

KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANALİZLERİ İÇİN ÖRNEK ALINMASI VE GÖNDERİLMESİ

Genel ilkeler:

Örnekler antimikrobik tedaviye başlanmadan önce alınmalıdır. Nekropsi ve biyopsi örnekleri otoliz (kokuşma) başlamadan önce yeni ölen ya da ötanazi yapılan hayvanlardan alınmalıdır. Örnekler infeksiyonu temsil eden etkilenmiş (ya da lezyonlu) bölgelerden, klinik belirtiler başladıktan sonra mümkün olan en kısa zamanda alınmalıdır. Grup ya da sürü sağlığı söz konusu olduğunda birden fazla hayvandan örnek alınması tercih edilmelidir. Asepsi ve antisepsi kurallarına mutlak suretle uyulmalı floraya ait ve çevresel mikroorganizmaların örnekleri kontamine etmeleri engellenmelidir. Aynı hayvana ait olanlar da dahil olmak üzere, tüm örnekler ayrı ayrı sızdırmaz ambalaj ya da taşıyıcıların içine konulmalı, ağızları sıkıca kapatılmalı ve dikkatlice etiketlenmelidir. Taşıyıcı materyal steril olmalı, örnekler kontamine olmamalı ve çevre için de tehlike yaratmamalıdır. Bu amaç için, steril tek kullanımlık plastik materyal (idrara kabı, gaita kabı, kilitli numune poşeti vb.), sıvay, kapaklı tüp ve kavanozlar, enjektör, parafilmle kapatılmış petri kutusu ve benzeri materyal kullanılabilir. Eğer laboratuvara gönderilmesi gecikecek ise, örnekler soğuk zincirde korunmalıdır. Mikrobiyolojik incelemelerde kullanılacak örnekler kesinlikle fikse edilmemeli, formol ve benzeri koruyucu kimyasallar ile gönderilmemelidir. Örneklere ait bilgi formu doldurulmalıdır

SIKLIKLA GÖNDERİLEN İNCELEME ÖRNEKLERİ

İdrar örnekleri

Mikrobiyolojik incelemeler için tercih edilen örnek alınma yolu deri antisepsisinden sonra uygulanan sitosentezdir. Bu sayede alt ürogenital kanaldaki flora bakterileri ve fekal kontaminantlar örneği kontamine etmez. Ancak bunun mümkün olmadığı durumlarda steril sonda uygulanabilir. Her iki şekilde de alınamıyorsa orta idrar alınmalıdır (Orta idrar, ilgili bölge antisepsisinden sonra ürinasyonun başlangıç ve sonunu içermeyen idrar örneğidir).

Deri kazıntısı (Mikolojik kültür için)

Dermatofitozdan şüphelenildiğinde, lezyonların bulunduğu bölge %70'lik etil alkol ya da hafif bir antiseptik ile silinmeli ve kuruması beklenmelidir. Deri kazıntısı ve follikülüyle birlikte kıl örnekleri lezyonlu bölümün sağlıklı kısma yakın bölgelerinden steril bir bistüri yardımı ile alınır. Lezyonun küçük olması durumunda, örnek miktarı az olacağından kullanılan bistüri de gönderilmelidir.

Mastitli hayvanlara ait süt örnekleri

Eğer meme uçları çok kirli ise önce temiz su ile yıkanmalı ve çok iyi şekilde kağıt havlu ile kurulanmalıdır. Daha sonra, meme başları %70'lik etil alkol ile dikkatlice silinmelidir. Bu işlem önce uzaktaki iki lob sonra ise yakındaki iki loba uygulanmalıdır. Bu işlemleri takiben yakın loblardan başlayarak, süt bir miktar dışarıya sağıldıktan sonra steril tüp ya da taşıyıcılara alınır.

Apseler

Eğer mümkünse, apsenin duvarından alınan kazıntı ile birlikte 3 ml miktarında irin örneği alınarak gönderilmelidir. Apse odağının merkezinde bulunan irinde genellikle mikroorganizma bulunmayacağı unutulmamalıdır. Birden fazla odak bulunuyorsa yeni şekillenenler tercih edilmelidir.

Kan kültürü

Yüksek ateşli dönemde septisemi şüphesi olan hastalarda kanda bulunan bakterileri izole etmek için kullanılır. Kan alınacak damarın üstünde bulunan tüyler tıraş edilmelidir. Deri çok iyi şekilde antiseptikler ile temizlenmeli ve kuruması beklenmelidir. Yaklaşık 10 ml kan alınarak, bekletilmeden laboratuvarından alınan kan kültürü şişesine nakledilir. Besiyeri ve kan karışımı hafifçe çalkalandıktan sonra oda ısısında ve kısa sürede laboratuvara gönderilmelidir

Sıvı örnekleri

Derideki fistüller, kulak mukozası, konjunktiva, derin drenaj kanalları, yumuşak doku infeksiyonları, genitoüriner sistemden örnek almak için kullanışlıdır. Kontaminantların aşırı üremelerini, metabolik

artıkların zarar vermesini ve hassas patojenlerin ölmelerini engellemek için, taşıma besiyerli olan sıvaplar (Stuart besiyeri, Amies besiyeri, Cary-Blair besiyeri vb.gibi) tercih edilmelidir. Birden fazla inceleme isteniyorsa (örneğin, bakteriyolojik ve mikolojik) aynı bölgeden birden fazla örnek alınarak gönderilmelidir

Nekropsi materyali

Farklı incelemelerden dolayı (patolojik, virolojik, parazitolojik vb. gibi) organın tamamı gönderilemiyorsa, gönderilen örnekte lezyonlu kısımlar ile birlikte makroskobik olarak normal doku da bulunmalıdır. Gönderilen organa göre değişmekle birlikte, farklı histolojik doku ve katmanları (korteks, medulla, kapsula, zar vb) da içermelidir. Organ ve dokular sadece tek tarafından kesilerek gönderilmelidir. Bağırsak gibi lumenli organlar iki uçlarından ligatüre edilmelidir.

Alt solunum yolu infeksiyonları

Alt solunum yolu infeksiyonlarının tanısına yönelik inceleme örnekleri üst solunum yolu florası ile kontamine olmamalıdır. Bu durumlarda nazal sıvap yerine trakeal aspirasyon sıvısı, bronko alveoler lavaj veya periton sıvısı tercih edilmelidir.

Anaeroblar

Zorunlu anaerob bakterilerin oksijene maruz kalmamaları için mümkün olan en kısa sürede laboratuvara ulaştırılmalıdır. Eğer örnekler kısa sürede laboratuvara ulaştırılamayacaksa vakumlanmış veya faklı yöntemler ile oksijeni giderilmiş kavanoz ya da ambalajlara konulmalı ya da ticari anaerob örnek gönderme sistemleri kullanılmalıdır. Sıvı örnekler ve irin, enjektörün içindeki hava çıkarıldıktan sonra çekilmeli ve tekrar oksijenin girmesini engellemek için ucu kapatılmalıdır. Sıvap örnekleri bu amaç için özel üretilmiş (redüktan=indirgeyici) ya da derin dökülmüş Stuart veya Cary-Blair besiyerleri içinde gönderilmelidir.

Serolojik incelemeler için örnek alınması

Serolojik testler (aglutinasyon testleri, ELISA) için, kan yada antikoagülanlı kanın santrifüj edilmesiyle elde edilen plazma değil, serum gönderilmelidir. Serumlar hemolizsiz olmalı, plastik tüpler içinde ve soğuk zincirde gönderilmelidir

BESİYERLERİ

Bakteri ve mantar gibi mikroorganizmaların invitro olarak üretilbildikleri cansız ortamlara “**Besiyeri**” denir. (Viruslar gibi zorunlu hücre içi mikroorganizmalar besiyeri olarak isimlendirilen cansız ortamlarda üreyemedikleri için; bu ders notunda mikroorganizma ifadesi bakteri ve mantarları içermektedir).

Besiyerleri kullanım amaçları;

Bakteri ya da mantarların üretilmesi ve canlılıklarının korunması, saf kültürlerinin elde edilmesi, bakteri sayımlarının yapılması, cins ve tür bazında identifikasyonlarının yapılması, antimikrobiyel duyarlılık testlerinin yapılması amaçlarıyla kullanılmaktadırlar. Besiyeri seçimi, ekim yapılacak örneğin nereden alındığına, içerisinde bulunabilecek bakteri ya da mantarların beslenme gereksinimlerine göre yapılır.

Besiyerleri fiziksel özelliklerine göre üç şekilde sınıflandırılırlar.

Sıvı besiyerleri: İçinde katılaştırıcı madde (agar) bulunmayan sıvı hâldeki besiyerleridir. Nutrient Broth ve peptonlu tuzlu et suyu (buyyon) sıvı besiyerine örnektir.

Katı besiyerleri: Bileşimine kıvam verici, katılaştırıcı madde (agar) katılmış besiyerleridir. Katılaştırıcı madde olarak en çok agar, nadiren jelatin, yumurta, serum, alginatlar ve silika jel kullanılır. Örnek: Nutrient agar, MacConkey agar vb. gibi.

Yarı katı besiyeri: Sıvı besiyerlerine % 0,3–0,5 oranında agar ilave edilerek hazırlanmış besiyerleridir. Örnek: Bakterilerin hareket muayenesi için % 0,4 oranında agar içeren yarı-katı besiyerleri kullanılır.

Besiyerlerinin kullanım amacına göre sınıflandırılması bileşimleri ile doğrudan ilgilidir ve sınıflandırmada en yaygın olarak kullanılan yöntemdir.

Kullanım amaçlarına göre besiyerlerinin sınıflandırılması

1- **GENEL BESİYERLERİ:** İnsan ve hayvanlarda hastalık oluşturan ya da normal florada bulunan mikroorganizmaların çoğunluğunun üretilbildiği besiyerleridir.

Genel besiyerleri üreticilik özelliklerine göre 2 çeşittir:

a-Temel (Bazal) besiyerleri: Bu besiyerlerinde yalnızca pepton ya da buyyon gibi maddelerle su bulunur. Buyyona agar eklenerek hazırlanan katı besiyerine Jelöz adı verilir. Bu besiyerleri birçok bakterinin üremesi için uygundur.

b- Zenginleştirilmiş besiyerleri: Temel besiyerlerine kan, serum, glukoz, yumurta gibi besleyici maddelerin eklenmesi ile elde edilen besiyerleridir. Temel besiyerlerinde üreyemeyen birçok mikroorganizmalar bu besiyerlerinde üretilebilirler.

2- ÖZEL BESİYERLERİ: Çalışma amacına göre hazırlanan daha komplike yapıdaki besiyerleridir.

a- Özgül besiyerleri: Yalnız bir çeşit bakterinin üretilmesi amacıyla hazırlanan besiyerleridir. Örneğin Tüberküloz etkenlerinin üretilmesinde kullanılan Lowenstein – Jensen besiyeri.

b- Seçici (Selektif) besiyerleri: Temel ya da zenginleştirilmiş besiyerlerine bir kısım bakterilerin üremesini önleyen antibiyotikler, kimyasal maddeler ve boyalar konularak hazırlanırlar. Bu şekilde o inceleme örneğindeki ya da karışık kültürdeki bakterilerin bazılarının üremesi inhibe olurken, bazıları üreyebilecek uygun ortama sahip olur. Bu besiyerine en güzel örnek Mac Conkey agar verilebilir. Bu besiyerinin içerisinde Gram pozitif bakterilerin üremesini inhibe etmek amacıyla kristal violet boyası ilave edilir ve bu şekilde inceleme örneğindeki Gram negatif bakterileri izole etme imkânı olur.

Seçici besiyerlerin bir kısmı yukarıdaki örnekte olduğu gibi bir bakteriyi inhibe ederken diğerine hiçbir olumlu ya da olumsuz etkisi olmaksızın üremesi olanak sağlayabilir. Bir kısım seçici besiyerinin çalışma mekanizması ise daha farklıdır. Bu ikinci tip selektif besiyerleri besiyerleri “seçerek çoğaltıcı” besiyerleri olarak ta tanımlanırlar. İçlerinde karışık bir ortamdaki bazı bakterilerin üremesini inhibe ederken, diğer bir grup bakterinin de üremesini arttıcı maddeler içeririler. Örnek olarak dışkıdan *Salmonella* spp. izolasyonu amacıyla ön zenginleştirmede kullanılan Selenit-F buyyon ve Tetrathionatlı buyyon verilebilir. Bu besiyerlerinin içerisindeki

bazı maddeler *Salmonella* türlerinin üremesini arttırırken, bazı maddeler de *E. coli* gibi dışkıda bulunabilecek ve hızlı üreme özelliğindeki koliform grubu bakterilerinin üremesini belirli bir süre için inhibe eder.

c- Ayırtıcı (diferansiyel) besiyerleri: İçerdikleri çeşitli kimyasal maddeler, indikatör maddeler aracılığıyla, benzer bakterilerin farklı renkte koloniler oluşturmalarını sağlayarak bakterileri birbirinden ayırmaya yarayan besiyerleridir. Saf kültür etme amacıyla sıklıkla kullanılırlar.

Örnek olarak yine MacConkey agar verilebilir. Bu besiyerinin içerisinde laktoz ve pH değişimlerine göre farklı renk alan indikatör bir boya bulunmaktadır. MacConkey agarda laktozu fermente eden bakteriler pembe renkli koloniler oluştururken, laktozu fermente etmeyenlerde bu renk değişimi görülmez.

d- Ayıraçlı besiyerleri: Mikroorganizmaların identifikasyonu için gerekli olan biyokimyasal özelliklerinin saptanması için kullanılan besiyerleridir. Bu besiyerleri içlerine çeşitli ayıraçlar (bromtimol mavisi, metil kırmızısı, andrade ayırıcı, fenol kırmızısı gibi) ve bakterinin metabolizma etkisinin öğrenilmesi istenen maddeler (laktoz, glukoz gibi) konularak hazırlanırlar. Yukarıda sayılan diğer besiyerlerinin hepsi özellikle izolasyon aşamasında, saf kültür elde edilmesi aşamasında kullanılmaktadır, bu nedenle de karışık kültürlerde de, saf kültürlerde de kullanılabilir. Ancak ayıraçlı besiyerleri bakteri ya da mantarların tür ve cins bazındaki identifikasyonları amacıyla hazırlanan ve kullanılan besiyerleridir. Bu nedenle bu besiyerlerini kullanmaya başlamadan önce mutlaka elimizdeki kültürün saf olduğundan emin olunmalıdır.

EKİM YÖNTEMLERİ

İçerisinde mikroorganizmaların bulunup bulunmadığını saptayabilmek, varsa bunu üretebilmek için; inceleme örneklerinden uygun ekim aletleri aracılığı ile alınan örneklerin uygun besiyerlerine aktarılması işlemine **ekim** denilmektedir. Ekim yapılacak örneğin ya da izolasyonu yapılacak etkenin özelliğine, besiyerine göre farklı ekim yöntemleri bulunmaktadır.

Ekim yaparken uyulması gereken genel bazı kurallar vardır; hangi yöntemi kullanacak olunursa olunsun mutlaka bu kurallara dikkat etmek gerekir. Ekimler mutlaka bu iş için ayrılmış olan banko, biyogüvenlik kabin vb. gibi özel yerlerde yapılmalıdır. Ekimlerin yapıldığı odalarda kapılar kapalı olmalı, gereksiz giriş ve çıkışlar engellenmelidir. Ekimler her zaman yanan gaz ya da alkol ocağı alevinin yanında yapılmalıdır. Çalışmaya başlamadan önce ve bittikten sonra mutlaka çalışılan yerin dezenfeksiyonu yapılmalıdır. Çalışmanın sonunda inceleme örneklerinden kalanlar sonuçlar çıkana kadar uygun ısı ve ortamlarda saklanmalı, atılacak olanlar da yine biyogüvenlik kurallarına uygun şekilde uzaklaştırılmalıdır. Ekim yapmadan önce besiyerlerinin üzerinde etiketleme işlemi dikkatli bir şekilde yapılmalı, ön işlemlerden geçirilmesi gereken örneklerin bu işlemler tamamlanıp hazır hale getirilmelidir. Ekim için kullanılacak öze, pipet vb. aletler önceden hazırlanmalı ve ekim yapılacak yerde kolay ulaşılabilir şekilde tutulmalıdır.

Farklı örneklerden farklı besiyerlerine yapılan ekim yöntemleri;

Sıvı besiyerlerine ekimler:

Tüpteki bir inceleme örneğinden sıvı besiyerine ekim: İnceleme örneğinden pipet veya öze yardımıyla bir miktar alıp sıvı besiyerine aktarılması yapılır.

Katı özellikteki bir inceleme örneğinden sıvı besiyerine ekim: İç organları gibi inceleme örneklerinden ekim yapmadan önce organın yüzeyi dağlanır. Dağlanan bölge üzerinde, steril bir bistüri ile ensizyon yapılır. Alevde kor hale getirilmiş ve soğutulmuş öze yardımıyla ensizyon atılan bölgeden organın içine girilerek örnek alınır, sıvı besiyerine aktarılır.

Katı besiyerlerine ekimler:

Tüpteki besiyerlerine ekimler: Kullanım amacına göre yatık olarak ya da dik olarak hazırlanmış besiyerlerinin içerisine ekim yaparken çizgi ekimi, yüzeysel ekim, batırma kültürü vb. yöntemler kullanılabilir. Özellikle bakterilerin biyokimyasal özelliklerinin saptanmasına yönelik hazırlanan besiyerlerine ekimler bu şekilde yapılmaktadır. Ayrıca inkübasyon süresi uzun olan bakteri ya da mantar etkenlerinin ilk izolasyonu amacıyla da tüplerde hazırlanmış besiyerleri tercih edilmelidir.

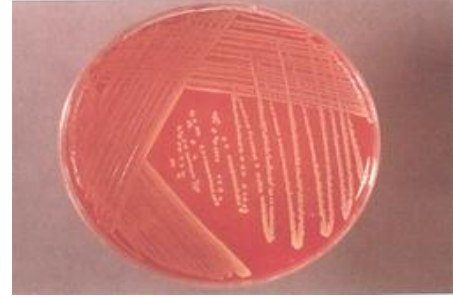
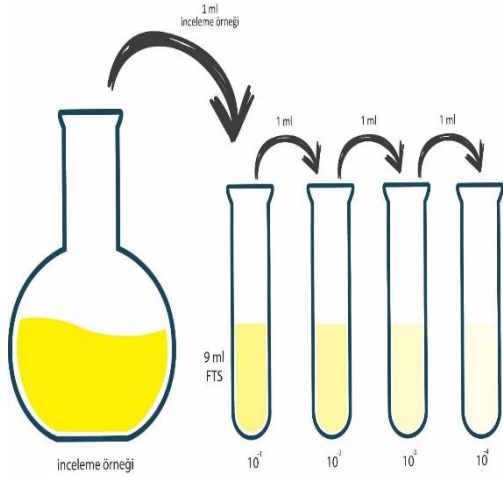
Petri kaplarındaki besiyerlerine ekim: İnceleme örneklerinden ilk ekim yapılırken sıvı besiyerlerinin yanında petri kapları içerisinde hazırlanmış besiyerlerine de ekim yapılmaktadır. Ekim yapılacak besiyerlerinin çok su kaybetmemiş olmasına, yüzeylerinin kurumamış olmasına dikkat edilmeli, uygun kalınlıkta dökülmüş besiyerlerine ekim yapılmalıdır. Saklama koşullarına bağlı ya da besiyerinin dökülmesi sırasında yapılan bazı hatalar sonrası eğer besiyerinin yüzeyi çok nemli/sulu ise yine hemen ekim yapılmamalıdır. Çalışma amacına göre farklı yöntemlerle ekim işlemini yapmak mümkündür. Örneğin; tek koloni düşürmek amacıyla yapılan ekim yöntemleri, plak besiyeri içerisine yapılan ekimler, plak yüzeyine yaygın ekim yöntemi gibi.

Doğru sonuçlar elde edebilmek için, inceleme örneğinden yeterli miktarda materyalin uygun besiyerlerine aktarmak çok önemlidir ama tek başına yeterli değildir. Ekim işlemi tamamlanan besiyerlerinin inkübasyon süreleri içerisindeki, sıcaklık, atmosferik koşullar, nem gibi çeşitli faktörlerin de amacına uygun optimum değerleri içerisinde olmasına dikkat edilmesi gereklidir.

SAF KÜLTÜR ELDE ETME YÖNTEMLERİ

Tek koloni elde etme prensibine dayalı saf kültür yöntemleri:

a. Genel katı besiyerine **seyreltme yöntemi** ile ekim yapıldığında koloniler tek düşecektir ve tek düşen kolonilerden yapılacak pasajlar sonrası saf kültür elde edilebilir. Seyreltme yöntemi ile hesaplamalarda kolaylığın ve standartlığın sağlanması amacıyla dilüsyon genellikle 1:9 oranı ile yapılır. Bu, 1 birim örnek + 9 ml FTS (veya başka bir steril dilüsyon çözeltisi) demektir. Toplam 10 birim hacmin 1 birimi materyalden (ya da 1 önceki dilüsyon tüpünden) gelmektedir. 1:9 oranında dilüsyon, materyaldeki sayının, 10'un katları şeklinde azalmasını sağlar.



b. İnceleme örneklerinden ekim yapılırken genel besiyerlerinin yanında şüphelenilen etkene yönelik zenginleştirilmiş, seçici ya da selektif besiyerleri de kullanılmaktadır. Burada da amaç, yine saf kültür elde etmektir. Örneğin, kanlı agara ekim yapıldığında o inceleme örneğinde hemoliz özelliği olan ve olmayan bakterilerin ayrımını yapmak; MacConkey agara ekim yapıldığında o örnekteki laktozu fermente eden ve etmeyen bakterilerin ayrımını yapmak mümkün olmaktadır. Farklı renk ve özellikteki koloniler gözle saptanıp, onlardan yapılacak pasajları takiben saf kültür elde etmek mümkün olacaktır.

c. Saf kültür elde etmek amacıyla zaman zaman 0,45 µm çaplı membran filtreler kullanılabilir. Uygun oranlarda sulandırılmış bakteri süspansiyonu membran filtrelerden geçirilir ve bakteriler bu

filtrelerin aralıklarına takılır, kalır. Bu filtreler steril koşullarda yeni bir besiyerinin üzerine yapıştırılırsa, besiyerinin yüzeyinde tek tek koloniler oluşturacak şekilde üremeler gözlemlenir ve yine burada tek düşmüş kolonilerden pasaj yapılarak saf kültür elde edilebilir.

d. Saf kültür elde etmek amacıyla zaman zaman kimyasal yöntemlere de gereksinim duyulabilir. Bu yöntem karışık mikroorganizmaların olduğu bir inceleme örneği/kültür ortamına bazı kimyasallar ilave edilir ve bu ajana duyarlı olanlar ortamdan uzaklaştırılır ve besiyerlerine ekim yapılır. Böylece asıl istenen o kimyasal ajana da dirençli olan bakteriler saf olarak izole edilebilir. Bu yönteme örnek olarak tüberküloz homojenizasyon/dekontaminasyon işlemleri örnek verilebilir

e. Saf kültür elde etme de deney hayvanlarından da yararlanılabilir.

BİYOĞÜVENLİK

Biyogüvenlik, özellikle insanlara zarar verdiği bilinen veya potansiyel risk taşıyan biyolojik materyal, infeksiyöz mikroorganizmalar veya onların genetik ya da toksik komponentleriyle yapılan çalışmaların, insan, hayvan ve çevre için güvenli biçimde yapılmasını sağlamaya yönelik, laboratuvar alt yapı, tasarım, donanım, uygulama ve tekniklerin en uygun kombinasyonu olarak tanımlanabilir. İşletmenin tipine göre biyogüvenlik önlemleri uygulamaları değişiklik gösterecektir. Ama temelde ortak amaçları vardır: çalışanı korumak, diğer insanları korumak, çevreyi korumak.

Dünya Sağlık Örgütüne göre mikroorganizmalar; mikroorganizmanın konakçı varlığı/özellikleri, patojenitesi, infeksiyöz dozu, bulaşma yolu, toplum sağlığına etkileri, ne tür korunma ve tedavisinin bulunduğu (ya da bulunmadığı) gibi özelliklerine göre risk gruplarına ayrılmaktadırlar.

Risk grup 1

Bireysel ve toplumsal riski olmayan ya da bu riskinin önemli ölçüde az olduğu mikroorganizmaları içermektedir. İnsanda infeksiyona neden olmadığı kesinlikle bilinen mikroorganizmalar

Risk grup 2

Klinik mikrobiyolojide sıklıkla karşılaşılan ve insanlarda hastalık nedeni olduğu bilinen mikroorganizmaların çoğu bu gruptadır. Genel olarak neden oldukları hastalıkların etkili tedavi/korunma yolları vardır; toplum sağlığı açısından oluşturduğu risk sınırlıdır.

Risk grup 3

Toplumsal riski düşük ancak bireysel riski yüksek, etkili tedavi ve korunma yollarının bilindiği mikroorganizmalardır.

Risk grup 4

Hem toplumsal hem de bireysel riskin yüksek, etkili korunma ve tedavi yöntemlerinin bulunmadığı mikroorganizmalardır.

Bu sınıflandırmaya göre laboratuvar alt yapıları da, dört farklı seviyede tasarlanmıştır:

Biyogüvenlik seviye 1 (BSL-1) laboratuvar; Biyogüvenlik seviye 2 (BSL-2) laboratuvar ; Biyogüvenlik seviye 3 (BSL-3) laboratuvar; Biyogüvenlik seviye 4 (BSL-4) laboratuvar

Bir mikroorganizmanın hangi risk grubunda yer alacağı ve çalışmanın hangi seviyede yürütüleceği 4 önemli faktöre bağlıdır;

1. Organizmanın patojenitesi,
2. Bulaşma yolu ve konakçı durumu (konakçı varlığı, sayısı, türü, yayılımı),
3. Lokal olarak etkili korunma yollarının varlığı,
4. Lokal olarak etkili tedavi yollarının varlığı.

Klinik materyal söz konusu olduğunda materyallerin genel olarak risk grup 2 mikroorganizmaları içerebileceği düşünülmelidir; hastanelerin mikrobiyoloji, biyokimya ve patoloji laboratuvarları alt yapı, uygulamalar ve mikrobiyal teknikler açısından minimum BSL-2 olmalıdır. Mikrobiyal risk açısından çalışma ve uygulamalar değerlendirildiğinde ilave önlemlere gerek duyulduğunda alt yapı ve/veya uygulamalar BSL-3'e yükseltilebilmelidir.

Biyogüvenlik seviye 1 (BSL-1) laboratuvarları

Sağlıklı erişkinlerde hastalık yapmadığı bilinen, çevre için düşük risk potansiyeline sahip mikroorganizmalarla yapılan çalışmalar için uygundur. Bu tip laboratuvarın bina içinde izole olması gerekmez, çalışmalar üstü açık bankalarda yapılır, özel donanım ve yerleşim şekli gerekli değildir. Çalışanlar

yürütülen işlemler konusunda eğitime sahiptirler ve mikrobiyoloji (ya da ilgili bilim dalı) hakkında genel eğitim almış bir sorumlunun gözetimi altındadır

Standart Mikrobiyolojik Uygulamalar

Deneyler yapılırken laboratuvara giriş çıkışlar kontrollü, denetimli olmalıdır. Çalışma öncesi ve sonrası ellerin yıkanması gereklidir. Laboratuvar içerisinde yemek yemek, bir şey içmek, sigara kullanımı kesinlikle yasaktır. Mekanik pipetleme yapılmalıdır. Hem çalışma öncesi hem de sonrası çalışma yüzeyinin dezenfeksiyonu yapılmalıdır. Çalışılırken mutlaka önlük giyilmelidir.

Özel Uygulamalar

Dekontamine edilecek materyallerin sızdırmaz kapaklı kaplarda toplanması ve ağzı kapalı şekilde laboratuvardan çıkarılması gereklidir.

Güvenlik ekipmanı Özel bir ekipman gerekli değildir.

Laboratuvar tasarımı

Kolay temizlenebilmelidir. Bankolar su geçirmez, ısıya dayanıklı özellikte olmalıdır. Pencereleer açılabilir, ama sineklik vb destekler takılmalıdır.

Biyogüvenlik seviye 2 (BSL-2) laboratuvarları

Standart mikrobiyolojik uygulamalar geçerlidir. İlave olarak bazı özel uygulamalar bulunmaktadır.

Özel Uygulamalar

Çalışacak personel patojen mikroorganizmalarla çalışma konusunda eğitilmiş olmalıdır. Laboratuvara giriş çıkışlar sınırlı (özellikle yüksek riskli kişiler) olmalıdır. Kapısında “Biyozarar” işareti olmalı ve sorumlu kişinin ulaşım bilgileri yazılmalıdır. Çalışırken eldiven kullanılmalıdır. Tüm

alışmalar nlk giyilerek yapılmalı, çalışma sonunda önlükler çıkartılmalı ancak kişisel kullanım alanlarına gtrlmemeli, laboratuvarda bırakılmalıdır. Tüm atıklar atılmadan önce dekontamine edilmelidir. Gerekli durumlarda personele serolojik taramalar yapılabilir. Biyogüvenlik el kitabı bulunmalıdır.

Güvenlik ekipmanı

Sınıf I ya da sınıf II güvenlik kabinleri. Santrifüjleme gibi kapalı ortamlarda yapılan işlemler bankolarda yapılabilir, ancak infeksiyöz aerosollerin oluşacağı işlemler mutlaka kabin içerisinde yapılmalıdır.

Laboratuvar tasarımı

Kolay temizlenebilmelidir. Bankolar su geçirmez, ısıya dayanıklı olmalıdır. Pencereler açılabilir, ama sineklik vs takılmalıdır. Laboratuvar içerisinde otoklav bulunmalıdır.

Biyogüvenlik seviye 3 (BSL-3) laboratuvarları

Standart mikrobiyolojik uygulamalar geçerli (BSL1 ve BSL2)

Özel Uygulamalar

BSL-3 alışma kurallarını bilen özel eēitimi personel bulunmalıdır. Tüm alışmalar güvenlik kabini içinde, uygun koruyucu giysiler ile yapılmalıdır. Önlük, maske, eldiven vs kesinlikle laboratuvar dışına çıkartılamaz. Giriş-ıkışlar sıkı kontrollü, çalışma sırasında kapılar mutlaka kapalı tutulmalıdır. Personele rutin serolojik taramalar yapılması gereklidir.

Güvenlik ekipmanı

Sınıf I, sınıf II, sınıf III güvenlik kabinleri. Tüm alışmalar kabin içerisinde yapılmalıdır.

Laboratuvar tasarımı

Giriş en az iki kapıdan geçilerek saēlanmalıdır. Otomatik kullanıma uygun lavobolar bulunmalıdır. Pencereler açılmayacak şekilde

ayarlanmalıdır. Tamamen kapalı ve kontrollü yönlendirilmiş özel hava sistemi sağlanmalıdır. Laboratuvar içerisinde mutlaka otoklav bulunmalıdır.

Biyogüvenlik seviye 4 (BSL-4) laboratuvarları

Standart mikrobiyolojik uygulamalar geçerli (BSL1, BSL2 ve BSL3)

Özel Uygulamalar

Özel eğitimli personel gereklidir ve gerektiği durumlarda çalışacak personele bir ön immunizasyon işlemi uygulanmalıdır. Ayrı bina, ya da bina içerisinde tamamen izole bir yerde kurulmalıdır. Bölgeye giriş tamamen sınırlandırılmalı, kapılar kilitli tutulmalıdır. Giriş-çıkışlar kayıtlıdır. Giriş-çıkış öncesi kıyafet değişimi, duş odaları bulunmalıdır. Laboratuvarda çift kapaklı otoklav bulunmalıdır. Tüm malzemeler otoklavda steril edildikten sonra içeri alınmalı ve otoklavlandıktan sonra çıkartılmalıdır.

Güvenlik ekipmanı- Laboratuvar tasarımı

Sınıf II, sınıf III güvenlik kabinleri bulunmalıdır. Özel ventilasyonlu koruyucu giysiler giyilmelidir. HEPA filtreli havalandırma sistemi kullanılmalıdır. Otomatik kapı sistemleri kullanılmalıdır. Pencereleer kırılmaya karşı dayanıklı olmalıdır.

Biyogüvenlik Kabinleri

Çalışan personeli ve çevreyi korumak, çalışılan ürünü korumak* amacıyla hava akımı düzenlenmiş cihazlardır. İki özelliğe sahiptirler; amaca yönelik kontrollü hava akımını sağlar ve hava içerisindeki mikrobiyal partikülleri elimine eder. Ön açıklıktan kabin içine alınan hava akım miktarı ve hızı, resirkülasyon oranları ve egzoz sistemlerine göre Sınıf I (Ave B), Sınıf II (A ve B), Sınıf III şeklinde sınıflandırılırlar.

Sınıf I biyogüvenlik kabinleri

Çalışan kişiyi ve çevreyi korumaya yönelik tasarlanmış, ürün koruma özelliği bulunmayan kabinlerdir. Oda havası çalışma yüzeyine doğrudan ulaşır; HEPA filtrelerden geçtikten sonra kabin dışına atılır.

Sınıf II ve III biyogüvenlik kabinleri

Çalışan kişiyi, çevreyi ve ürünü korumaya yönelik tasarlanmış kabinlerdir. Oda havası ön açıklıktan girer ancak çalışma alanına temas etmeden önce filtrelerde geçer ve yine HEPA filtrelerden geçtikten sonra kabin dışına atılır.

SÜT ÖRNEKLERİNİN İNCELENMESİ

Mastit, bir ya da birden fazla meme lobunun, parankim dokusu, süt kanalları ve interstisiyel dokusunun yangısı olarak tanımlanmaktadır. Dünyanın birçok ülkesinde ve ülkemizde de görülmekte olup, süt endüstrisinde ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Mastite neden olan etkenleri iki temel grupta toplanırlar; bulaşıcı patojenler ve çevresel patojenler.

Bulaşıcı patojenler: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* ve *Mycoplasma* türleri bu gruba dahildirler. Bu etkenler infekte memede yaşayabilir çevrede uzun süre canlılığını koruyamazlar. Bulaşma inekten ineğe olmaktadır. Sağım sırasında sağım makinaları ve eller aracılığı ile bulaşma gerçekleşmektedir.

Çevresel patojenler: Başta *Escherichia coli*, *Streptococcus. dysgalactiae*, *Klebsiella* spp. ve *Enterobacter* spp., *Corynebacterium bovis*, *Micrococcus* spp., *Candida albicans* gibi çeşitli bakteriler ve mantar türleri bu grup içerisinde. Bu etkenler ineğin memesinde bulunabileceği gibi çevrede de uzun süre canlılığını koruyabilirler. Bulaşmada sağım makinaları, sağıcılar ve aynı zamanda çevrede önemli rol oynamaktadır. .

İnceleme örneği = SÜT

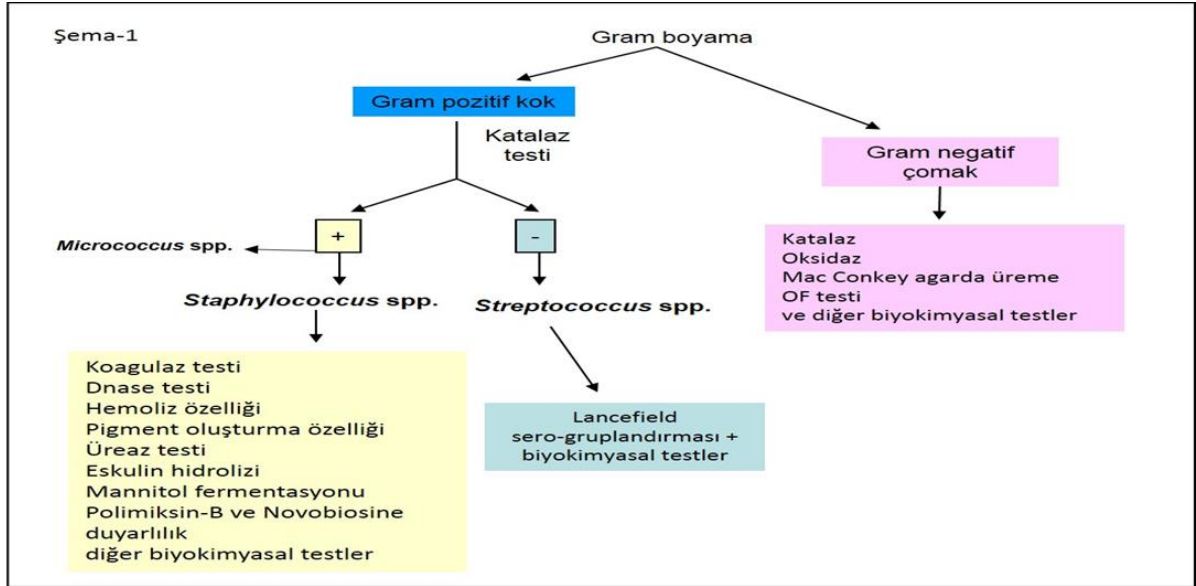
Hayvanın memeleri öncelikle temiz su ile memeye zarar vermeyecek şekilde temizlenir, amaç çamur, dışkı gibi kontaminasyon kaynaklarını uzaklaştırmaktır. Her bir meme ucu %70'lik alkolle ya da bir antiseptiğe batırılmış bir pamuk ya da bez ile silinir. Steril bir bez ile kurulanır. İlk süt sağılarak atılmalıdır. Sonra her bir memeden ayrı ayrı steril tüplere ya da kaplara süt örneği alınmalıdır. Örnekler alınırken tüplerin üzerine hangi

meme lobundan örnek alındığı mutlaka yazılmalıdır. Örnekler en kısa sürede soğuk zincirde laboratuvara gönderilmelidir. Sürenin uzadığı durumlarda süt örnekleri dondurulmalı ve o şekilde transfer edilmelidir.

Kültür

İnceleme örneklerinden genel ve özel besiyerlerine ekimler yapılır.

Genel bakteriyolojik inceleme amacıyla süt örneklerinden kanlı agar, serumlu buyyon ve Mac Conkey ağara ekim yapılır, 37 °C de 24-48 saat süreyle inkube edilir. Kanlı agar ve serumlu buyyonlar mikroaerob, MacConkey agarlar aerob koşullarda inkube edilir. İnkubasyon süresi sonunda Gram boyama yapılır. Gram boyama sonucuna göre izlenmesi gereken yol şema-1 de özetlenmiştir.



Özel durumlar

- Bulaşıcı patojenler arasında yer alan *Mycoplasma* türlerinin izolasyonu için Mycoplasma broth ve agara ekim yapılır.
- Mayaların izolasyonu için Sabouraud dextrose agar besiyerine ekim yapılır.

- Bunun dışında hayvanlarda Bruselloz ya da Tüberküloz infeksiyonu var ve birer semptomu olarak mastit olgusu şekillendiyse, bu etkenlerin tanısında kullanılan besiyerlerine ekim yapılmalıdır.

İDRAR KÜLTÜRÜ

İdrarın Alınması

İdrarın alınmasında temel ilke, olabildiğince üretra ve çevre dokulardaki mikroorganizmalara hiç kontamine etmeden ya da en az seviyede bulaşmış olarak alınmasıdır.

Sonda ile alınan idrar, uygun nitelikte olmakla beraber sondanın idrar kesesine sokulması esnasında üretradaki mikroorganizmaların içeri itilerek infeksiyona neden olma riski bulunmaktadır. Bu yöntem sıklıkla at ve sığırlardan idrar alımında kullanılmaktadır.

Orta idrar, hayvan idrar yapmaya başlar, bir miktar dışarı yapılmasına izin verilir. Sonra steril bir kaba bir miktar idrar alınır. Sonra hasta idrar yapmaya devam eder. İdrarın alınma zorluğu ve flora bakterilerini içermesi nedeniyle çok tercih edilen bir yöntem değildir.

Sistosentez ile alınan idrar, daha uygun bir yöntem olup özellikle kedi ve köpeklerden idrar alımında tercih edilen bir yöntemdir. İdrar kesesinin bulunduğu bölge traş edilerek, aseptik koşullar sağlanır. Ultrason yardımıyla enjektör ile idrar kesesine girilerek örnek alınır.

Laboratuvara gelen idrar bir saat içinde incelenmeyecekse +4°C de bekletilerek, en geç 24 saat içinde incelenmelidir.

İdrar yolları infeksiyonuna, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterococcus* spp. vb gibi bakteriler sıklıkla neden olmaktadır.

İdrarda Bakteri Sayma Yöntemi

- Bir tüp içerisinde 9ml fizyolojik tuzlu suya (FTS) 1ml idrar eklenir.
- 1 ml idrar alınarak 9ml sulandırıcı içine konması ile inceleme örneği 10 katlı sulandırılmış olur.
- İkinci bir tüpe 9,9ml FTS konur ve önceki sulandırmadan 0,1ml eklenir.
- Bu şekilde 10^3 oranında sulandırma yapılmış olur.
- Bu sulandırmadan 0,1ml alınarak besiyerine yayma ekim yapılır.
- İnkübasyon süresi sonunda dilüsyon yapılan besiyerindeki koloniler sayılıp, dilüsyon oranıyla çarpılarak 0,1ml' deki bakteri sayısı tespit edilmiş olur.

Alınan idrar örneğinden, yukarıda anlatıldığı şekilde dilüsyon yapılarak ve direkt idrardan 0,1ml alınıp kanlı agar ve MacConkey agar yüzeyine damlatılır. Drigalski yardımıyla tüm besiyeri yüzeyine yayılır. Kanlı agar mikroaerob, MacConkey agar ise aerob olarak 37°C' de 24 saat inkübasyona bırakılır.

İnkübasyon süresi sonunda saf kültür değilse saflaştırma işlemi yapılır. Saf kültür ise üreyen bakterinin identifikasyonu için Gram boyama ve biyokimyasal testler yapılır.

KAN KÜLTÜRÜ (HEMOKÜLTÜR)

Sepsis retiküloendotelyal sistemin ortadan kaldıracılabileceği kapasitesinin üzerindeki mikroorganizma varlığı ile ortaya çıkan bir tablodur. Sepsise bağlı mortalite ve morbiditenin yüksek olması nedeniyle hızlı ve doğru tanı hastanın tedavisi açısından çok önemlidir. Bunun içinde uygulanması gereken ilk test "Kan Kültürü"dür.

Kan kültürü konusunda yıllardır yüzlerce çalışma yapılmış ve etkenlerin hızlı izolasyonu için en uygun besiyeri ve ortamlarının geliştirilmesi sağlanmıştır. Hızlı tanı için nükleik asit problemleri ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi çeşitli moleküler yöntemler geliştirilmiş olmasına rağmen, hala en duyarlı ve güvenilir yöntem kan kültürüdür. Günümüzde

manuel ve otomatize birçok sistem klinik kullanıma sunulmuştur. Örnek uygun şişelere alındığı takdirde aerobik, anaerobik, fungal ve mikobakteriyel etkenler kolaylıkla izole edilebilmektedir.

İnfeksiyonun lokalize olması, örneğin doğru zamanda alınmaması, yetersiz kan alımı veya hastanın antibiyotik tedavisi alıyor olması gibi nedenlere bağlı olarak uygulamalarda pozitif oranı yaklaşık 1/3'dür.

Pozitif kan kültürlerinin büyük kısmı gerçek kan dolaşımı infeksiyonlarına bağlıdır. Üreyen mikroorganizmaların en kısa sürede saptanarak etken veya kontaminant olup olmadığının ortaya konması, etken olarak kabul edilen mikroorganizmanın antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılarak tedavinin doğru yönlendirilmesi mortalite, morbiditenin ve sağlık giderlerinin azaltılmasında çok önemlidir.

Kan kültürünün endikasyonları

1. Bakteriemi veya fungemiden klinik olarak şüphe edilen durumlarda kan kültürü alınmalıdır.

2. Klinik olarak endokardit ön tanısı olması

3. Sepsis için aşağıdaki bulgular değerlendirmeye alınmalıdır;

a. Vücut sıcaklığının normal değerlerin dışında olması

b. Anormal nabız sayısı, düşük veya yüksek kan basıncı değerleri veya artmış solunum sayısı

c. Üşüme, titreme varlığı

d. Lökopeni veya lökositoz

e. Yeni veya kötüleşen konfüzyon

f. Sepsis bulguları çok genç veya ileri yaş hasta grubunda çok hafif olabileceği veya hiç görülmeceği akılda tutulmalıdır.

Kan kültürlerinin alınmasında genel prensipler

Kan kültürü alınması rutin bir tetkik olarak görülmemelidir, **sadece klinik gereklilikler doğrultusunda kan kültürü alınmalıdır.**

Zamanlama: Kan kültürünün zamanlaması ve doğru sonuç eldesi için bildirilen optimum süre olarak pratikte ateş ortaya çıktığı dönem olarak önerilmektedir. Ancak kanda bulunan mekanizmalar nedeni ile bu süre zarfında bakteri kandan temizlenebilir. Bu nedenle ateş veya titreme ortaya çıkar çıkmaz, en kısa sürede örnek alınmalıdır.

Kan / besiyeri oranı Kan mikroorganizmaların üremesini inhibe eden maddeler içerir. Bu nedenle kan kültürü yapılacağında alınan hasta kanının belirli bir oranda dilue olması gerekir. Bu oran 1:5 veya 1:10 olmalıdır. Genellikle kültür şişelerinde en uygun kan miktarı olarak 10 ml kan ekilmektedir.

Antimikrobiyal tedavi Kan kültürleri olası sepsis veya bakteriyemi durumunda antibiyotik tedavisi başlanmadan önce alınmalıdır. Bakteriyemi veya fungemi şüphesi varlığında ayrı venlerden iki set kan kültürü alınmalıdır ve sonuçlar karşılaştırılmalı değerlendirilmelidir.

Standart kan kültür setleri

Genellikle her sette 2 şişe bulunur. Kan kültürü yaparken bir aerop, bir de anaerop şişe kullanılarak her şişeye en az 10 ml kan alınması gerekir (toplamda 20-30 ml). Anaerop kan kültürü şişesine alınan kan sadece anaerop bakterilerin izolasyonu için değil *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* gibi bazı fakültatif bakterilerin ilk izolasyonda anaerop besiyerlerinde daha iyi ve çabuk üremeleri nedeniyle tercih edilmektedir. Yeterli kanın alınmadığı durumda öncelikle aerop şişeye gerekli miktar konularak kalan anaerop şişeye konmalıdır. Çünkü *Pseudomonas* spp. gibi mutlak aerop bakterilerin yanı sıra mantar izolatları da çoğunlukla aerop şişelerden elde edilmektedir. Anaerop şişe kullanılmayacaksa da, yeterli miktarda örnekleme yapmak ve uygun kan: besiyeri oranı sağlayabilmek için 2 şişe kullanılmalıdır.

Cilt dezenfeksiyonu, kontaminasyonun önlemi

İnfeksiyon etkeninin en kısa zamanda ve doğru olarak saptanması için başta antisepsi-dezenfeksiyon olmak üzere bir takım kurallara uyulması gerekmektedir. Kan birçok mikroorganizmanın kolayca üreyebileceği bir ortamdır. Bu yüzden kan alma sırasında deri antisepsisi çok önemlidir. Antisepsiye dikkat edilmediğinde deriden bulaşabilecek cilt florası bakterileri yanlış değerlendirmeye yol açabilirler.

Standart uygulama olarak derinin öncelikle tüylerden arındırılması, %70 propil alkol ile temizlik, ardından %1-2'lik iyot tentürü veya bir iodofor (iyotun sudaki çözeltileri) ile silinmesi önerilir. İyodoforların maksimum antiseptik etkisi için 1,5-2 dk. temas süresi gereklidir.

Kan alımı

1. Kültür için kan örneğinin venöz girişimle alınması tercih edilir, arteriyel kan kültürü önerilmez.

2. Kateter veya damar içi diğer yabancı cisim aracılığı ile kan kültürü alınmamalıdır, çünkü kontaminasyon riski yüksektir. Gereken durumda kateterden kan alındığında da mutlaka venöz kandan ayrıca kültür alınmalıdır. Örneğin alındığı şişe üzerine kateterden alındığı mutlaka yazılmalıdır.

3. Venöz girişim yeri belirlendikten sonra kültür şişesi ya da tüpün lastik kapağı izopropil alkol ile silinerek kuruması beklenir.

4. Venöz kan önce bir iğne ve enjektör aracılığı ile alınır ve besiyeri şişesine iğne değiştirerek aktarılır.

5. Kan, ticari ürünler arasında bulunan iki taraflı iğne ya da transfer seti ile kültür şişesine aktarılabilir. Bu şekilde direk inokülasyon yapıldığı durumda geri kaçmayı önlemek için kültür şişesi vena girişimi bölgesinin aşağısında tutulmalıdır.

6. İlk girişimde damara ulaşılamamış ve yeniden girişim yapmak gerekirse yeni iğne kullanılmalıdır.

8. Örnek alındıktan sonra şişenin kapağı antiseptikle silinmeli; hafifçe sallayarak ters çevirmek sureti ile kanın pıhtılaşması önlenip besiyeri ile karışması sağlanmalıdır.

9. Örnek 2 saat içinde laboratuvara ulaştırılmalı, bu sırada buzdolabı ya da dondurucuya konmamalıdır.

Örnek alımı sonrası dikkate alınması gereken noktalar

a. Kan kültürü şişelerine kan konulduktan sonra şişenin kapağının antiseptik madde ile temizlendiğinden emin olunmalıdır.

b. Hastadan kan alındığında hemen şişelerin üzerine gerekli bilgilerin yazılıp yazılmadığı kontrol edilmelidir.

c. Alınan kan miktarı toplam alınması gereken miktardan az ise mutlaka klinisyenin laboratuvara bilgi vermesi gerekir.

d. Kültür için kan alındıktan sonra zaman, sıcaklık ve uygun şekilde transportun sağlanması önemlidir.

e. Şişeler laboratuvara ulaştırılıncaya kadar oda ısısında tutulmalıdır. >35°C sıcaklıkta bekletilmemelidir.

KAN KÜLTÜRLERİNİN İNKÜBASYONU VE İNCELENMESİ

Genel Kurallar

Kan kültürleri, Beyin Omurilik Sıvısı (BOS) kültürleri ile birlikte Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarında uygulanan en önemli tanı testidir. Bu nedenle de kan kültürleri her gün en az bir kez pozitiflik açısından incelenmelidir. İdeal olarak, pozitiflik saptanır saptanmaz şişe çıkarılıp değerlendirilmelidir. Tüm pozitif şişeler, katı besiyerlerine (kanlı agar, çukulata agar, anaerop kanlı agar gibi) pasajlanmalı ve Gram boyalı preparat hazırlanarak incelenmelidir. Gram boyası sonuçları hastanın kliniğine bildirilmelidir. Sürekli monitörizasyon sağlayan otomatize bir sistem yoksa şişeler üreme açısından, görsel olarak önce 6-12 saat inkübasyon sonunda, sonra da günlük olarak 7 gün süresince izlenmelidir. Şişeler çalkalandığında üreme oranları artar ancak bu durumda görsel değerlendirme yapılmaksızın 12- 18 saat sonra kör pasajlama yapılmalıdır. Üremenin erken saptanması için pasaj sırasında Gram boyalı preparat hazırlanmalıdır. Anaerop şişeler ise çalkalama yapılmadan inkübe edilir ve üreme varlığını gösterecek, gaz, bulanıklık, hemoliz gibi belirtiler açısından görsel olarak incelenir. Anaerop şişelerden kör pasaj gerekli değildir.

Pozitif kan kültürlerinden yapılan preparatların incelenmesi

Bir kan kültüründe üreme belirlendiğinde yapılması gereken en önemli test, Gram boyalı preparat hazırlanması ve incelenmesidir. Gram boyama sonuçları bildirilirken mümkün olduğunca açık ifadeler kullanılmalı, yanıltıcı veya farklı anlamlara gelen açıklamalar kullanılmamalıdır. Örneğin, "Gram pozitif kok görüldü" dendiğinde; stafilokok, streptokok veya enterokoklar anlaşılırken; "Gram pozitif diplokoklar ve kok zincirleri görüldü" olası etkeni, pnömokoklar, enterokoklar veya grup B streptokoklar ile sınırlamaktadır. Uzun zincirler açıklaması ise; beta-hemolitik ve viridans streptokokları düşündürmektedir.

Mikroskopik inceleme sonuçlarından bağımsız olarak tüm pozitif kültürler, katı besiyerlerine pasajlanmalıdır. Pozitif kültürlerde görsel olarak, bulanıklık, gaz kabarcıkları, kan renginin kırmızıdan kahverengiye dönmesi gibi belirtiler aranır. Diğer üreme belirtileri arasında; granüler veya küçük küresel yapıların, küşeri düşündüren pamuksu yapıların ya da kuyruklu yıldıza benzer bulanıklık çizgilerinin görülmesi sayılabilir. Pasaj için kullanılan besiyerleri zengin olmalı, bu amaçla en azından %5 koyun kanı içeren triptik soya agarı ve çikolata agar kullanılmalıdır. Kan kültürü iyice karıştırıldıktan sonra bu iki besiyerine 1-2 damla olacak şekilde aktarılır ve yayılır. Besiyerleri 35-37°C'de, % 3-5 CO₂ içeren ortamda, her gün kontrol edilerek en az 48 saat inkübe edilir. Gram boyama sonuçlarına göre kullanılan besiyerlerine, gram negatif basiller için MacConkey veya EMB agar, mantarlar için mikolojik besiyerleri, eklenebilir. Eğer üreme sadece anaerop şişede olursa veya her iki şişede görülen mikroorganizmalar anaeroblara düşündürürse; vitamin K ve hemin ile zenginleştirilmiş bir anaerop kanlı agara da ekim yapılmalı ve anaerop şartlarda 48-72 saat inkübe edilmelidir. Üreme tespit edilmezse inkübasyona devam edilir. Kan kültürünün alındığı tarihten itibaren 7 gün bekletilmiş ve pasajlarında bakteri üremesi tespit edilmemiş kültürler 'üreme olmadı' şeklinde rapor edilir.

Ardından üremeler standart biyokimyasal testler, ticari tanı panelleri (API, Biomerieux, France) gibi konvansiyonel laboratuvar teknikleri ile ya da mümkünse antikor testleri/prob hibridzasyonu ile doğrudan tanımlama,

protein-nükleik asit floresans in situ hibridizasyon (PNA-FISH), PCR testleri ve MALDI-TOF MS kullanımı ile identifikasyon gerçekleştirilir. Universal 16S rRNA (bakteriler için) ve 18SrRNA (mantarlar için) primerleri ile amplifikasyon ve dizi analizi tabanlı testler (NAAT) kan kültüründen doğrudan tür tanımlamaları için kullanılabilir.

Ancak, bu yöntemler kullanılmadan önce genellikle bakteri hakkında bilgi sahibi olunması (en azından Gram negatif çomak, Gram pozitif kok gibi) gereklidir. Karışık üremelerde sonuçların yorumlanmasında güçlük olmaktadır, karışık Gram pozitif ve Gram negatif üremelerde amplifikasyon sistemlerinin ayrı panellerle kullanılması gereklidir. Bu da ya maliyeti, ya da saf kültür eldesi için bekleme süresini arttıracaktır. Yetişmiş eleman, özel cihaz ve maliyet nedeniyle, bu yöntemler henüz rutin kullanım için uygun gözükmemektedir.

Bakteri saf kültür olarak elde edildiğinde CLSI veya EUCAST standartlarına uygun bir şekilde duyarlılık testinin gerçekleştirilmesi ve duyarlı antibiyotiklerin hekime bildirilmesi önerilir.

ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTİ (ANTİBİYOGRAM)

Antibiyotikler, mikroorganizmalar tarafından sentezlenen, yarı sentetik ve sentetik olarak hazırlanabilen antimikrobiyal kimyasal maddelerdir. Antibiyotiklerin mikroorganizmalar üzerine etkisi kullanılan konsantrasyonlara bağlı olarak iki türlüdür:

1- Bakteriostatik etki: Bu etki sonucunda bakterilerin üremesi durur. Eğer çok uzun olmayan bir süre sonra bakteri antibiyotiğin etkisinden kurtarılıp yeni ve uygun bir ortama aktarılırsa yeniden üremesini sürdürür.

2- Bakterisid etki: Antibiyotik bakterinin ölümüne yol açar. Bakteri antibiyotikli ortamdan ayrılarak uygun bir üreme ortamına aktarıldığında ya

hiç üreyemez ya da bir iki pasaj üreme gösterdikten sonra üremesi durur ve ölür.

Tüm antibiyotikler bakterilere belirli yoğunluklarda ve belirli bir zaman sürecinde önce bakteristatik, daha fazla yoğunluklarda ve daha uzun sürelerde bakterisid etki yaparlar.

Antibiyotiklerin bilinçsiz ve gelişigüzel kullanımları sonucu kullanılan antibiyotiklere karşı bir direnç gelişmekte ve buna bağlı olarak sağaltımda istenilen sonuçlar alınamamaktadır. Bu nedenle infeksiyon olgularında başarılı bir sağaltıma gitmek için antibiyotik duyarlılık testinin yapılması gereği ortaya çıkmaktadır.

Antibiyotik duyarlılık testi bir antibakteriyel ajanın belli bir bakteri türüne karşı in-vitro etkinliğini saptamak amacıyla uygulanan testtir. Yöntemlerine göre 5'e ayrılır:

- 1- Disk difüzyon testleri
- 2- Dilüsyon testleri
 - A. Agar dilüsyon testleri (katı besiyerinde sulandırım testi)
 - B. Broth dilüsyon testleri
 - a. Makrodilüsyon (tüp dilüsyon) yöntemi
 - b. Mikrodilüsyon yöntemi
- 3- Gradient strip testleri(E-test, MICE)
- 4- Otomatize yöntemler
- 5- Moleküler yöntemler

Hastalık etkenlerinin antibiyotiklere karşı duyarlılığının saptanabilmesi için öncelikle bu etkenlerin izole edilmesi gerekir. Bu amaçla, oluşan infeksiyona göre inceleme örnekleri alınarak laboratuvara gönderilir. Antibiyotik kullanmakta olan hastalardan inceleme örnekleri alınmamalıdır. Hasta eğer antibiyotik kullanmışsa son kullanımdan 72 saat geçtikten sonra örnek alınmalıdır.

DİSK DİFFÜZYON YÖNTEMİ İLE ANTİBİYOGRAM TESTİ

Laboratuvara gönderilen örneklerden ekim yapılarak etken izole edilir.

Her bir etken fizyolojik tuzlu su ile 0.5 McFarland yoğunluğuna eş değerde sulandırılarak bulanıklığı ve dolayısıyla bakteri sayısı standardize edilerek ayarlanır.

Sıvıdan 0,1 ml alınarak Muller Hinton Agar ya da Kanlı Agar besiyerinin yüzeyine yayılır.

Bu yüzeye, içlerine değişik antibiyotiklerin emdirildiği yaklaşık 5-8mm çapındaki diskler eşit aralıklarla yerleştirilir.

Besiyeri yeniden 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılır ve bu süre sonunda sonuçlar değerlendirilir.

Değerlendirmede disklerin çevresinde oluşan zonlar dikkate alınır. Bu zona Üreme İnhibisyon Zonu denir.

Disk çevresinde oluşan zon alanında üreme olup olmadığına ve zonun çapına bakılır.

Eğer zon alanı içinde üreme varsa etkenin o antibiyotiğe karşı dirençli olduğu anlaşılır ve tedavi amacıyla kullanılmaz.

ÖRNEK SORULAR

Bu sorular grupların laboratuvar çalışmaları sonucunda hazırladıkları sorulardır. Sınavda bu soru önerileri gözönünde bulundurularak sınav soruları hazırlanmaktadır. Ancak bu durum sınavda sorular aşağıdakilerin birebir aynısı olacaktır şeklinde yorumlanmamalıdır. Sınava girecek tüm arkadaşlara başarılar dileriz.

Kanlı agar ve MacConkey agara pasaj yapıldıktan sonra inkübasyona kaldırıldığı ortamlar sırasıyla aşağılardan hangisidir?

Örnekten yapılan pasajlamada elde edilen ve saflığı bilinmeyen kültürü saflaştırmak için uygulanan ilk adım aşağıdakilerden hangisidir?

Elinize bir klinikten mantar şüphesiyle kulak sıvabı gelmiştir ve mikolojik inceleme yapılması istenmektedir? Ne yaparsınız?

Karışık kültürden saflaştırma amaçlı olarak pasaj yaparken nelere dikkat edersiniz?

Bakteriyoskopi nedir?

Gram boyamada fiziksel tespit nasıl yapılır?

Gram negatif bakteriler Gram boyama sonrasında hangi renkte görülürler?

Bakterinin hangi özelliğini saptamak için kanlı agara ekim yapılır?

Biyogüvenlik seviye 1 laboratuvarı hangi çalışmalar için uygundur? Çalışılabilecek bir bakteri türüne örnek veriniz.

Klinik bir örneğin işlenmesi için kullanılacak laboratuvarların güvenlik seviyesi minimum ne olmalıdır?

Tüm laboratuvarlarda uyulması gereken “standart mikrobiyoloji uygulamaları” na 3 örnek veriniz

Biyogüvenlik kabinlerinin kullanım amaçları nelerdir?

Bir mikroorganizmanın hangi risk grubunda yer alacağı hangi kriterlere göre saptanır?

Hayvanlarda idrar örneği kaç şekilde alınabilir?

Bakteriyolojik inceleme amacıyla idrar örneği alınırken neden sistosentez yolu tercih edilir?

Kan kültürü için örnek pratikte hangi dönemde alınır?

Septisemi bulguları nelerdir?

Kan kültürünün endikasyonları nelerdir?

Kan kültüründe üreme gözlemlendiğinde yapılması gereken ilk işlem nedir?

İdrardaki bakteri sayısı hangi değer üzerinde ise enfeksiyon var olarak yorumlanır?

En az kaç ml idrar örneği alınmalıdır?

En güvenli idrar alma yöntemi hangisidir?

Laboratuvara gelen idrar örneği hangi koşullarda saklanmalıdır?

Antibiyogram ne amaçla yapılır?

Disk difüzyon testi nasıl yorumlanır?

Disk difüzyon testinin yapılışını çalışın☺arkadaşlarınızın çok güzel test sorusu var...

Bulaşıcı mastit etkenleri nelerdir?

Mastit şüpheli bir hayvandan süt örneği alınırken nelere dikkat edilmelidir?

Tüm inceleme örneklerinden hangi besiyerlerine ekimler yaptığınızı ve hangi amaçla bu besiyerlerini kullandığınızı çalışın☺ tüm gruplarda benzer sorular bulunmaktadır. Ve yine her inceleme örneğinde laboratuvarında genel bir sırayı takip ettiniz bu aşamaları da bilin. Başarılar.....