

# GENEL MİKROBİYOLOJİ UYGULAMA DERS NOTU

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa  
Veteriner Fakültesi

## **Mikrobiyoloji Laboratuvarında Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar**

- 1- Laboratuvar içerisinde ve çalışmalarında mutlaka önlük giyilmelidir. Önlükler uzun kollu, vücudu yeterli kapatıcı uzunlukta ve bedene uygun genişlikte olmalı, laboratuvar içerisinde düğmeleri ilikli olmalıdır. Önlük dışına hiçbir giysi, aksesuar çıkmamalıdır.
- 2- Laboratuvar içerisinde mutlaka kapalı ayakkabı kullanılmalıdır. Terlik, ucu açık ayakkabılar laboratuvarında kullanılmamalıdır.
- 3- Giyecekler, çantalar, kullanılmayacak ders materyalleri kontaminasyon riski nedeniyle mutlaka çalışma bölgesinden uzakta tutulmalıdır.
- 4- Laboratuvar içerisine kapalı paket içinde olsa da, yiyecek ve içecek sokulmamalıdır.
- 5- Saçlar özellikle ateşin yanında çalışılırken mutlaka toplanmalıdır. Sarkan, sallanan takılar riski artırdığı için laboratuvar içerisinde kullanılmamalıdır.
- 6- Çalışma süresince kulak, ağız, burun, göz gibi açık organlardan kalem, parmak, yiyecek, öze, deney tüpü vb. gibi unsurlar uzak tutulmalıdır.
- 7- Enjektörler, kesici delici aletler yapılan çalışmalar sonrasında mutlaka biyolojik atık kutularına atılmalıdır.
- 8- Pipet kullanımında puar ya da otomatik pipet kullanılmalıdır.
- 9- Kimyasal ya da biyolojik hiçbir madde koklanmamalı, tadılmamalıdır.
- 10- Ateş ile çalışırken dikkatli olunmalıdır, çalışan kişiler arasında hiçbir şekilde şakalaşma yapılmamalıdır. Kullanılmadığı sürece bek alevi kapalı konumda tutulmalıdır.
- 11- Mikroskoplar kullanım sonunda xylol ile temizlenmelidir, kullanılmış preparatlar kirli kovasına atılmalı, kullanım sonrasında mikroskopların ışıkları ve örtüleri kapatılmalıdır.
- 12- Laboratuvardaki eğitim materyalleri, kültürler, inceleme örnekleri kesinlikle laboratuvar dışına çıkarılmamalıdır
- 13- Hamilelik, alerjiler, renk körlüğü gibi tıbbi durumlarınızı mutlaka dersin sorumlusuna bildiriniz.
- 14- Laboratuvar çıkışında eller mutlaka uygun şekilde yıkanmalıdır.
- 15- **Meydana gelen kazaları (dökülme, kırılma vb.) mutlaka dersin sorumlusuna bildiriniz.**

## I. NOT

### MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARINDA KULLANILAN GEREÇLER

**1- Cam gereçler:** Mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılan cam malzemeler genellikle borosilikat bileşimindedir. Bu camlar ısıya dayanıklı olduğu gibi ani ısı değişikliklerine de dirençlidir.

Laboratuvarında en çok kullanılan cam malzemeler;

**Tüpler:** Deney tüpleri kullanım amaçlarına göre değişik boy ve çaptadırlar. Çoğunlukla 18 x 180mm ya da 15 x 150mm boyutlarındaki tüpler kullanılır. Son zamanlarda plastik otoklavlanabilir değişik ebatlarda tüplerde kullanılmaktadır.

**Petri kutuları:** Çeşitli amaçlarla kullanılan farklı çaplardaki (6, 9, 18 cm ) cam kutulardır. Çoğunlukla içlerine katı besiyerleri dökülerek mikroorganizmaların üretilmesi ve antibiyogram amacıyla kullanılırlar. Steril plastik tek kullanımlık petrilere de üretilmektedir.

**Pipetler:** Pipetler sıvıları ölçmek, aktarmak, besiyerlerine ekimler yapmak, serolojik reaksiyonları uygulamak gibi amaçlarla kullanılırlar. Boyları 30–40 cm, hacimleri 0.1, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 ml' ye kadar olabilen cam borulardır.

**Pasteur pipetleri:** Az miktardaki sıvıların alınması ve aktarılmasında kullanılırlar. Bu pipetler cam borulardan laboratuvarında hazırlanırlar.

**Desikatör ve jarlar:** Maddeleri kuru tutmada ya da kurutmada kullanılan yuvarlak, kalın ve kapalı cam kaplardır. Aynı zamanda istenilen atmosferik şartların (anaerobik, mikroaerobik) içlerindeki sınırlı ortamda sağlanması içinde kullanılırlar.

Yukarıdaki cam gereçlerin yanı sıra beherglas, mezür, havan, enjektör, santrifüj tüpleri, balon ve balon jojeler oldukça sıklıkla kullanılırlar.

**2- Ekim gereçleri:** Mikroorganizmaların besiyerlerine ekilmesi amacıyla pipetler dışında özel, yanmayan ve okside olmayan tellerden yapılan araçlar kullanılır.

**Öze:** Yanmayan madeni ve özel bir sapa takılan ve ucunda 2–4 mm çapında halka bulunan 7–8 cm uzunluğundaki paslanmaz çelik ya da platin tellerdir. Daha çok sıvı ortamlardan örnek alıp ekim yapmaya yarar.

**İğne:** Ucunda halkalı tel yerine düz tel bulunan aynı yapıdaki gereçlerdir. Katı ortamlardan ve özellikle kolonilerden örnek alıp aktarmaya yarar.

**Eküvyon (Svab):** Boğaz, burun, kulak, anüs, vajina v.s. yerlerden mikroplu materyal almak için kullanılan ucu pamuklu tahta çubuklar, tel ya da plastikten yapılmış araçlardır. Tüp içinde steril olarak bulundurulurlar.

**Spatül:** Karaciğer, dalak, akciğer v.s. gibi iç organların iç kısmından steril olarak örnek almak için bu organların yüzeylerini dağlamaya yarayan alettir.

**3- Diğer gereçler:**

**Etüv (inkübatör):** Mikroorganizmaları üretmek için kullanılan, ısıyı üretecek etkenin karakterine göre ayarlanabilen sıcak hava dolaplarıdır. İnsan ve hayvanlarda hastalık oluşturan mikropların çoğunluğu 37°C'de ürediğinden etüvler genellikle 37°C'ye ayarlanır. Mantar etkenleri ve balıklarda hastalık yapan mikroorganizmaların üretilmesi için 25°C' de çalışan ve çevre ısısından etkilenmeyen özel soğutmalı etüvler kullanılır. Etüvün içerisinde aşırı kurumunun önlenmesi için yeterli nemin sağlanması gerekir. Bu amaçla etüv içine küvetle su konur. Özel amaçlı üretilen anerobik ve karbondioksitli(CO<sub>2</sub>) etüvlerde mevcuttur.

**Su banyosu (Benmari):** İstenilen ayardaki ısı derecelerinde sıcak su elde etmeye ve suyu bu derecelerde sabit tutmaya yarayan gereçlerdir. Laboratuvarında çok çeşitli amaçlarla kullanılır.

**Otoklav:** Besiyerlerini, laboratuvarında kullanılan malzemeleri ve kontamine (bulaşık)

materyali temizlemek ve sterilize etmek için kullanılan, basınçlı buharla çalışan özel aletlerdir.

**Açık otoklav (Koch kazanı):** Besiyerlerinin sterilizasyonunda ve katı besiyerlerinin eritilmesinde kullanılan aletlerdir. Basınçsız buhar ile çalışırlar.

**Pasteur fırını:** Kuru sıcak hava ile sterilizasyon amacıyla kullanılan aletlerdir.

**pH metre:** Besiyerlerinin ve diğer sıvıların pH'sını ölçmede kullanılan elektrik veya pille çalışan aletlerdir.

**Distile su aygıtı:** Besiyerleri ve diğer solüsyonlar için çok gerekli olan saf suyu elde etmede kullanılan aletlerdir.

**Terazi:** Kimyasal maddelerin tartılmasında kullanılırlar. Amaca göre hassas ya da normal teraziler tercih edilir.

**Santrifüj aleti:** Bir sıvıda bulunan mikroorganizmaları, hücreleri, partikülleri çöktürmede ve sıvıları berraklaştırmada yararlanılan aletlerdir.

**Derin dondurucu (Deepfreeze):** Uzun süreli ve çok düşük ısılarda saklanması gereken çeşitli kimyasal ve marazi maddelerin korunduğu dolaptır. -20 ile - 80°C' ler arasında çalışabilir.

**Tüp karıştırıcı (vorteks):** Genellikle tüp içindeki sıvıları karıştırmada kullanılan, hızı istenilen dereceye ayarlanabilen bir alettir.

**Hot plate shaker:** Çok miktardaki sıvıları karıştırmada kullanılan ve ısısı istenilen dereceye ayarlanabilen karıştırıcıdır.

**Mikroskoplar:** Laboratuarlarda genel amaçlar için " Işık Mikroskopları" kullanılır. Büyütme kapasiteleri 1000–3000 arasında değişir.

Ayrıca özel amaçlar için geliştirilmiş olan Karanlık Saha Mikroskobu, Faz-Kontrast Mikroskobu, Flüoresans Mikroskobu ve Elektron Mikroskobu mikrobiyoloji alanında sıkça kullanılmaktadır.

## II.NOT MİKROBİYOLOJİK TERİMLER

**Mikroorganizma:** Canlılarda infeksiyonlara yol açan çok küçük biyolojik etkenlerdir. Bunlar bakteriler, virüsler, mantarlar ve parazitlerdir.

**Mikrobiyoloji:** İnsan ve hayvan sağlığı ile direk olarak ya da yakından ilgili olan mikroorganizmaların incelendiği bilim dalı.

**Bakteri:** İnsan ve hayvanlarda infeksiyona yol açan, DNA ve RNA'ya sahip, enzim aktivesi gösteren, canlı ve cansız (besiyeri) ortamlarda bölünmeyle çoğalabilen, filtrelerden geçemeyen toprak, su ve havada da bulunabilen yuvarlak, çomak ya da sarmal şekilli canlılardır. Bakterileri inceleyen bilim dalına "Bakteriyoloji" denir.

**Virüs:** Zorunlu hücre parazitleri olup, bakterilerin geçemedikleri filtrelerden geçebilen, kendi metabolik aktiviteleri olmadığı için seçtikleri canlı hücrenin metabolizmasından yararlanarak çoğalabilen ve girdikleri organizmada değişikliklere yol açan, yalnızca bir nükleik asit (DNA ya da RNA) taşıyan, infeksiyon oluşturma gücüne sahip canlılardır. Virüsleri inceleyen bilim dalına "Viroloji" denir.

**Mantar (Fungus):** Doğada yaygın olarak bulunan, insan ve hayvanlarda mikotik infeksiyonlara yol açan, bölünme, tomurcuklanma ve sporlanmayla çoğalabilen küf ( çok hücreli) ya da maya (tek hücreli) yapısındaki canlılardır. Mantarları inceleyen bilim dalına "Mikoloji" denir.

**Epizootiyoloji:** Salgın hayvan hastalıklarının çıkış, yayılış ve dağılışları ile bunlara etkileyen faktörleri ve bu hastalıklardan korunma ve kontrol yöntemlerini inceleyen bilim dalıdır.

**Hastalık:** İnsan ve hayvanlarda hücre, doku veya organlardan birinin ya da birkaçının normal fonksiyonlarını yerine getirememesidir.

**Saprofitik mikroorganizma:** İnsan ve hayvanlarda hastalık oluşturmeyen mikroorganizmalardır.

**Patojenik mikroorganizma:** İnsan ve hayvanlarda hastalık oluşturan mikroorganizmalardır.

**Patojenite:** Mikroorganizmaların hastalık oluşturma yeteneğidir.

**Virulens:** Patojen mikroorganizmaların hastalık oluşturma gücüdür.

**İnfeksiyon:** Patojenik bir mikroorganizmanın vücuda girmesi, yerleşmesi, çoğalarak yayılması ya da üremesi sırasında oluşturduğu enzim ve toksinlerinin yayılması sonucunda canlıda hastalık belirtilerinin ortaya çıkmasıdır.

**İnceleme örneği:** Vücudunda herhangi bir infeksiyonun söz konusu olduğu canlı ya da ölü hayvanlardan, infeksiyonun laboratuvar tanısı amacıyla alınan her türlü muayene maddesine (iç organlar, kan, idrar, dışkı v.s.) inceleme örneği denir.

**Bakteriyoskopi:** Laboratuvara gönderilen marazi maddelerden direkt olarak preparat hazırlanarak, etkenin morfolojik tanısı amacıyla mikroskopta incelenmesidir.

**Besiyeri (Vasat):** Mikroorganizmaların üretilmeleri, saf olarak elde edilmeleri ve çeşitli biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi için kullanılan, sıvı ya da katı olarak hazırlanan besleyici ortamlardır.

**Ekim:** İçerisinde mikroorganizmaların bulunduğu bilinen ya da bunların bulunup bulunmadığı araştırılacak olan ortamlardan ekim aletleri (çoğunlukla öze) ile alınan örneklerin belirli kurallara göre besiyerlerine aktarılması olayıdır.

**İnokulum – İnokulasyon:** Canlı ve ölü hayvanlardan alınan marazi maddelerden çeşitli yöntemlerle hazırlanan homojen süspansiyona inokulum, inokulumun deney hayvanlarına çeşitli yollarla uygulamasına inokulasyon denir. Bu uygulama etkenin patojenitesini saptamak amacıyla yapılır.

**İnkubasyon (Kuluçka) Süresi:** Mikroorganizmaların vücut içinde ya da dışında üremesi için gerekli olan süre.

**Üreme:** Bakterilerin ve mantarların uygun besiyerlerinde ve çevresel koşullar altında, virüslerin canlı ortamlarda (doku kültürü, embriyolu yumurta, deney hayvanları gibi) çoğalmasdır.

**Kültür:** Laboratuarlarda besiyerlerinde üretilmiş olan mikroorganizmaların tümüne kültür denir.

**Koloni:** Katı besiyerinde üreyen mikroorganizmaların oluşturdukları gözle görülebilen kümelere koloni denir. Mikroorganizma türleri kendilerine özgü renk, koku, büyüklük ve yapıda koloni oluştururlar.

**Karışık kültür:** İçinde çeşitli mikroorganizmaların ürediği kültürdür.

**İzolasyon:** İnceleme örneğinde bulunan hastalık etkeni mikroorganizmanın laboratuarda ekim yapılarak üretilmesi ya da karışık kültürdeki bir mikroorganizmayı diğerlerinden ayırarak saf olarak üretme işlemidir.

**Saf kültür:** Yalnız bir tür mikroorganizmanın uygun besiyerinde üretilmesi ile oluşan kültürdür.

**Suş (Köken):** Herhangi bir ortamdan soyutlanarak elde edilen ve bütün özellikleri belirlenmiş saf kültürlerdir.

**İdentifikasyon:** İzole edilen mikroorganizmanın morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin saptanarak isimlendirilmesidir. (ör; E.coli)

**Spor:** Bazı bakterilerin stoplazmasının içerisinde ve özel koşullara bağlı olarak oluşan, o bakterilerin çeşitli fiziksel ve kimyasal çevre etkilerine karşı dayanıklı olmasını sağlayan ve üreme ile ilgisi olmayan oluşumlardır.

**Portör:** Bazı infeksiyonlarda hayvanların iyileştikten sonra hastalık etkenini çeşitli yollarla saçmalaradır.

**Rezervuar:** Hastalık etkenini aldıkları halde, kendileri infeksiyona yakalanmayan fakat etkeni bünyelerinde barındırarak duyarlı hayvanlara bulaşmasını sağlayan omurgalı canlılardır.

**Morbidite:** Bir havyan topluluğunda, infekte olan hayvan sayısının populasyon sayısına oranıdır.

**Mortalite:** Bir havyan topluluğunda hastalıktan ölen hayvan sayısının populasyon sayısına oranıdır.

**Letalite:** Bir hayvan topluluğunda hasta olan hayvan sayısının aynı hastalıktan ölen hayvan sayısına oranıdır.

**İnsidens:** Belirli bir zaman periyodunda görülen hastalık olgularının oranıdır

**Prevalans:** Belirli bir zaman kesitinde saptanan hastalık olgularının oranıdır.

**Zoonotik infeksiyon:** Hayvanlardan insanlara, insanlardan hayvanlara bulaşabilen hastalıklara denir.

## STERİLİZASYON

Herhangi bir maddenin ya da cismin birlikte bulunduğu tüm mikroorganizmaların her türlü canlı ve aktif şekillerinden temizlenmesi işlemidir. Sterilizasyon işlemi sonucunda, bu işlemin uygulandığı madde ya da cisimlerde gelişme ve çoğalma yeteneğinde hiçbir mikroorganizma bulunmadığı anlaşılır.

### Sterilizasyon Yöntemleri:

#### A - Isı ile Sterilizasyon

##### I – Nemli ısı ile sterilizasyon

##### a- Buharla sterilizasyon

##### 1- Basınçlı buharla

##### 2- Basınçsız buharla

##### b- Sıcak su ile sterilizasyon

##### 1- Kaynatma ile

##### 2- Tindalizasyon

##### II – Kuru sıcak hava ile sterilizasyon

##### III – Yakma ve alevle sterilizasyon

#### B – Süzme (filtrasyon) ile sterilizasyon

#### C – Işınlama ile sterilizasyon

#### D – Kimyasal maddelerle sterilizasyon (Dezenfeksiyon)

#### E – Etilen oksit gazıyla sterilizasyon

### A – ISI İLE STERİLİZASYON

Bu sterilizasyonda, hücre proteinleri doğrudan doğruya koagüle edilerek sterilizasyon sağlanır. Isı ile sterilizasyonda çeşitli etmenler etkilidir:

- Isı derecesi: Derece yükseldikçe sterilizasyon daha iyi ve çabuk olur.
- Isının etki süresi: Etki süresi ısı derecesiyle ters orantılıdır.
- Ortamdaki nem oranı: Ortamdaki nem oranı arttıkça daha düşük ısı derecelerinde, daha kısa zamanda ve daha iyi sterilizasyon olur.
- Mikroorganizma içindeki su miktarı: Proteinlerin koagüle olabilmeleri için ortamda en az % 50 oranında su bulunmalıdır. Sporlar az su içerdiklerinden ısı ile sterilizasyona daha dayanıklıdır.
- pH derecesi: Nötral pH' dan uzaklaşıp asit ya da alkali ortama kaydıkça ısının etkisi

artmaktadır.

- Ozmotik basınç: Ozmotik basıncın çokluğu hücre suyunun azalmasına neden olarak olumsuz etki yapar.

## I – Nemli ısı ile sterilizasyon

### a- Buharla sterilizasyon

Sterilizasyon için su buharı, kuru sıcak havadan daha etkilidir. Çünkü buharın öldürücü etkisi daha fazladır ve gözenekli maddelere daha kolay etkir.

**1 – Basıncılı buhar ile sterilizasyon:** Buharla doymuş basınçla bir ortamda, 100° C’ den yüksek ısı ile sterilizasyon sağlanır. Bu amaçla otoklav kullanılır. Genellikle 121° C’ de 15 dakika, 115° C’ de 30 dakika ya da 134° C’ de 3 dakikalık süreler sterilizasyon için yeterlidir. Sıvı ve katı besiyerleri, kontamine cam malzemeler ve bazı süspansiyonlar bu şekilde sterilize edilirler.

**2 – Basıncısız buharla sterilizasyon:** Buharla doymuş bir ortamda, 100° C’ de ve basınçsız olarak uygulanan sterilizasyondur. Bu amaçla Koch kazanı kullanılır. Makas, pens, bisturi gibi aletler ve 100° C’ nin üzerinde bozulabilecek maddeler bu şekilde sterilize edilirler. Basıncısız buharla sterilizasyon için 30–60 dakikalık süreler yeterlidir.

### b- Sıcak su ile sterilizasyon

**1 – Kaynatma ile sterilizasyon:** Basıncısız buhar sterilizasyonunun kullanıldığı amaçlar için kullanılabilir. Bu tip sterilizasyon için bazı noktalara dikkat etmek gerekir. Su, 760 mm basınçta ve 100° C’ de kaynar. Atmosfer basıncı düştükçe kaynama derecesi de azalır. Buna göre sterilizasyon zamanı basınca ve sterilize edilen cisme göre ayarlanır. Kaynatma ile sterilizasyon için 100° C’ de 30 dakikalık süre yeterlidir. Sterilize edilecek aletlerin tümünün kaynar suyun içine batmış olmalarına dikkat edilmelidir.

**2 – Tindalizasyon:** Tindalizasyonun esası, sıvı maddeleri belli bir ısı derecesinde aşamalı olarak ısıtarak birkaç günde sterilizasyon elde etmektir. Bu amaçla benmari kullanılır ve 56 – 100° C’ de, günde 1 saat olmak üzere 3 gün üst üste sterilizasyon yapılır. Birinci ısıtma sonunda bakterilerin vejetatif şekillerinin çoğu ölür, sporlar canlı kalır. Bir gün oda ısısında bekletilmekle bu sporlar açılıp vejetatif şekle dönerler. İkinci gün yeniden bir saat ısıtma uygulanarak bunlar da ölürler. Bir gün daha bekletilip üçüncü gün uygulana ısıtma sonucunda tam olarak sterilizasyon elde edilmiş olur.

## II – Kuru sıcak hava ile sterilizasyon

Bu sterilizasyon şeklinde, nem etmeni ortadan kalktığı için daha uzun süre gerekir. Bu amaçla Pasteur fırını kullanılır. Bu yöntemle cam ve metal aletler ile içlerine nemin ulaşmadığı yağlar (vazelin gibi) sterilize edilirler. Sterilize edilecek malzemenin kuru olmasına dikkat edilir. Besiyerleri ve sıvılar kuru sıcak hava ile sterilize edilemezler. Kuru sıcak hava ile sterilizasyon için, 175° C’ de bir, 165° C’ de iki, 150° C’ de üç ve 120° C’ de 8 saatlik süreler uygun olur.



### III – Yakma ve alevle

Laboratuarda kullanılan öze, iğne gibi malzemeler kullanılmadan önce alevde kızıllaşıncaya kadar yakılarak sterilize edilirler ve soğutulduktan sonra kullanılırlar. Tüp, erlenmayer, balon gibi daha önceden sterilize edilmiş cam malzemelerin ağzı çalışma sırasındaki olası bir bulaşmaya karşı kullanılmadan önce, kullanılırken ya da kullanıldıktan sonra alevden geçirilerek, alev in yaladığı yüzeyler yeniden sterilize edilmiş olur.

### B – SÜZME (FİLTRASYON) İLE STERİLİZASYON

Özellikle ısı ve kimyasal etmenlerle bozulan maddelerin ve serumların sterilizasyonunda filtrasyondan yararlanır. Bu yöntemde sıvı kültürde, sıvı besiyerlerinde, patolojik sıvılarda ve serumlardaki bakteriler süzülerek, bu bakterilerin süzüntüye geçmesi önlenir ve böylece steril süzüntü elde edilir. Bu amaçla bakterileri tutan ve delik çapı 1µm'yi aşamayan filtreler kullanılır. Filtreler yapısını oluşturan maddelere göre 5 çeşittir: - Selüloz membran filtreleri

- Berkefeld filtreleri
- Seitz filtreleri
- Cam tozu filtreleri
- Chamberland filtreleri

### C – IŞINLANMA İLE STERİLİZASYON

Işınlama ile sterilizasyonun uygulama alanı sınırlıdır. En çok kullanılan ışınlar ultraviyole ışınları, X ışınları ve gama ışınlarıdır.

Ultraviyole ışınları daha çok oda atmosferi ve bazı alet yüzeylerinin dezenfeksiyonunda kullanılır. Bu ışınlarla çalışırken özel filtreler ve gözlükler kullanmak gerekir. Gama ve X ışınlar, penetran olmaları nedeni ile iyi ambalajlanmış ve polietilen ya da benzeri sentetik maddelerden yapılmış protezler, yapay kalp kapakçıkları, katgüt, ipek dikiş malzemeleri, kateter ve çeşitli sentetik organların sterilizasyonunda ve besin maddelerinin saklanması için kullanılır. Gama ve X ışınlarının etrafa yayılmasının önlenmesi için kurşun izoleli odalarda çalışılması gerekir.

### D – KİMYASAL MADDELERLE STERİLİZASYON (DEZENFEKSİYON)

Bir cismin ya da maddenin hastalandırıcı nitelikteki mikroorganizmalardan arındırılması işlemidir. Tam bir dezenfeksiyon için ortamdaki hastalık yapıcı bakteri ve mantar gibi mikroorganizmaların vejetatif şekillerinin ve sporlarının ölmesi ve maddelerin inaktive olması gerekir.

Kimyasal maddelerin mikroorganizmalar üzerindeki etkileri yapılarına, yoğunluklarına ve mikroorganizmalarla bir arada bulunma sürelerinin uzunluğuna bağlıdır. Dezenfeksiyon işlemi sırasında hastalandırıcı olmayan mikroorganizmalar da ölebilirler. Ancak bu mikroorganizmaların ortamda bulunması dezenfeksiyon işlemine aykırı olmaz.

Dezenfektanların mikroorganizmalar üzerine değişik tarzda etkileri vardır:

- 1- Bakteri membranının fonksiyonunu bozarlar. Bunlar fenol ve fenol bileşikleri, sentetik deterjanlar ve organik solventlerdir.

- 2- Proteinleri denatüre ederler, bunlar daha çok asit (asit borik, propionik asit gibi) ve alkaliler ( KOH, NaOH gibi) dir.
- 3- Enzim aktivitesini bozarlar. Bunlar ağır metaller (cıva, gümüş gibi), tuzlar, oksidan maddeler ( oksijenli su, potasyum permanganat, klor, sodyum hipoklorit gibi) ve alkilin maddeler (formaldehid, formol gibi) dir.
- 4- Nükleer sistemi bozarlar. Bu amaçla boyalardan yararlanılır. Bunlar metilen mavisi, brillant yeşili, fuksin, malaşit yeşili v.s.dir.

## **E – ETİLEN OKSİT GAZIYLA STERİLİZASYON**

Etilen oksit % 10 veya %20 karbondioksit ile karıştırılır. Bu karışımlarda etilen oksit etkisini kaybetmemekte ve patlayıcılık özelliği yok olmaktadır. Gaz çok penetran olup tüm aralıklara ve kağıt ya da polietilen ambalajlarını da geçerek ulaşır. Etilen oksit ile sterilizasyon için bir taraftan havanın boşaltıldığı diğer yandan gazın verildiği cihazlar kullanılır.

### III. NOT

## MİKROORGANİZMALARIN ÜRETİLMESİ

Mikroorganizmaların laboratuvar koşullarında üretilmeleri, saf olarak elde edilmeleri ve çeşitli özelliklerinin incelenerek identifiye edilmesi için çeşitli besleyici ortamlar kullanılır. Bu üretim ortamları başlıca iki bölüme ayrılırlar:

#### A- CANLI ORTAMLAR

Hastalık oluşturan bazı etkenler ( viruslar, riketsialar, bedsonialar) üreyebilmek için canlı hücrelere gereksinim duyarlar. Bu amaçla kullanılan canlı ortamlar 3 çeşittir.

##### 1- Doku Kültürü

Tüp, şişe, petri kutusu gibi laboratuvar kaplarında uygun besleyici sıvıların içerisinde üretilerek kullanılan canlı dokulardır. Bu amaçla çeşitli canlıların (insan, maymun, tavşan, kobay, fare, tavuk embriyonu gibi) çeşitli organları ( böbrek, akciğer, testis gibi) önce parçalanarak canlı hücreler tek tek ya da en çok birkaç hücrelik gruplar kalacak şekilde ayrıştırılırlar. Belirli sayılardaki hücreler, içlerinde çeşitli tuzlar, tampon maddeleri, vitaminler ve çoğu kez at ya da dana serumu içeren besleyici sıvılarda süspanse edilerek steril tüp ya da şişelere konulurlar. Bu hücre süspanسیونları 36–37°C’ de bekletildiğinde hücreler kabın çeperine yapışarak ürerler. Üreme sonucu oluşan dokuya “Doku Kültürü” adı verilir. Doku kültürleri virusların invitro olarak üretildiği ortamlardır.

##### 2- Deney Hayvanları

Bakteri ve viral etkenlerin üretilmesi amacıyla değişik türlerde deney hayvanları kullanılır. Bu amaçla çoğunlukla fare, kobay, sıçan, tavşan, hamster ve tavuklardan yararlanılır. Ayrıca patojenite testleri, immunolojik çalışmalar gibi bazı araştırmalar için de deney hayvanları kullanılır. Üretilecek etkenin özelliğine göre, deney hayvanının yaşı, türü, cinsi ve bu hayvanlara inokulasyon yolları değişir. Deney hayvanları da mikroorganizmaların invivo olarak üretildiği ortamlardır.

Deney hayvanları yetiştirilme biçimlerine göre 3 kısma ayrılırlar:

**a – Konvansiyonel hayvanlar:** Laboratuvar ya da enstitülerde kendi kendine yetişen, üreyen ve herhangi bir sağlık kontrolünden geçirilmeyen hayvanlardır. Bu hayvanların sindirim, solunum ve ürogenital sistemleri ile deri ve mukozalarında her türlü etken bulunabilir. Bu nedenle konvansiyonel hayvanların bu amaçlarla kullanılmaları sakıncalıdır.

**b – Specific Pathogen FREE (SPF) hayvanlar:** Bu hayvanların sistemlerinde çeşitli mikroorganizmalar bulunur, ancak bazı önemli hastalık yapıcı etkenler ( örneğin Tuberculosis, Salmonellosis, Pasteurellosis, bazı viral hastalıkların etkenleri) yönünden temizdirler. Bu nedenle SPF hayvanlar güvenle kullanılabilirler.

**c- Germ free hayvanlar:** Bu hayvanların sistemlerinde herhangi bir mikroorganizma bulunmadığı gibi kanlarında da antikor bulunmaz. Böyle hayvanlarla çalışmak çok güvenilirdir

ancak mikropsuz olarak izole edilmeleri, mikropsuz koşullarda üretilmeleri ve bunun sürdürülmesi oldukça güçtür.

### 3 – Embriyolu Yumurta

Bazı viral etkenlerin, riketsiaların ve bazı bakterilerin üretilmesinde kullanılan diğer bir canlı ortam embriyolu yumurtalardır. İnokulasyonda kullanılacak olan yumurtaların SPF (Specific Pathogen Free) olması istenir. Embriyolu yumurtalar virusların invivo olarak üretildiği ortamlardır. Embriyolu yumurtaya virus inokulasyonu için 4 değişik yöntem kullanılır ve kullanılan yöntemlere göre embriyo yaşları değişir.

- a- Korioallantoik membrana inokulasyon (10 -12 günlük embriyo)
- b- Allantoik boşluğa inokulasyon (9 – 12 günlük embriyo)
- c- Amniotik boşluğa inokulasyon (7- 15 günlük embriyo)
- d- Yumurta sarısına inokulasyon (5- 8 günlük embriyo)

### B – CANSIZ ORTAMLAR

Hastalandırıcı özellik gösteren bakteri, mantar, mikoplazma gibi mikroorganizmaların çoğunluğu organizma dışında invitro olarak üretilmektedir. Mikroorganizmaların invitro olarak üretiltikleri bu cansız ortamlara “**Besiyeri**” denir. Besiyerlerinde, mikroorganizmaların üreyebilmesi için karbon ve azot kaynakları, mineraller ve gelişme faktörlerinin bulunması gerektiği gibi bunların hazırlanışında nem, oksijen, CO<sub>2</sub> gibi etmenlerin göz önünde bulundurulması ve üretilme sırasında ısının gerektiği derecede sağlanması koşuldur. Besiyerleri katı ya da sıvı olarak hazırlanırlar.

Besiyerleri 2 grupta incelenir:

**1- Genel Besiyerleri:** 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 mikropların üremesi için uygundur.

**b- Zenginleştirilmiş besiyerleri:** temel besiyerlerine kan, serum, glukoz, yumurta gibi daha besleyici maddelerin eklenmesi ile elde edilen besiyerleridir. Temel besiyerlerinde üreyemeyen birçok mikroplar bu besiyerlerinde üretilbilirler.

**2- Özel Besiyerleri:** Çalışma amacına göre hazırlanan daha komplike yapıdaki besiyerleridir.

**a- Özgül besiyerleri:** Yalnız bir çeşit mikrobun üretilmesi için 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 hazırlanan böylece karışık ortamdaki bazı bakterileri seçerek üremelerini sağlayan besiyerleridir. Örneğin Gram (-) bakterileri karışık kültürden izole edebilmek için besiyerlerine Gram (+) bakterileri inhibe eden kristal violet katılır.

İçlerinde karışık bir ortamdaki (dışkı gibi) bazı bakterilerin üremesini kamçılıyıcı maddeler içeren besiyerlerine “seçerek çoğaltıcı” besiyerleri denir. Örneğin dışkıdaki Salmonella’ ların seçilerek çoğaltılması için Selenit-F ve Tetrathionatlı buyyon kullanılır.

**c- Ayırtıcı (diferansiyel) besiyerleri:** İçerdikleri çeşitli ayıraçlar ve kimyasal maddeler aracılığıyla, benzer bakterilerin ayrı renkte koloniler oluşturmalarını sağlayarak karışık bakterileri birbirinden ayırmaya yarayan besiyerleridir. Örneğin E.coli 'nin EMB agarda metelik yeşil renkte koloniler oluşturması ya da fermente eden bakterilerin McConkey agarda pembe renkli koloniler oluşturması gibi

**d- Ayıralı besiyerleri:** Mikroorganizmaların identifikasyonu için gerekli olan biyokimyasal özelliklerinin saptanması için kullanılan besiyerleridir. Bu besiyerleri ilerine çeşitli ayıraçlar (bromtimol mavisi, metil kırmızı, andrade ayırıcı, fenol kırmızı gibi) ve mikrobun metabolizma etkisinin renilmesi istenen maddeler (laktoz, glukoz gibi) konularak hazırlanırlar.

## IV.NOT İNFEKSİYON ETKENLERİNİN LABORATUAR TANISI

İnfeksiyonların tanısı için : ♦ Anamnez  
♦ Klinik bulgular  
♦ Otopsi bulguları değerlendirilerek enfeksiyonun kesin tanısı amacıyla  
♦ Laboratuvar incelemeleri yapılır.

**Anamnez:** Hasta sahibinden, bakıcısından ya da hasta ile ilişkili diğer kişilerden hasta hayvan ve hastalık hakkında bilgiler edinilmesidir. Bu bilgiler çok önemlidir çünkü hastaların yaşı, cinsiyeti, hastalığın ne zaman ve nasıl başladığı, ne şekilde geliştiği, eğer bir sürüde enfeksiyon görülüyorsa ölen hayvanların olup olmadığı, ölen hayvanlar varsa ölmeden önce ne tür belirtiler gösterdikleri, hayvanlara aşı uygulanıp uygulanmadığı gibi sorular tanıya yardımcı olur.

**Klinik Bulgular:** Genel semptomlar (iştahsızlık, durgunluk, titreme, ateş, kabızlık gibi) genelde birçok enfeksiyonda görüldüğü için tanıya yardımcı değildir. Ancak özel semptomlar (solunum, sindirim, sinir, ürogenital ve dolaşım sistemi bozuklukları ile ilgili semptomlar) tanı açısından yararlıdır. Hastada görülen özel semptomlara göre inceleme örneği alınarak laboratuvar tanıya gidilir.

**Otopsi bulguları:** Ölen ya da öldürülen hayvanlara otopsi yapılarak tüm organları gözden geçirilir. Lezyonların nerede olduğu, büyüklüğü, şekli ve diğer bulgular değerlendirilerek bu lezyonlu bölgelerden alınan örnekler laboratuvarda incelenir.

Anamnez, klinik ve otopsi bulgularına göre kesin tanı koymak oldukça güçtür. Elde edilen bulgular bu bulgulara göre alınan şüpheli örneklerin laboratuvarda incelenmesinden sonra çıkan bulgularla birleştirilerek hastalıkların kesin tanısı yapılır.

### LABORATUAR TANI:

#### İnceleme örneklerinin alınması

İnceleme örnekleri hasta canlıyken ya da öldükten sonra alınırlar ve bu işlem için bazı önemli noktalara dikkat etmek gerekir.

- İnceleme örnekleri steril kaplara alınarak soğukta muhafaza edilmelidirler.
- Örnek alındıktan sonra incelemenin yapılacağı laboratuvar yakınsa hemen gönderilmelidir. Laboratuvar uzaksa dondurulduktan sonra termoslar içinde ve en kısa sürede gönderilmelidir.
- Laboratuvarda aynı gün ekimi yapılamayacak örnekler -20° C'de saklanmalıdır.
- İnceleme örneği hastalığın akut dönemlerinde alınmalıdır. Bu dönemde kanda fazla miktarda etken saptanabileceğinden inceleme örneği olarak kan alınıp hemokültür yapılmalıdır. Kronik

dönemde ise etkenler kandan çekilerek doku ve organlara yerleşirler ve buralarda bozukluklar oluştururlar. Bu durumda etkenler çeşitli sekret (süt, sperma, tükürük gibi) ve ekskretle (idrara, gayta, balgam, burun ve uterus akıntıları gibi) dışarı atılırlar. Bu örnekler alınarak gerekli incelemeler yapılır.

- Vücudun derin kısımlarındaki kapalı ve florasız bölgelerde bulunan örnekler (beyin omurilik sıvısı- BOS, plevra, periton, sinoviyal sıvılar gibi) deri ve mukozalar yeterince dezenfekte edildikten sonra uygun ponksiyonlarla alınmalıdır.

- Hayvan ölmüşse zaman geçirmeden otopsi yapılarak lezyonlu doku ve organlardan inceleme örneği alınmalıdır.

- İnceleme örnekleri antibiyotik kullanımından önce alınmalıdır. Eğer antibiyotik uygulanmışsa antibiyotiğin vücuttan atılma süresini bekleyip örnek alınmalıdır.

- İnceleme örneğinin türü klinik olarak ve otopside görülen bulgulara göre değişir. Örneğin Antraks şüpheli olgularda dalak, kemik iliği; Mastitis şüpheli olgularda süt; Brusellozis şüpheli olgularda atık yavru, uterus akıntıları, kan, Paratüberküloz şüpheli olgularda rektum kazıntısı alınır.

**a- Bakteriyoskopi (Mikroskopi):** Gönderilen inceleme örneklerinden preparatlar hazırlanır. Bakteriyel enfeksiyondan şüpheleniyorsa sürme preparatlar hazırlanarak Basit ya da Bileşik boyama yöntemlerinden biri ile boyama yapılır. Gönderilen inceleme örneğinde bakteri olup olmadığını, eğer bakteri varsa morfolojik görünümünü saptamak için basit boyama (Metilen mavisi, Bazik fuksin gibi) yapılır ya da direk olarak Gram boyama yapılarak bakterinin gram özelliği saptanır. Ancak Gram boyama ile boyanamayan bazı özel hastalık etkenlerinin varlığından şüphelenildiği durumlarda (klinik ve otopsi bulgularına göre) şüphelenilen etkene göre özel boyama yöntemleri uygulanır. Örneğin Tüberkülozis şüpheli örneklerden hazırlanan preparatlar Ziehl-Neelsen yöntemi ile Leptospirozis şüpheli örneklerden hazırlanan preparatlar Giemsa ile boyanır.

Mantar enfeksiyonunda şüpheleniliyorsa lam lamel arası preparatlar hazırlanarak ya Laktofenol pamuk mavisi ile ya da şüphelenilen enfeksiyona göre özel mantar boyama yöntemleri ile boyamalar yapılır.

**b-Kültür:** İnceleme örneklerinden genel ya da özel besiyerlerine ekim yapılarak 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. Örneğin E.coli aerobik koşullarda 37° C de 18-24 saatte, Brusellozis etkenleri mikroaerofilik koşullarda 5-7 günde, Clostridumlar anaerobik koşullarda 25-37° C lerde 24-72 saatte ürerlerken Tüberkülozis etkenleri aerobik koşullarda 37-44° C lerde 2-8 haftada ürerler. Mantarlar ise 24-26° C lerde 1-3 haftada ürerler.

Mikroorganizmaları üretmek için kullanılan besiyerleri de izole edilmesi istenen etkenin türüne göre değişir. Örneğin mantar etkenlerinin izolasyonunda Sabouraud Dekstroz Agar, Tüberkülozis etkenlerinin izolasyonunda Lowenstein-Jensen besiyeri, Salmonellaların izolasyonunda SS ve Brilliant Green Agar, Mikoplazmaların izolasyonunda PPLO agar kullanılır

**Mikroorganizmaların identifikasyonu:** Etken izole edildikten sonra saf olarak üretilir ve çeşitli özellikleri incelenerek identifikasyonu yapılır.

**I- Morfolojik özellikler:** Mikroorganizmanın morfolojik özellikleri incelenir.

**A-Makroskobik morfoloji:** Mikroorganizmanın katı ve sıvı besiyerlerinde gözle görülen özellikleri incelenir.

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

**2- Sıvı besiyerinde:** Mikroorganizmanın üreme durumu (zayıf, orta, bol), dipte tortu oluşumu, üstte zar oluşumu, gaz oluşumu, granüler ya da homojen üreme, renk oluşumu saptanır.

**B- Mikroskobik morfoloji:** Mikroorganizmanın mikroskopta görünümü incelenir.

**1- Koloni morfolojisi:** Katı besiyerinde üreyen koloniler stereomikroskopta daha ayrıntılı olarak incelenir.

**2- Bireysel morfoloji:** Sıvı kültürden ve katı besiyerlerinden üreyen kolonilerden preparatlar hazırlanarak boyama yapılır ve mikroskopta incelenir. Mikroskopların şekli (kok, basil, spiral gibi) büyüklüğü, spor oluşumu, kapsül oluşumu, uçlarının şekli (yuvarlak, köşeli), dizilişleri (zincir, küme, filament) incelenir. Sıvı kültürden lam lamel arası preparat hazırlanarak hareketli olup olmadığı saptanır.

**II- Fizyolojik özellikler:** Mikroorganizmanın üreme özellikleri incelenir. Oksijen gereksinimi ve üreme ısısı değerlendirilir.

**III- Biyokimyasal özellikler:** Mikroorganizmanın identifiye edilebilmesi için makroskobik ve mikroskobik özellikleri değerlendirildikten sonra biyokimyasal özellikleri saptanır. Bu amaçla birçok testler (indol, nitrat, üre, jelatin, katalaz, oksidaz gibi) yapılarak sonuçları değerlendirilir.

**IV- Patojenite:** Mikroorganizmanın deney hayvanlarında enfeksiyon oluşturup oluşturmadığı incelenir.

**V- Bakteriyofajlara duyarlılık:** Bakteriyofajlar izolatların tiplendirilmesi ve de klasifikasyonunda yardımcı olur.

**c- Deney Hayvanları İnokulasyonu:** Deney hayvanı inokulasyonu hastalık etkenlerinin patojenitesini saptamak amacı ile kullanılır. Bunun için inceleme örneklerinden direk olarak ya da besiyerlerinde üreyen şüpheli kolonilerden homojen süspansiyonlar hazırlanarak duyarlı deney hayvanlarına enjekte edilir.

Deney hayvanının türü ve inokulasyon yolları araştırılan hastalık etkenine göre değişir. Örneğin; Bacillus anthracis'e en duyarlı deney hayvanları fare ve kobaylardır. Antraks şüpheli inceleme örneklerinden ya da kolonilerden fare veya kobaylara deri altı ya da intraperitoneal yollarla inokulasyon yapılarak etkenin patojenitesi saptanır.

İnokulasyon yapılan hayvanlar hastalık yönünden her gün kontrol edilirler. Ölen hayvanların otopsileri yapılarak patolojik bozukluklar gözden geçirilir. Yeniden inceleme örnekleri alınarak etkenin izolasyonu yapılır.

**d- Serolojik testler:** Serolojik testler canlı hayvanlardan alınan kan serumları ile uygulanır. Özellikleri sürü enfeksiyonlarını saptamak açısından oldukça önemlidir. Birçok enfeksiyonlarda



indirek tanı amacı ile farklı serolojik testlere başvurulur. Bakteriyel enfeksiyonların serolojik tanısında çoğunlukla Aglütinasyon, Presipitasyon, Komplement Fikzasyon, ELİSA, AGİD yöntemleri kullanılır. Viral enfeksiyonların serolojik tanısında bu testlere ek olarak Hemaglütinasyon, Hemaglütinasyon-Inhibisyon (HI) ve Nötralizasyon testleri uygulanır.

**e- Allerjik testler:** Bazı enfeksiyonlarda, enfeksiyondan şüpheli canlı hayvanları derisine özel alerjen maddeler enjekte edilerek oluşan reaksiyona göre tanı yapılır. Hayvanlarda özellikle Ruam, Tüberkülozis ve Paratüberkülozisin indirek tanısı amacı ile allerjik testlerden yararlanır. Bu allerjik testlerde kullanılan alerjen maddeler etkene özgüdür. Ruamda mallein, Tüberküloziste tüberkülin, Paratüberküloziste johnin kullanılır.

**f- Moleküler Tanı:** Biyoteknolojik ve moleküler teknikler, günümüzde insan ve veteriner hekimliğinde teşhis aracı olarak geniş bir kullanım alanı bulmaktadır. Teşhiste biyoteknoloji oldukça dinamik bir disiplin olup her geçen gün yeni teknikler ve modifikasyonlar denerek tıbbın kullanımına sunulmaktadır. DNA ve RNA' nın yapı ve fonksiyonlarının aydınlatılmasını takiben; DNA 'nın replikasyon, hibridizasyon ve üzerinde bulunan nükleotid sırasına uygun RNA molekülü oluşturma yeteneğini kullanan moleküler teknikler geliştirilmiştir. Moleküler teknikler içinde en sık kullanılan PCR, istenilen mikroorganizmaya ait DNA gen bölgelerinin (hedef-target) in vitro olarak bir tüp içinde çoğaltılması (amplifiye edilmesi) ve amplifiye edilen bu ürünlerin gözle görülebilir hale getirilerek saptanmasıdır.

## V. NOT

### MİKROSKOBİK İNCELEME İÇİN PREPARAT HAZIRLANMASI

Mikroorganizmaları mikroskop altında inceleyebilmek için öncelikle preparat hazırlanması gerekir. Preparatlar ya doğrudan inceleme örneklerinden (bakteriyoskopi) ya da kültürlerden, istenilen amaca göre değişik şekillerde hazırlanırlar. Yine istenilen amaca göre boyanarak ya da boyanmadan mikroskopta incelenirler.

Boyasız preparatlar çoğunlukla bakteri hareketlerini saptamak, Boyalı preparatlar ise mikroorganizmaların morfolojik ve boyanma özelliklerini incelemek amacıyla hazırlanırlar.

Preparatların hazırlanması için kullanılacak lamaların çok temiz, yağsız ve çiziksiz olmasına dikkat edilir. Lamalar kullanılmadan önce bir süre etil alkolde bekletilir, kullanılacağı zaman temiz bir bezle silinerek iyice kurutulur. Preparat hazırlanması için lam dışında, tercihe göre, öze, pastör pipeti ya da svablara gereksinim duyulur. Boyasız preparatların hazırlanması için bunlara ek olarak lameller kullanılır.

#### BOYALI PREPARAT HAZIRLANMASI

##### **İnceleme örneğinden preparat hazırlanması:**

Otopsi ya da biyopsi sonucu küçük parçacıklar halinde alınan inceleme örnekleri ya iki lam arasında ezilerek ya da pensle tutulup lama sürülerek ince preparatlar hazırlanır. Organ parçasının yüzeyinde kontaminasyon olasılığı varsa, ateşte iyice kızdırılan bir spatülle yüzeyi dağlanarak steril hale getirilir ve steril bir öze ile bu bölgeden içeri girilerek alınan parçalardan froti hazırlanır.

Patolojik sıvılardan preparat hazırlamak için, pastör pipeti ya da öze ile alınan bir damla sıvı örneği lamın ortasına damlatılarak ince bir tabaka halinde yayılır.

Kandan preparat hazırlanmak isteniyorsa, lamın uçlarına yakın bir kısmına bir damla kan konularak diğer bir lamın kısa kenarı ile ya da lamelle diğer uca doğru ince bir şekilde çekilir.

##### **Kültürden preparat hazırlanması:**

Bilindiği gibi kültürler, mikroorganizmaların katı ve sıvı besiyerlerinde üretilmiş halidir. Katı besiyerlerinde üreyen mikroorganizmalar koloniler oluştururlar. Sıvı besiyerlerinde ürediklerinde ise çeşitli değişiklikler (bulanıklık, dipte tortu oluşumu, sıvının yüzeyinde zar oluşumu gibi) oluştururlar. Bu nedenle sıvı ve katı kültürlerden değişik şekilde preparat hazırlanır.

Kolonilerden preparat hazırlanması: önce pastör pipeti ya da öze yardımıyla lam üzerine bir damla fizyolojik tuzlu su (FTS) konur. Sonra da öze ile koloniden örnek alınarak lam üzerindeki FTS içinde ezilir ve homojen hale getirildikten sonra dairesel hareketlerle 1-2 cm çapında bir alana yayılır.

Sıvı kültürden preparat hazırlanması: sıvı kültürden öze ya da pastör pipeti ile alınan bir damla örnek lam üzerine konularak aynı şekilde yayılır.

İnceleme örneklerinden ve kültürlerden yukarıda anlatılan şekilde hazırlanan preparatlar ya baş ve işaret parmakları arasında tutulduktan sonra dairesel ya da yatay hareketler yapılarak ya da kendi hallerinde bekletilerek kurutulur.

Preparatlar kurutulduktan sonra tespit edilirler. Tespitin amaçları:

- 1- Mikroorganizmaları öldürmek
- 2- Mikropların lama yapışmalarını sağlamak

**Tespit 2 şekilde yapılır:**

- 1) **Fiziksel tespit:** Kurutulan preparat, bir ucundan pensle tutularak alevin içinden üç kez (45° lik eğimle) geçirilir. Bu işlem yapılırken preparatın yanmamasına dikkat edilir.
- 2) **Kimyasal tespit:** Kurutulan preparatın üzerine kimyasal maddeler ( metil alkol, etil alkol, aseton gibi) dökülerek bir süre bekletilirler. Sonra suyla yıkanılır. Kan ve dokulardan hazırlanan preparatlar bu şekilde tespit edilirler.

İnceleme örnekleri ya kültürlerden hazırlanan preparatlar yukarıda anlatılan işlemler uygulandıktan sonra boyama için uygun hale gelir.

## **BASİT BOYAMA**

Basit boyama tek bir boya (Metilen mavisi, Sulu fuksin gibi) kullanılarak yapılan boyama yöntemidir. Bu boyamanın amacı bakterilerin varlığı ve varsa morfolojik yapıları (kok, basil, kokobasil) hakkında bilgi edinmektir.

### **Boyama Yöntemi**

- İnceleme örneği ya da kültürden preparat hazırlanır.
- Hazırlanan preparat kurutulur ve tespit edilir.
- Metilen mavisi ile 3-5 dk boyandıktan sonra boya dökülür ve suyla yıkanır.
- Preparat kurutulur ve immersiyon yağı damlatılarak immersiyon objektifi ile incelenir.

## VI. NOT

### GRAM BOYAMA

Gram boyama bakterilerin Gram özelliklerini saptamak amacıyla uygulanan bileşik bir boyama yöntemidir.

Boyama sonucunda bakteriler aldıkları renge göre Gram (+) ve Gram (-) olarak belirlenirler. Karışık kültürlerde Gram (+) ve Gram (-) bakteriler bir arada görülebilirler. Saf kültürlerde yalnızca bu özellikten birine sahip bakteriler görülür.

#### Boyama Yöntemi

- İnceleme örneği ya da kültürden preparat hazırlanır.
- Hazırlanan preparat kurutulur ve tespit edilir.
- Preparat Kristal Violet eriği ile 3 dakika boyandıktan sonra üzerindeki boya dökülür ve suyla yıkanır.
- Gram İodin (Lugol) eriği ile 1 dakika boyanır, boya dökülür.
- Alkol ile renksizleştirilir. (Dekolorizasyon) Bu işlem preparat üzerine alkol dökülerek, preparatı birkaç kez sağa sola eğmek suretiyle uygulanır.
- Alkol dökülür ve su ile yıkanır.
- Sulu fuksin eriği ile 30 saniye boyanır.
- Preparat su ile yıkanır ve kurutulur.
- İmmersiyon yağı damlatılarak immersiyon objektifi (100x) ile incelenir.

#### Mekanizma

Gram boyamada ilk olarak kristal violet eriğinin uygulanması ile ortamdaki tüm bakteriler mor renge boyanır. İkinci olarak uygulanan gram iodin eriği ortamdaki Gram (+) bakterilerin daha önce almış olduğu mor rengi sabitleştirir. Gram (-) bakteriler de daha önce mor renk almıştır. Ancak bu durum onlar için söz konusu değildir. Fakat daha sonra alkolle yapılan renksizleştirme işlemi sonucunda Gram (-) bakterilerin üzerindeki kristal violet-garm iodin kompleksi uzaklaştırılarak Gram (-) bakteriler renksiz kalırlar. Son aşamada sulu fuksin eriğinin uygulanması ile Gram (-) bakteriler pembe renge boyanırlar.

- Gram boyama sonucunda : Gram (+) bakteriler **MOR**  
Gram (-) bakteriler **PEMBE** renkli görülürler.

## VII. NOT

### SPOR BOYAMA

Sporlar bazı bakterilerin sitoplazmasının içinde ve özel koşullara bağlı olarak oluşan, o bakterilerin çeşitli fiziksel ve kimyasal çevre etkilerine karşı dayanıklı olmalarını sağlayan oluşumlardır. Bakteri sporlarının üremeye ilgisi yoktur. Bacillus (aerob) ve Clostridium cinsi bakteriler spor oluştururlar.

#### Boyama Yöntemi

- İnceleme örneği ya da kültürden preparat hazırlanır.
- Hazırlanan preparat kurutulur ve tespit edilir.
- Preparatın üzerine Malaşit yeşili eriyiği dökülür.
- Ucunda alkollü pamuk bulunan bir çubuk yakılarak üzerinde boya bulunan preparat 5 dakika süre ile alttan ısıtılır. Boyanın kaynamamasına dikkat edilmelidir.
- Preparat suyla yıkanır.
- Fuksin eriyiği ile 30 saniye boyanır.
- Preparat su ile yıkanır ve kurutulur.
- İmmersiyon yağı damlatılarak immersiyon objektifi (100x) ile incelenir.

- Spor boyama sonucunda : sporlar **YEŞİL**  
bakteriler **PEMBE** renkli görülürler

# ZIEHL-NEELSEN BOYAMA

Aside dirençli bakterilerin örneğin Mycobacteri'lerin mikroskopta görülmesi amacıyla kullanılan boyama yöntemidir.

Aside dirençli bakteriler hücre duvarındaki lipid oranının fazla olması nedeni ile kolay boyanmazlar. Boyanmaları için yoğun fenollü eriyiklerin ısı ile beraber uygulanması gerekir.

## Mekanizma

Yoğun fenollü karbol fuksin eriyiğinin ısı etkisiyle uygulanması sonucunda ortamdaki tüm bakteriler ve zemin kırmızı renge boyanır. Asit-alkol uygulanması sonucunda aside dirençli bakteriler boyayı bırakmalarına karşın diğer bakteriler ve zemin renksizleşir. Malaşit yeşili ya da metilen mavisi ile yapılan zıt boyama sonucunda ise zemin ve ortamdaki aside dirençli olmayan bakteriler yeşil ya da mavi renk alır.

## Boyama yöntemi

- İnceleme örneği ya da kültürden preparat hazırlanır.
  - Hazırlanan preparat kurutulur ve tespit edilir.
  - Preparatın üzerine Karbol fuksin solusyonu dökülür.
  - Ucunda alkollü pamuk bulunan bir çubuk yakılarak üzerinde boya bulunan preparat 5-8 dakika süre ile alttan ısıtılır. Boyanın kaynamamasına dikkat edilmelidir.
  - Preparat suyla yıkanır.
  - Asit-alkol (HCl + %95 etil alkol karışımı) ile renksizleştirilir.
  - Suyla yıkanır.
  - Malaşit yeşili ya da metilen mavisi ile 30 saniye boyanır.
  - Preparat su ile yıkanır ve kurutulur.
  - İmmersiyon yağı damlatılarak immersiyon objektifi (100x) ile incelenir.
- Spor boyama sonucunda : Aside dirençli bakteriler **KIRMIZI**  
Zemin ve aside dirençli olmayan bakteriler **MAVİ/YEŞİL**  
renkli görülürler.

## VIII. NOT

### HAREKET İNCELENMESİ İÇİN PREPARAT HAZIRLANMASI VE BAKTERİ HAREKETLERİNİN İNCELENMESİ

Hareket, bakterilerin identifikasyonunda yararlanılan önemli bir özelliktir. Bazı bakteriler (*E.coli*, *P.vulgaris*, *B.subtilis*) flagellaları yardımıyla aktif hareket yaparlar. Bazı bakterilerin (*Streptococcus*, *Staphylococcus*, *B.anthraxis*, *M.tuberculosis* gibi) flagellaları yoktur, bu nedenle aktif hareket yapamazlar. Diğer bir kısım bakteriler ise spiral (spiroketler), kayma (*Flexibacter columnaris*) ve koloni (*B.alvei*) hareketi yaparlar.

Bakteri hareketlerinin incelenmesi için 3 yöntem vardır:

- 1- Lam-lamel arası inceleme
- 2- Asılı damla yöntemi
- 3- yarı katı besiyerinde inceleme

**1- Lam-lamel arası inceleme:** hareket incelemesi yapılacak olan bakteriden sıvı besiyerine ekim yapılarak 18-24 saat inkübasyona bırakılır.

- \*Alkol içinde bekletilen lamlardan alınarak iyice temizlenir.
- \*Sıvı kültürden pipet yardımıyla 1 damla alınarak lam üzerine damlatılır.
- \*Lam üzerine sıvının üstünü örtecek şekilde lamel kapatılır.
- \*40X objektif ile incelenir.

**2- Asılı damla yöntemi:** bu amaçla ortası çukur ya da üzerinde plastik halka bulunan lamlar kullanılır. Sıvı kültürden bir damla alınarak lamel üzerine konur. Lamel ters çevrilerek lamın çukur ya da halka bulunan kısmına kapatılır. Damla boşlukta sarkar bir duruma getirilir. Lamelin kenarları sıvı parafin ile kapatılarak 40X objektif ile incelenir.

**3- yarı katı besiyerinde inceleme:** hareket incelemesi yapılacak olan bakteriden sıvı kültür hazırlandıktan sonra bu kültüre steril iğne öze daldırılır, sonra da çıkarılarak yarı katı olarak hazırlanmış tüp içindeki besiyerine dik olarak batırılır ve çıkarılır. Besiyeri 24-48 saat inkübasyona bırakılır. Bu süre sonunda eğer besiyerinin yüzeyinde ve inokulasyon hattı boyunca üreme var ve sağa sola doğru bir yayılma yoksa bakterinin hareketsiz olduğuna kara verilir. Eğer inokulasyon hattının çevresine doğru yayılma varsa bakteri hareketli olarak değerlendirilir.



## IX.NOT

# 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 türdür:

**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 aktarırsa 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 bakteriostatik, 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.

Hastalık etkenlerinin antibiyotiklere karşı duyarlılığının saptanabilmesi için öncelikle bu etkenlerin elde edilmesi gerekir. Bu amaçla, oluşan infeksiyona göre inceleme örnekleri alınarak laboratuara 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

- Laboratuara gönderilen örneklerden ekim yapılarak etkenler izole edilir.
- Her bir etken distile su ile 0.5 McFarland yoğunluğuna eş değerde sulandırılarak bulanıklığı ve dolayısıyla 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 sağaltım amacıyla kullanılmaz.