ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ

general bacteriology.weebly.com

general bacteriology.weebly.com

Bakterilerde İdentifikasyon

Mikrobiyoloji-I

Doç. Dr. Özlem BÜYÜKTANIR YAŞ

Doğru ve kesin bakteri identifikasyonu ve patojen tespiti neden önemlidir?

- ✓ Doğru hastalık teşhisi,
- ✓ Enfeksiyon tedavisi
- ✓ Mikrobiyal enfeksiyonlarla ilişkili hastalık salgınlarının izlenmesinde önemli

Bakteri İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Bakterilerin izolasyon basamakları;

- Hastalık hikayesi
- Hastadan muayene materyali (örnek) alınması
- Örneğin laboratuvara nakli
- Örneğin makroskopik/mikroskopik incelenmesi
- Kültür
- Bakteri izolasyonu

- **Geleneksel bakteri tanımlama yöntemleri**, organizmanın fenotipik tanımlamalarına dayanır.

Genel olarak,

- Kültür
- Gram boyama,
- Biyokimyasal, moleküler, serolojik vb yöntemler

Mikrobiyolojik inceleme için örnek seçimi

- Örnekler hastalığın gelişimini yansıtan bölgelerden alınmalıdır.
- Eküvyon Çubuğu örnekleri; Deri veya mukoza zarlarını toplamak için kullanılır.
- Aspirasyon veya biyopsi teknikleri
- İdrar
- Dışkı
- BOS (Beyin Omurilik Sıvısı)
- Boğaz kültürü
- Balgam,
- Yara örnekleri

Bakteri İdentifikasyonu

- Mikroorganizmaların cins ve türlerini ayırt etmek,
- Antijenik karakterler (virülans faktörleri)
- Patojenik karakterler
- Serolojik karakterler
- Biyokimyasal özelliklerin belirlenmesi
- Antibiyotik duyarlılığı
- PCR gibi moleküler yöntemler

MİKROBİYOLOJİK MUAYENE

Örneğin makroskopik (gözle) incelenmesi

- Bütün örnekler önce gözle makroskopik olarak incelenmelidir.
- 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.

Enfeksiyöz hastalıkların tanısı için patojenlerin izolasyonu ve tanımlanması "altın standart"

- **Kültür**; bakteriyolojik ortamda üretilen mikroorganizmalar,
- **Saf kültür**, aynı genotipik ve fenotipik özellikleri paylaşan bir organizmadan üretilen kültür
- **Suş**, saf mikroorganizmaların tüm özellikleri köken olarak tanımlanmıştır.

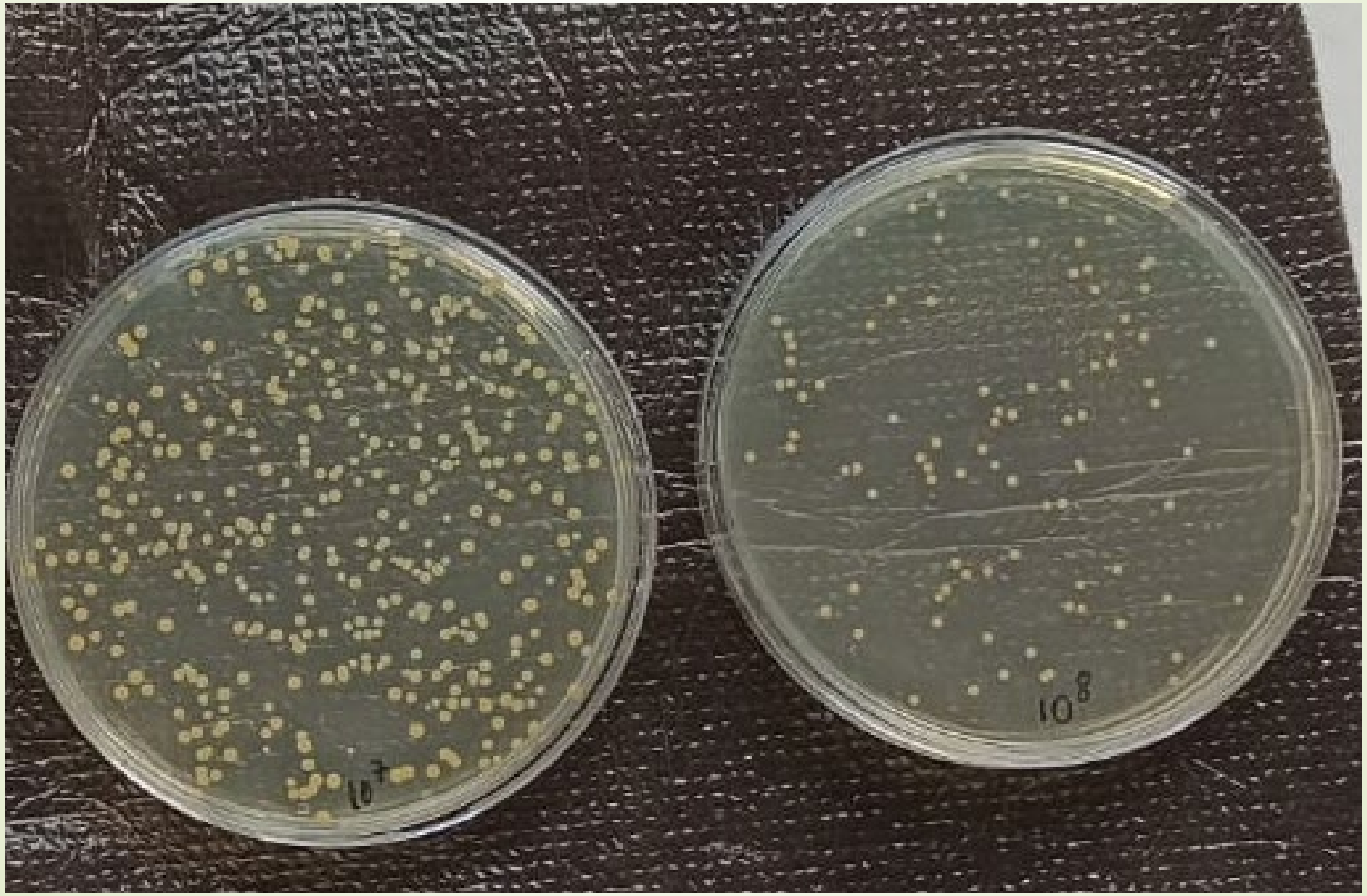
Kültür

- İzolasyon için rutinde
- Tek koloni düşürme, azaltma (Çizgi kültür) tekniği kullanılır
- Platin öze kullanılır

Azaltma ekimle kültür

Saf Kültür

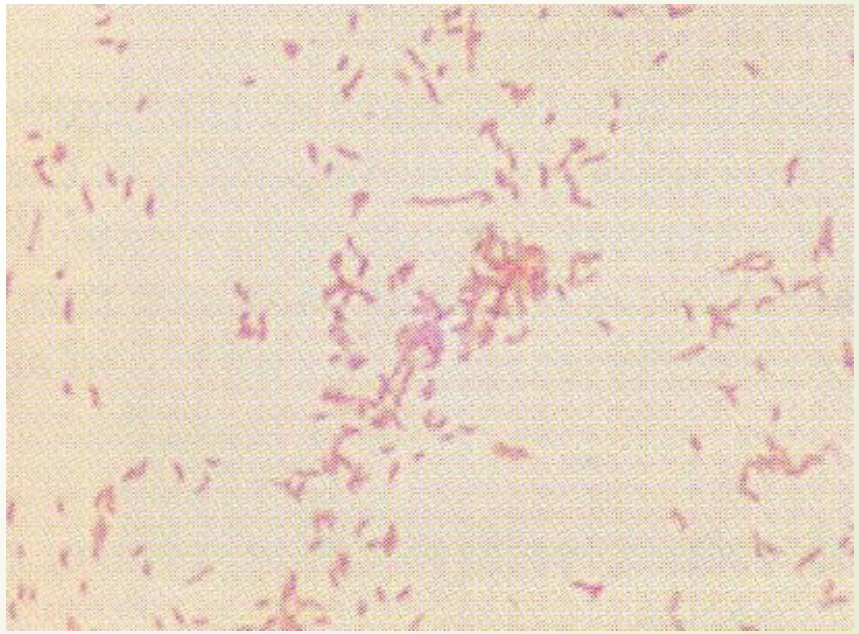
Tek koloni düşürme



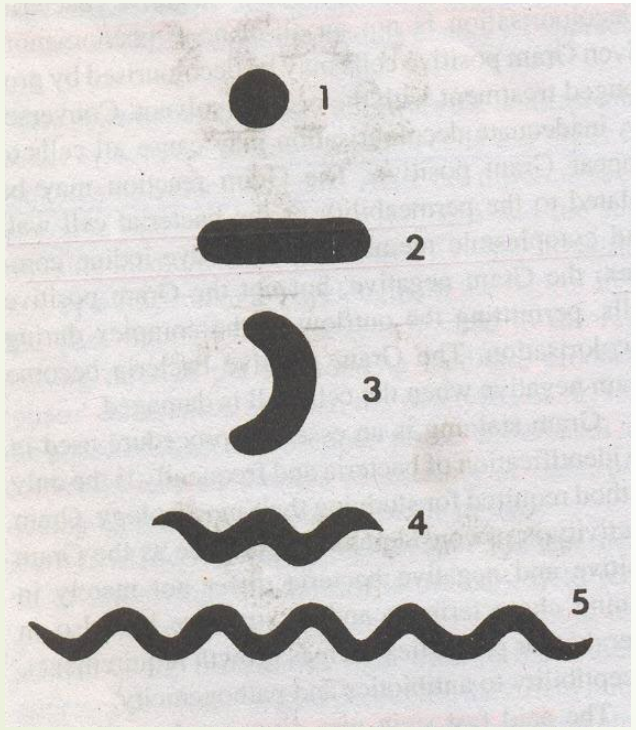
Direkt mikroskopik muayene

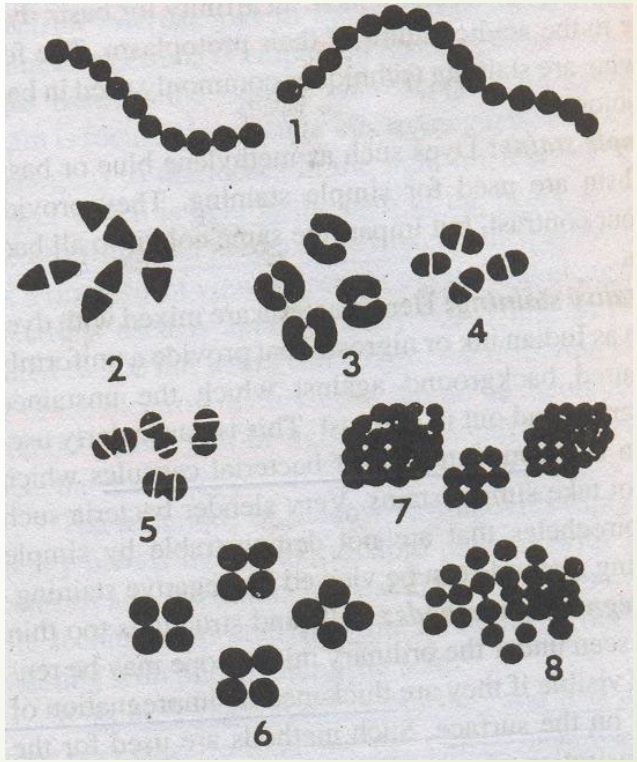
- Örnekten direkt preparat hazırlanır,
- **bakteriyolojide boyalı preparatlar tercih edilir.**
- **Boyanmadan incelenen bakteriler (Spiroketler)**
- Mikroorganizmaların; genel şekilleri (basil, kok, kokobasil)
- Işık mikroskopisi için boyama teknikleri hem doğrudan hasta örneğine hem de kültürde üretilmiş mikroorganizma kolonisine uygulanabilir.

- Bakteriyolojide en yaygın kullanılan boya **Gram boyasıdır.**
- Bakterilerin Hücre duvarı farklılıklarını belirlemek amaçlı



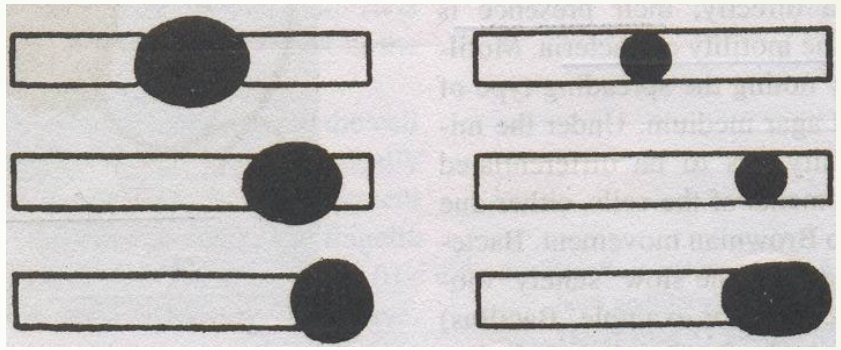
Mikroskobi-Morfoloji



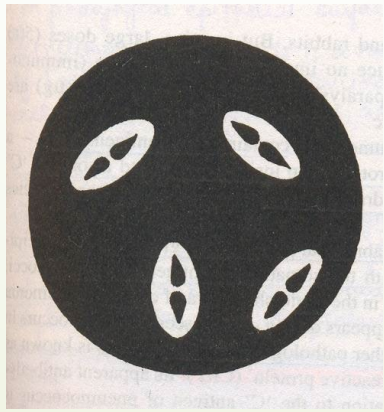


Morfoloji

- Endospor – şekli ve pozisyonu



- Kapsül

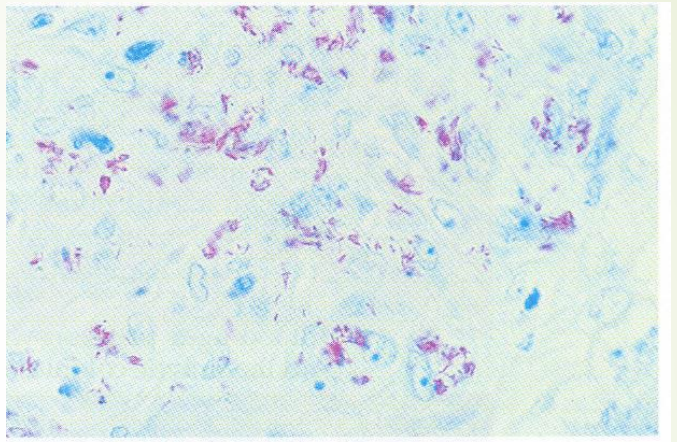


Gram boyama ile Boyanmayan Bakteriler

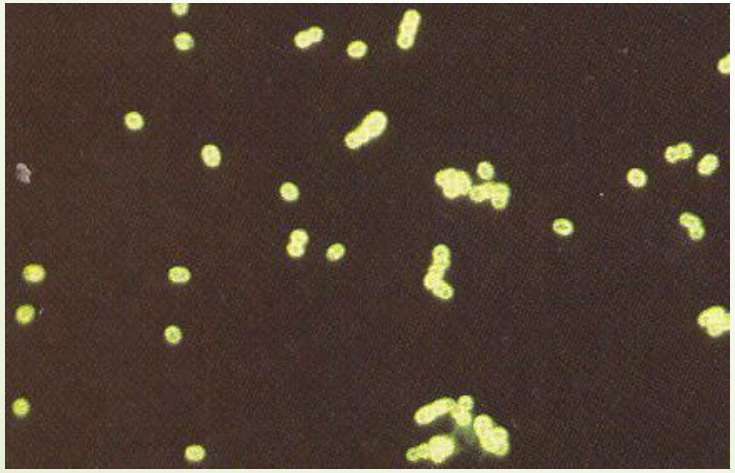
- Konak hücrede yaşayan mikroorganizmalar (örneğin Chlamydia),
- Hücre duvarı olmayanlar (Ureaplasma ve Mycoplasma),
- Aside dirençli bakteriler, mikobakteriler
- Spiroketler

Özel Boyama Yöntemleri

- Ziehl-Neelsen boyama



- Flouresan boyama - Mycobacteria

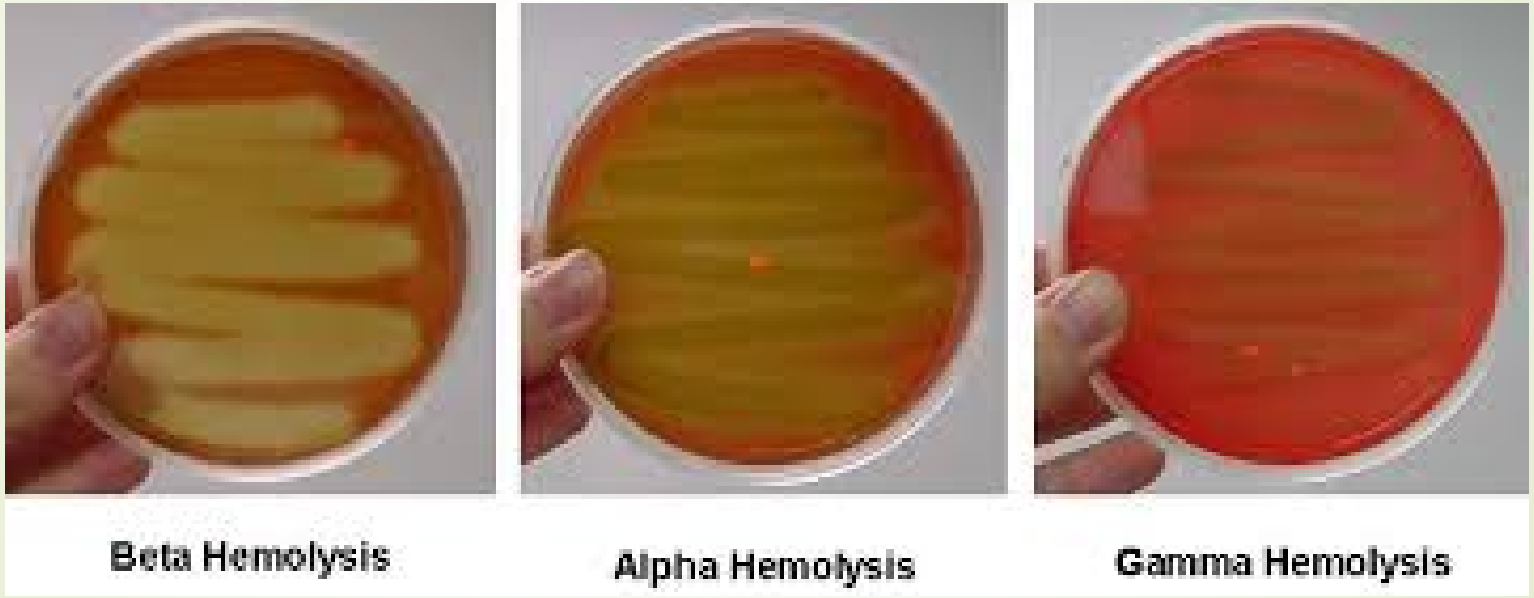


Katı Besiyerinde Üretme

- Koloni morfolojisi

Kültür Özelliklerine Örnek

- Katı Basiyerinde-Kanlı agarda hemoliz tipi



Besiyerlerinin Sınıflandırılması

- Genel Üretim Besiyerleri
  - ✓ Basit (temel) Besiyerleri (Peptonlu su, buyyon, adi agar)
  - ✓ Zengin Besiyerleri (Kanlı agar)

Özel Besiyerleri

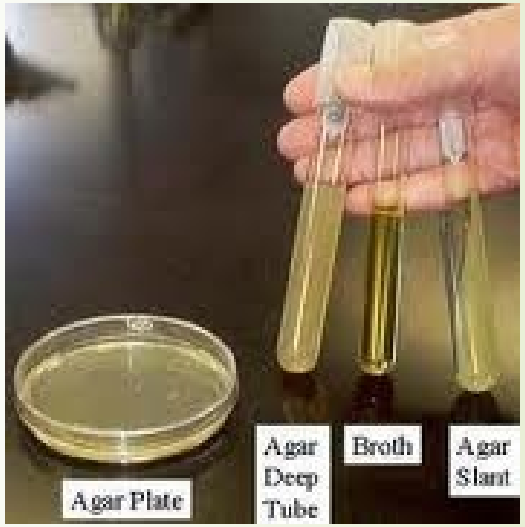
- ✓ Seçici (selektif) Besiyerleri (EMB, MacConkey)
- ✓ Ayırt Edici (farklılaştırıcı) Besiyerleri (EMB, SS vb)
- ✓ Ayıraçlı Besiyerleri (Sitrat, Üre vb)
- ✓ Özgül Besiyerleri (Loewenstein-Jensen)
- ✓ Zenginleştirici besiyerleri (Thioglycollate broth, brain-heart infüzyon broth, tryptic soy broth)

Sıvı ve Katı Besiyerleri

Sıvı besiyeri

Kanlı Agar

scienceprofonline.org



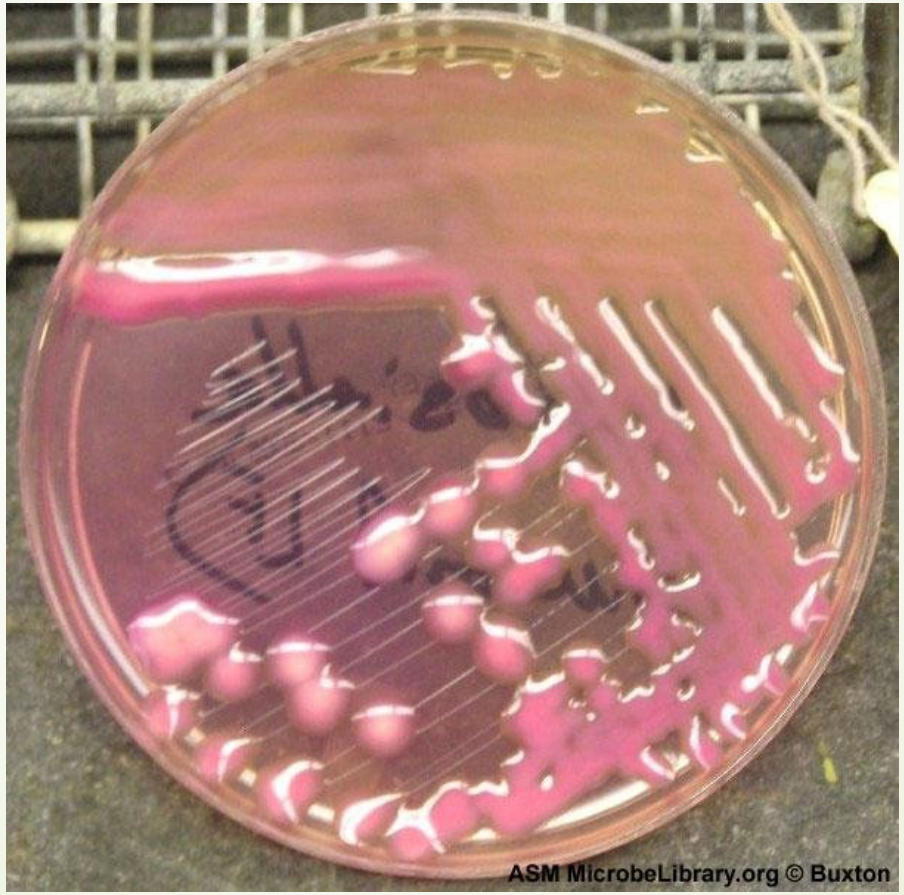
quora.com

S (Smooth) tipli koloniler

textbookofbacteriology.net

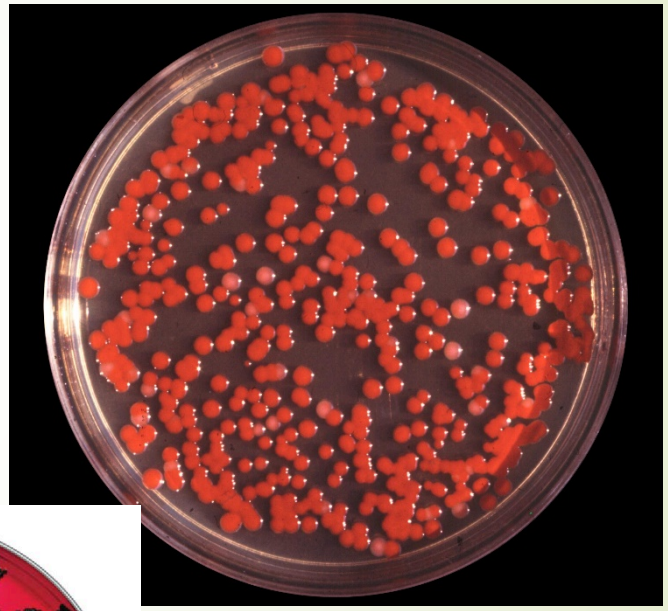
R (Rough) tipli koloniler

M (mukoid) tipli koloniler



Agar'da çeşitli koloniler

archive.bio.ed.ac.uk



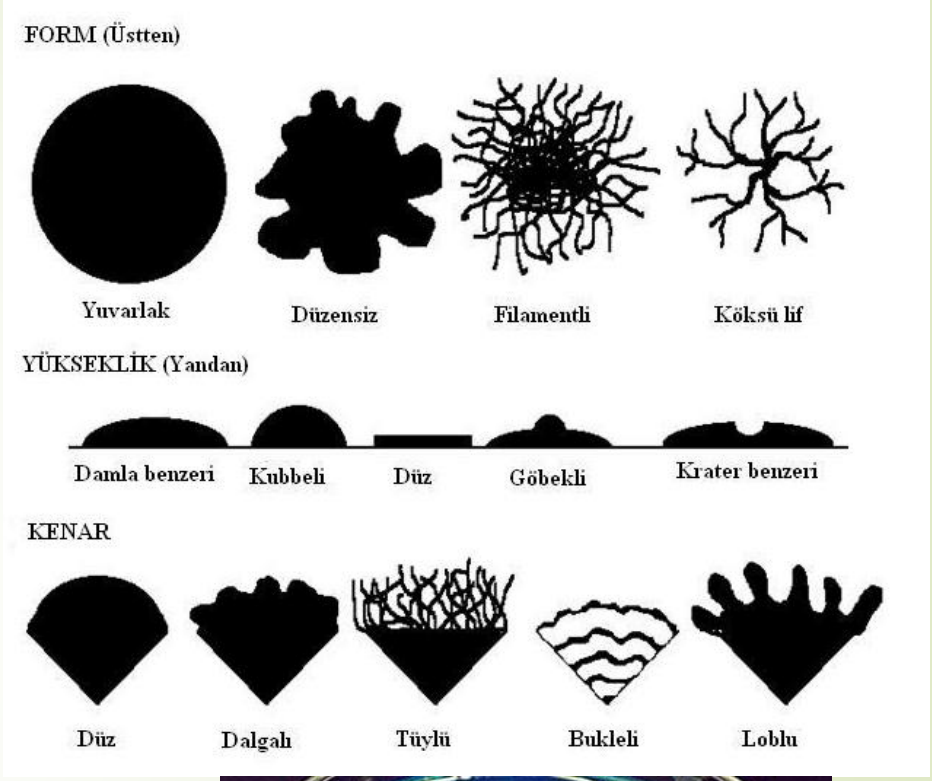
-Koloni şekli ve büyüklüğü:
Yuvarlak,düzensiz, nokta şeklinde (ince)

-Sınırları: Bütün (düzgün), dalgalı, loblu

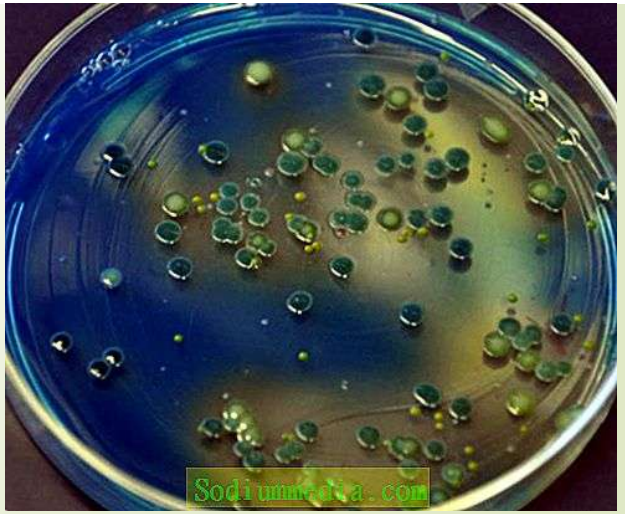
-Yüksekliği: Konveks, düz, kabarık

-Rengi: Renk veya pigment, opak veya saydam, parlak veya mat

-Yapısı: Nemli, mukoid, kuru



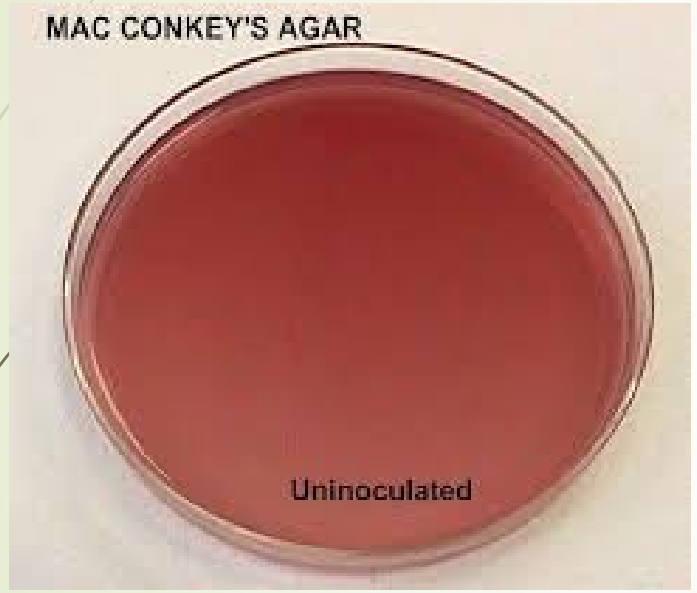
microbeonline.com



✓MacConkey Agar

- MacConkey agar Laktoz şekerini fermente eden Gram negatif bakterilerin ayırımını yapar. İçeriğindeki Safra tuzları, kristal violet boyası Gram pozitif bakterilerin üremesini engeller.
- Laktozu fermente eden mikroorganizmalar pembe renkli koloniye sahiptir.
- *E. coli* Laktoz (+)
- *Salmonella* Laktoz (-)

Mac Conkey Agarda Üreme



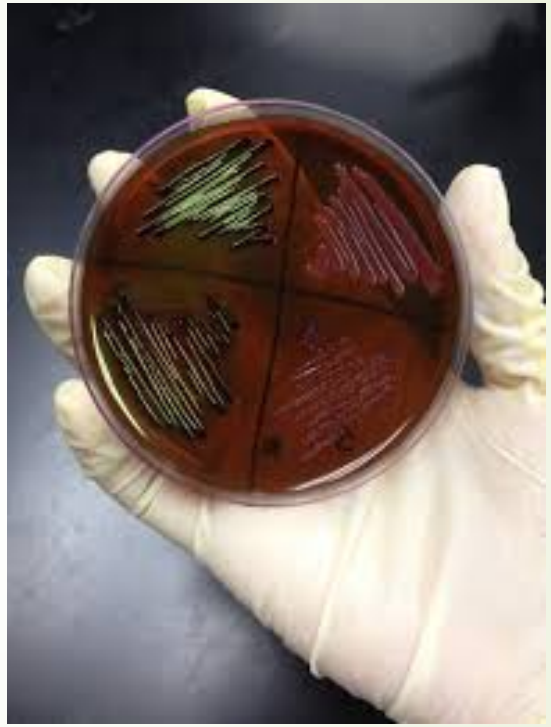
microbiologyinfo.com

✓Eosin Methylene Blue (EMB) Agar

- Laktozu fermente eden Gram negatif bakterilerin ayrımında kullanılır.
- *E. coli* Laktoz (+) metalik röfle renkli koloniler tipiktir.
- *Salmonella* renksiz koloniler üretir.

EMB Agarda Üreme

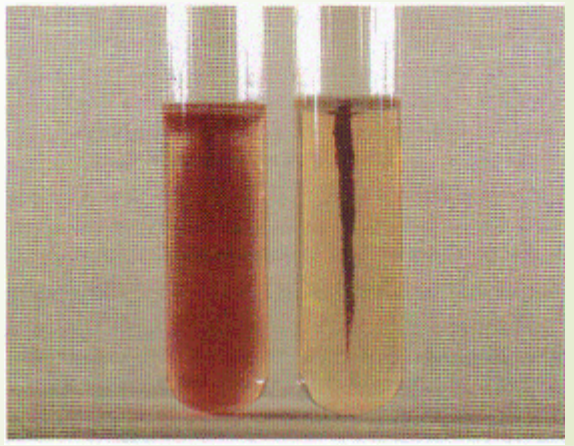
*E. coli”*nin metalik yeşil renkte üremesi



E. coli ve *Salmonella* ayırımı

Hareket muayenesi

- Bakterinin hareketli olup, olmadığını saptamada
- Bu amaçla tüpte **yarı katı** bir besiyerine iğne öze ile dik ekim yapılır. İnkubasyon süresi sonunda bakteri hareketsizse sadece ekim çizgisi boyunca; hareketliyse tüm besiyerinde üreme izlenir.



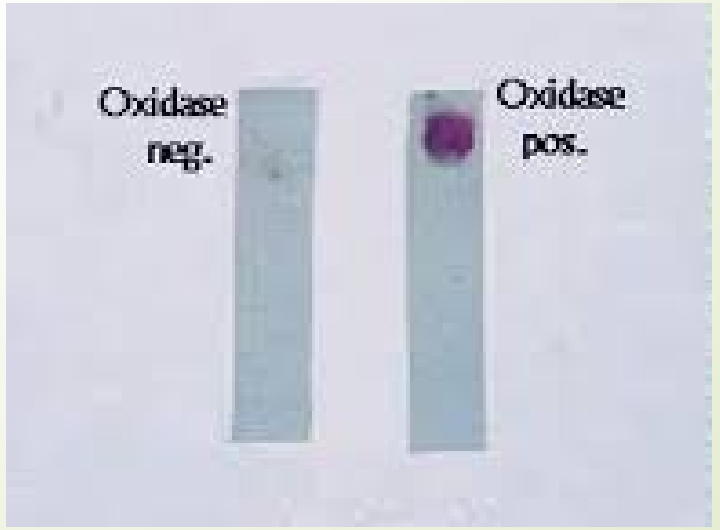
Biyokimyasal Testler

- **Bakteriler biyokimyasal aktivite yönünden farklıdır**.
- Aynı cins içinde bulunan türler veya aynı türün farklı bireyleri arasında ayrılıklar meydana gelebilir. Bu değişmeler fenotipik veya genotipik özellikte olabilir.
- Bazı özellikler, test koşullarında, değişik durumlar gösterebilir.
- **Saf ve taze kültürler**, sabit ve değerli olan (güvenilebilir) **standart sonuçlar verebilir** (tiplendirmede önemli)

Oksidaz Testi

- Bu test, mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ve intrasellüler olan **oksidaz** enziminin (sitokrom C oksidaz) varlığını ortaya koymada kullanılır.

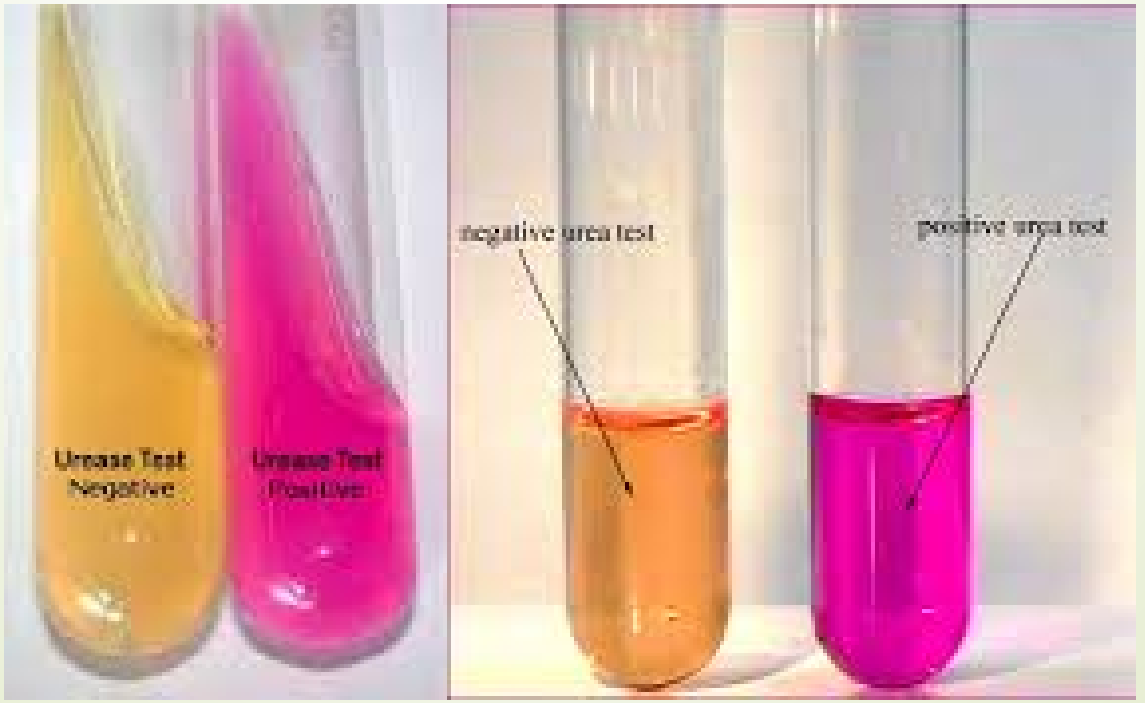
- Oksidaz reaksiyonu, bakterilerde (aerobik olanlarda) sitokrom oksidaz sisteminin bulunduğunu ifade eder.



Üreaz Testi

- Bazı bakteriler Üreaz enzimleri ile üreyi hidrolize ederek, amonyak oluşturma yeteneğine sahiptirler.

- Kültürlerde oluşan amonyak pH'nın yükselmesine neden olur.

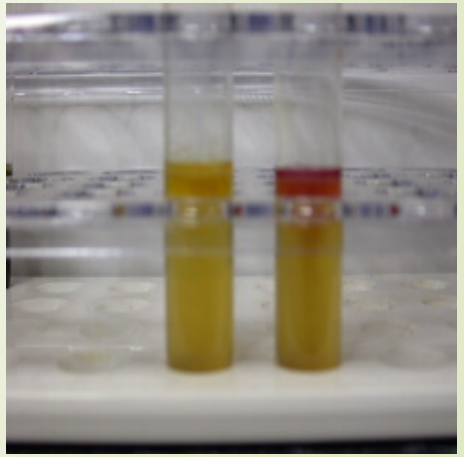


Gram Negatif Bakterilerin Ayrımı

- **IMVIC (indol, metil kırmızısı, Voges Proskauer, sitrat testleri)**
- ***Enterobacteriaceae*** ailesinde yer alan türlerin identifikasyonu için kullanılan birkaç farklı reaksiyondan oluşur.

(IMVIC)-İndol Testi

- Bu test, mikroorganizmaların bir aminoasit olan triptofanı ayrıştırarak indol meydana getirebilme yeteneğini belirlemek için kullanılır.
- Triptofanaz enzimi



(IMVIC-Metil Red,Voges Proskauer)

- Bu test, bazı mikroorganizmaların glukozu fermentasyonu sonucunda oluşan son ürünü saptamak için kullanılır.

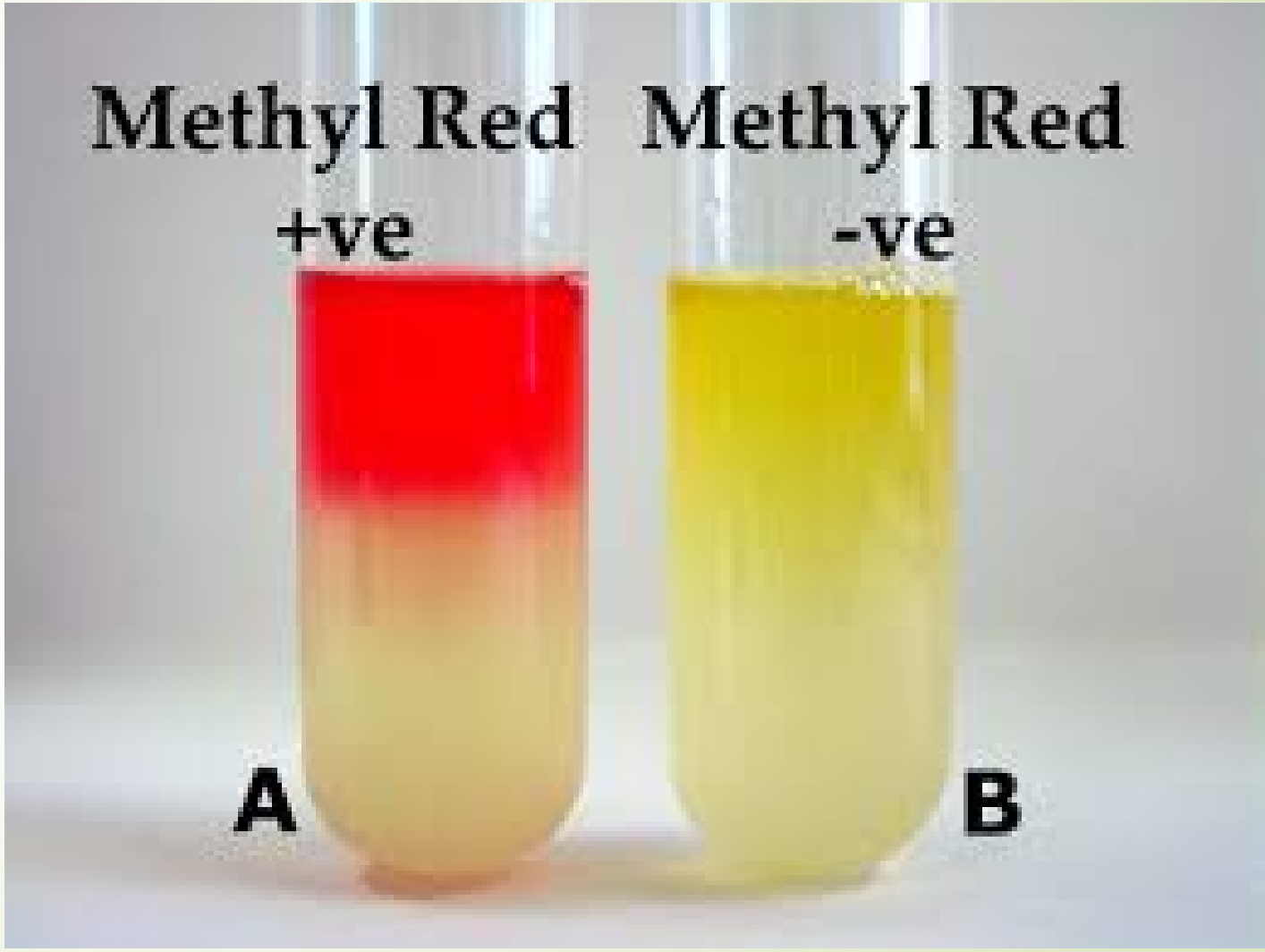
-Bazı mikrorganizmalar glukozu fermente ettiğinde nötral bir ürün olan asetoin (VP) oluşturur

-Bazıları da organik asit oluşturur (MR)

VP

Son ürün

MR



Son ürün organik asitler

(IMVIC)-Sitrat Kullanma Deneyi

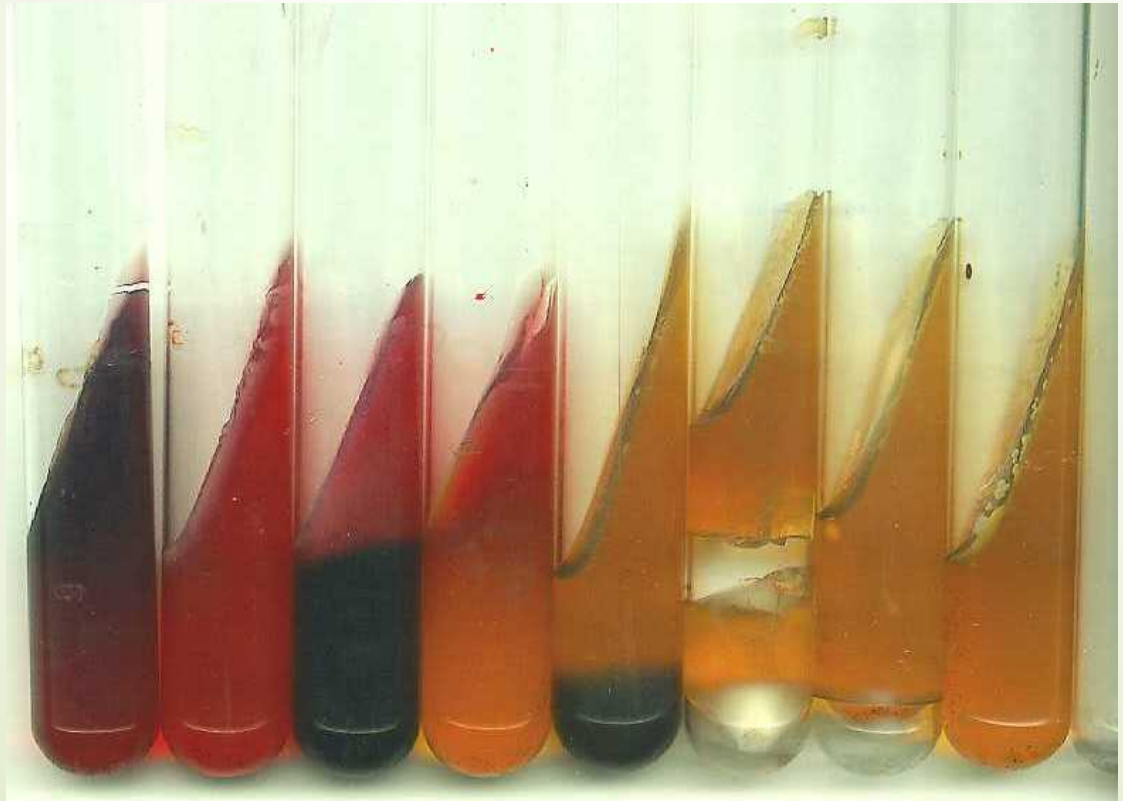
- Bazı bakteriler tek karbon kaynağı olarak sitratları kullanır.
- Sitratlı ortamda mavi renk (Prusya mavisi) oluşumu pozitif reaksiyonu, besiyerinin orijinal rengi olan yeşil rengin değişmemesi ise negatif reaksiyonu gösterir.

Karbonhidrat Fermentasyon Testi

- Bu test, mikroorganizmaların çeşitli spesifik karbonhidratları ayrıştırma yeteneklerini (sakkarolitik aktivite) belirlemek amacı ile yapılmaktadır.
- Bunun sonucunda oluşan ürünler saptanır.

- ✓ **TSI(Triple Sugar Iron) Agar**

- TSI’de üretilen farklı özellikte bakteriler: glukoz, laktoz ve sükroz şekerlerinin fermentasyonu, H2S ve gaz oluşumu belirlenir



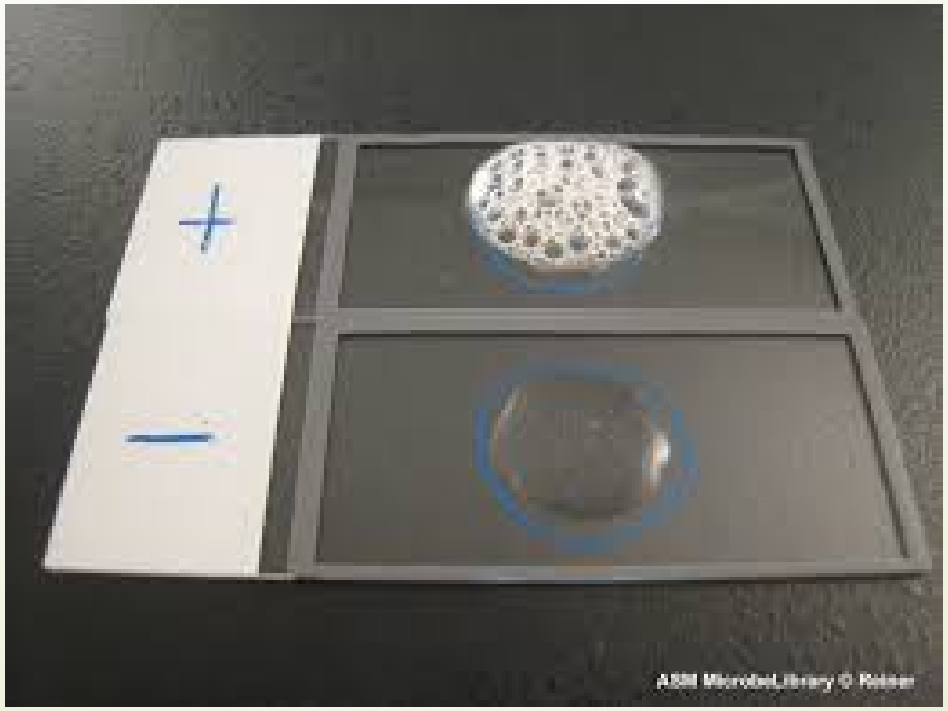
Gram Pozitif Bakterilerin Ayrımında Kullanılan Testler

- Katalaz Testi
- Koagülaz Testi
- Eskülin Ayrışması Testi

✓ Katalaz

Bakterinin hidrojen peroksiti (H2O2) **su ve oksijene** parçalayan katalaz enzimine sahip olup olmadığını saptamak için kullanılır

-Taze hazırlanmış hidrojen peroksid solüsyonları kültür süspansiyonunun üzerine damlatılır



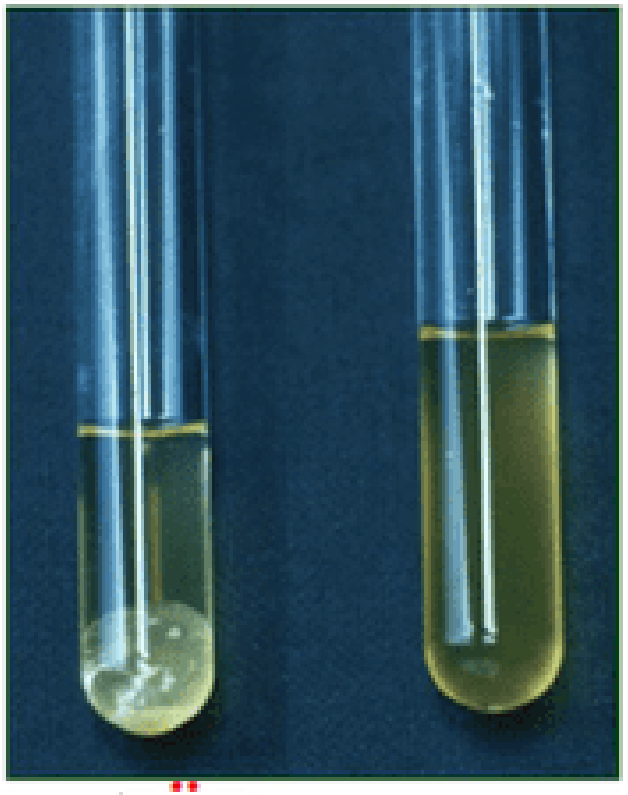
✓ Koagülaz testi

- **Koagülaz**, özellikle **patojen stafilokoklar** tarafından üretilen ve fibrinojeni fibrine dönüştürerek plazmayı pıhtılaştıran enzimdir.
- Koagülaz testi ile **koagülaz enzimi** aranır.

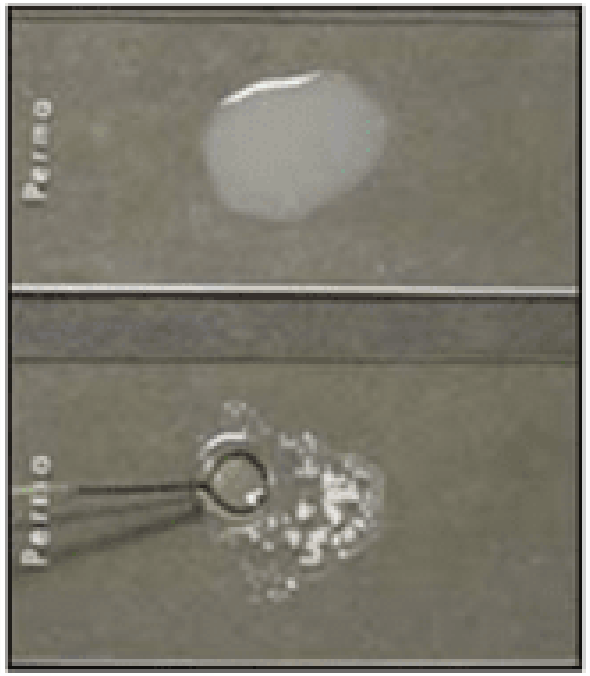
-Testte sulandırılmış plazma kullanılır

- Test, tüp içerisinde veya lam üzerinde yapılabilir.

KOAGÜLAZ TESTİ



TÜP



LAM

Negatif

Pozitif

Eskülin Ayrışması Testi

- Enterekok ve D grubu streptokokların ayırımında, ayrıca anaerob bakterilerin tanımlanmasında kullanılır.
- Bir glikozid olan eskülin, enzimler ile hidrolize edilerek ayrıştırılır.
- Eskülinli buyyon veya agarda uygulanır.

Ticari Mikroorganizma İdentifikasyon testleri

- Bakterilerin enzimatik reaksiyonları sonucunda oluşan ürünlerin verdiği reaksiyonları belirleyerek tanımlama yapan kitlerdir.
- Örneği: API ID 32A, API ID 32C