



## BAKTERİLERDE İZOLASYON, TANI VE İDENTİFİKASYON YÖNTEMLERİ

Prof. Dr. İştar Dolapçı

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji AD

Şubat 2016

### İçerik

- Giriş
  - Enfeksiyon hastalıklarının görünüşleri hakkında bilgi / Mikrobiyoloji laboratuvarı ile ilişkilendirme
- Klinik örneklerin mikrobiyoloji tanı laboratuvarında bakteriyolojik tanı amacıyla işleme algoritması
  - Bakteriyel tanı, izolasyon ve identifikasyon basamaklarının sıralanması

\*\*\*

### Öğrenim Amaç ve Hedefleri

- Klinik mikrobiyoloji laboratuvarının görevlerini öğrenmek
- Enfeksiyon hastalıklarının laboratuvar tanısındaki algoritmayı kavramak
- Mikrobiyoloji laboratuvarında örnek işlenmesi ile ilgili basamakların temelini öğrenmek
- Klinik örneklerin bakteriyel tanı amacıyla nasıl işleneceğini bilmek
- Bakterilerin mikrobiyoloji tanı laboratuvarında izolasyon ve identifikasyon basamaklarını sıralamak
- Gram pozitif ve gram negatif bakterilerin birbirlerinden ayırımalarında kullanılan testleri bilmek

\*\*\*

Enfeksiyon hastalıklarının laboratuvar tanısı;

1. Etiyolojik ajanın varlığı açısından hasta materyalinin direkt muayenesi
2. Aynı örneklerdeki ajanın kültür yoluyla üretilmesi
3. Kültüre edilen mikroorganizmanın identifikasyon yoluyla analiz edilerek tanımlanması
4. Antimikrobiyal duyarlılığının belirlenmesi aşamalarını içerir.

Enfeksiyon hastalıklarının tanısında altın standart,patojenlerin izolasyonu & identifikasyonudur.

Son yıllarda mikrobiyoloji laboratuvarlarında, hızlı antijen saptama testleri ve nükleik asit temelli moleküler testleri, mikroskopi ve kültür yöntemleri ile birlikte kullanılmaya başlanmakta ve bir gelişim yaşanmaktadır.

- ❖ Bir klinik örnekten izole edilen **patojen** mikroorganizmaların tanımlanması &
- ❖ Bu mikroorganizmaların, vücudumuzun çeşitli bölgelerinde bulunan **normal flora** mikroorganizmalarından ayırt edilmesi, enfeksiyon hastalıklarının **tanısı** ve **tedavi protokollerinin belirlenmesi** bakımından büyük önem taşır.

Mikroorganizma – klinik görünüm ?

Bazı enfeksiyon hastalıklarına doğrudan klinik görünüme bakılarak tanı konulabilmektedir, ancak patojenlerin pek çoğu, insanlarda, oldukça geniş bir '**klirik sendrom çeşitliliğine**' neden olmaktadır. Bazı durumlarda da tek bir klinik sendroma birçok patojenden herhangi biri yol açabilmektedir. Örneğin influenza virus enfeksiyonları, solunum yolu sendromlarına yol açmakta ancak klinik görünüm; streptokok, mikoplazmalar ya da 100'den fazla virustan herhangi biri ile oluşan klinikten ayırt

edilememektedir. Bu gibi nedenlerle, sıklıkla **spesifik etiyolojik ajanın tanımlanabilmesi için** mikrobiyolojik laboratuvar yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

**“Tanısal tıbbi mikrobiyoloji”** hastalıkların etiyolojik ajanlarının tanımlanması disiplindir. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarının görevi / işi, **hastalık etkeni olan mikroorganizmaları saptamak için hasta örneklerini test etmek** & aynı zamanda tanımlanan mikroorganizmalara karşı **antimikrobiyal ilaçların in vitro etkinlikleri hakkında bilgi sağlamaktır.**

Uygun test seçilmeli!

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarı personeli örnek işlenmesinde olduğu kadar; klinisyene uygun öneriler sunma konusunda da yeterli olmalıdır. Klinisyen de laboratuvara, hastanın yaşı, cinsiyeti, ön tanısı gibi temel bilgilerle birlikte, gerektiğinde klinik sendromun ne olduğu, başlangıç tarihi, hastanın daha önce almış olduğu antimikrobiyal tedavinin içeriği, immünolojik durumu ve altta yatan başka hastalıklarının olup, olmadığı gibi detay bilgileri de sağlamalıdır. Bu bilgiler ışığında klinik mikrobiyolog, toplanacak örneğin tipi ve zamanı, saklama ve laboratuvara nakil koşulları hakkında katkı sağlayabilir. Laboratuvara gelen örneği en uygun ne şekilde işleyeceğine karar verebilir.

### ENFEKSİYONUN GÖRÜNÜMÜ

Enfeksiyonun görünümü, mikroorganizmanın vücuda giriş yeri, hangi organ ya da sisteme eğilim gösterdiği, mikrobiyal virülans, hastanın yaşı, cinsiyeti ve bağışıklık durumu, altta yatan başka hastalıklarının olup, olmadığı ve herhangi bir protezinin bulunup, bulunmadığı gibi pek çok faktöre bağlıdır.

Enfeksiyonun belirti ve bulguları lokalize olabileceği gibi, sistemik de olabilir ve ateş, üşüme, hipotansiyonu içerebilir. Bazı durumlarda enfeksiyonun görünümü tanı için yeterli olabilse de **çoğunlukla nonspesifiktir.**

### ENFEKSİYONUN MİKROBİYAL NEDENLERİ

Enfeksiyon etkenleri; bakteriler (mikobakteri, klamidya, mikoplazma ve riketsiyaları da içeren), virüsler, mantar ya da parazitler olabilir. Enfeksiyon **endojen** ya da **ekzojen** kaynaklı olabilir.

Endojen enfeksiyonlarda, mikroorganizma (çoğunlukla bakteri) hastanın kendi vücut florasının bir parçasıdır. **Endojen enfeksiyonlar** mikroorganizmanın normalde bulunması gereken bir bölgeden başka bir vücut bölgesine geçmesi ya da sayıca üstünlük kazanmaları gibi durumlarda ortaya çıkar ortaya çıkar. Örneğin;

Flora bakterisinin üst solunum yollarından alt solunum yollarına aspire edilmesi ya da travma ya da cerrahi girişimler sonucunda deri ya da mukozal bariyerlerin delinmesi gibi..

Vajinal kandida enfeksiyonlarındaki gibi normal flora elemanının fırsatçı patojen hale gelmesi gibi...

Buna zıt olarak ekzojen enfeksiyonlarda mikroorganizma toprak ya da su gibi çevreden ya da başka bir insan ya da hayvandan bulaşır.

Enfeksiyonun kaynağını tahmin etmek önemli! NEDEN?

- ✓ Uygun radyoloji ve laboratuvar tetkiki istemi yapabilmek &
- ✓ Mikrobiyolojik muayene için **uygun örneğin seçimine** karar vermek açısından..

### ÖRNEK SEÇİMİ, ALINMASI VE İŞLENMESİ

Mikrobiyolojik muayene için örnek seçiminde; mutlaka **hastalığın gelişimini yansıtacak bölgelerden** alınmasına ve tam bir **mikrobiyolojik incelemeye imkan sağlayacak miktarda** olmasına dikkat edilmelidir. Mikrobiyolojik materyal alımında en popüler yöntem: Eküvyonlarla alınan sürüntü örnekleridir! Dezavantajı: Bu yöntemle genellikle çok az miktarda örnek toplanabilmektedir. Aslında sadece deri ya da müköz membran örneklerinin toplanmasında kullanılmalıdır. Hücre içi mikroorganizmalar için hücre içeren kazıntı örneği alınmasına dikkat edilmelidir. Deri ve müköz membranlar çok sayıda ve çeşitli **endojen floraya** sahiptirler. Bu nedenle örnek toplanması sırasında

**kontaminasyonun önlenmesi** için çok dikkat edilmelidir. Alternatif olarak sürüntü örneği yerine aspirasyon ya da biyopsi teknikleri ile **endojen flora içeren alan bypass** edilebilir. Transtrakeal aspirasyon ile alt solunum yolu salgılarının aspire edilmesi ya da İdrarın suprapubik mesane aspirasyonu ile alınması bu gibi durumlara örnek olarak verilebilir. Kontamine olmadan örnek alma imkanı yoksa, mikrobiyoloji laboratuvarında **seçici besiyerleri** kullanılarak endojen floranın baskılanması ya da kantitatif kültür yapılması gerekir. Eğer mümkünse örnekler antibiyotik tedavisine başlanmadan önce alınmalıdır (neden?) Bu aşamada uygun ve yeterli örneğin, uygun zamanda alınması için klinisyen ve mikrobiyolog arasında kesin bir işbirliği esastır.

#### **Bakterilerin izolasyon basamakları**

- Hastadan muayene materyali (örnek) alınması
- Örneğin laboratuvara nakli
- Örneğin makro/mikroskopik incelenmesi
- Bakteri izolasyonu için kullanılan çeşitli yöntemlerin uygulanması
  - Kültür
  - Kültür dışı yöntemler
- Mikrobiyolojik inceleme için örnek alınması, saklanması ve taşınması: ANLATILDI!

#### **MİKROBİYOLOJİK MUAYENE**

Mikrobiyolojik muayene örneğin laboratuvara ilk girdiği andan itibaren başlar. Laboratuvara aynı anda birden fazla örnek geldiğinde öncelik; **BOS, doku, kan, steril vücut sıvıları** gibi kritik olanlara verilir. İdrar, boğaz kültürü, balgam, dışkı, yara örnekleri sonrası için saklanabilir.

#### **Örneğin makroskopik (gözle) incelenmesi**

Bütün örnekler önce gözle makroskopik olarak incelenmelidir. Aynı örnek üzerinde birden fazla mikrobiyologun çalıştığı durumlarda, daha sonraki incelemeleri yapacak kişilerin de örneğin makroskopisi hakkında fikir sahibi olmaları gereklidir. Mikrobiyolojik inceleme için gönderilen herhangi bir katı örneğin (dışkı, balgam, doku vs.) üzerinde kanlı/mukuslu alanlar olması materyalin enfektif olduğu görüşünü destekler. Bu nedenle örnekte kan ve mukus içeren alanlar varsa, belirlenmeli; kültür / direkt bakı için işaretlenerek, bu bölgelerden çalışılmalıdır. Sıvı örnekler için de genel görünümleri (renk, bulanıklık, koku vs.) mutlaka not edilmelidir, yönlendirici bilgiler içerir.

#### **Direkt mikroskopik muayene**

Bütün uygun örneklerle direkt mikroskopi yapılmalıdır. Burada amaç;

1. Örneğin kalitesinin değerlendirilmesi,
2. Hasta ile ilgili erken bilgi edinilmesi,
3. Kültürde üreyen mikroorganizmaların, direkt bakıda görülenlerle karşılaştırılmasının sağlanmasıdır.

Direkt mikroskopik muayene genellikle; boğaz örneği, nazofaringeal örnek ve dışkı örneklerinde yapılmaz.

#### **NEDEN?**

##### **Örneğin kalitesinin değerlendirilmesi**

Örn., tükrük özelliği gösteren balgam reddedilebilir. Squamoz epitel hücre sayısına bakılarak, gerçek alt solunum yolları salgısı olmadığı söylenebilir.

##### **Hasta ile ilgili erken bilgi edinilmesi**

Örneğin, lökosit içermesi enfeksiyöz etken lehine yorumlanır.

##### **Kültürde üreyen mikroorganizmaların, direkt bakıda görülenlerle karşılaştırılmasının sağlanması**

Örneğin, boyalı preparatta (Gram boya) 3 farklı mikroorganizma görülürken, kültürde 2 adet ürerse, üçüncünün anaerop olduğu düşünülebilir.

### Mikroskopı çeşitleri

Günümüzde beş mikroskopik yöntem kullanılmaktadır:

1. Işık mikroskopisi
2. Karanlık alan mikroskopisi
3. Faz kontrast mikroskopisi
4. Floresan mikroskopisi
5. Elektron mikroskopisi

Mikrobiyoloji laboratuvarında **en sık ışık mikroskobu** kullanılır.

### Işık Mikroskopisi

**Çalışma prensipi:** Alttan gelen ışığın örneğin içinden geçtikten sonra; bir dizi mercek sisteminden kırılarak yansması ve bu sırada oluşan görüntünün büyütölmesi esasına dayanır.

**Kondansatör:** Işık kaynağı ile preparatın yerleştirildiği tabla arasında yer alır. Işınları toplayıp, optik sisteme ileten bir mercek sistemidir.

**Diyafragma:** Kondansatörün hemen altında yer alır. Bir kol aracılığıyla açılıp kapanabilir. Kondansatöre gelen ışık miktarının ayarlanmasına yarar.

**Objektif:** Genel olarak üç farklı büyüklükte objektif lensi kullanılır. 10x; Preparat alanını taramak için tercih edilir. 40x; Parazitler ya da filamentöz mantarlar gibi büyük mikroorganizmaları görmek amacıyla tercih edilir. 100x; Bakterileri, maya mantarlarını ya da büyük mikroorganizmaların hücre detaylarını incelemek üzere kullanılır (immersiyon yağı ile birlikte) .

**Oküler:** Genellikle 10 ya da 15 kat büyütürler.

**Büyütme gücü:** Objektif X Okülerin büyütme gücüdür. Örn: 100 x 10 = 1000

**Rezolüsyon (çözünürlük):** Yan yana duran iki noktanın birbirinden ayrı olarak fark edilebildikleri en yakın mesafedir. Çözünürlük gücü mikroskoptaki mercek sisteminin iki objeyi birbirinden ayırabilme yeteneğidir! IM'da birbirine çözünürlük gücünden daha yakın olan noktaların görüntüleri üst üste biner ve ayırt edilemez. IM'larının çözünürlük gücü bakterilerin tek tek görölmelerine olanak verir ancak; bakteriyel yapıların ayırımına yetmez! IM'da en iyi çözünürlük gücüne **immersiyon yağı** kullanılarak ulaşılır (**100'lük objektif ile**) Çünkü immersiyon yağı objektif lensi ile lam arasındaki boşluğu doldurarak, ışığın örnekten geçtikten sonra dağılmasını engeller. Bu şekilde iyi bir IM'da 0.2 mm'lik rezolüsyon gücüne ulaşılabilir. Virusları izlemek için yeterli değildir. Diğer mikroskopi yöntemlerine ihtiyaç vardır. Bakteriyel yapıların detaylı izlenmesi için yeterli değildir. Boyama yöntemleri ya da diğer mikroskopi yöntemlerine ihtiyaç vardır.

**Kontrast:** IM'nun bir diğer anahtar bileşenidir. Objenin arkasındaki zeminden ayırımını ifade eder. IM'da en iyi kontrast boyama yöntemleri ile elde edilir. Böylece bakteriyel yapıların detayları hakkında bilgi sahibi olunabilir.

### Karanlık alan mikroskopisi

Objektif ve oküler yapıları IM ile ayındır. Fark yaratan yapı: **KONDANSATÖR**'dür! Kondansatörün ortası siyah boya ile karartılmıştır. Preparat sadece oblik ışınlarla aydınlatılır. Işık mikroorganizmanın içinden değil çevresinden yansıdığından; hücre yapısındaki detaylar izlenemez☹ Çözünürlük gücü IM'na göre belirgin oranda arttırılır (0.2 mm'ye karşın 0.02 mm'ye ulaşılır) ☺ 0.2 mm'dan daha ince olan ve iyi boyanamayan *Treponema pallidum* ve *Leptospira* spp. gibi mikroorganizmalar ancak bu yolla izlenebilir.

### Faz kontrast mikroskopisi

Fark yaratan yapı; özel faz objektifleridir. Amaç; mikroorganizmaların görölebilmesi için gerekli kontrastı sağlamaktır. Bu kontrast boyama ile de sağlanabilir ancak bu yöntemin avantajı mikroorganizmaların boyanması temeline dayanan gözlem sadece ölü mikroorganizmaların saptanmasına olanak tanırken, faz kontrast mikroskopisinde boyamaya gerek olmadığı için canlı mikroorganizmaların da izlenebilmesidir ☺

## Floresan mikroskopisi

Floresan ışık rengi kullanılan boya ve filtreye bağlıdır. Akridin oranj, Auramine, Floresein izotiyosiyanat (FITC), Kalkoflor beyazı sıklıkla kullanılan boyalardır. Kullanılan floresan boyanın bileşimine göre;

### 1. Florokromlama

Bakteri hücrelerinin bir bölümü ile floresan boya arasında direkt kimyasal etkileşim olur. Bu etkileşim IM'daki boyamaya benzemekle birlikte; **boyalı hücreler IM'nda izlenene göre 10 kat daha güçlü saptanır!!!** IM ile bir örnekte mikroorganizma görülebilmesi için;  $10^5$  hücre / ml gerekirken, FM'da;  $10^4$  hücre / ml bulunması yeterlidir...

### 2. İmmunofloresans

Antikor ile floresan boya kimyasal olarak bağlanır ve mikroorganizmaların "özgül" olarak saptanmasında kullanılır. *Legionella spp*, *Bordetella pertussis*, *Chlamydia trachomatis* gibi hasta örneğinde zor / yavaş üreyen bakterilerin saptanmasında tercih edilir. Antikorlar ile konjuge edilmek için en çok kullanılan boya; **Floresein izotiyosiyanat (FITC)**, elma yeşili floresans verir.

## Direkt mikroskopik muayene

Gelen örnekten direkt preparat hazırlanarak, boyasız inceleme yapılabileceği gibi, **bakteriyolojide boyalı preparatlar tercih edilir**. Işık mikroskoplarının rezolüsyon gücü (çözünürlüğü) bakteri hücrelerinin tek tek görülmelerine olanak vermekle birlikte, bakteriyel yapıların ayırımı için yeterli değildir. Işık mikroskopunda hem bakteriyel yapıları inceleyebilmek hem de objenin arkasındaki zeminden ayırımını ifade eden "**kontrast**"ı yükseltebilmek için boyama teknikleri kullanılır. Bu sayede mikroorganizmalar hakkında daha detaylı bilgi sağlanmış olur. Boyasız preparatlar kabaca mikroorganizmaların; genel şekilleri (basil, kok, kokobasil) hakkında bilgi verebilir ve eğer varsa epitel hücrelerinin ve lökositlerin (iltihap hücreleri) izlenmesini sağlarlar. Boyalı preparatlar şçilen boyaya bağlı olarak, mikroorganizmanın hücre duvar yapısı, kapsül, spor varlığı, aside dirençli boyanma özelliği vb. hakkında bilgi verir. Işık mikroskopisi için boyama teknikleri hem doğrudan hasta örneğine hem de kültürde üretilmiş mikroorganizma kolonisine uygulanabilir. Bakteriyolojide en yaygın kullanılan boya **Gram boyasıdır**.

## Gram boyama

Gram boyama ile yapılan inceleme, bakterilerin **hücre duvar yapıları** hakkında bilgi sağlayarak, sınıflandırılmanın ve dolayısıyla **tanının ilk basamağını** oluşturur. Gram boyama bir bileşik boyama yöntemidir ve hazırlanan preparat üzerine sıra ile çeşitli boyaların uygulanması ile yapılır. Bunun sonucunda bakteriler Gram pozitif ve Gram negatif olarak ikiye ayrılırlar.

## ÖNEMİ

Bu işlem, bakteriyel **tanı koyma aşamalarının ilk basamağıdır** ve daha sonra yapılacak tanıya yönelik testler, bakterinin gram pozitif ya da negatif olmasına göre farklılıklar içerir. Aynı zamanda **tedavide kullanılacak ajan** da bakterinin gram pozitif ya da negatif özellik göstermesine göre değişir. **GRAM POZİTİF** bakterilerin hücre duvarlarında **peptidoglikan tabakası daha kalındır** ve bu kalın tabaka Gram negatif bakterilerde bulunmayan **teikoik asit içermektedir**. **GRAM NEGATİF** bakterilerde ise hücre duvarı yüksek oranda lipit bulduran **lipopolisakkarit** tabakasından oluşmuştur.

## Gram boyama

Gram pozitif / negatif ayırımı renksizleştirme basamağında ortaya çıkar. Gram pozitiflerde bulunan teikoik asit alkol ile dekolorizasyona direnç gösterir. Gram negatif bakterilerin hücre duvarında bol miktarda bulunan lipitler ise alkol karşısında çözünürler ve bakteriler almış oldukları mor renkli boyayı geri bırakırlar.

Konak hücre içinde yaşayan mikroorganizmalar (örn. *Chlamydia*), hücre duvarı taşımayanlar (*Ureoplasma* ve *Mycoplasma*'lar), farklı duvar yapısı özellikleri bulduranlar (aside dirençli boyanan

mikobakteriler gibi) ya da ışık mikroskopunun çözünürlüğü ile görünemeyecek kadar ince olanlar (spiroketler) dışındaki hemen hemen her bakteri Gram ile boyanır.

#### **Direkt mikroskopi ile tanı / ön tanı konulabilen enfeksiyon hastalıkları / etkenleri**

*Actinomyces*

*Treponema pallidum*

Dermatofitler

*Neisseria meningitidis*

*Neisseria gonorrhoeae*

*Bacillus anthracis*

Paraziter hastalıklar

*Gardnerella vaginalis*

*Mobiluncus*

*Mycobacterium tuberculosis*

*Mycobacterium leprae*

*Clostridium tetani*

*Cryptococcus neoformans* menenjitisi

*Pneumocystis jirovecii*

Whipple hastalığı

*Candida* vajiniti

#### **Altın Standart**

Enfeksiyon hastalıklarının tanısı amacıyla çok sayıda süratli ve pratik tanı yöntemleri geliştirilmiş olmakla beraber, **patojenlerin izolasyonu ve identifikasyonu** halen "**altın standart**" olarak kabul edilmekte ve önemini korumaktadır.

Klinik Mikrobiyolojide Mikroorganizmalar;

- Hastalık etkeninin tanınması (identifikasyonu),
- Etkenin antibiyotik duyarlılıklarının saptanması,
- Çevre ve toplum sağlığının denetlenmesi (epidemiyolojik araştırmalar),
- Aşı, antiserum, antijen elde edilmesi,
- Bilimsel araştırmalar yapmak için üretilirler.

#### **İzolasyon ve İdentifikasyon**

Mikroorganizmalar laboratuvar şartlarında, üremeleri ve çoğalmaları için gerekli besin maddelerini içeren **besiyerlerinde** üretilirler. Mikroorganizmaların üreyebilmek için ihtiyaç duydukları maddeler türler arasında farklılık gösterir. **Karbon, nitrojen ve su**, tüm canlı varlıklar için ortak gereksinimlerdir.

#### **Besiyerinin Sahip Olması Gereken Özellikler**

Üretilmek istenen mikroorganizmanın gerek duyduğu tüm maddeleri içermelidir. Mikroorganizma üremesi için gerekli olan pH, nem, ozmotik basınç ve oksidasyon-redüksiyon potansiyeline sahip olmalıdır. Kontaminasyonu engelleyecek uygun kaplarda hazırlanmalıdır. Uygun şekilde sterilize edilmiş olmalıdır. Sterilizasyon kontrolü yapılmış olmalıdır. Uygun şartlarda (sıklıkla buzdolabında) saklanmalıdır.

Mikroorganizmaların uygun çevre koşulları sağlanarak, çoğaltılmaları işlemine **üretim**, bir besleyici ortamda üretilmiş olan mikroorganizmaların tümüne **kültür**, yalnız tek bir organizmadan üretilen kültüre **saf kültür** (aynı genotipik ve fenotipik özellikleri paylaşırlar), tüm özellikleri belirlenmiş, saf kültür halindeki mikroorganizmalara **köken (suş)** adı verilir.

### **Sıvı/Katı besiyeri; Pasaj/Subkültür**

Sıvı besiyerleri az sayıdaki mikroorganizmaların üretilmesi için daha yüksek duyarlılığa sahiptir (neden?) Bununla birlikte farklı mikroorganizmaları içeren karışık örnekler, sıvı besiyerlerinde üretildiklerinde, identifikasyon için katı besiyerlerine yapılan subkültürlere (pasajlara) ihtiyaç duyulur) Bu subkültürlerde mikroorganizmaların tek tek ayırımları yapılabilir. Pasaj / subkültür; bakterinin eski besiyerinden yeni bir besiyerine nakli ile elde edilen ikinci kültürdür.

### **Sıvı / Katı besiyerleri**

Sıvı besiyerlerinde üreme olduğunda **genellikle** sayı olarak sonuç verilemez. Bununla birlikte katı besiyeri bir bakıma sıvı besiyerine göre daha az duyarlı olmakla birlikte, eğer gerek duyulursa izole edilen bakterilere ait **kolonilerin** tek tek sayılarak, kantitatif sonuç verilmesine olanak verir (örn. idrar kültürleri) Hatta bazı cins ve türler katı besiyerindeki **koloni morfolojilerine** bakılarak tanınabilirler.

### **Katı besiyerinde üreme**

**KOLONİ:** Tek bir bakteri hücrenin çoğalmasıyla oluşan bakteri topluluğudur. Her bir koloni, tek bir hücreden köken alan saf kültürlerdir. Koloni görünümü ile büyüklüğü, rengi, şekli, kenar yapısı; düzenli/düzensiz, yüzey yapısı; bombe-basık-düz, yüzey görünümü; mat-opak-translucent, hemolitik paterni ya da pH indikatöründe renk değişimi yapması, kokusu gibi özellikleri kastedilmektedir. S (smooth), R (rough) ve M (mucoid) koloni (kapsüllü bakterilere ait) tipleri vardır.

### **KULLANIM AMAÇLARINA VE İÇERİKLERİNE GÖRE BESİYERLERİ**

Bakterileri laboratuvar ortamında üretmek için yüzlerce farklı besiyeri mevcuttur. Bunlardan bazıları çok sayıda farklı bakterilerin üremesi için elverişli ortam teşkil ederken, bazıları sadece tek bir tür bakterinin üremesine izin verir. Bazıları substratların metabolizması sonucu oluşan pH değişikliklerini tespit etmek için pH indikatörleri içerir. Bazıları bakterilerin kapsül veya spor oluşturmalarını kolaylaştıran maddeler taşır.

### **Besiyerlerinin Sınıflandırılması**

#### **Genel Üretim Besiyerleri**

Basit (temel) Besiyerleri (Peptonlu su, buyyon, adi agar)

Zengin Besiyerleri (Kanlı agar)

#### **Özel Besiyerleri**

Seçici (selektif) Besiyerleri (EMB, MacConkey)

Ayırtıcı (farklılaştırıcı) Besiyerleri (EMB, SS vb)

Ayırıcı Besiyerleri (Sitrat, Üre vb)

Özgül Besiyerleri (Loewenstein-Jensen)

Zenginleştirici besiyerleri (Thioglycollate broth, brain-heart infüzyon broth, tryptic soy broth )

**Kültür Besiyerinin Seçimi:** Besiyeri, gelen örnek ve muhtemel patojene göre seçilir. Öncelikle ekim yapılacak örneğin nereden alındığının, örnekte bulunabilecek mikroorganizmaların ve bu mikroorganizmaların beslenme gereksinimlerinin bilinmesi gerekir. Örn; adi agar çok sayıda bakterinin üremesi için uygun ortam teşkil eder, ancak belirli bakterileri üretebilmek için ortama zenginleştirici veya inhibe edici maddeler ilave etmek gerekir.

### **Ekim Teknikleri**

- Floralı/katı örnekler (boğaz, balgam, yara, gaita, vb) "tek koloni düşürme yöntemi" ile ekilir.
- Florasız/sıvı örnekler (idrar, BOS, vb) örnekteki mikroorganizma sayısını tanımlayabilmek için "idrar ekim" tekniği ile ekilir.
- 

### **Tek koloni düşürme tekniği:**

Amaç: Kolonileri tek düşürerek farklı koloni tiplerini birbirinden ayırmaktır.

**İdrar ekim tekniği:**

Kalibre (içine aldığı sıvının hacmi bilinen) öze ile ekim yapılır. Kalibre özeler 1 µl (0,001 ml) veya 10 µl (0,01 ml) örnek alabilir. Amaç; 1 ml örnekte kaç koloni bakteri olduğunu hesaplamaktır. **Örnek:** 0,001 ml öze kullanılarak yapılan idrar kültüründe 24 saat sonra plakta 13 koloni oluşturan birim (KOB; colony forming unit=CFU) görülüyor. İdrar kültürünün sonucunu KOB/ml cinsinden hesaplayınız. Cevap: 0,001 ml → 13 CFU; 1 ml → x; x=13/0,001; x= 13.000 **SONUÇ:** 13.000 KOB/ml üreme olmuştur.

**Mikroorganizmaların Üremesi Üzerine Etkili Olan Çevresel Faktörler**

Mikroorganizmaların üreyebilmesi için dört kritik çevresel faktör vardır:

1. Isı
2. pH
3. O<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub>
4. Nem

**Isı**

Psikrofil Bakteriler: -8 - +15 C°

Mezofil Bakteriler: 20 – 45 C°

Termofil Bakteriler: >50 C°

İstisnalar bulunmaktadır. Örneğin *Campylobacter jejuni* 42°C'de ürer. *Listeria monocytogenes* & *Yersinia enterocolitica*; 20-40°C'ler arasında üreyebilmekle birlikte, 0°C'de de çoğalabilirler. Bu özelliklerinden dolayı bu mikroorganizmalar için laboratuvarında "soğukta zenginleştirme" yapılabilir.

**pH;** hidrojen iyon konsantrasyonudur. pH:7 nötral, 7'nin altı asidik, 7'nin üzeri alkalendir. Patojen mikroorganizmalar genellikle pH (6.5) **7.2 ile 7.4** arasında ürerler. Besiyeri hazırlarken pH'ya dikkat edilmesi gereklidir.

**Oksijen / Karbondioksit**

- **Aerobik** bakterilerde son elektron alıcısı oksijendir. Oksijensiz ortamda üreyemezler. Örn; *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Brucella*, *Bordetella*, *Francisella*
- **Fakültatif anaeropl**ar hem oksijenli hem de oksijensiz ortamda yaşarlar. Örn; patojen bakterilerin çoğu
- **Mikroaerofiller** için düşük düzey oksijen yeterlidir.
- **Kesin anaeropl**ar için oksijen öldürücüdür.

Oksijenin yanı sıra ortamdaki karbondioksit miktarı da önemlidir; %5-10 gibi yüksek karbondioksit miktarında iyi üreyebilen mikroorganizmalara **kapnofilik** denir. Örn; *H.influenzae*, *N.gonorrhoeae* Bunlar bilindiği zaman, muhtemel etken patojene göre gelen klinik örnek uygun inkubasyon koşullarına kaldırılır.

**İnkubasyon koşulları**

<b>Aeropl</b> ar;	%21 O <sub>2</sub> , % 0.03 CO <sub>2</sub> (atmosfer havası)
<b>Anaeropl</b> ar;	%5-10 H <sub>2</sub> ,
	%5-10 CO <sub>2</sub> ,
	%80-90 N <sub>2</sub> ,
	%0 O <sub>2</sub> içeren anaerobik jar içinde,
<b>Kapnofiller</b> ;	%5-10 CO <sub>2</sub> ,
	%15 O <sub>2</sub> içeren CO <sub>2</sub> 'li etüv ya da mumlu kavanozda,
<b>Mikroaerofiller</b> ;	%5-10 CO <sub>2</sub> ,
	%8-10 O <sub>2</sub> içeren özel jar içinde bekletilir

**Nem:** Besiyerleri 37°C'de inkübe edilirken, buharlaşma nedeniyle su içeriklerini kaybederler. Su, bakterinin metabolik aktivitesi için gereklidir. Su kaybı rölatif olarak besiyerindeki katı bileşenlerde artışa yol açar; bu da bakteri hücrelerinin ozmotik şok sonucu lizisine neden olur. İnkubasyon sırasında nem kaybına dikkat edilmelidir.



Sonuç olarak; patojen mikroorganizmaların **oğu**, 35-37°C'de, nemli ortamda, %3-5 CO<sub>2</sub> varlığında, 24-48 saatte iyi ürerler.

**İzolasyon ve İdentifikasyonun Basamakları:** Laboratuvara gelen örneğin makroskopik ve mikroskopik incelenmesi sonrasında örnekten önce besiyerine ekim yapılıp; sonra lam üzerine aktarılarak direkt mikroskopik incelemeye alınır.

Kültürde reme görüldükten sonra;

**1. Aşama:** Kültür plaklarının değerlendirimi; inkübasyon sonrası kolonilerin oluşumu (rn 24 sa); boyut, yapı, renk, hemoliz özelliği, oksijen ihtiyacı

**2. Aşama:** Kolonilerin Gram ile boyanması; mikroorganizmaların mikroskopik incelenmesi

**3. Aşama:** İzole edilen bakterinin tiplendirilmesi; genellikle fizyolojik testler kullanılarak

Mikroskopik morfoloji ve boyanma zellikleri

Makroskopik (koloni) morfolojileri

Üreme için gerekli çevresel faktörler

Antimikrobiyal direnç paternleri

Besin ihtiyacı ve metabolik kapasiteleri

**4. Aşama:** Antibiyotik duyarlılık testleri

**Kültür olmaksızın hızlı tanı**

**NE ZAMAN VE NEDEN?**

- Zayıf reme gösterenler
- Kültürü yapılamayanlar

*Treponema pallidum*

*Mycobacterium lepra*

- Acil tanı gereken durumlar için

## İDENTİFİKASYON

Bakterinin adını koymak gereklidir nkn, klinik önemi saptanmalıdır: Patojen mi? Kontaminant mı? Antimikrobiyal direnç testi gerekip, gerekmediğine karar verilmeli ve antimikrobiyal tedavi yönlendirilmelidir. Mikroorganizmanın diğer hastalar, çalışanlar ya da toplum için risk taşıyıp, taşımadığı belirlenmelidir.

**İdentifikasyon şemaları fenotipik** ya da **genotipik** olabilir. Genotipik yaklaşım; bir gen / gen parçasının; RNA ürününün saptanması şeklindeyir. Yüksek oranda özgül ve oldukça duyarlıdır. Fenotipik özelliklerle mikroorganizma identifikasyonu, genlerin kendilerinden ziyade ürünlerinin analizi temeline dayanır. Bakterilerin fiziksel ya da metabolik özelliklerinin gözlenmesiyle yapılır. Sıklıkla kullanılan fenotipik zellikler:

- Mikroskopik morfoloji ve boyanma özelliği
- Makroskopik (koloni) morfolojisi
- Üreme için gerekli çevresel faktörlerin saptanması
- Antimikrobiyal direnç paternlerinin gösterilmesi
- Besin ihtiyacı ve metabolik kapasitenin ortaya konulmasıdır.

**Mikroskopik morfoloji ve boyanma zellikleri**

Bazı durumlarda boyanma özelliği tek başına kesin identifikasyonda kullanılır. rn, floresan işaretili spesifik antikörler ve floresan mikroskopi ile; *Legionella pneumophila* ve *Bordetella pertussis* tanısı konulabilir.

**Makroskopik (koloni) morfolojisi**

Koloninin büyüklüğü, şekli, rengi, yüzey görünümü, agar yüzeyinde koloni çevresinde izlenen her türlü renk değişimini (hemoliz gibi) içerir. Kesin tanı koydurmaz; n bilgi sağlar.

**Üreme için gerekli çevresel ihtiyaçlar**

Oksijen, karbondioksit, ısı gibi üreme için gerekli çevresel ihtiyaçlardan iki yönlü yararlanılabilir. Klinik n tanıyı biliyorsak uygun besiyeri ve inkubasyon koşullarını seçebiliriz. Birkaç farklı besiyeri ve

inkubasyon koşuluna ekim yapıp; hangisinde üreme görüyorsak; mikrobiyolojik ön tanıya gidebiliriz! Örn; *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* yüksek miktarda karbondioksit ister. *Campylobacter jejuni* 42°C'da ürer. *Yersinia enterocolitica* 0°C'de canlı kalır.

### Antimikrobiyal direnç / duyarlılık

Ön tanı sağlar. Örn; Gram pozitif bakteriler "vankomisin"e duyarlı, Gram negatifler ise dirençlidir. Dolayısıyla vankomisin diski etrafındaki inhibisyon zonu Gram pozitif bakteri olduğunu gösterir. Benzer şekilde colistin ya da polymixin'e Gram pozitifler dirençli, Gram negatifler duyarlıdır. (Bazı istisnalar bulunabilir, ön tanı sağlar)

### Besin ihtiyacı ve metabolik kapasite

Bir bakteri izolatının; besin ihtiyacı & metabolik kapasitesinin ortaya konulması genellikle cins ve tür düzeyinde tanım yapmak için kullanılan en yaygın yaklaşımdır. Bakterinin besin ihtiyacı ve metabolik kapasitesini saptayabilmek için kullanılan tüm yöntemler ya bakterinin **enzimatik yeteneklerinin ortaya konulması** ya da tuzlar, antimikrobiyaller, toksinler gibi çeşitli **inhibitörlerin varlığında bakterinin üreyebilmesi** ya da yaşamını devam ettirebilmesi özelliklerinin saptanmasına dayanır.

### Enzimatik içeriğın saptanması

Enzimler genetik olarak kodlandığı için; enzimatik içerik mikroorganizmanın genetiğini yansıtır.

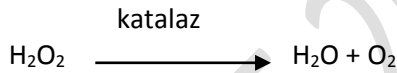
### Tek enzim testleri

Kültürde üremiş mikroorganizma üzerine hemen uygulanabildiğı için hızlı sonuç verirler. Uygulama ve değerlendirmelerinin kolaylığından dolayı identifikasyon şemalarında anahtar rol oynarlar.

1. Katalaz
2. Oksidaz
3. İndol
4. Üreaz
5. PYR

### KATALAZ

Aerobik karbonhidrat metabolizmasının son ürünü olan hidrojen peroksiti parçalayan enzimdir.



%3'lük hidrojen peroksit solüsyonu üzerine bakteri eklendiğinde hava kabarcıklarının (O<sub>2</sub>) oluşumu; katalaz enzimi varlığını gösterir. Şüpheli bakteri kolonisinden alınan bir parça, temiz bir lam üzerinde bir damla fizyolojik tuzlu su içerisinde süspansedilir. Üzerine 1-2 damla %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damlatılır. Oksijen kabarcıklarının oluşması testin pozitif olduğunu gösterir. **Eritrositlerde de katalaz enzimi bulunduğundan dolayı, test edilecek bakteri kan içermeyen bir besiyerinden alınmalıdır.**

	Mikroorganizma	Katalaz
Gram pozitif koklar	<i>Streptokoklar</i>	Negatif
	<i>Stafilokoklar</i>	Pozitif
Sporsuz Gram pozitif basiller	<i>Listeria monocytogenes</i>	Pozitif
	<i>Corynebacteria</i>	Pozitif
	Diğerleri	Negatif

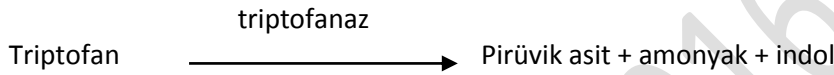
### OKSİDAZ

**Sitokrom oksidaz, oksidatif fosforilasyon** yapan bakterilerin kullandıkları enzimdir. Bu bakteriler tarafından elektron transportu ve nitrat metabolik yollarında kullanılır. Oksidaz testi bu enzimin

aktivitesini ölçmeye yönelik bir testtir. Steril bir petri kutusu içerisine yerleştirilmiş kurutma kağıdına 2-3 damla oksidaz ayıracı (**dimetil veya tetrametil fenilendiamin dihidroklorid**) damlatılır. Üzerine, öze ile şüpheli koloniden bir miktar alınarak sürülür. 10–60 saniye içerisinde mor veya kahverengi-siyah bir renk oluşması testin pozitif olduğunu gösterir. Agar yüzeyinden alınan bakteri kolonisi tercihen 24 saatten eski olmamalıdır; koloniyi almak için **platin ya da plastik öze** kullanılmalıdır; demir öze yanlış pozitif sonuca yol açar. Benzer şekilde MacConkey besiyeri gibi **karbonhidrat fermentasyon besiyerlerinden alınan koloniler de kullanılmamalıdır**; pH düşüklüğüne bağlı yanlış negatif sonuç alınabilir. Oksidaz testi esas olarak Gram negatif bakterilerin ayırımında kullanılır.

Mikroorganizma	OKSİDAZ
<b><i>Enterobacteriaceae</i></b>	NEGATİF
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	
<i>Acinetobacter spp</i>	
<i>Pseudomonas</i>	POZİTİF
<i>Aeromonas spp</i>	
<i>Neisseria*</i>	

### İNDOL



Triptofan bir aminoasittir. İndol deneyi ile triptofanı parçalayan, triptofanaz enzimi varlığı araştırılır. Özellikle *E.coli*'nin identifikasyonunda kullanılır. *E.coli* indol pozitifdir. İncelenecek bakteri **triptofan içeren** bir sıvı besiyerine inoküle edilir. Bu amaçla genellikle **peptonlu su** veya **buyyon** kullanılır. En az 24 saatlik inkübasyondan sonra üzerine, tüpün kenarından yavaşça akıtılmak suretiyle, 0.5 ml **Kovaks ayıracı (para-dimethyl aminobenzaldehyde)** ilave edilir. Oluşan indol **aldehitlerle** (ayıracıdaki) reaksiyona girince kırmızı renk verir. Besiyerinin üst kısmında parlak kırmızı bir halka oluşması testin pozitif olduğunu gösterir.

### ÜREAZ



Üre bakteriler tarafından **karbon kaynağı** olarak kullanılır. Üreaz testi de bakterilerin üreaz aktivitesini araştırmak için yapılır. Üre içeren agar ya da sıvı besiyerinde amonyak oluşumu sonucu değişen pH'ya bağlı renk farkının gösterilmesi ile yapılır. Bu amaçla indikatör olarak **fenol kırmızısı** içeren **Christensen üre besiyeri** kullanılır. Ürenin hidrolizi sonucu ortaya çıkan amonyak alkali bir üründür ve besiyerinin rengini sarıdan pembeye dönüştürür. Fenol kırmızısı alkali pH'da kırmızıdır!

Mikroorganizma	ÜREAZ
<i>Proteus mirabilis</i>	POZİTİF
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	
<i>Helicobacter pylori</i>	
<i>Brucella</i>	
<b><i>Escherichia coli</i></b>	NEGATİF

**PYR**

Gram pozitif kokları; özellikle A grubu beta hemolitik streptokoklar (*Streptococcus pyogenes*) ve enterokokları ayırmada kullanılan bir testtir. L-pyrrolidonyl arylamidase enziminin varlığı esasına dayanır. Substrat emdirilmiş disk su ile ıslatılır. Üzerine bir-iki koloni bakteri sürülür. Oda ısısında 2 dk beklenir. Reagen damlatılır. Kırmızı renk oluşumu gözlenir.

Substrat: L-pyrrolidonyl-beta-naphtylamide

**Enzim: L-pyroglutamil aminopeptidaz**

Ürün: Beta-naftilamid

Bu ürün "cinnamaldehit" reageni ile karşılaşınca parlak kırmızı renk ortaya çıkar.

<b>PYR (+)</b>	<b><i>Stafilokoklar,</i> <i>Enterokoklar,</i> <i>Streptococcus pyogenes</i></b>
<b>PYR (-)</b>	Diğer streptokoklar

**METABOLİK ARAYOLLARA AİT TESTLER**

Tek enzim testlerinin aksine, birbirleriyle etkileşen birkaç enzimi içerirler. Bu etkileşimler sonucu ortaya çıkan son ürünün gösterilmesine dayanırlar.

Üç genel sınıfa ayrılırlar:

1. Karbonhidrat oksidasyon ve fermentasyonu
2. Aminoasit degradasyonu
3. Tek substrat utilizasyonu

**OKSİDASYON – FERMENTASYON TESTLERİ**

Bakterilerin spesifik karbonhidratları **oksidatif** olarak mı, **fermentatif** olarak mı kullandıklarının ayırt edilmesi temeline dayanır. Oksidatif süreç oksijene ihtiyaç duyar. Fermentasyonda oksijene ihtiyaç yoktur. Her iki yol sonucunda da asit son ürünler oluşur. Bakteriler rutin olarak altı karbonhidrat için test edilmektedirler:

1. Glukoz
2. Ksiloz
3. Mannitol
4. Laktoz
5. Sükroz
6. Maltoz

Besiyeri az miktarda pepton ve bu karbonhidratlardan herhangi birini tek olarak içerecek şekilde hazırlanır. Yarı katı bir besiyeridir. İçine pH değişimini gösterecek ayıraç konur (Bromtimol mavisi \*, Andrade ayırıcı, Fenol kırmızısı vb...) İki ayrı OF besiyerine ekim yapıp, birinin üzeri mineral yağ ile kapatılarak oksijen ile bağlantısı kesilir. Ağız açık tüp yüzeyinde renk değişimi olursa bakterinin oksidatif, her iki tüp sararırsa fermentatif yolu kullandığı sonucuna varılır. Oksidasyon-fermentasyon testleri mikroorganizmaları büyük gruplara ayırmada kullanılır:

	Glukoz için
<b><i>Enterobacteriaceae</i></b>	<b>Fermentatif</b>
<b><i>Pseudomonas</i></b>	<b>Oksidatif</b>

**AMİNOASİT İNDİRGENMESİ**

Aminoasit olarak genellikle lizin, arginin, ornitin, fenilalanin kullanılır. Testin esası; dekarboksilaz enzimlerinin aminoasitlerden karboksil gruplarını ayırıp, böylece aminoasitlerin aminlere dönüştürülmesi ve bunun gösterilmesine dayanır. Amin'ler ortam pH'sını arttırır ve indikatör renk değiştirir. Dekarboksilasyon aktivasyonu için asit ortama gerek duyan, anaerobik bir süreçtir.

Bakterilerin aminoasidler üzerine olan etkilerini göstermek amacıyla; pepton, glukoz, aminoasid (herhangi biri) ve indikatör olarak bromkrezol moru içeren besiyerlerine ekim yapılır ve üzerlerine steril mineral yağ ilave edilerek hava ile ilişkileri kesilir.

- Bakteri önce glikozu kullanır; pH düşer, indikatör sararır (asit ortam oluşur); aminoasit dekarboksilasyonu başlar; oluşan aminler pH'yı arttırır; renk tekrar mora döner.
- Bir gecelik inkubasyon sonrası; mor renk: pozitif; sarı renk: negatif (dekarboksilaz aktivitesi yok)

### TEK SUBSTRAT UTİLİZASYONU

Bir mikroorganizmanın tek bir besin (örn; karbonhidrat) ya da karbon kaynağı varlığında üreyebilmesi (örn; sitrat, malonat, asetat) identifikasyonu için önemli bilgiler sağlar. Bu testler mikroorganizmanın böyle bir besiyerine inokülasyonundan sonra inkubasyonu takiben üreme görülmesi (besiyerine ilave edilen çeşitli indikatörlerin renk değiştirmesi ya da bakteri kolonilerinin görülmesi ile anlaşılır) ile yorumlanır. İçinde tek bir karbonhidrat (laktöz, sükroz, glukoz vb) ve ters çevrilmiş küçük bir tüp (Durham tüpü – gaz oluşumunu göstermek için) içeren sıvı bir besiyerine ekim yapılır. Amaç; bakterinin o karbonhidratı kullanıp kullanmadığını araştırmaktır.

### Tek şeker testleri

Bakteri besiyerindeki şekeri kullanıyorsa oluşan asit pH'ya bağlı indikatör renk değiştirir (besiyeri sarıya döner). Asit ile beraber gaz da oluşuyorsa, Durham tüpünün içinde hava kabarcığı görülür ve tüpün yukarıya itilmesinden anlaşılır.

**Kullanılan indikatörün özelliğine göre aşağıdaki gibi karar verilir:**

İndikatör	Asit	Nötr	Alkali
Andrade	kırmızı	sarı	renksiz
Bromtimol Mavisi	sarı	hafif mavi	mavi – koyu mavi
Bromkrezol Moru	sarımsı	morumsu	mor
Fenol Kırmızısı	sarı	renksiz	pembe

### İNİHİTÖR ÖZELLİKLERİN BELİRLENMESİ

Bakteri izolatinın bir ya da daha fazla inhibitör madde varlığında üreyebilmesi identifikasyonu için değerli bilgiler sağlar.

- **Çeşitli NaCl konsantrasyonlarında** üreyebilme enterokoklar ve *Vibrio* türlerinin identifikasyonunu sağlar.
- **Optokine duyarlılık ve safra tuzları varlığında erime** *Streptococcus pneumoniae*'nin identifikasyonunu sağlar.
- **Safra varlığında eskülini hidrolize edebilme** yeteneği enterokoklarda bulunur.
- **Etanol varlığında canlılığını devam ettirebilme** özelliği *Bacillus* türlerinin identifikasyonunu sağlar.

### TSi (triple sugar iron) besiyeri

Özellikle *Enterobacteriaceae* ailesinin üyelerini tanımlamak amacıyla kullanılan bir besiyeridir. Bu besiyerinde; şekerlerin fermentasyonu, şekerlerin fermentasyonu sonucu gaz oluşumu ve hidrojen sülfid (H<sub>2</sub>S) oluşumu olmak üzere, bakterilerin üç temel özelliği incelenir. Besiyeri; glukoz, laktöz ve sükroz olmak üzere üç farklı şeker, pH indikatörü olarak fenol kırmızısı ve H<sub>2</sub>S oluşumunun göstergesi olarak ferrik ammonyum sitrat ( & sodyum tiyosülfat) içerir. Besiyerindeki sükroz ve laktöz miktarı, glukoz miktarının 10 katıdır. Glukozu fermente eden bakteriler, 6 saatlik inkübasyonu takiben besiyerinin hem dip kısmının hem de yüzeyinin sarı renge dönüşmesine yol açarlar. 18-24 saat sonra

dip kısım glukozun anaerobik koşullarda fermentasyonu sonucu oluşan organik asitler sonucu sarı (asidik) kalır. Yüzey fermentasyon ürünlerinin (peptonların) aerobik koşullarda oksidasyonu sonucu alkali aminlere dönmesi sonucu kızarır (alkali olur). Glukoza ek olarak, laktoz ve sükroz da fermente edilirse, oluşan yüksek miktardaki fermentasyon ürünleri yüzeydeki alkali aminleri nötralize eder ve yüzeyin de asidik (sarı) kalmasını sağlar. Önerilen 18-24 saatlik inkübasyon periyodu sonunda 24 saatten sonra değerlendirilmemelidir. Bakteriler glukoz veya laktozu kullanamıyorsa, enerji kaynağı olarak besiyerinde bulunan proteinleri ve aminoasitleri kullanırlar. Protein metabolizması primer olarak oksijenin bol olduğu besiyeri yüzeyinde meydana gelir ve ortaya çıkan alkali ürünler besiyeri yüzeyinin kırmızı renk almasına yol açarlar. Reaksiyonlar sırasında CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub> oluşumu besiyerinde kırılmalara ya da besiyerinin tütün dibinden ya da yanlarından ayrılmasına yol açar. Bu durum gaz oluşumu şeklinde değerlendirilir. Sodyum tiyosülfatın hidrojen sülfite (H<sub>2</sub>S'e) indirgenmesi, asit ortam gerektirir; H<sub>2</sub>S, besiyerindeki **ferrik amonyum sitrat** ile reaksiyona girer; bu da tütün dibinde ya da yüzeyin hemen altında siyah renkli **ferröz sülfat** oluşumu olarak izlenir.

#### Değerlendirme:

- Besiyerinin dip kısmının kırmızı kalması (orijinal renkte) bakterinin glukozu fermente edemediğini, dolayısıyla *Enterobacteriaceae* ailesinin üyesi olmadığını gösterir.
- Glukozu fermente edip laktoz ve sükrozu parçalamayan bakteriler dipte sarı, üst tarafta kırmızı renk oluştururlar.
- Besiyerinin tümünün sarı renge dönüşmesi ise glukoz'un yanısıra laktoz ve/veya sükroz'un da bakteri tarafından kullanıldığını gösterir.
- şekerlerin fermentasyonu sonucu gaz oluşumu besiyerinin yukarıya doğru itilmesi veya besiyerinde yer yer parçalanmaların oluşması ile anlaşılır.
- H<sub>2</sub>S oluşturun bakteriler besiyerinin dip kısmının siyahlaşmasına yol açarlar.

#### **Hareket muayenesi**

Bakterinin hareketli olup, olmadığını anlamak da identifikasyon şeması basamaklarından birisidir. Bu amaçla tüpte **yarı katı** bir besiyerine iğne öze ile dik ekim yapılır. Inkübasyon süresi sonunda bakteri hareketsizse sadece ekim çizgisi boyunca; hareketliyse tüm besiyerinde üreme izlenir. Hareket muayenesi '**Kregi besiyeri**' adı verilen, içinde iki ucu açık küçük bir boru içeren tüpte **yarı katı** bir besiyeri ile de yapılabilir. Ekim iğne öze ile küçük boru içine yapılır, bakteri hareketliyse inkübasyon süresi sonunda borunun alt ucundan çıkarak tüm besiyerini bulandırır.

#### **IMVIC (indol, metil kırmızısı, Voges Proskauer, sitrat testleri)**

Özellikle *Enterobacteriaceae* ailesinde yer alan türlerin identifikasyonu için kullanılan birkaç farklı reaksiyondan oluşur.

#### **IMVIC testleri - İndol Deneyi**

Tritofandan triptofanaz enzimi ile indol oluşumu araştırılır. 1 gecelik buyyon kültürü üzerine **Kovaks ayırıcı** (dimetilaminobenzaldehit) veya **Ehrlich ayırıcı\*** (Etil alkol + Dimetilaminobenzaldehit) damlatılır. Yüzeyde pembe halka oluşursa test pozitifdir.

#### **IMVIC testleri - Metil Red & Voges Proskauer Deneyi**

Birlikte değerlendirilirler. Bir mikroorganizmanın glukoz fermentasyonu yapıp yapamadığını saptarlar. Temelleri; bazı mikroorganizmaların glukoz fermentasyonu sonucu asit son ürünler; bazılarının ise nötral son ürünler (2-3 butanediol ya da asetoin gibi) oluşurmalarının saptanması esasına dayanırlar.

#### **IMVIC testleri – Metil Red Deneyi**

Metil kırmızısı testi, karışık asit fermentasyonunu saptamaya yöneliktir. Bakterilerin glukozu fermente ederek ortamın pH'ını 4.4'ün altına düşürmeleri esasına dayanır. İncelenecek bakteri pepton ve glukoz içeren tamponlanmış **Clark-Lups besiyerine** inoküle edilir. En az 48 saatlik inkübasyondan sonra ortama 5-6 damla metil kırmızısı ayırıcı ilave edilir. Bu ayıraç pH 4.4 ve altında kırmızı, pH 6.2 ve üzerinde ise

sarı renk verir, dolayısıyla kırmızı renk oluşması testin pozitif olduğunu gösterir. Reaksiyon hemen değerlendirilir.

Mikroorganizma	MR	Renk
<i>Escherichia coli</i>	Pozitif	Parlak kırmızı
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Negatif	Sarı

#### IMVIC testleri – Voges Proskauer Deneyi

Glukoz fermentasyonu ile oluşan asit son ürünlerin **asetoin** ya da **2,3-butanediol**'e dönüştürülmesi araştırılır. 1 gecelik **Clark Lups besiyeri** kültürü üzerine önce alfa-naftol ayıracı (0,6 ml), daha sonra KOH ayıracı (0,2 ml) damlatılır, besiyeri çalkalanır, 5-10 dk beklenir. Besiyeri pembeleşirse test pozitifdir.

Mikroorganizma	VP	Renk
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Pozitif	Kırmızı
<i>Escherichia coli</i>	Negatif	Sarı

#### IMVIC testleri – Sitrat testi

Tek karbon kaynağı olarak bakterinin sitratı kullanması araştırılır. Bu amaçla sitrat ve pH indikatörü olarak bromtimol mavisi içeren **Simmons sitrat agar** besiyeri kullanılır. Bakteriler 24 saatlik inkübasyondan sonra (inkübasyon süresi 4 güne kadar uzayabilir), oluşan alkali ürünler nedeniyle besiyerinin rengini maviye dönüştürür.

Mikroorganizma	Sitrat	Besiyeri rengi
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Pozitif	Mavi
<i>Escherichia coli</i>	Negatif	Yeşil

#### Koagülaz testi

**Koagülaz**, özellikle **patojen stafilokoklar** tarafından üretilen ve fibrinojeni fibrine dönüştürerek plazmayı pıhtılaştıran enzimdir. Koagülaz testi ile koagülaz enzimi aranır. Koagülaz testi, **Staphylococcus aureus**'un (stafilokok cinsi içerisindeki en önemli insan patojeni olan tür) diğer stafilokoklardan ayırt edilmesinde kullanılan en önemli testtir. Koagülaz enziminin fazla olması reaksiyonun daha çabuk ve belirgin olarak meydana gelmesine neden olur. Test, tüp içerisinde veya lam üzerinde yapılabilir.

#### Lam Deneyi

Lam deneyinde, kültür filtratına geçmeyen ve bakteri hücresi yüzeyinde bulunan "**bağı koagülaz**" (**clumping factor = kümeleştirici faktör**) araştırılır. Şüpheli bakteri kolonisinden bir parça öze ile alınarak lam üzerinde bir damla sitratlı tavşan plazması ile karışırılır. Bakteri hücre duvarına bağı bulunan faktörün plazmadaki fibrinojeni pıhtılaştırması bakterilerin kümeleşmesine yol açar. 10-30 saniye içerisinde gözle görülür kümelerin oluşması testin pozitif olduğunu gösterir.

#### Tüp Deneyi

Tüp deneyinde, bakterilerin buldukları ortama saldıkları "**bağı olmayan koagülaz**" araştırılır. Burada, hücre dışına salınan protein yapıdaki enzim plazmadaki **trombin** molekülü ile etkileşime girerek bir **kompleks** oluşturur; bu kompleks **fibrinojeni fibrine** çevirir. Şüpheli bakteri kolonisi 1/5 oranında sulandırılmış sitratlı tavşan plazması içerisinde süspansiyon edilir ve 37°C'lik su banyosunda 1-4 saat inkübe edilir. Pıhtı oluşması (süspansiyonun jel halini alması) testin pozitif olduğunu gösterir. Tüp deneyi ile lam deneyi sıklıkla paralel sonuç vermekle birlikte, lam deneyinde negatif sonuç veren şüpheli suşlar tüp deneyi ile de test edilmelidir. Özellikle metisilin'e dirençli *Staphylococcus aureus* suşları lam yöntemi ile negatif sonuç verebilir.

### **Basitrasin duyarlılığı**

**Basitrasin** diski A grubu beta hemolitik streptokokların (*Streptococcus pyogenes*) tanısında kullanılır: Duyarlıdırlar!

**DİKKAT:** A grubu yanında C ve G grubunda yer alan streptokoklar da basitrasine duyarlı olabildikleri için A grubunun kesin identifikasyonunda PYR pozitif olmalarından yararlanılır.

### **Optokin duyarlılığı**

**Optokin** diski *Streptococcus pneumoniae* tanısında kullanılır: Duyarlıdır!

14 mm'nin üzerinde zon çapı verir; zon çapı 14 mm'nin altında ise ancak safrada eriyebilme özelliği taşıyorsa pnömokok denir.

### **İdentifikasyon ?**

İdentifikasyon için yapılacak testlerin seçiminde;

Bakterinin tipi,

Klinik önemi,

Mevcut testlerin neler olduğu göz önünde bulundurulur.

### **Otomatize sistemler**

Tüm parametreler tek bir kart üzerinde toplanmıştır. Kart üzerindeki her bir kuyucuğa ekim yapılır. İnkübasyon sonrasında her kuyucuk için özel ayıracılar damlatılır. Renk değişimi veya bulanıklık oluşumuna göre sonuçlar değerlendirilir. Elde edilen sonuçlar bir rakama çevrilir. Karşılık gelen mikroorganizma adı belirlenir. Bilgisayarla desteklenebilir.

### **Moleküler Yöntemler**

“Nazlı/zor üreyen” patojenleri üretmedeki güçlük, bazı patojenlerin örneğin laboratuvara nakli sırasında canlılıklarını yitirmeleri, yavaş üreyen patojenlerin identifikasyonundaki güçlük / gecikme, in vitro olarak bazı mikroorganizmaları tanımlayacak yöntemlerin yokluğu gibi fenotipik yöntemlerin yetersiz kaldığı durumlarda moleküler (genotipik) yöntemlere başvurulabilir. Genotipik yöntemler enzimler gibi genlerin ürünleri yerine doğrudan DNA ya da RNA'nın saptanmasına yöneliktir.

### **Kaynaklar**

- Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, Tille PM, 13<sup>th</sup> Ed, Elsevier, 2014
- Medical Microbiology; Murray, Rosenthal, Pfaller; 7<sup>th</sup> Ed; Elsevier Saunders; 2013
- Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology; 27<sup>th</sup> Ed; McGraw Hill Lange; 2016
- Sherris Medical Microbiology; 6<sup>th</sup> Ed; Ryan KJ, Ray CG; McGraw Hill Education; 2014

\*\*\*\*\*