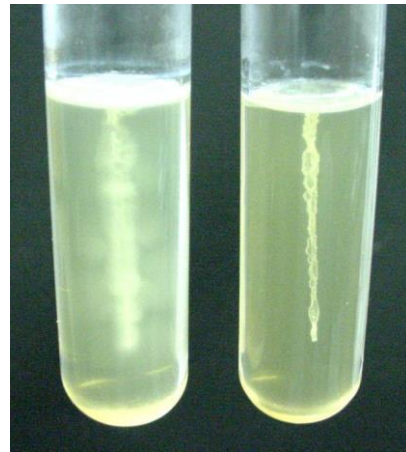
4-Hareket Testi

Bakterilerin hareketli olup olmadığını belirlemek amacıyla yarı katı besiyeri (%0,3-0,5 agar) kullanılır (Şekil 24).

Değerlendirme: Bakterinin sadece ekim hattı boyunca üremesi o bakterinin hareketsiz olduğunu gösterir. Eğer üreme ekim çizgisi dışına doğru etrafa yayılan bir biçimde meydana gelmiş ve besiyerinde bulanıklaşma oluşmuş ise bakteri hareketli olarak yorumlanır.



Şekil 23. Üreaz testi. Pozitif sonuç (sol) negatif sonuç (sağ).



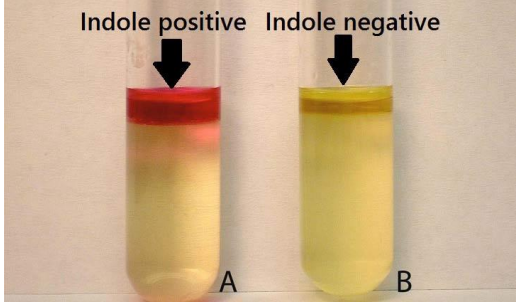
Şekil 24. Hareket testi. Pozitif sonuç [hareketli bakteri] (sol), negatif sonuç [hareketsiz bakteri] (sağ).

5-İndol Testi

Triptofanaz enziminin varlığını tespit eder. Bu enzime sahip bakteriler triptofandan zengin besiyerlerinde ürerken triptofanı hidrolize eder ve yıkım ürünlerinden biri olan indolün açığa çıkmasına

neden olurlar. İndol testi, açığa çıkan indolün bazı aldehitlerle birleştiğinde renkli bir bileşik meydana getirmesi prensibine dayanır.

Değerlendirme: İnkübasyon tamamlandıktan sonra, birkaç damla Kovacs (paradimethylaminobenzaldehyde) ayırıcı damlatılır. Eğer bakteri triptofanaz enzimine sahipse, besiyerinin üst kısmında kırmızı bir halka oluşur ve test bu indol (+) olarak değerlendirilir. Eğer besiyeri yüzeyinde herhangi bir renk değişimi gözlemlenmezse, indol (-) olarak değerlendirilir (Bu test *E.coli* için pozitif, *Klebsiella* için negatiftir) (Şekil 25).



Şekil 25: İndol testi.

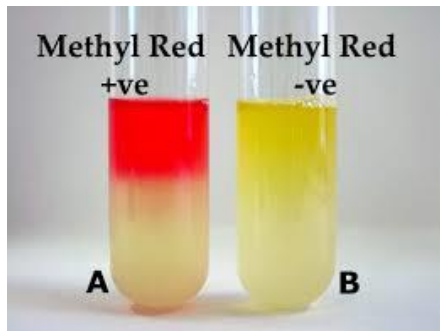
A: İndol pozitif. **B:** İndol negatif

6-Metil kırmızısı ve Voges Proskauer testi (MR-VP)

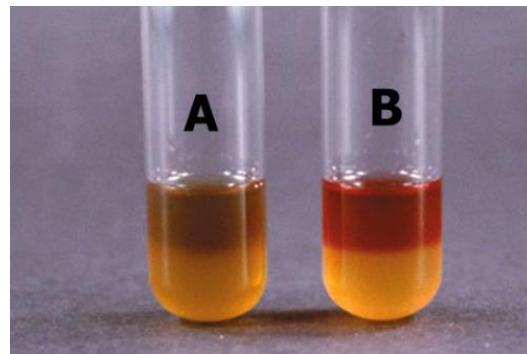
Glukoz fermentasyonu yapan bakterilerin, fermentasyon sonucunda güçlü asitler mi yoksa asetoin gibi nispeten nötral ürünler mi ürettiğini saptamak için kullanılır. Her iki test için de aynı besiyeri kullanılır. Glukoz içeren sıvı bir besiyeridir. Ayıraç olarak MR için metil kırmızısı VP için KOH ve alfa naftol kullanılır.

Değerlendirme: İnkübasyon sonunda besiyerlerinden birine metil kırmızısı ayırıcından birkaç damla damlatılır. Eğer bakteri glukoz fermentasyonu sonucunda karışık asitler oluşturmuşsa besiyeri pH'sı asitleşir ($pH < 4.5$) ve besiyerinin üst kısmında, ayırıcın temas ettiği kısımda kırmızı bir halka meydana gelir. Bu durum MR (+) olarak değerlendirilir (Şekil 26).

Diğer besiyerine 2 damla KOH ve 6 damla alfa naftol damlatılır. Glukoz fermentasyonu sonucunda asetoin meydana gelmişse 10-15 dk içinde üst kısımda kırmızı halka oluşumu gözlenir. Bu durum VP (+) olarak değerlendirilir (Şekil 27).



Şekil 26. Metil kırmızısı (MR) Testi. Pozitif (sol), negatif (sağ) sonuç



Şekil 27. Voges Proskauer (VP) Testi. Pozitif (sağ), negatif (sol) sonuç

B.1.2. Nonfermentatif bakteriler

Nonfermentatif bakteriler karbonhidratları fermente etmeyen mikroorganizmalardır. Karbonhidratları oksidatif yolla kullanabilen bakteriler olduğu gibi asakkarolitik türler de bulunmaktadır. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*, gibi cinsler tıbbi mikrobiyolojin laboratuvarında izole edilen nonfermentatif gram negatif çomaklardır. Bu bakteriler çevrede ve insanların deri ve mukozalarında bulunabilen fırsatçı patojenlerdir.

Nonfermentatif bakterilerin konvansiyonel yöntemlerle identifikasyonunda sık kullanılan testler arasında oksidaz, hareket, amino asit parçalama ve dekarboksilaz testleri (örn lizin dekarboksilaz), Dnaz ve oksidasyon fermentasyon testleri yer almaktadır.

Oksidaz testi: Oksidaz testi sitokrom oksidaz enziminin gösterilmesi amacıyla kullanılır. Bazı bakteriler, demir içeren bir hemoprotein olan sitokrom oksidaz veya indofenol oksidaza sahiptirler. Bu enzimler NADH gibi verici bileşiklerden bir elektron alıcısına (genellikle oksijene) elektron taşınmasını katalize ederler. Non-fermentatif bakterilerden *Pseudomonas* cinsi oksidaz enzimine sahip iken *Stenotrophomonas* ve *Acinetobacter* türleri bu enzimi taşımaz.

Prosedür: Oksidaz testi (Şekil 28) çok çeşitli yöntemler ile yapılabilir. Filtre kağıdında yapılan test için oksidaz ayırıcından (%1'lik dimetil para fenilen diamin dihidroklorür ya da tetrametil para fenilendiamin dihidroklorür) filtre kağıdına birkaç damla damlatılıp üzerine öze ile birkaç koloni sürülür. 10 saniye içinde koyu mor renk görülürse test pozitifdir. Renk değişmiyorsa oksidaz testi negatiftir.



Şekil 28. Oksidaz testi. Pozitif (sol), negatif (sağ) sonuç.

DNaz (deoksiribonükleaz) deneyi: Deoksiribonükleik asiti (DNA) parçalama özelliği olan DNaz enzimi içeren bakteriler DNA içeren besiyerinde onu parçalayıp oligonükleotidler oluştururlar. Bu test ile *Stenotrophomonas* türleri DNaz pozitifdir.



Şekil 29. DNaz testi. Koloninin etrafında şeffaf zon oluşması pozitif reaksiyon olarak yorumlanır.

Hareket testi: Bkz. enterik Gram negatif basillerin laboratuvar tanısı-Hareket testi. Hareket testi yarı katı besiyeri kullanılarak belirlenecek ise nonfermentatif bakterilerin besiyerinin sadece yüzeye yakın kısımda üreyebilecekleri ve bu nedenle testin değerlendirilmesinde güçlük yaşanabileceği göz önünde bulundurulurken besiyerine tetrazolyum eklenmesi faydalı olacaktır. *Pseudomonas* ve *Stenotrophomonas* türleri hareketlidir.

Diğer kriterler: Tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarında izole edilen non fermentatif Gram negatif çomakların başında *Pseudomonas aeruginosa* gelir. Yukarıda bahsedilen özelliklerin haricinde *Pseudomonas aeruginosa* oluşturduğu mavi-yeşil pigmenti (Şekil 30) ve meyve (üzüm)-sabun kokusu ile diğer bakterilerden ayırt edilir. Bu tür aynı zamanda 42 °C'de üreyebilmektedir.



Şekil 30: Piyosiyenin üreten *Pseudomonas aeruginosa*

Tablo1: Klinik materyallerden etken olarak yaygın izole edilen gram negatif basillerin identifikasyonu

	TSI reactions					Urease	İndol	MR	VP	Citrate	Motility
	Glucose	Lactose	Sucrose	Gas	H ₂ S						
E.coli A/A*	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+
Klebsiella A/A	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-
Salmonella A/ALK** (H ₂ S)	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
Shigella A/ALK	+	-	-	-	-	-	+/-	+	-	-	-
Proteus A/ALK (H ₂ S)	+	-	-	+/-	+	+	+	+	-	-/+	+
Pseudomonas ALK/ALK***	-	-	-	-	-	V	V	V	-	-	+

* TSI reactions: A/A: acid deep/ acid slant

**TSI reactions: A/ALK: acid deep/ alkaline slant

***TSI reaction: ALK/ALK: alkaline deep/ alkaline slant (*Pseudomonas* use glucose oxidatively)

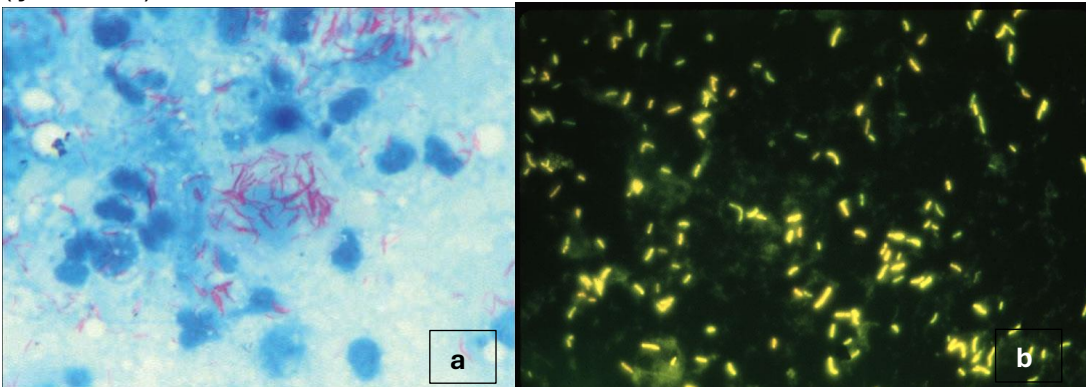
C. MİKOBAKTERİLER

Mikobakteriler yüksek oradan lipid (uzun zicirli mikolik asitler, serbest asitler vd) içeren eşsiz bir hücre duvarı yapısına sahiptir. Bu eşsiz hücre duvarı yapısı mikobakterilerin güçlü asitlere ve alkali solüsyonlara daha dayanıklı yapar (aside dirençli bakteri denilmesinin nedeni) ve Gram yöntemi ile boyanmaz aside dirençli boyama yöntemleri olarak adlandırılan özel yöntemler ile boyanırlar.

Mikroskopi

-EZN ile aside dirençli boyanırlar, mavi zemin üstünde ince kırmızı basiller (Şekil 31-a)

-Auramine Rodamin ile karanlık alan mikroskopunda sarı-yeşil floresan veren basiller (Şekil 31-b)



Şekil 31 (a). EZN ile boyanan mikobakteriler. **(b).** Auramine Rodamin ile boyanan mikobakteriler

Kültür

Klinik örnekten Mycobacterium türlerinin izole edilmesi altın standarttır. Kültürde mikobakterilerin üretilmesi için hasta örneklerinin mililitresinde 10-100 canlı basilin olması yeterlidir. Mikobakteriler yavaş ürediğinden kültür 6-8 haftaya kadar uzayabilmekte bu sebeple özel besiyerleri kullanılmaktadır. Mikobakterilerin üremesine imkan verirken hızlı üreyen kontaminant mikroorganizmaları baskılayan çeşitli besiyerleri bulunmaktadır. Katı besiyerleri agar temelli ve yumurta temelli olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Yumurta temelli besiyerleri arasında Löwenstein-Jensen, agar temelli besiyerlerinden Middlebrook 7H10 ve 7H11 birçok tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılmaktadır. Sıvı besiyerleri daha hızlı üreme sağlamaları açısından avantajlıdır. Sıvı kültür manuel olarak Middlebrook 7H9 besiyeri kullanılarak ya da otomatize sıvı kültür sistemleri (örn. BACTEC MGIT) ile yapılabilir. Mikobakterilerin izolasyon şansını optimize etmek için hem katı hem de sıvı kültür sistemlerinin bir arada kullanılması önerilmektedir.

Konvansiyonel olarak bu bakteriler üreme özellikleri (üreme hızı ve pigment oluşumu) ve bir dizi biyokimyasal test ile ayırt edilebilmektedir. Konvansiyonel fenotipik yöntemler (katalaz testi, niasin birikimi testi, nitrat redüksyonu testi, paranitro benzoik asit ile inhibisyon testi vd) ile identifikasyon uzun süre gerektirdiğinden, günümüzde sıklıkla immünokromatografik veya moleküler testler gibi hızlı yöntemler tercih edilmektedir.



Şekil 33. Löwenstein-Jensen



Şekil 34. Middlebrook besiyeri



Şekil 35. BACTEC-MGIT

BİYOLOJİK ETKENLER-SAVUNMA-ENFLAMASYON KURULU

3. DERMATOFİTLERİN ve BAZI FIRSATÇI MİKOZ ETKENİ MANTARLARIN İNCELENMESİ

Laboratuvar: ANK-215

ÖĞRENİM ÇIKTISI
Mantarların laboratuvar tanısında kullanılan spesifik mikrobiyolojik yaklaşımları ve testleri listeleyebilir.
Mikolojide yaygın kullanılan besiyeri ve boyaları sıralayabilir
Dermatofitlerin ve yaygın fırsatçı mikoz etkenlerinin mikroskopik morfolojilerini ayırt edebilir

A-Mantar Üretilmesinde Kullanılan Bazı Besiyerleri

1- Sabouraud Dekstroz Agar (SDA)

Enfeksiyon etkeni maya ve küf mantarlarının üretilmesinde kullanılan genel besiyeridir

- Mantarların ihtiyaç duyduğu karbohidratları yüksek düzeyde içerir
- Besiyerinin düşük pH'sı bakterilerin üremesini baskılar

2-Antibiyotikli SDA

Saprofit küflerin ve flora elmanı bakterilerin üremesini engellemek için besiyerine çeşitli antimikrobiyaller eklenerek hazırlanan SDA'dır.

3-Mısır Unlu Tween 80 Agar

Klamidospor üretimini artırmak için kullanılan besiyeridir. Klamidosporların biçimi ve sayısı bazı maya mantarlarının tür düzeyinde ayırımında kullanılmaktadır.

B-Mantarların İncelemesinde Kullanılan Bazı Boyalar ve Kimyasallar

1-Gram Boya

Mayaların mikroskopik olarak incelemesinde kullanılır. Mayalar Gram pozitif boyanırlar.

2-Laktofenol Pamuk Mavisi

Küf mantarlarının boyanmasında ve detaylı mikroskopik yapılarının incelenmesinde kullanılır.

Preparatlar x40'luk objektif ile (400'lük büyütme) incelenir

3-Çini Mürekkebi

Maya mantarlarının kapsül yapısını göstermek amacıyla kullanılır.

2-Potasyum Hidroksit (%10-20 KOH)

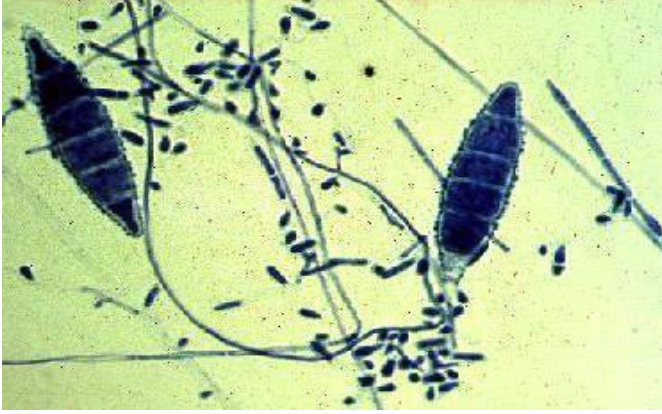
Keratini eriterek dokulardaki (saç, tırnak) etken mantarın gözlenmesine olanak sağlar

1. DERMATOFİTLER

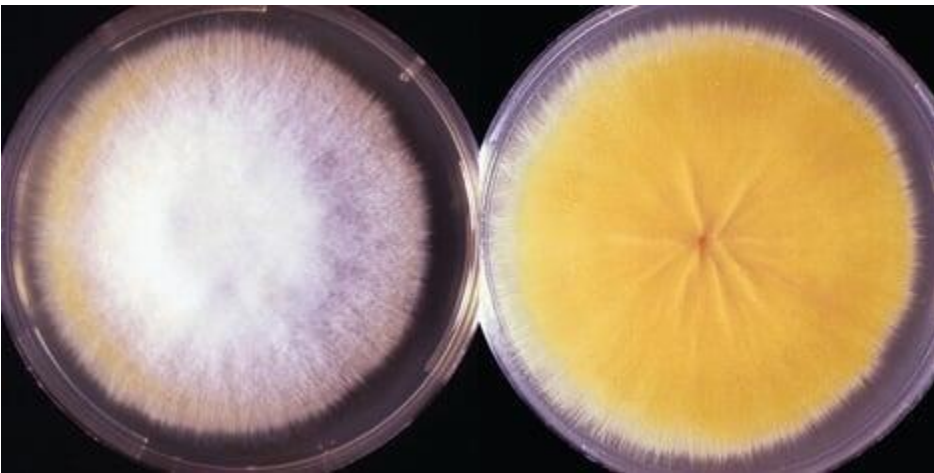
Microsporum, *Trichophyton* ve *Epidermophyton* saç, deri ve tırnakta enfeksiyon etkenidirler. Yaptıkları hastalıklar Dermatofitoz olarak adlandırılır.

1.1 *Microsporum* türleri

Saç ve deride enfeksiyon etkenidirler. Makroskopik olarak tüysü ya da pamuksu koloniler oluştururlar. İğ şeklinde (ya da mekik) makrokonidya ve daha az sayıda, oval veya elips şeklinde mikrokonidya oluştururlar.



Şekil 1. *Microsporum* makrokonidya ve mikrokonidyaları



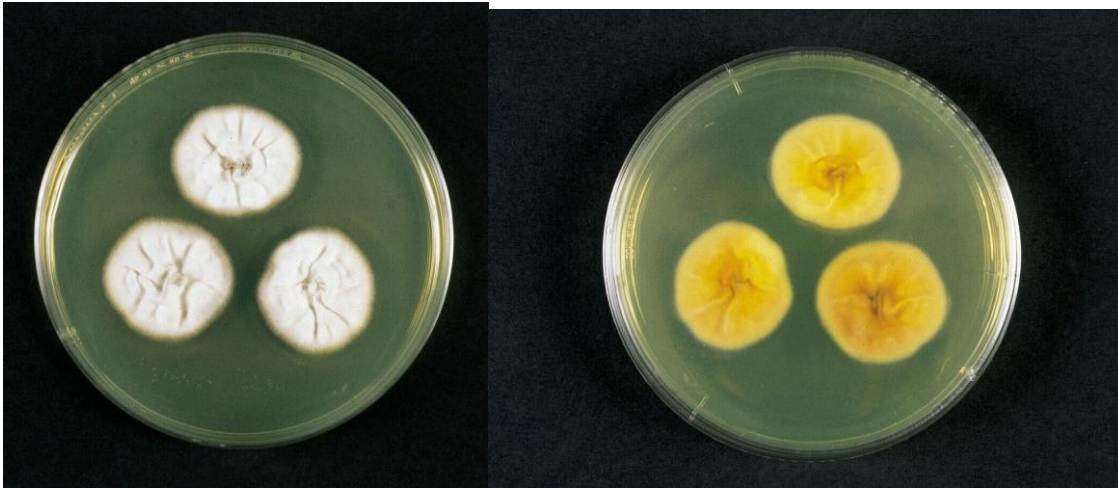
Şekil 2. *Microsporum* kolonisinin üstten ve alttan görünümü

1.2. *Epidermophyton* türleri

Deri ve tırnak enfeksiyonlarından izole edilirler. İnsanda enfeksiyon etkeni tek tür *E.floccosum*'dur. Makroskopik olarak kolonileri pudramsı veya pamuksu, süet benzeri bir dokuya sahiptir. Makrokonidyalari genelde muz ya da lobut şeklinde olup kümeler halinde bulunur, mikrokonidyalari yoktur.



Şekil 3. *Epidermophyton* makrokonidyalari



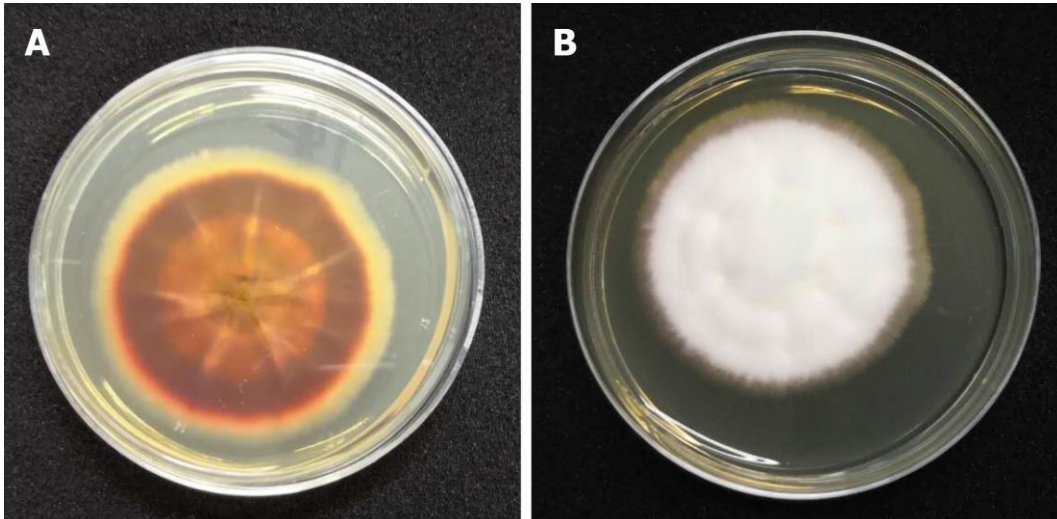
Şekil 4. *Epidermophyton* kolonisinin üstten ve alttan görünümü

1.3. *Trichophyton* türleri

Saç, deri, tırnakta enfeksiyon etkenidirler. Makroskopik olarak pamuksu veya kadifemsi koloniler oluştururlar. *T.rubrum*, petrinin arka yüzeyinden görülebilen kırmızı pigment oluşturur. Puro benzeri makrokonidya ve armut benzeri mikrokonidya oluştururlar.



Şekil 5. *Trichophyton* makrokonidya ve mikrokonidyaları



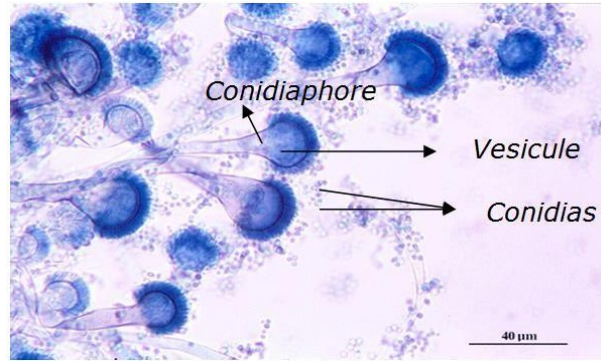
Şekil 6. *T.rubrum* kolonisinin üstten ve alttan görünümü

2. FIRSATÇI MİKOZ ETKENİ KÜF VE MAYA MANTARLARI

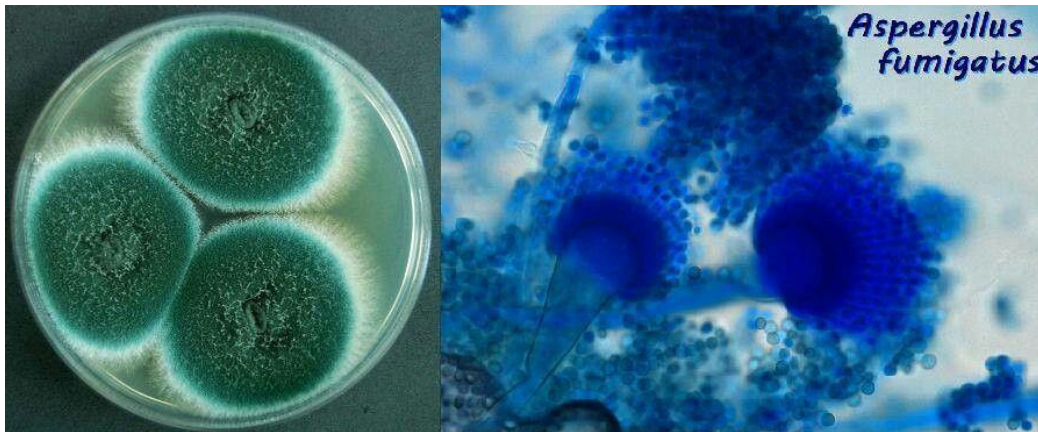
Fırsatçı mikoz etkeni mantarlar sadece bağışıklığı baskılanmış hastalarda enfeksiyon etkeni olarak bulunurlar. En yaygın izole edilen cinsler küf mantarlarından *Aspergillus* ve maya mantarlarından *Candida* cinsine ait türlerdir.

2.1. *Aspergillus* türleri

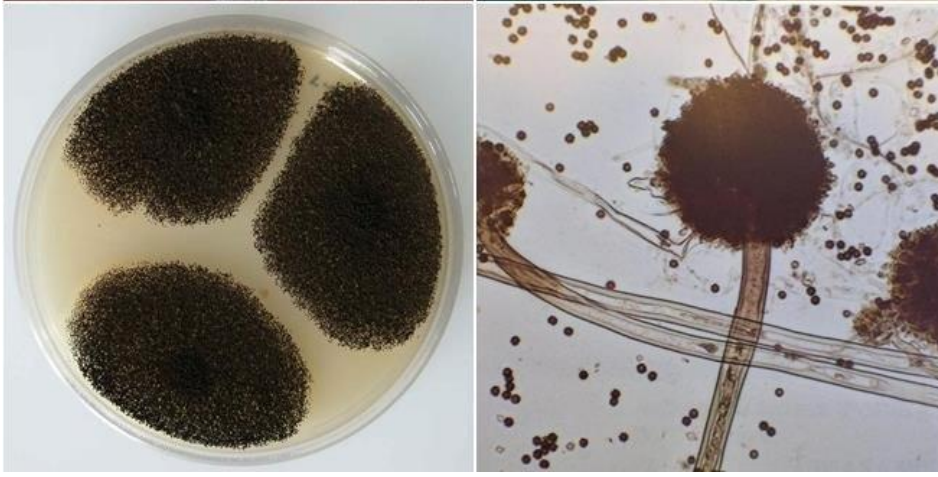
Aspergillus türleri doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Aspergilloz etkenidirler ve enfeksiyonlarından en sık izole edilen tür *A. fumigatus*'tur. 45°'lik açılarla (V şeklinde) dallanmış septalı hiflere sahiptirler ve bu tanımlama açısından kritik öneme sahip bir karakteristiktir. SDA'ya ekim sonrası 30-37°C'de bir hafta içinde ürer ve besiyerinde pamuksu- kadifemsi koloniler oluşturur. Makroskopik koloni morfolojileri mavi-yeşil, siyah, çimen yeşili gibi türe göre değişen renklere olabilir. Septalı hif, konidyofor, vezikül (topuz), fiyalid ve konidyum zincirlerinin mikroskopik olarak detaylı incelenmesinde laktofenol pamuk mavisi boyası kullanılır.



Şekil 7. *Aspergillus* konidyofor, vezikül ve konidya yapıları



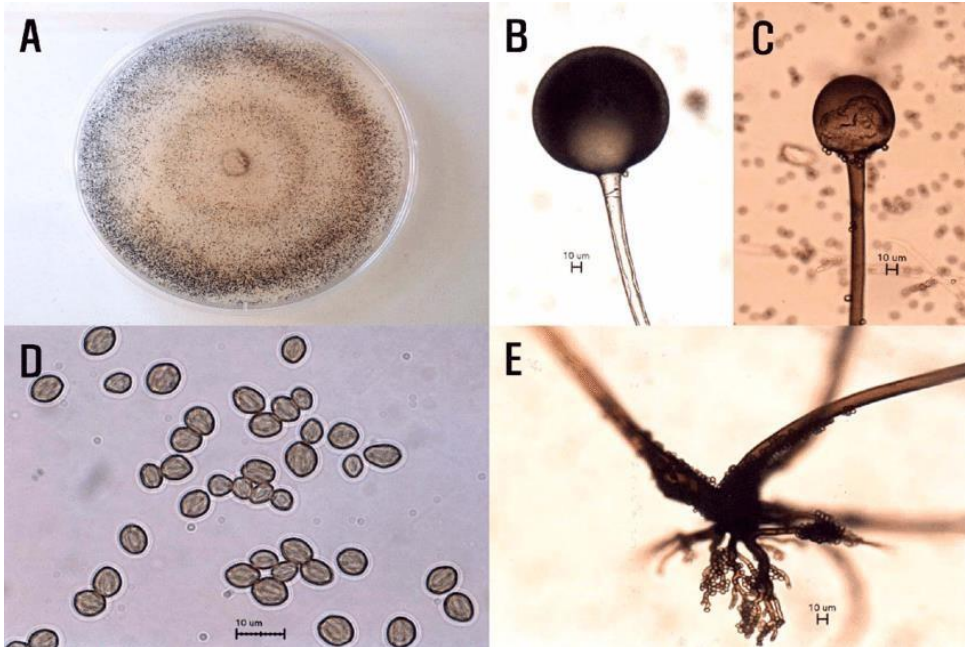
Şekil 8. *A. fumigatus* makroskopik koloni morfolojisi ve LPM ile boyanmış preparatta mikroskopik yapıları



Şekil 9. *A. niger* makroskopik koloni morfolojisi ve LPM ile boyanmış preparatta mikroskobik yapıları

2.2 Mucorales

Doğada yaygın olarak bulunurlar. En sık izole edilen cinsler *Rhizopus*, *Mucor*, *Rhizomucor* ve *Absidia* olarak sayılabilir. Septasız (nadiren septalı) hifler meydana getirirler. Hifler dik açı ile dallanır ve birbirine paralel olmayan kurdeleye benzeyen bir görünüme sahiptir. Pamuk şekerine benzeyen, tüylü, gevşek, beyaz-gri yada kahverengi koloniler yaparlar.



Şekil 10. *Rhizopus* **A**-Koloni morfolojisi, **B-C**-Sporanjium yapısı **D**-Sporangiopsorlar **E**-Rizoid yapısı

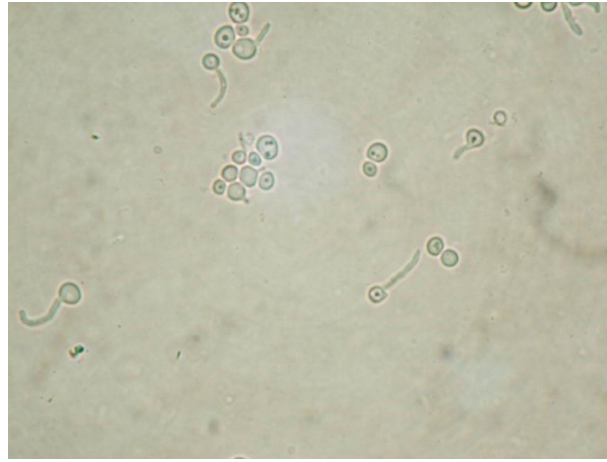


Şekil 11. *Mucor* hif ve spor yapıları

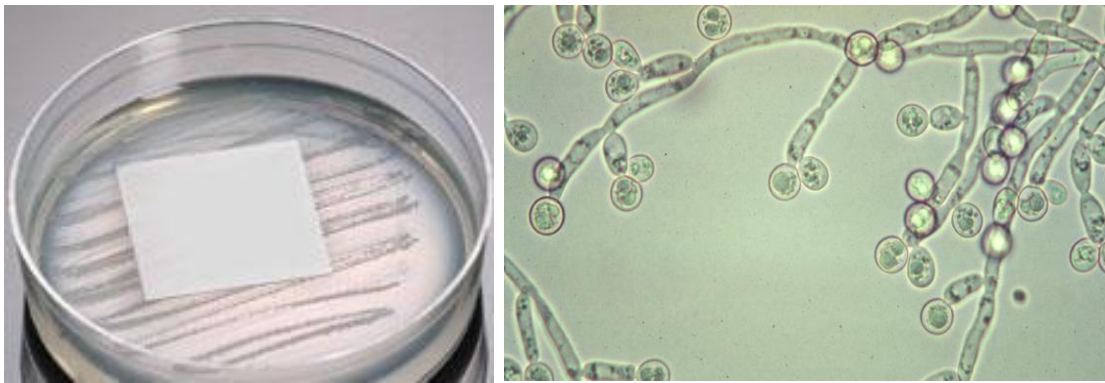
2.3. Fırsatçı Mikoz Etkeni Maya Mantarları

2.3.1. *Candida* türleri

*Yaptıkları hastalığa “Kandidiyazis” ya da “Kandidoz” adı verilir. *Candida* türleri kütanöz, lokal ve sistemik enfeksiyonlarla ilişkilidir ve *C.albicans* en sık etken olarak izole edilmektedir. SDA besiyerinde krem renkli, kremsi koloniler meydana getirerek ürerler. Mikroskopik olarak oval, Gram pozitif boyanan hücreler olarak izlenirler. Blastokonidya ve psödohif oluştururlar. Psödohifle gerçek hif arasındaki fark, psödohifin düzensiz köşe ve boğumlara sahip olmasıdır. Germ tüp testi, Mısır unlu tween 80 agarda klamidospor oluşumu ve karbohidrat fermentasyon-asimilasyon testlerine göre tür düzeyinde tanımlamaları gerçekleştirilir.



Şekil 12. *Candida albicans* germ tüp yapısı



Şekil 13. Mısır unlu agarda *Candida albicans* klamidospor yapısı



Şekil 14. SDA'da üretilmiş *Candida albicans*'ın koloni morfolojisi



Şekil 15. Gram pozitif, oval-yuvarlak, tomurcuklanan



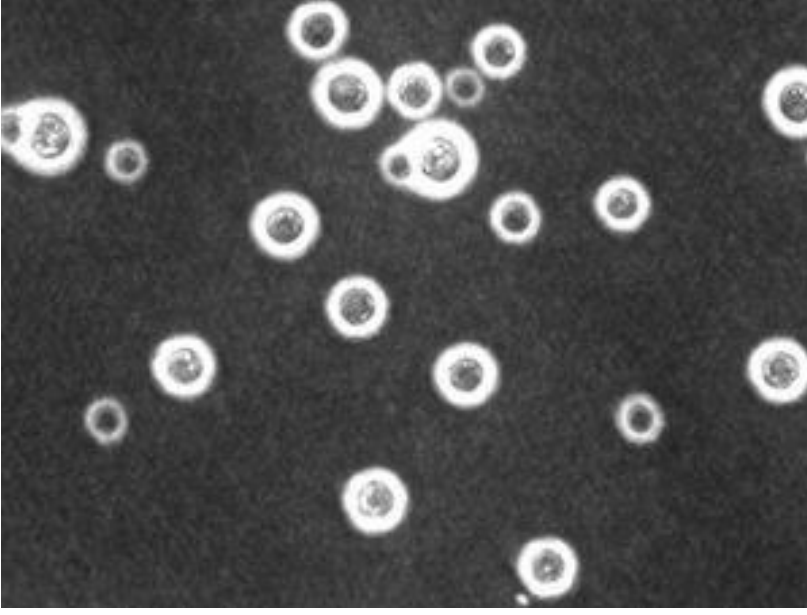
Şekil 16. Psödohif yapısı

2.3.2. *Cryptococcus neoformans*

C. neoformans kapsüllü bir maya mantarıdır. Meninks ve deride tutulum yaparak Kriptokokkoz olarak adlandırılan hastalığa sebep olur. SDA besiyerinde 37°C'de 48-72 saat inkübasyonu takiben krem renkli mukoid koloniler meydana getirir. Çini mürekkebi ile boyanarak kapsül yapısı mikroskopik olarak incelenebilir.



Şekil 17. *C. neoformans*'in mukoid kolonileri



Şekil 18. Çini mürekkebi ile boyanmış kapsüllü mayalar

YAŞAMIN EVRELERİ-I KURULU

4. PARAZİTLERİN MİKROBİYOLOJİK TANISI

Laboratuvar: ANK-215

ÖĞRENİM ÇIKTISI
Parazitlerin laboratuvar tanısında mikroskopik inceleme ile parazit kit, trafozit ve yumurtalarının değerlendirilmesini yapabilir
Parazitlerin laboratuvar tanısında mikroskopik inceleme ile parazit kit, trafozit ve yumurtalarının değerlendirilmesini yapabilir

A- GASTROİNTESTİNAL SİSTEM PARAZİTLERİNİN TANISI

Parazitler gastrointestinal enfeksiyonların %10-15'inden sorumludur.

Etkenler

Protozoa

Giardia intestinalis

Entamoeba histolytica

Cyclospora cayatensis

Cryptosporidium parvum

Helmintler

Enterobius vermicularis

Trichuris trichiura

Ascaris lumbricoides

Kancalı kurtlar

Strongyloides stercoralis

A.1. Klinik örneklerin Toplanması ve Laboratuvara Ulaştırılması

*Gayta örnekleri sızdırmayan, vidalı kaplar içerisine alınmalıdır. Gayta örneği su, toprak ve idrarla kontamine olmamalıdır.

*Klinik örnekler hareketli trofozoit formların görülebilmesi için mümkün olan en kısa sürede laboratuvara ulaştırılmalı, 30dk-2 saat içinde işleme alınmalıdır.

*Kısa sürede işleme alınmaması durumunda örnekler buzdolabında (+4 °C) saklanmalı asla inkübatöre konulmamalıdır.

**E. histolytica* şüpheli örnekler en kısa sürede incelenmeli, bunun olmadığı durumda -20 °C'de dondurulmalıdır.

*On gün içinde art arda alınan üç gayta örneği incelemeye alınmalıdır.

A.2. Gaytanın Makroskopik İncelenmesi

*Dışkıının kıvamı yumuşak, gevşek veya sulu olabilir.

*Gaytanın görünüşü etken hakkında ipucu verebilir:

Örneğin:

-Pirinç sulu ishal kolera için karakteristiktir.

-Yağlı bir gayta görünümü, sarı renk ve kötü koku Giardia hakkında ipucu verebilir.

*Gaytada kan ve mukus varlığı önemlidir. Mümkünse incelemeler bu alanlardan alınan örneklerle yapılmalıdır.

-Dışkıda makroskobik olarak kan ve mukus varlığı dizanteri bulgusu olabilir.

*Gayta helmintlerin veya tenya proglottidlerinin varlığı yönünden de incelenmelidir.

A.3. Gaytanın Mikroskobik İncelenmesi

A.3.1.Lam-lamel Arası Islak Preparat (Wet-Mount)

Islak preparat fekal örneğin ya direkt ya da yoğunlaştırma prosedürlerinden geçirildikten sonra incelenmesinde kullanılır.

Protozoon trofozoitleri, kistler, ookistler ve helmint yumurta ve larvaları, ıslak preparat tekniği kullanılarak görülebilir ve tanımlanabilir. İdeal olarak, aynı lam üstünde bir tanesi de Lugol ile boyanabilen iki sürüntü hazırlanmalıdır.

a-Direkt İnceleme

En basit ve kolay uygulanan yöntemdir. Gaytadan alınan bir miktar örnek tuzlu su ya da basit boyalar içerisinde süspansiyon edildikten sonra mikroskopta incelenir.

Tuzlu su ile ıslak preparat hazırlanması: Bu şekilde özellikle parazitlerin trofozoit formları ve bunların hareketleri kolaylıkla görülür. Ayrıca eritrosit ve lökosit varlıkları da saptanabilir.

Lugol ile ıslak preparat hazırlanması: Parazitlerin özellikle kist formlarını görmek için kullanılan bir yöntemdir. Lugol kistlerin çekirdek ve glikojen içeriklerini boyayarak görünür hale getirir (Resim 1).

Yapılışı:

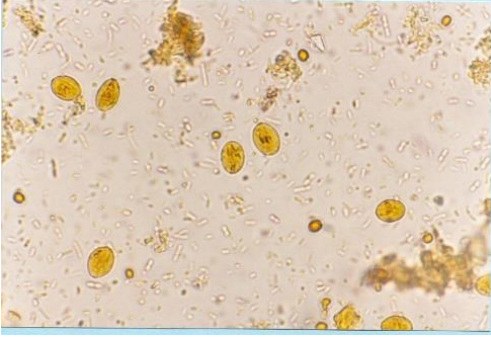
*Bir damla tuzlu su ya da lugol lam üzerine damlatılır.

*Gaytanın varsa kanlı mukuslu bölgelerinden, değilse farklı birkaç kısmından az bir miktar örnek alınır.

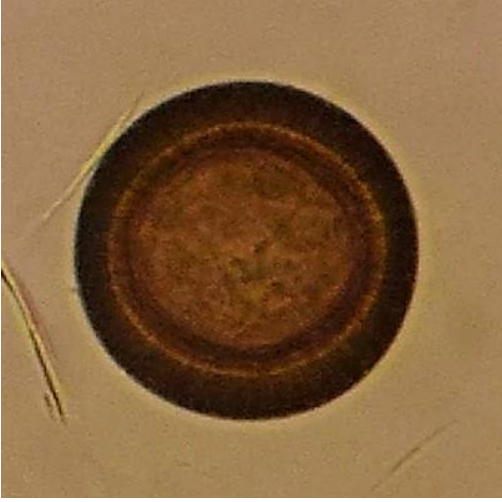
*Alınan örnek tuzlu su ya da lugolün kenarında iyice ezildikten sonra sıvı ile karıştırılır.

*Üstüne hava kabarcığı olmayacak şekilde lamel yerleştirilir.

* X10'luk objektifte alan bulunduktan sonra X40'luk objektifte preparat incelenir.



Resim 1: *Giardia intestinalis* kistleri



Resim 2: *Tenia spp.* yumurtaları

b-Yoğunlaştırma Yöntemi

İki şekilde yapılır:

1-Sedimentasyon (çöktürme) yöntemi: Yumurta ve kistler dibe çöktürülerek parazitlerin debriden ayrılması sağlanır. Özellikle örnekte parazit miktarı az ise izolasyon şansını artırır.

2-Flotasyon (yüzdürme) yöntemi. Çinko sülfat ya da Sheather's şeker çözeltileri kullanılır. Bu çözeltiler sayesinde kist ve trofozitler özgül ağırlıklarından yararlanılarak yüzeyde yüzerken, debri dibe çöker. Bu yöntemle, sedimentasyon tekniğine kıyasla daha temiz bir inceleme materyali elde edilebilir.

A.3.2. Selofan Bant Yöntemi

**Enterobius vermicularis*'in saptanmasında kullanılan yöntemdir.

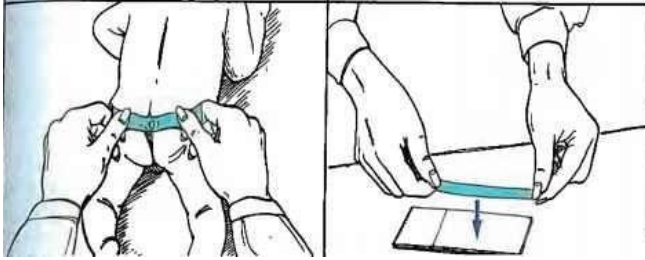
Yapılışı:

*Kişi sabah uyandığında, duş ve tuvalete çıkma öncesi, selofan bant perianal bölgeye yapıştırılarak yumurtalar toplanır. Selofan bant temiz bir lam üzerine yapıştırılır ve laboratuvara getirilir (Resim 3).

*Yumurtaların saptanabilmesi için üç gün üst üste aynı işlemin yapılması ve üç preparatın laboratuvara teslim edilmesi gerekir.

*Preparatlar 10x objektifte incelenir.

Enterobius'un tipik oval ve kalın çeperli yumurtaları görülür (Resim4). Yumurtalar genellikle embriyo ile doludur



Resim 3: Selofan bant yöntemi ile örnek alınması ve incelenmesi



Resim 4: *Enterobius vermicularis*

A.3.3. Boyalı Preparat Hazırlanması

Bu yöntemde mikroorganizmalar boyanmakta ve farklı yaşam evreleri immersiyon (100X) objektifi kullanılarak ayrıntılı olarak incelenebilmektedir.

Gram Boyama

Dışkı materyali, bakteriyel etiyolojyi ekarte etmek için Gram boyama yöntemi ile incelenebilir. Gram boyamada görülen ince, martı kanadı şeklindeki gram negatif basiller *Campylobacter* enfeksiyonunu gösterebilir. Gram pozitif basiller, *Clostridium difficile* için düşündürücü olabilir.

Metilen Mavisi ile boyama

Özellikle bakteriyel enfeksiyonların tanımlanmasında yardımcıdır. Bu boya dışkı örneklerinde polimorfonükleer lökositlerin (PMN, nötrofiller) saptanması için kullanılır.

Yapılışı

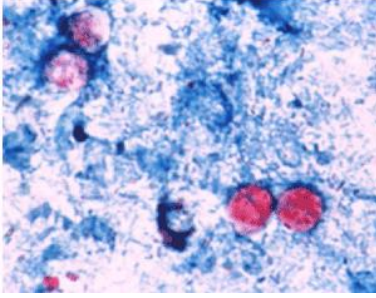
*Bir damla tuzlu su lam üzerine damlatılır.

*Gaytanın varsa kanlı-mukuslu bölgesinden veya farklı birkaç yerinden öze ile örnek alınır.
*Tuzlu su yanında iyice ezildikten sonra süspanse edilir. Havada kurumaya bırakılır.
*Kuruduktan sonra alevde fikse edilir ve üzerine metilen mavisi boyasından damlatılır ve 1 dk beklenir.

*Sonra suyla yıkanır ve kuruduktan sonra immersiyon yağı damlatılarak 100 X objektifte incelenir.

Aside dirençli Boyama (EZN)

* Bu yöntem genellikle *Cryptosporidium*, *Cyclospora* ve *Isospora* ookistlerini tanımlamak üzere kullanılır (Resim 5).



Resim 5: Kinyoun aside dirençli boyama
(*Cyclospora* ookistleri)

A.4. Antijenlerin Saptanması

*Etkenlerin antijenlerinin saptanması esasına dayanır.

Cryptosporidium spp , *G.intestinalis* ve *E.histolytica*'nın antijenlerinin saptanması için ticari olarak temin edilebilen immünofloresan antikör ve enzim immünoanaliz testleri (İHA, İFA, ELISA...) vardır.

Clonorchis sinensis



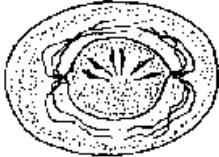
27-35 μm long
12-19 μm wide

Taenia spp.



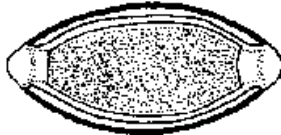
30-47 μm diameter

Hymenolepis nana



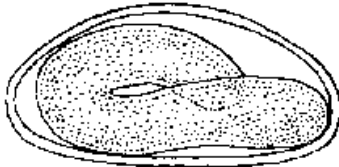
31-43 μm diameter

Trichuris trichiura



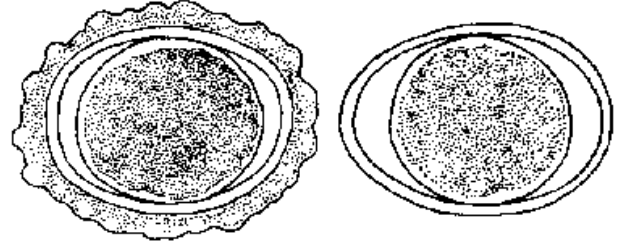
50-54 μm long
20-23 μm wide

Enterobius vermicularis



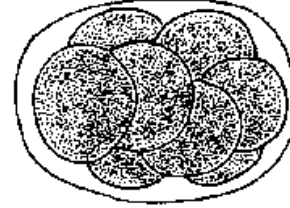
70-85 μm long
60-80 μm wide

Ascaris lumbricoides (fertile egg)



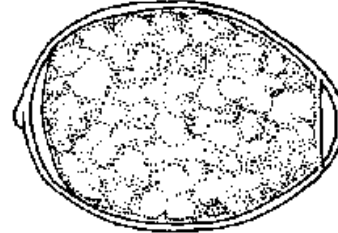
45-75 μm long
35-50 μm wide

Hookworm



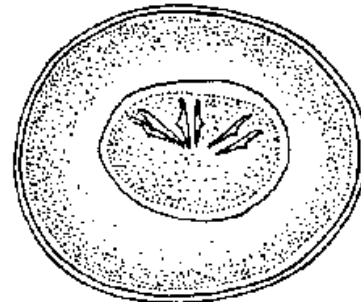
56-75 μm long
36-40 μm wide

Diphyllobothrium latum



58-75 μm long
40-50 μm wide

Hymenolepis diminuta



70-85 μm long
60-80 μm wide

B- KAN, DOKU VE DİĞER KLİNİK MATERYALLERDEN PARAZİTLERİN TANISI

Kan ve doku Protozoonları:

- *Plasmodium*
- *Trypanosoma*
- *Leishmania*
- *Babesia*
- *Toxoplasma*

B.1. Kanın İncelenmesi

*Protozoon ve helmintlerin bir kısmı yaşam döngülerinin bir kısmını veya tamamını kanda geçirirler. Eritrositler içinde veya kan hücreleri arasında serbest olarak yaşarlar.

*Bu parazitlerin tespitinde **ince yayma** ve **kalin damla** kan preparatları hazırlanarak inceleme yapılır.

B.1.1. Kan örneğinin alınması

*Tercihen 3. ya da 4. parmak ucu %70'lik alkolle temizlenir ve kuruması beklenir

*Steril lansetle delinir.

İlk damla kan kuru bir pamukla silinir.

*Ardından gelen kan lama değdirilir ve üstüne lamel kapatılır

Taze Kan Preparatlarının İncelenmesi: Hazırlana preparat 40X objektifte incelenir. Bu şekilde eritrositler arasında hızla hareket eden mikrofilaryalar görülebilir.

B.1.2. Kan Yaymalarının Hazırlanması

İnce yayma:

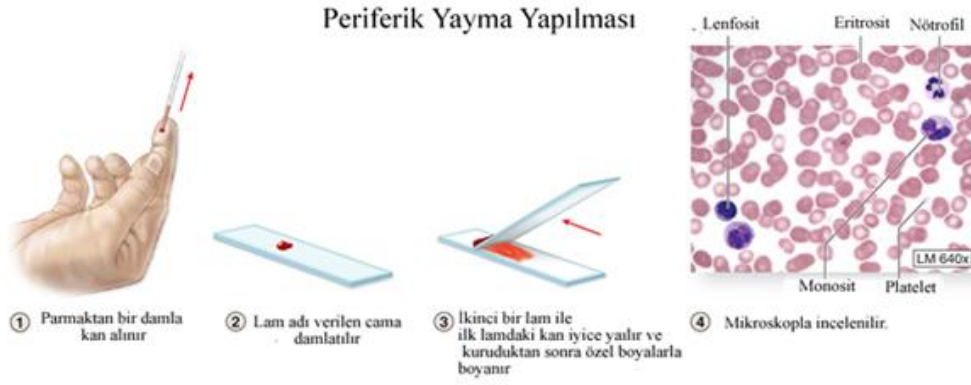
*Temiz ve işaretlenmiş bir lam üstüne bir damla kan alınır.

*Başka bir lamın kısa kenarı ile 30-45°C'lik açı yapacak şekilde tutularak kan damlasına yaklaştırılır.

*Kanın lam kenarına yayılmasını bekledikten sonra lam tek hamlede geri itilir. Böylece kan, lamın ardından sürüklenerek ince bir şekilde lama yayılmış olur (Resim 7).

*Mikroskopla bakıldığında tüm kan hücreleri tek tek yayılmış ve üst üste kümeler yapmamış olmalıdır.

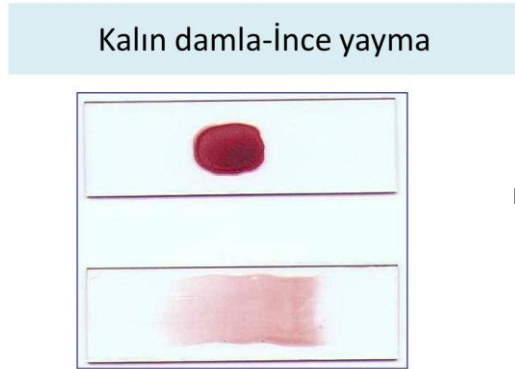
*Kurumaya bırakıldıktan sonra metil alkol ile tespit yapılır ve Giemsa boyanarak mikroskopta incelenir.



Resim 7: Periferik yayma

Kalın damla:

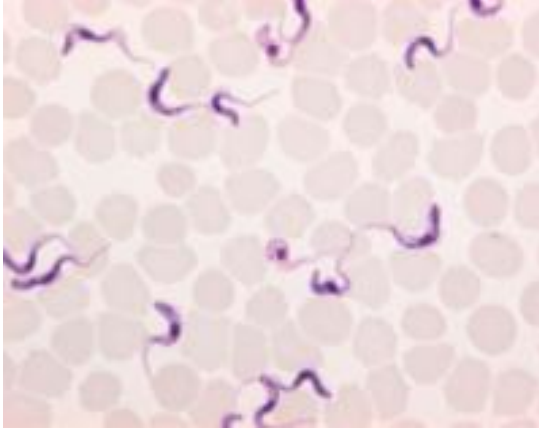
- *Parmaktan toplanan kan yoğun bir damla olarak lama alınır (Resim 8).
- *Başka bir lamın köşesi ile kan defibrine edilmek üzere dairesel hareketlerle karıştırılır.
- *Kendi kendine kurumaya bırakılır, **tespit işlemi yapılmaz**.
- *Ardından Giemsa boyama yapılarak mikroskopta incelenir (Resim 8).



Resim 8: Kalın damla ve ince yayma preparatlar

Giemsa Boyama Yöntemi:

- *Boyama için hazırlanmış lamlar boyama köprüsü üzerine yerleştirilir ve lamların tüm yüzeyi Giemsa boyası ile kaplanır.
- *İnce yayma preparatlar için 30 dakika, kalın damla preparatlar için 45 dakika bekletilir.
- *Ardından musluk suyu ile nazikçe yıkanır ve havada kuruması beklenir.
- *Preparatlar immersiyon objektifinde (100X) incelenir (Resim 8 ve 9).



Resim 9: Giemsa ile boyanmış *Leishmania* spp.

	Vivax	Ovale	Malariae	Falciparum
Ring				
Trophozoite				
Mature Trophozoite				
Schizont				
Gametocytes				
Gametocytes				

Resim 10: *Plasmodium* sp. kandaki farklı

B.2.Ürogenital Materyal İncelemesi

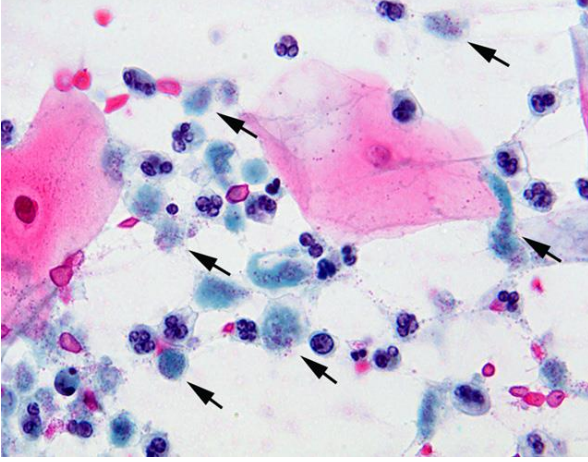
*Ürogenital enfeksiyonlara neden olan ve klinikte en sık karşılaşılan parazit *Trichomonas vaginalis*'tir.

*Yalnızca trofozoit formu vardır. Trofozoitler vajinal ve üretral sekresyonun yanı sıra, idrarda da bulunabilir.

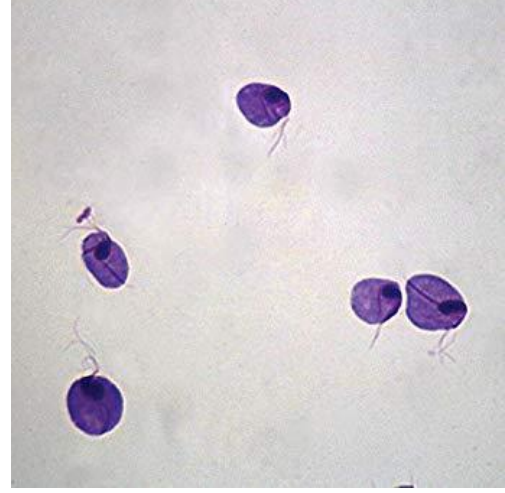
*Kadınlarda vajina ya da üretra salgısı, erkeklerde prostat salgısı incelenir.

Direkt mikroskopi

Zaman geçirmeden klinik örnekten lam üzerine 1 damla damlatılır. Üzerine 1 damla SF eklenerek lamel kapatılır ve 40x objektifte inceleme yapılır. SF preparatlarında tipik hareketli trofozoitler kolayca tanınır. Ayrıca boyalı preparat (Giemsa) da hazırlanabilir.



Resim 11: Vajinal sürüntüden hazırlanmış boyalı preparatta *Trichomonas vaginalis*



Resim 12: Giemsa boyalı preparatta *Trichomonas vaginalis*

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