

VET 301
ÖZEL MİKROBİYOLOJİ I DERSİ
UYGULAMA KİTAPÇIĞI



2021

Uygulamanın adı	Biyogüvenlik uygulamaları, Streptococcus türlerinde gram boyama ve mikroskopik inceleme, mastitisli süt örneği alınması, laboratuara gönderilmesi, laboratuvar teşhis prosedürü, CAMP ve Katalaz testleri
Yapılacağı hafta	1
Uygulamanın temel hedefi	Mastitis vakalarında Streptococcus türlerinin izolasyonu
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Besiyeri, öze, öze ucu, mastitisli süt, lam, serum fizyolojik, mikroskop, bünzen beki, gram boyama seti, mikroskop, hidrojen peroksit, bakteri kültürü, CMT test araçları, dezenfektan, alkol, pamuk.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

Mastitis, evcil çiftlik hayvanlarında meme dokusun yapısının ve fonksiyonunun bozulması sonucu meydana gelen bir hastalıktır. Özellikle süt verimi açısından beslenen sığır, koyun ve keçilerde sıklıkla, atlarda ise daha seyrek görülmekle beraber tedavi edilmeyen durumlarda süt veriminin düşmesi, meme dokusunun körelmesi ve hatta ölümle sonuçlanan ekonomik kayıplar oluşabilmektedir.

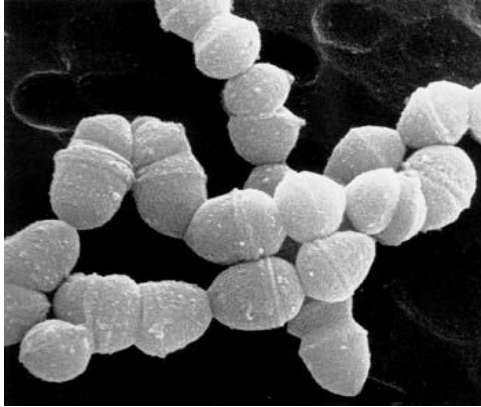
Mastitisler, meme kanalı yolu, meme bezlerinde açılan bir portantre veya metastaz ile mikroorganizmanın girmesinden oluşur. Bu olayı

- 1) mikroorganizmaların dokuya girmesi,
- 2) mikroorganizmanın dokuya yapışması ve
- 3) çoğalarak yayılması olmak üzere genellikle üç safhada meydana gelir.

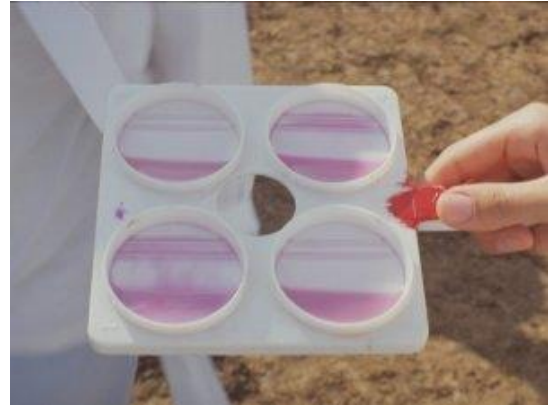
Çevre damarları genişler, bol miktarda lökosit damarlardan sızarak meme dokusuna ve süte karışır. Ayrıca, damarların genişlemesi nedeniyle, kandan süte albümin, sodyum klorür ve sodyum bikarbonat gibi maddelerin geçişi artar ve sütün pH'sı değişir. Laktoz sentezi durur, kazein sentezi azalır; buna bağlı olarak sütün fiziksel ve kimyasal yapısı bozulur. Mastitis teşhisinde kullanılan en pratik test California Mastitis Testi (CMT)'dir. Normal görünümdeki sütleri saha koşullarında kontrol etmek ve subklinik mastitisleri meydana çıkarmak için bu test sıkça kullanılmaktadır. Test sütle lökosit ve epitel hücre sayısının artmasına bağlı olarak DNA ve RNA'ların, *aryl alkyl sulfanat grupları* ile birleşerek presipitasyon oluşturması esasına dayanır. Testin uygulanmasında dört gözlü küçük bir plastik kap kullanılır. CMT kabının her gözüne, hayvanın her memesinden, 2 ml süt konulur: üzerine eşit miktarda CMT ayırıcı ilave edilir. CMT ayırıcı, % 2 *arylalkaline sulphate* + % 0,01 *brom kreosol moru* + 15 cc % 10 NaOH + 1000 ml distile su ter kibindedir. CMT kabı içerisindeki karışım 15 - 20 saniye dairesel hareketler ile karıştırılır, oluşan presipitasyon durumuna göre lökosit sayısı hakkında bilgi edinilir. Ayrıca bulunan *brom kreosol moru* ile de sütün pH'sı hakkında fikir edinilir. Bu testle sağlıklı sütler sarı, mastitisli sütler mor renkte gözüktür.

Streptokoklar, evcil çiftlik hayvanlarından sıklıkla izole edilen bakterilerdir. Doğada yaygın bulunmasından dolayı mastitis vakalarında da primer etiyolojik ajan konumunda bulunmaktadırlar. Özellikle *S. uberis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* suşları sığırlarda meme dokusu hastalıklarında gerek etiyolojik olarak gerekse fırsatçı patojen olarak hastalıklara yol açmaktadırlar.

Streptokokların laboratuvar teşhisinde ise önce mastitisli süt meme başı dezenfekte edildikten sonra enjektöre alınır ve soğuk zincir altında +4 °C'de laboratuvara getirilir. Daha sonra 1 damla süt örneği besiyerine konulur. Öze ucu alevde sterilize edildikten sonra seyreltme metodu ile ekimi yapılır. Besiyeri 37 °C'de 1-2 gece inkubasyona bırakılır. Besiyerinde üreme durumuna bakılır. Üreyen koloni varsa morfolojik olarak incelenir. Toplu iğne başı büyüklüğünde hafif şeffaf koloniler Streptokok identifikasyonuna tabi tutulur. Daha sonra Gram boyama yöntem ile koloniler mikroskopik olarak incelenir. Koloni öze alındıktan sonra. Lam üzerine damlatılmış hidrojen peroksit ile katalaz testine tabi tutulur. Katalaz testinde eğer bakteride hidrojen peroksiti oksijen ve suya ayırtıran enzim bulunmaz ise herhangi bir değişiklik görülmez. Reaksiyonun negatif olması üreyen koloninin Streptokok türü olduğunu göstermektedir. Diğer bir identifikasyon metodu ise CAMP testidir. Lancefield B grubu streptokokların (*Streptococcus agalactiae*) identifikasyonu için CAMP testi kullanılır. B grubu streptokoklar sığır matitlerinin etkenlerinden biridir. CAMP faktörü, B grubu streptokoklar tarafından üretilen difüzibl, ısıya dayanıklı ekstrasellüler bir protein olup *Staphylococcus aureus*'un spesifik bir beta hemolizini ile bir araya gelince agardaki koyun eritrositlerini tam hemolize uğratar. Bu protein, koyun ve sığır eritrositlerini hemoliz için stafilokokların beta toksini ile sinerjistik olarak etki eder. Tavşan, at ve insan eritrositleri üzerine sinerjistik etkisi yoktur. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 beta hemolizin oluşturmaktadır ve CAMP testinde kullanılır. Koyun kanlı agar üzerine düz bir hat boyunca beta toksin üreten *S. aureus* türü ekilir. Bu ekim çizgilerine dik doğrultuda, stafilokok ekim çizgisine dokundurmamaya dikkat ederek, incelencek mikroorganizma 2-3 cm uzunlukta ekim yapılır. Her plağa 4-5 organizma ekilebilir. Plaklar 37°C'de 18-24 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda, streptokok ve stafilokokların üreme yapıları incelenir. Birbirlerine yakın oldukları yerde ok başı şeklinde hemoliz meydana gelirse "CAMP testi pozitif" denir. *S. aureus*'un beta lizini ile *S. agalactiae*'nın ekstrasellüler ürünü birlikte hareket ederek büyük bir beta hemoliz oluşturur.



Streptokokların mikroskopik görünümü



CMT testinin uygulama prosedürü

Uygulamanın adı	Staphylococcus türlerinde gram boyama ve mikroskopik inceleme, mastitisli süt örneği alınması, laboratuara gönderilmesi, laboratuvar teşhis prosedürü, CAMP ve Koagulaz testleri
Yapılacağı hafta	2
Uygulamanın temel hedefi	Mastitis vakalarında Staphylococcus türlerinin izolasyonu
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Besiyeri, öze, öze ucu, mastitisli süt, lam, serum fizyolojik, mikroskop, bünzen beki, gram boyama seti, mikroskop, hidrojen peroksit, bakteri kültürü, CMT test araçları, dezenfektan, alkol, pamuk.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

Mastitis, evcil çiftlik hayvanlarında meme dokusun yapısının ve fonksiyonunun bozulması sonucu meydana gelen bir hastalıktır. Özellikle süt verimi açısından beslenen sığır, koyun ve keçilerde sıklıkla, atlarda ise daha seyrek görülmekle beraber tedavi edilmeyen durumlarda süt veriminin düşmesi, meme dokusunun körelmesi ve hatta ölümle sonuçlanan ekonomik kayıplar oluşabilmektedir.

Mastitisler, meme kanalı yolu, meme bezlerinde açılan bir portantre veya metastaz ile mikroorganizmanın girmesinden oluşur. Bu olayı

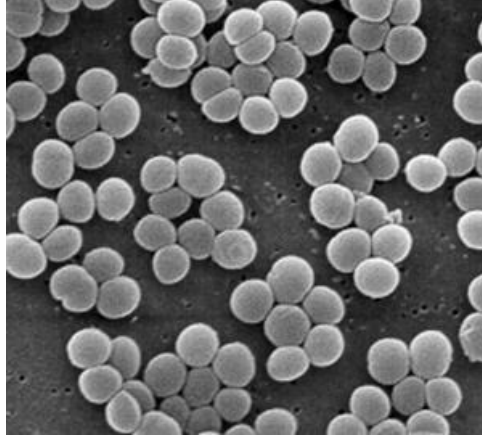
- 1) mikroorganizmaların dokuya girmesi,
- 2) mikroorganizmanın dokuya yapışması ve
- 3) çoğalarak yayılması olmak üzere genellikle üç safhada meydana gelir.

Çevre damarları genişler, bol miktarda lökosit damarlardan sızarak meme dokusuna ve süte karışır. Ayrıca, damarların genişlemesi nedeniyle, kandan süte albümin, sodyum klorür ve sodyum bikarbonat gibi maddelerin geçişi artar ve sütün pH'sı değişir. Laktoz sentezi durur, kazein sentezi azalır; buna bağlı olarak sütün fiziksel ve kimyasal yapısı bozulur. Mastitis teşhisinde kullanılan en pratik test California Mastitis Testi (CMT)'dir. Normal görünümdeki sütleri saha koşullarında kontrol etmek ve subklinik mastitisleri meydana çıkarmak için bu test sıkça kullanılmaktadır. Test sütle lökosit ve epitel hücre sayısının artmasına bağlı olarak DNA ve RNA'ların, *aryl alkyl sulfanat grupları* ile birleşerek presipitasyon oluşturması esasına dayanır. Testin uygulanmasında dört gözlü küçük bir plastik kap kullanılır. CMT kabının her gözüne, hayvanın her memesinden, 2 ml süt konulur: üzerine eşit miktarda CMT ayırıcı ilave edilir. CMT ayırıcı, % 2 *arylalkaline sulphate* + % 0,01 *brom kreosol moru* + 15 cc % 10 NaOH + 1000 ml distile su terkiibindedir. CMT kabı içerisindeki karışım 15 - 20 saniye dairesel hareketler ile karıştırılır, oluşan presipitasyon durumuna göre lökosit sayısı hakkında bilgi edinilir. Ayrıca bulunan *brom kreosol moru* ile de sütün pH'sı hakkında fikir edinilir. Bu testle sağlıklı sütler sarı, mastitisli sütler mor renkte gözüktür.

Stafilokoklar, evcil çiftlik hayvanlarından sıklıkla izole edilen bakterilerdir. Doğada yaygın bulunmasından dolayı mastitis vakalarında da primer etiyolojik ajan konumunda bulunmaktadırlar. Özellikle *S. aureus*, *S. intermedius* ve *Koagulaz Negatif Stafilokoklar* suşları sığırlarda meme dokusu hastalıklarında gerek etiyolojik olarak gerekse fırsatçı patojen

olarak hastalıklara yol açmaktadırlar.

Stafilokların laboratuvar teŖhisinde ise önce mastitisli süt meme baŖı dezenfekte edildikten sonra enjektöre alınır ve soğuk zincir altında +4  C’de laboratuvara getirilir. Daha sonra 1 damla süt rneği besiyerine konulur. ze ucu alevde sterilize edildikten sonra seyreltme metodu ile ekimi yapılır. Besiyeri 37  C’de 1-2 gece inkubasyona bırakılır. Besiyerinde reme durumuna bakılır. Üreyen koloni varsa morfolojik olarak incelenir. 1 mm çapındaki beyaz, krem rengi ve sarı renkli koloniler Stafilokok identifikasyonuna tabi tutulur. Daha sonra Gram boyama yöntem ile koloniler mikroskopik olarak incelenir. Koloni ze alındıktan sonra. Lam zerine damlatılmıŖ hidrojen peroksit ile katalaz testine tabi tutulur. Katalaz testinde eğer bakteride hidrojen peroksiti oksijen ve suya ayrıŖtıran enzim bulunuyor ise gaz ıkıŖı gözlenir. Reaksiyonun pozitif olması üreyen koloninin Stafilokok türü olduğunu göstermektedir. Patojenik Stafilokok ve Koagulaz Negatif Stafilokoktrlerinin ayrımı için koagulaz testi yapılır. Koagulaz testinde ise EDTA’lı tavŖan serumu ile koloni homojenize edilir ve aglutine yapılar görüldüğü zaman reaksiyon pozitif olarak değerlendirilir. Eğer bakteride koagulaz enzimi yoksa herhangi bir deėiŖiklik gözlenmez ve bakteri Koagulaz Negatif olarak değerlendirilir. Diğer bir identifikasyon metodu ise CAMP testidir.



Stafilokokların mikroskopik görünümü

Uygulamanın adı	Corynebacterium türleri ve Rhodococcus equi' nin Gram boyama ile incelenmesi, kolonilerinin incelenmesi, CAMP testi (C. renale, R. equi)
Yapılacağı hafta	3
Uygulamanın temel hedefi	Corynebacterium türleri ve Rhodococcus equi' nin izolasyon ve identifikasyonu
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Besiyeri, öze, öze ucu, lam, serum fizyolojik, mikroskop, bünzen beki, gram boyama seti, mikroskop, hidrojen peroksit, bakteri kültürü, CMT test araçları, dezenfektan, alkol, pamuk.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

Corynebacterium cinsi içinde hayvan ve insanlar için patojenik olan 30'dan fazla tür tanımlanmıştır. Korinebakterilerin çoğu fırsatçı patojendirler.

Korinebakterilerin hücre duvarları meso-diamino-pimelic acid (meso-DAP), arabinogalakattan ve mikolik asitleri içerir. Bu içerikler Mycobacterium ve Nocardia cinslerini de kapsayan "coryneform" bakterilerin tipik özelliğidir. Gram pozitif, hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz ve genç kültürleri fazlaca pleomorfiktir. Boyalı preparatlarda genellikle kümeler ve yan yana gelmiş çeşitli şekiller (X,V,Y,Z) halinde görülürler. Aerobik bir üreme özelliğine sahip olmalarına karşın mikroaerofilik koşullarda gelişebilir ve üreyebilir.

Corynebacterium türleri bir hayvan patojenleridir ve çoğu tür mukoz membranlarda kommensaldir. Derideki portantrelerin mikroplu eksudatlarla ya da bunlarla bulaşık su toprak, altlık gibi maddelerle teması sonucu bulaşır. C. renale infeksiyonları için soğuk hava, kesif yemle besleme ve yüksek verim predispoze edici faktörlerdir. Bulaşma kirli ve kontamine kataterlerin kullanılması, kontamine fırçalarla vulvaların yıkanması, infekte boğalarla çiftleşme gibi nedenlerle olur.

C. renale grubundaki bakteriler sığırlarda sistit ve pyelonefrite neden olan üriner sistem patojenleridir. Üreaz üretilir ve üreyi hidrolize ederler. Üre yıkılımına bağlı olarak amonyak üretimi enflamatuvar olayı, idrarda yüksek alkaliniteyi (pH 9.0) antibakteriyel savunma mekanizmasının baskılanmasını başlatır. C. renale grubu üyeleri ürogenital mukozaya yapışmayı sağlayan fimbriyalara sahiptir. Ürotheliuma pilus aracılığı ile tutunma ve üre hidrolizi patogenezi için önemli noktalar olarak kabul edilir. Oluşan patolojik değişiklikleri nötrofilik infiltrasyon ve endotelial hasar karakterize eder. Lezyonlar apselerdir.

Laboratuvara apse içeriği, akciğer, lenf yumruları, uterus, burundan alınan svablar, diğer organlardan alınan parçalar, atılan yavru veya organ parçaları, eklem sıvısı, süt, sperma gibi maddeler gönderilir. Marazi maddelerden hazırlanan preparatlar Gram boyama tekniğine göre boyanır. Gram pozitif pleomorfik mikroorganizmaların görülmesi korinebakterilerden şüphe ettirir. Ancak boyama ile teşhis konması mümkün değildir.

Marazi maddelerden zenginleştirilmiş kanlı agara ve serumlu agara ekimler yapılır. 37 oC de 1-2 gün inkubasyona bırakılır. Bu süre sonunda 0.5-1 mm çapında küçük, S tipli koloniler ürer. Bunlar streptokok kolonilerine benzerler. Korinebakteriler serum içeren buyyonlarda,

tüpün dip kısmında granüler tarzda bir üreme gösterir ve buyyonun üst kısmı berrak kalır.

R. equi etkenleri Gram pozitif, koktan çomağa kadar değişen şekillerde, $1 \times 5 \mu m$ boyutlarında görülen aerobik mikroorganizmalardır. Nutrient agar gibi zenginleştirilmemiş besi yerlerinin çoğunda, aerobik olarak, geniş bir ısı aralığında ($10^{\circ}C$ 'den başlayan) ürer ve yaklaşık 48 saat içerisinde karakteristik mukoid, somon rengi koloniler oluştururlar. Koloniler büyüktür (3-5 mm). Hemoliz oluşturmazlar. Kapsül formasyonu ve pigment üretimi özellikleri vardır. Organizma hareketsiz, katalaz, üreaz ve nitrat pozitif, oksidaz negatif ve zayıf olarak aside dirençlidir.

R. equi toprak kaynaklıdır ve sıklıkla gübrede bulunur. Atların bulunduğu çevrenin bir parçasıdır. Problemlili çiftliklerde ve tayların üretim bölgelerinde en fazla bulunur. *R. equi* hem toprağa, hem de hayvanların barsaklarına yerleşir. Gübrede ve barınakların altlıklarında uzun süre canlı kalır. Etken bulaşık toprak, gübre, infeyöz sekresyonlar veya dışkıda bulunur. Enfeksiyon direkt temas, inhalasyon, sindirim, umbilikal veya mukoz membran aracılığıyla konkonjenital olarak alınır. Yaz aylarında en fazla görülür. Bu, duyarlı taylara ve solunum sistemi savunma mekanizmalarına ilave zorluklar yaratan sıcak ve tozun yoğunluğuna bağlanmaktadır.

Korinebakterilerin teşhisinde laboratuvar muayene örnekleri için trakeal aspiratlar ve lezyonlardan alınan irinler kullanılır. Apse materyalinde Gram pozitif, genellikle kokoid, çomak şeklinde organizmalar görülür. Şüpheli materyal inokule edilen kanlı agar ve MacConkey agar besi yerleri aerobik olarak, 24-48 saat süreyle $37^{\circ}C$ 'de inkube edilir. İzolatlar için identifikasyon kriterleri; kanlı agardaki 3-5 mm çapında, düzgün, nonhemolitik, somon rengi ve mukoid koloniler, MacConkey agarda üremenin olmaması, CAMP testinin pozitif olması (*R. equi* kaynaklı hemolizinler, *C. pseudotuberculosis*'in fosfolipaz D'sinin veya *S. aureus*'un hemolizininin hemolizini güçlendirir), oksidasyon fermentasyon ve şeker fermentasyon testlerinde reaksiyon vermemesi, ticari kitler kullanılarak elde edilen biyokimyasal profildir

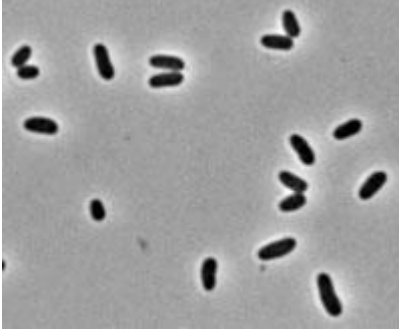
PATOJEN	KONAKÇI	HASTALIK	BULUNDUĞU YERLER
<i>C. bovis</i>	Sığır	Subklinik mastitis	Meme ucu
<i>C. kutscheri</i>	Laboratuvar rodentleri	Süperfişyal apseler, karaciğer, akciğer ve lenf nodüllerinde kazeoprulent	Mukoz membranlar, çevre

odaklar

C. pseudotuberculosis

Nitrati indirgemeyen biyotip	Koyun, keçi	Kazeöz lenfadenit	Deri, Mukoz membranlar, çevre
Nitrati indirgeyen biyotip	At, sığır	Ülseratif lenfadenit, apseler	Çevre
<i>C. renale</i> grubu			
<i>C. renale</i> (tip 1)	Sığır	Sistit, pyelonefrit	Ürogenital kanal
	Koyun, keçi	Ülseratif balonopostitis	Prepusyum
<i>C. pilosum</i> (tip 2)	Sığır	Sistit, pyelonefrit	Sığır Ürogenital kanal
<i>C. cystitidis</i> (tip 3)	Sığır	Sistit, pyelonefrit	Sığır Ürogenital kanal
<i>C. ulcerans</i>	Sığır	Mastitis	İnsan faringeal mukoza

Korinebakterilerin yaptığı hastalıklar



Korinebakterilerin mikroskopik görünümü



R. equi mikroskopik görünümü

Uygulamanın adı	Actinomycet, Nocardia ve Dermatophilosis laboratuvar tanısı
Yapılacağı hafta	4
Uygulamanın temel hedefi	Actinomycet, Nocardia ve Dermatophilosis identifikasyonu
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Besiyeri, öze, öze ucu, lam, serum fizyolojik, mikroskop, bünzen beki, gram boyama seti, mikroskop, , bakteri kültürü, dezenfektan, alkol, pamuk.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

Bu cinslerdeki türler Gram pozitif, sporsuz, hareketsiz ve üremeleri için zenginleştirilmiş besi yerine gereksinim gösteren bakterilerdir. Anaerobik veya fakültatif anaerobiktirler. Morfolojik olarak heterojendirler. Modifiye Ziehl-Nelsen (M ZN) negatiftir. Mukoz membranlara kolonize olurlar. *Arcanobacterium pyogenes* son yıllarda 2 isim değişikliğine uğramıştır. Daha önce *Actinomyces pyogenes* olarak isimlendirilirken, bundan önce de *Corynebacterium pyogenes* denilmekteydi. *Actinobaculum suis* de daha önce *Actinomyces suis* olarak bilinmekteydi. Bu iki tür organizma da korineform morfolojiye sahipken *Actinomyces* türleri genellikle uzun ve filamentözdür. Kısa, V, Y ve T koniğürasyonları da vardır. Veteriner hekimlikte öneme sahip türler, *Arcanobacterium pyogenes*, *Actinobaculum suis*, *Actinomyces bovis*, *Actinomyces viscosus* ve *Actinomyces hordeovulneris*'tir.

Koloni morfolojisi türler arasında değişkenlik gösterir; *Arcanobacterium pyogenes* 24 saatlik aero inkubasyondan sonra karakteristik belirsiz hemoliz oluşturur. 48 saat sonra pinopoint (iğne ucu şeklinde) β hemolitik koloniler görülür. *Actinomyces bovis* ve *A. hordeovulneris* kolonileri tipik olarak agara yapışır ve genellikle non-hemolitiklerdir. *Actinomyces viscosus* biri büyük ve düzgün, diğeri küçük ve kaba olmak üzere 2 tür koloni oluşturur. Büyük koloni V, Y, T hücre konfigürasyonlarından oluşur ve daha küçük koloniler kısa branşlı filamentlerden oluşur. *Actinobaculum suis* 3 mm çapında ortası parlak ve yüksek, kenarları mat olan koloniler oluşturur. Koyun kanı katılmış kanlı agarda tam sınırlanmamış hemoliz görülür.

Aktinomikotik infeksiyonların çoğu endojendir. İnfeksiyon kommensal bir suşun kendi konakçasındaki duyarlı bir dokuya ulaşması ile şekillenir. İnfeksiyonlar üst sindirim sisteminin mukoz membranlarındaki yaralarda başlar. Isırma (dişleme) diğer bir bulaşma yoludur, Bursaların veya vücut kaviterlerinin infeksiyonu hematogen yolla veya perforasyonlar (sindirim sistemi, vücut duvarı) sonucu olabilir, Aktinomikozis ev dışında yaşayan köpeklerde, yarı kıraç bölgelerdeki otlarla ilgili şekillenebilir.

Klinik görünüm, etkilenen hayvanlar, lezyonların tipi ve yerleşimi olaya katılan bakteri türlerini düşündürebilir. *A. bovis* infeksiyonlarında, ilerlemiş vakalarda klinik belirtiler sıklıkla ayırt edicidir. Klinik hasarın derecesinin saptanmasında radyografi kullanılabilir. Çene kemiklerinde şişkinlikle sonuçlanan durumlardan ve kafanın yumuşak dokularının infeksiyonu aktinobasillozisten ayırt edilmelidir.

Laboratuvar işlemleri için uygun örnekler eksudatlar, aspiratlar ve doku örnekleridir.

Granüller içeren, açılmamış lezyon veya dokulardan alınan örnekler tercih edilir. Şüpheli eksudatlar birkaç mm çapında sarımsı partiküller (sülfür granülleri) açısından nuayene edilir. Granüller tuzlu suda (saline) yıkanır ve bir damla tuzlu su içerisinde lam üzerine yerleştirilir. Yavaşça bir lamel üzerine bastırılır ve ışık altında preparat incelenir. Ezilmiş granüller Gram boyama metodu ile boyanır. Gram pozitif, pleomorfik, aside dirençli olmayan branşlı filamentler bu etkenleri akla getirir.

Hayvanlardan elde edilen suşların, çoğu anaerobik inkubasyon gerektirmez, fakat artmış CO₂'den yarar sağlarlar. Örnekler kanlı agar ve MacConkey agarlara inokule edilir ve 5 gün süreyle 37 °C'de inkube edilir. *A. bovis* kanlı garda, beyin kalp infüzyon agarda ve thioglycolate buyyonda iyi ürer. %5-10 CO₂ içeren atmosfer tercih edilir. *A. pyogenes* dışındaki türlerin identifikasyonu güçtür. İdentifikasyonda koloni karakterleri, boyalı preparatlardaki morfoloji, kanlı agarda hemolizin varlığı veya yokluğu, MacConkey agarda üremenin olmayışı, Sabouraud dextrose agarda (SDA'da) subkültür edildiğinde üremenin varlığı veya yokluğu, Loeffler's serum besi yerine üreme (*A. pyogenes*), üreaz üretimi (*A. suis*), hücre duvarı analizi ve diğer biyokimyasal testler önem taşır.

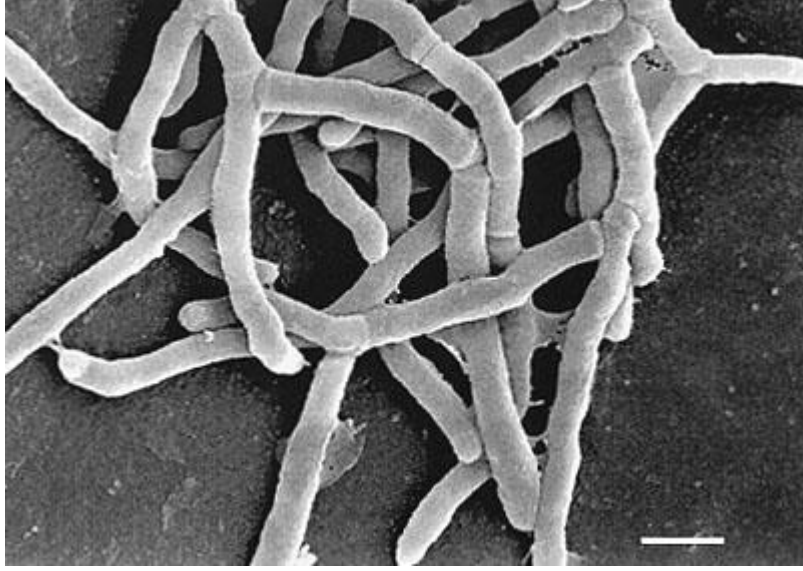
Nocardia türleri hareketsiz, sporsuz, aerobik, genellikle branşlı ve aerial hifa oluşturan Gram pozitif çomaklar şeklinde saprofitik actinomycetlerdir. Gramla boyanmış *Nocardia spp.* *Actinomyces spp.* 'den ayırt edilemeyebilir. Nokardialar kokobasiller (dinlenme fazı) ve aktif şekilde üreyen filamentöz şekiller arasında değişiklik gösterir. İnfekte dokuların eksudatlarından yapılan preparatlarda çomak ve kokları içeren uzun, silindirik branşlı filamentler şeklinde görünürler. Kültüre edildiklerinde bu organizmalar spor oluşturabilen aerial filamentler halindedir.

Laboratuvar muayenesi için uygun örnekler eksudatlar, aspiratlar, süt, granülomlardan alınan doku ve histopatoloji için fikze edilmiş dokudur. İrin ve eksudatlardan hazırlanan preparatlar Gram ve MZN yöntemleri boyanmalıdır. Gramla boyanmış yaymalar çomaklı veya çomaksız olarak Gram pozitif branşlı filamentler görülür. *N. asteroides* MZN negatif olan *Actinomyces* türlerinin aksine MZN pozitifdir. Patojenik nokardialar genellikle asi dirençlidir, ancak bazı suşlar dirençli değildir. Doku örneklerinden yapılan histopatolojik muayene nokardial filament kümelerini ortaya koyabilir.

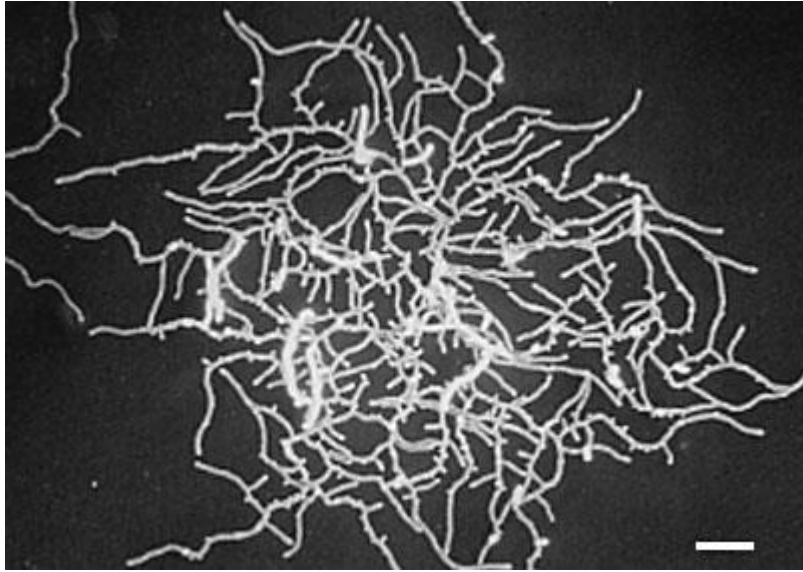
Kültür: Organizma kanlı agarda veya charcoal-yeast extract gibi besi yerlerinde kültüre edilebilir. Petriler 10 gün 37°C'de aerobik olarak inkube edilir. Kanlı agardaki koloniler genellikle günlük bir inkübasyondan sonra görünür hale gelir. Bunlar beyaz, pudramsı ve agara sıkı şekilde yapışıktır. Kolonilerin hemolitik özelliği değişkendir ve kokusuzdur. SDA'daki subkültürde 5 günlük inkübasyondan sonra kuru, buruşuk portakal rengi koloniler oluşur. Kolonilerden, yapılan preparatlarda Gram boyamada çomak kokların baskın olduğu bazı filamentöz şekiller görülür. Nokardialar nitratı indirger ve katalaz pozitifdir. *N. asteroides* laboratuvar ortamını kontamine edebilen *Streptomyces* türlerin ayırt edilmelidir. *Streptomyces* türlerini *N. asteroides* 'ten ayıran özellikler güçlü topraksı koku, MZN negatif filamentler ve SDA'daki tozlu beyaz görünümdeki kolonilerdir. Katalaz testleri pozitifdir.

Dermatophilus congolensis Gram pozitif bir bakteri olup, 0,5-1,5 µm çapındaki branşlı filamentleri uzunlamasına ve çaprazlamasına bölünürler. Bölünmeden sonra 8 adet kokoid veya kübik şekilli hücreler (hareketli sporlar) meydana gelir. Teşhiste "HAALSTRA" metodu kullanılmaktadır. Bu metoda göre Bu metoda göre; Dermatitisi bölgeden ayrılan kabuk, küçük parçalara ayrıldıktan sonra içerisinde 1 ml. steril distile su bulunan tüplere koyulur. Tüpler 3-4 saat süre ile oda ısısında bekletilir. Oda ısısında bekletilen tüpler ağızları açık bir şekilde % 5-10 CO₂ içeren bir jar içerisine konulup ve 37 °C'de 15 dk. inkubasyona bırakılır. İnkube edilmiş tüplerin üst sıvılarından Kanlı Agarlara (1000 IU/ ml Polymixin B ilaveli) ekimleri yapılır. Ekim yapılan petriler mikroaerofilik ortamda 37°C'de 48 saat inkube edilir. Ayrıca inkube edilmiş tüplerin üst sıvılarından mikolojik izolasyon amacıyla Sabouraud Dextrose Agarlara ekimleri yapılır ve oda ısısında bir hafta inkubasyona bırakılır.

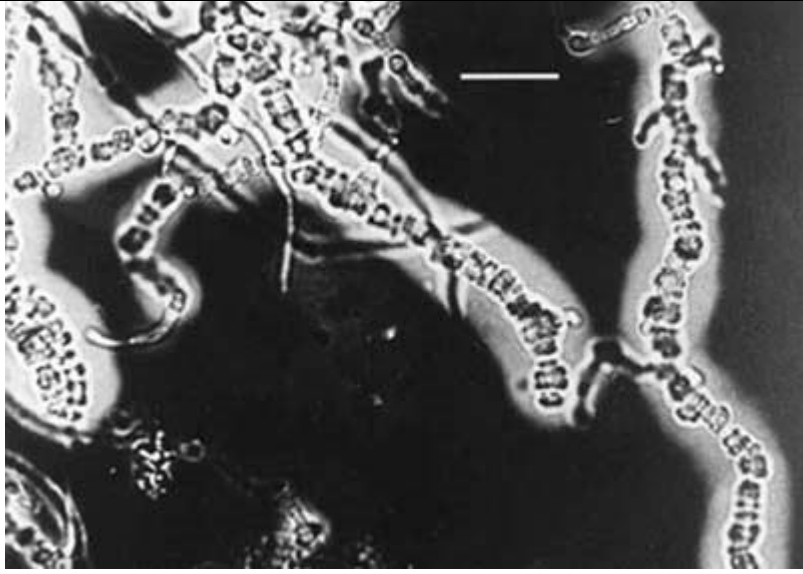
İnkubasyon sonrası yapılan muayenelerde herhangi bir üreme olmadığı saptanır. Kanlı Agar petrilerinin 37°C’de 48 saatlik inkubasyonlarından sonra görülen β hemolitik gri-beyaz renkli rough koloniler Gram boyama metodu ile boyanır. Gram boyama metodu ile boyanmış preparatlar mikroskop altında incelenerek branşlı filamentler içerisindeki Gram pozitif koklar görülür.



Actinomyces türlerinin mikroskopik görünümü



Nocardia asteroides mikroskopik görünümü



Dermatophilus congolensis mikroskopik görünümü

Uygulamanın adı	Listeria türlerinin Gram boyama ile incelenmesi
Yapılacağı hafta	5
Uygulamanın temel hedefi	Listeria türlerinin identifikasyonu
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Besiyeri, öze, öze ucu, lam, serum fizyolojik, mikroskop, bünzen beki, gram boyama seti, mikroskop, bakteri kültürü, dezenfektan, alkol, pamuk.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ
Listerialar doğada (toprak, sular, lağım suları, atık sular, gübrelerde), gıdalarda (yemler, otlar, silajlar, sebzeler, bitkiler, et, süt ve bunların mamullerinde, vs.) sağlam insan ve hayvanların atık yavrularında, vajinal akıntılarında, fõtal membranlarda, süt, idrar, gaitalarında ve diğerkontamine materyallerde fazlaca bulunurlar. <i>L. monocytogenes</i> zoonotik özelliğesahip bir bakteridir. Listerialar Gram pozitif, hareketli, sporsuz, kapsülsüz, küçük, düz veya hafif bükülmüş çomakçık veya kokoid tarzında mikroorganizmalardır. Kùltürlerde tek tek, çift, V, Y şeklinde veya kısa zincirler halinde görùlürler. Genç kùltürlerde çomak şekilli mikroorganizmaların yanısıra, korinebakterilere çok benzeyen kokoid formlara da sıkça rastlanır. Kanlı agarda <i>L. monocytogenes</i> suşları dar bir beta-hemoliz alanı meydana getirirler. Serumlu glukozlu veya kanlı glukozlu tryptose agar gibi katı besi yerlerinde 24-48 saat içinde 0.5-1.0 mm çapında parlak, şeffaf, yuvarlak, S-tipli koloniler meydana getirir. Eski kùltürlerde ise R-formu koloniler oluşturur. Hastalıkta kendiliğinden iyileşmelerin çok nadir olması ve infeksiyonun insanlara da bulaşması nedeniyle, teşhis ve erken sağaltım önemlidir. A) Klinik teşhis: İnfeksiyon klinik olarak aşağıda belirtilen hastalıklarla karışabilir: Enterotoksemi Beyin apseleri Brusellozis Vibriozis Ketozis Bradzot Louping ill Zehirlenme Akut gastroenteritis Kuduz Viral ensefalitis Coenurus cerebralis infeksiyonu gibi B) Otopsi bulguları: Patognomik değildir. Laboratuvara serum, ölen hayvanların karaciğerk, dalak, pons, medulla oblongata ve spinal kordun anteriör kısmı, aborte olmuş fetus, fõtal membranlar ve uterus akıntıları gönderilir. Marazi maddelerden hazırlanan preparatlar Gram yöntemi ile boyanır ve preparatta Gram pozitif küçük çomakçık veya kokoid formlu mikroorganizmalar görùlmeye çalışılır. Ancak, materyaller genelde kontamine oldukları için bakteriyoskopide etkeni tanımlamak olanaksızdır. Kùltür a) Katı besiyeri: Kanlı agar, serumlu glukozlu triptoz agar veya kanlı glukozlu triptoz agar. Laboratuvara gönderilen marazi maddelerden ayrı ayrı buyyon içinde homojen bir süspansiyon (1/10) yapılır. Bu süspansiyonlardan özel besi yerlerine ekimler yapıldıktan sonra süspansiyonlar buzdolabı sıcaklığında (+4 °C) tutulurlar (soğuk zenginleştirme). Üreme oluncaya kadar bu süspansiyonlardan her gün ekimler yapılarak 37 °C' de 3-4 gün inkübasyona bırakılır. b) Koloni morfolojisi: Listerialar katı besiyerlerinde 0.5-1.0 mm çapında parlak, şeffaf,

yuvarlak, S-tipli ve dar hemolitik koloniler meydana getirir.

c) Spesifik besi yeri: % 0.05 Potasyum tellüritli veya %3.75 Kalium rhodanitli serumlu tryptose agar, tioglikolatlı veya beyinli besi yeri, % 0.2 glukoz + % 0.2 talyum asetat + 40 mg/ml nalidiksik asit + 1/5000 furasin içeren serumlu triptoz agar.

d) Buyyon kültürü: Sıvı besi yerlerine karaciğer ekstraktı, serum, kan ve az miktarda glukoz katılması üreme üzerinde olumlu etkide bulunur. *Listeria* 'lar buyyonda homojen bir bulanıklık oluştururlar.

Hayvan deneyi

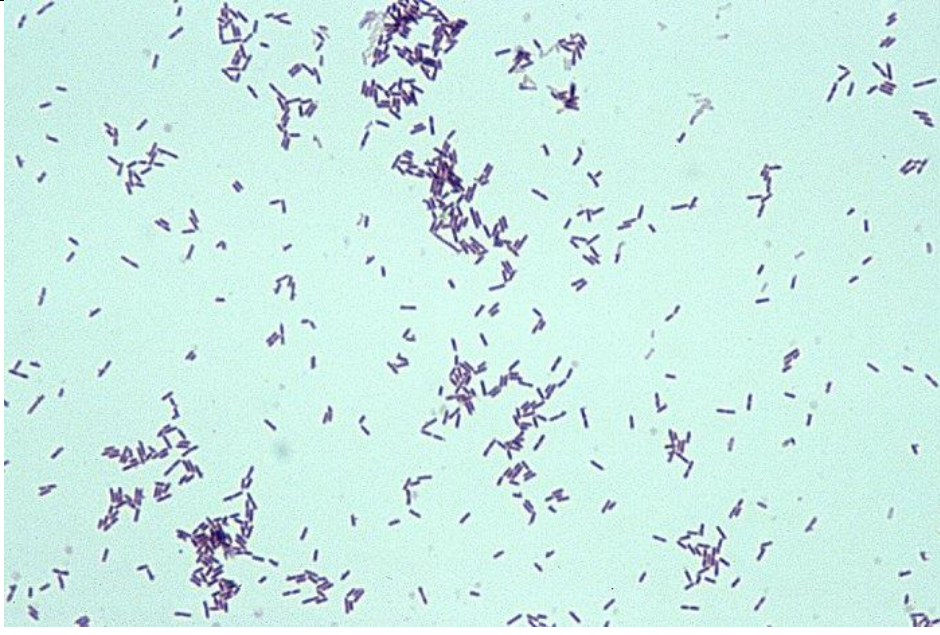
Farelerde (subkutan ve intraperitoneal) ve tavşanlarda (intravenöz) deneysel Listeriosis oluşturulabilir.

Serolojik Testler

İnfekte hayvanlardan alınan kanla yapılan serolojik testlere fazla güvenilmez. Çünkü, *L. monocytogenes*, Stafilokok, Enterokok, *E. coli* ve Korinebakteri gibi bazı mikroorganizmalarla kros-reaksiyonlar verir. Hasta ve portör hayvanları ortaya koymada komplement fikzasyon, indirekt hemaglutinasyon ve agar jel difüzyon testlerinden yararlanılabilir. Aglutinasyon testinde de, ancak monospesifik ve absorbe serumlar kullanılmalıdır.

	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. murrayi</i>
β hemoliz	+	+	+	-	-	-
Hareket	+	+	+	+	+	+
CAMP (S. aureus)	+	+	+	-	-	-
CAMP (R. equi)	-	-	+	-	-	-
Gram Boyama	+	+	+	+	+	+
Katalaz	+	+	+	+	+	+
Oksidaz	-	-	-	-	-	-
Üre	-	-	-	-	-	-
TSI	a/a	a/a	a/a	a/a	a/a	a/a
Glukoz O/F	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
MR-VP	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
NO₃	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	+	+
Ksiloz	-	+	+	-	-	-
Ramnoz	+	-	-	+/-	-	+/-

Listeria türlerinde identifikasyon şeması



Listeria türlerinin mikroskopik görünümü

Uygulamanın adı	Bacillus anthracis türlerinin preparatlarının incelenmesi, spor yapılarının görülmesi ve laboratuvar teşhis prosedürü
Yapılacağı hafta	6
Uygulamanın temel hedefi	Bacillus anthracis türlerinin identifikasyonu
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Besiyeri, öze, öze ucu, lam, serum fizyolojik, mikroskop, bünzen beki, gram boyama seti, mikroskop, bakteri kültürü, dezenfektan, alkol, pamuk.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

Endospor oluşturan Gram pozitif çomaklar ve koklar grubu içindedirler. Bu gruptaki etkenlerden *B. anthracis* dışındakilere Antraks benzeri ve anthracoid ismi verilmektedir. Gram pozitif çomak biçimli, sporlu, peritrik flagellaları ile hareketli (*B. anthracis* hariç) aerobik veya fakültatif anaerobiktirler. Katalaz pozitif, oksidaz değişkendir. Sporlar oval veya yuvarlak olabilir. Sporlar sentral, subterminal veya terminal lokalizasyon gösterir. Bazı *Bacillus* türleri karbonhidrat karakterinde kapsül meydana getirirler.

Hastalık perakut ve akut seyreden birçok hastalıkla karışabilir. Klinik belirtiler tanı için yetersizdir. Sığırlarda Yanıkara, Piroplasmosis, Leptospirozis, Pastörellozis, Basiller hemoglobini, koyunlarda Bradzot, Leptospirozis, atlarda sancı ile seyreden mide-barsak hastalıkları ile karışır.

Direkt tanı için yeterli bulgu yoktur. Spor kontaminasyonu nedeniyle kural olarak Şarbon şüpheli hayvanlara otopsi yapılmaz.

Anthrax şüpheli hayvanlardan alınan kan, dalak, ilikli kemik, kulak parçası ve organlardan alınan parçalar ile ödem sıvıları laboratuvara muayene için gönderilebilir.

Laboratuvara gönderilen materyallerden frotiler hazırlanarak Gram ve Giemsa boyama yöntemleri ile boyanır. Boyamalarda tek tek veya 2-8 basillik zincirler şeklinde etkenler görülür. Giemsa boyamada tek veya ikili kırmızı renkte boyanmış kapsüle sahip etkenler tipiktir.

Laboratuvara gönderilen numunelerden uygun besiyerlerine ekim yapılarak aerobik koşullarda 37 °C'de 24-48 saat inkubasyona bırakılır. Genellikle, 24 saat sonra 3-5 mm çapında R formu benzeri gri koloniler meydana gelir. Kültürlerden yapılan Gram boyamalarda etken saç benzeri uzun filamentöz bir yapıdadır. Bazıları sporlu Gram pozitif bakterilere rastlanır. Ölümünden sonra alınan numunelerde *B. anthracis*'e benzeyen birçok bakteri bulunabileceğinden ayırıcı identifikasyon yapılmalıdır. Özellikle, diğer *Bacillus*lar (*B. subtilis*, *B. megaterium*, vs) ve *P. aeruginosa* çok karışır.

İdentifikasyon için aşağıdaki tarzda hareket edilir:

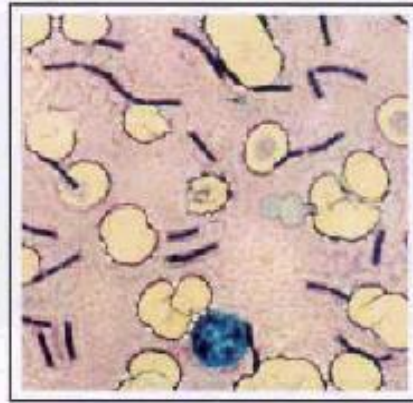
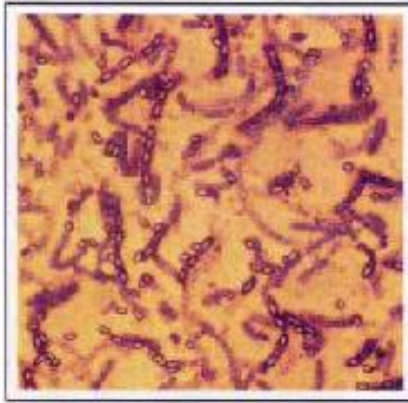
- A) KAPSÜL FORMASYONU: *B. anthracis* vücut içinde kapsül verir. Buna karşılık spor in vitro oluşur. *B. anthracis* aynı zamanda invitro olarak serumlu ve % 10-30 CO₂'li ortamlarda kapsül oluşturabilir. Besiyerlerinde üremiş kolonilerden emulsiyon yapıp, farelere intraperitoneal verildikten 6-8 saat sonra, periton sıvısından yapılan frotiler Giemsa ile boyanırsa kapsüllü

basillere rastlanır. Diğerlerinde bu kapsül formasyonu görülmez.

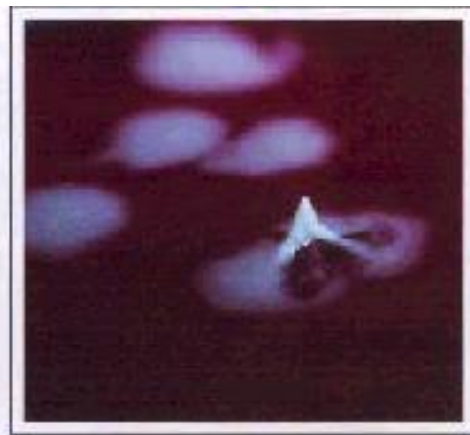
- B) BOYAMA: Kolonilerden yapılan boyamalarda antraks saç gibi uzun ve birbirine paralel filamentler meydana getirir.
- C) HAREKET: *B. anthracis* hareketsiz olmasına karşın *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium* hareketlidir.
- D) İNCİ REAKSİYONU: Eğer, *B. anthracis*, içinde 5-10 UI/ml penisilin içeren ortamlarda 8-9 saat üretildikten sonra frotiler yapıp Gramla boyanırsa, basillerin yuvarlaklaştığı ve tespih gibi bir görünüm aldığı saptanır. Bu görünüm diğerlerinde yoktur.

Laboratuvara gönderilen marazi maddelerden hazırlanan inokulumlar fare veya kobaylara deri altı veya intraperitoneal yolla verilir. Yaklaşık 2-7 gün sonra hayvanlar ölürlür. Ölen hayvanların otopsi yapılar, başta kan ve dalak olmak üzere diğer dokularından frotiler yapılır. Gram ve Giemsa ile boyanır ve tipik etken aranır. Ayrıca, besiyerlerine de dalak ve karaciğer gibi dokulardan ekimler yapılır. Üreyen koloniler *B. anthracis* yönünden incelenir.

Serolojik tanıda başta Ascoli termopresipitasyon testi olmak üzere az olarak agar jel presipitasyon testi, indirek mikrohemağlutinasyon testi ve ELISA'dan yararlanılır.



Zincir şeklinde(kültürde) ve tek tek (dokudan) *B. anthracis*'in mikroskopik görünümü



B. anthracis'in katı besi yerinde uzaktan ve yakından koloni görüntüleri

Uygulamanın adı	Clostridium infeksiyonlarında örnek alımı klinik tanı prosedürünün belirlenmesi
Yapılacağı hafta	7
Uygulamanın temel hedefi	Clostridium türlerinin identifikasyonu
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Besiyeri, öze, öze ucu, lam, serum fizyolojik, mikroskop, bünzen beki, gram boyama seti, mikroskop, bakteri kültürü, dezenfektan, alkol, pamuk.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

Clostridium türleri, doğada ve özellikle toprakta yaygın olarak bulunan anaerobik veya mikroaerofilik sporlu mikroorganizmalardır. İnsan ve hayvanların sindirim sisteminde flora bakterisi olarak da bulunan bu mikroorganizmalar, birçok hayvan türünde sinir, sindirim, kas ve iç organları etkileyen toksinleri ve vegetatif formlarıyla hastalık oluştururlar.

- C. botulinum*: Botulismus (insan, sığır, koyun, at, tavuk, ördek, mink)
- C. tetani*: Tetanoz (at, domuz, koyun, nadiren de diğer memeliler)
- C. chauvoei*: Yanıkara (sığır, koyun, keçi, geyik, domuz, tavşan, kobay)
- C. septicum*: Bradzot hastalığı (genç koyunlar)
- C. welchii* (*C. perfringens*): Enterotoksemi (koyun , kuzu)
- C. welchii* tip-A: Gazlı gangren, sepsis, gıda zehirlenmesi (insan)
- C. welchii* tip-B: Kuzu dizanterisi (1-2 haftalık kuzular)
- C. welchii* tip-C: Koyunların hemorajik enterotoksemisi (koyun)
- C. welchii* tip-D: Yumuşak böbrek hastalığı (koyun, kuzu)
- C. welchii* tip-E: Buzağı enterotoksemisi (buzağı)
- C. welchii* tip-F: Enteritis necroticans
- C. novyi*: İnfeksiyöz nekrotik hepatitis (koyun, sığır)
- C. haemolyticum*: İnfeksiyöz ikterohemoglobinüri (sığır, koyun, keçi, domuz)

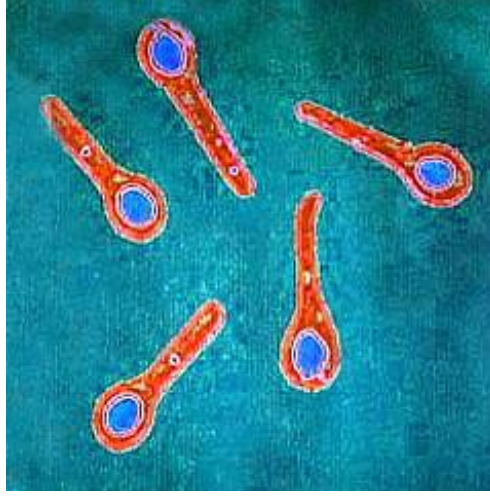
Kültürlerde tek tek, çift, kısa zincirler veya filamentler tarzında görülür. Genelde sporların çapı basillerin çapından büyük olduğu için, basile yüzük, tokmak, raket, mekik gibi çeşitli şekiller verdirir. Clostridium türleri Clostridium perfringens hariç hareketlidirler ve kapsül oluşturmazlar. *C. perfringens* kapsül oluşturur ve hareketsizdir. Clostridiumlar katı besi yerlerinde 37 oC de 24-48-72 saat içinde ortası kabarık, granüllü, düzenli veya düzensiz, kenarları çentikli, bazen de düzgün, filamentli görünümde, 2-4 mm çapında, saydam koloniler oluşturur. Kanlı agarda grimsi, nemli ve büyük boyda beta hemolitik koloniler meydana getirir.

Şüpheli gıda maddeleri ve hastalıktan ölmüş hayvanların çeşitli iç organları, yara veya portantre civarından el ayası büyüklüğünde parça, yaradan alınan kazıntı ve yara içinden gelen akıntı (*C. tetani*), kan ve ödem sıvısı (*C. chauvoei*), femur, abomasus içeriği, idrar (*C. welchii*) gibi marazi maddeler laboratuvar tanısında kullanılır.

Laboratuvara gönderilen marazi maddelerden hazırlanan preparatlar Gram ve spor boyama yöntemleriyle boyanarak Gram pozitif sporlu etkenler görülmeye çalışılır.

Kültür

- a) Katı besi yeri: Kanlı agar, laktozlu yumurta sarılı ve sütlü agar, glukozlu kanlı agar.
- b) Koloni morfolojisi: Klostridium'lar katı besi yerlerinde, ortası kabarık, granüllü, düzenli veya düzensiz, kenarları çentikli, bazen de düzgün, filamentli görünümde, 2-4 mm çapında, saydam ve hemolitik koloniler oluştururlar.
- c) Spesifik besi yerleri: Cooked meat buyyon (Merck 1.10928), glukozlu VF buyyonu, Terezzi, VF (Viande Foie), kıymalı-, beyinli- ve karaciğerli buyyon, dihidrojen fosfatlı, potasyum tellritli, sodyum azidli ve glukozlu VF besi yeri. Besi yerlerine %0.5 glukoz, %0.5 K₂HPO₄, kan serumu ve inorganik tuzların ilave edilmesi üremeyi olumlu etkiler.
- d) Buyyon kültürü: Klostridiumlar sıvı besi yerlerinde 24-48 saat içinde bol ve homojen bir üreme ve bazen de dipte çöküntü gösterirler. Çok miktarda gaz oluşumu, H₂S teşkili ve bozulmuş acı tereyağı kokusu veya peynirimsi bir koku meydana gelir. Buyyonda bulunan et parçaları dijestelir ve ette bazı değişiklikler şekillenir.



Clostridium türlerinin genel mikroskopik görünümü

Uygulamanın adı	Clostridium perfringens türlerinin preparatlarının incelenmesi, spor yapılarının görülmesi ve laboratuvar teşhis prosedürü
Yapılacağı hafta	8
Uygulamanın temel hedefi	Clostridium perfringens türlerinin identifikasyonu
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Besiyeri, öze, öze ucu, lam, serum fizyolojik, mikroskop, bünzen beki, gram boyama seti, mikroskop, bakteri kültürü, dezenfektan, alkol, pamuk.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

C. perfringens klostridi genel özelliklerini taşır. Klostridiler içinde flagellasız olan ve kapsüllü klostridi türüdür. Çomaklar kısa ve kalındır. Uzunlukları 4-8 mikrometre, genişlikleri 1-2 mikrometredir. Taze kültürlerde etken Gram pozitifdir. Tek tek veya ikiye çomak halinde görülürler Pleomorfizm gösterirler. Karbonhidratlı besi yerlerinde kısa çomaklar, proteinli besi yerlerinde filamantöz görünüm kazanırlar. Proteinden zengin, karbonhidratsız ve alkali besi yerlerinde spor verirler. Spor klostridi gövdesini şişirir. *C. perfringens* barsak içeriğinde spor verir, fakat etkilenen dokuda spor oluşmaz. Dokulardan ve vücut sıvılarından hazırlanan preparatlarda etken kapsüllüdür.

A- Klinik teşhis: Genel olarak *C. perfringens* infeksiyonları (enterotoksemiler) klinik olarak teşhis edilemezler.

B- Otopsi bulguları: Hemorajik ve ülseratif bir enteritis tablosu, kanlı barsak içeriği genel olarak *C. perfringens* değişik tipleri tarafından oluşturulan enterotoksemilerde görülen başlıca otopsi bulgularıdır.

C- Laboratuvar muayeneleri: Laboratuvar muayeneleri için gönderilecek örneklerin taze olması, ölümden sonra bir iki saat içerisinde örneklerin alınıp laboratuvara ulaştırılması, laboratuvar muayenelerinde başarı için çok önemlidir.

Laboratuvara gönderilecek örnekler, barsak içeriği, iç organlar, özellikle karaciğer, böbrek, dalak parçaları ve lenf yumrularıdır. Barsak içeriği üç ayrı yerden alınıp, steril şişe veya kapaklı kavanozlar içerisinde gönderilir. Koruyucu olarak barsak içeriğine kloroform katılır.

Teşhis

Laboratuvar muayeneleri:

1- Bakteriyoskopi: *C. perfringens* değişik tipleri, barsak florasını oluşturan mikroorganizmalar arasında yer alırlar. Bu nedenle bakteriyoskopi için kullanılacak materyalin çok taze olması veya materyal alınırken lezyonlu yerlerden frotilerin yapılıp gönderilmesi gerekir. Preparatlar Gram boyası ile boyanır ve Gram pozitif çomaklar aranır. Bazı *C. perfringens* infeksiyonlarında bakteriyoskopik muayenede klostridilerin veya sporların görülmesi teşhise yardımcı olabilir. *C. perfringens* Tip-A infeksiyonunda atlardaki enterotoksemi olgularında, barsak içeriğinden yapılan bakteriyoskopide çok sayıda klostridi (*C. perfringens* Tip-A) görülmesi infeksiyon için dikkati çekicidir. *C. perfringens* Tip-C infeksiyonlarında bakteriyoskopi pek uygulanmaz. *C. perfringens* Tip-D infeksiyonunda bakteriyoskopik muayene için barsak örneklerinden preparat yapılması önerilmektedir.

Laboratuvar muayeneleri:

2- Kültür: Etken izolasyonu için dihidrojen fosfatlı potasyum tellurit ve glukoz içeren besi yerleri ve buyyonlar kullanılmaktadır. Bu besi yerlerinde üretilen etkenler kanlı agar veya glukoz, potasyum tellurit içeren katı besi yerlerine aktararak tek koloni düşürülmeye

çalışılır. Katı besi yerlerinde tek düşen koloniler ile *C. perfringens* tipleri yönünden biyokimyasal testler uygulanarak etkenin 'identifikasyonuna gidilir. *C. perfringens* Tip-A infeksiyonunda at barsak içeriğinde çok fazla miktarda $10^4 - 10^7$ *C. perfringens* tip-A bulunmuştur. Normal atlarda bu sayı 10^2 olduğu için bu bulgu teşhis yönünden önemli sayılmaktadır. Diğer *C. perfringens* infeksiyonlarında etkenin izolasyonu identifikasyonu bu derece teşhis için önemli kabul edilemez.

3- Hayvan Deneyi: Kobaylar kullanılır

4- Toksin Aranması:

Enterotoksemilerin kesin teşhisi *C. perfringens* tiplerinin oluşturdukları toksinlerin ortaya konulması ve tiplerinin saptanması ile gerçekleşir. *C. perfringens* tipleri A, B, C, D ve E tarafından oluşturulan 12 değişik toksik maddeden alpha, beta, epsilon ve iota toksinlerinin ortaya konulması ve anti serumlarla toksinlerin tiplendirilmesi ile teşhis kesinleşir.

Toksin aranması için kullanılan materyal ince barsak içeriği veya kültürdür. İnce barsak içeriğinin taze olması gerekir. Test için muayene edilecek barsak içeriği ağzı kapaklı cam kavanoz veya şişede gönderilir veya laboratuvarında cam kavanoz veya şişeye aktarılır. Sahada alınan barsak içeriği için her 10 cc barsak içeriğine bir damla kloroform ilave edilmesi, örnekteki toksinlerin bir ay dayanmasını sağlar. Barsak içeriğinin, özellikle ülserlere yakın yerlerden bir pipet yardımı ile alınması önerilmektedir. Ölen hayvanın ince bağırsağında yeteri kadar içerik bulunmadığı zamanlarda, barsak içine buyyon verilerek örnek alınabilir.

5- Toksin nötralizasyonu: Barsak içeriği veya kültürde toksinin varlığı belirlendikten sonra, toksin nötralizasyon testi uygulanarak *C. perfringens* tiplerinin A, B, C, D ve E olarak kesin teşhisi yapılır.

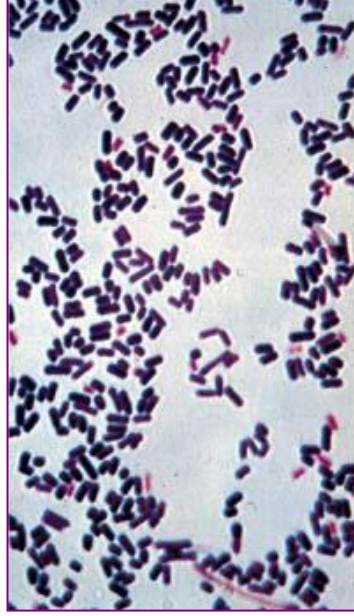
Toksin nötralizasyon (*Serum nötralizasyon*) testi farelerde letal etki, kobaylarda nekrotik etki ve spesifik anti serumlarla etkenin nötralize edilmesine göre değerlendirilir. Testte kullanılan anti-toksinler Dünya Sağlık Örgütü'nün (*World Health Organization-WHO*) lisanslı laboratuvarlarında standart olarak hazırlanmaktadır. Anti serumlar bütün dünyada teşhis laboratuvarlarına istek üzerine gönderilmektedir. Teşhis laboratuvarlarında, standart anti-serumlardan yararlanılarak konsantre toksinler ve bunlara karşı sub-serumlardan yararlanılarak konsantre toksinler ve bunlara karşı sub-standard antiserumlar hazırlanır. Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünde antitoksinler hazırlanmaktadır.

6- Serolojik testler: Enterotoksemilerin teşhisinde AGP, flokulasyon, hemaglutinasyon ve opalesans testleri ile fluoresans antikor ve ELISA testlerinden yararlanılır.

Ölen farelerin aldıkları anti-toksin tipi	içerikte olası tipler	içerikte olamayacak tipler
A	B,C,D, E	A
B	E	A,B,C,D

C	B,D,E	A,C
D	B,C,E	A,D
E	B,C,D	A,E

Toksin nötralizasyon testi ile *C. perfringens* tiplerinin saptanması



C. perfringens mikroskopik görünümü

Uygulamanın adı	Clostridium novyi ve Clostridium haemolyticum türlerinin preparatlarının incelenmesi, spor yapılarının görülmesi ve laboratuvar teşhis prosedürü
Yapılacağı hafta	9
Uygulamanın temel hedefi	Clostridium novyi ve Clostridium haemolyticum türlerinin identifikasyonu
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Besiyeri, öze, öze ucu, lam, serum fizyolojik, mikroskop, bünzen beki, gram boyama seti, mikroskop, bakteri kültürü, dezenfektan, alkol, pamuk.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

C. novyi tam bir an aerob klostrididir. Sıvı ve katı besi yerlerinde kolay ürer. Kanlı agarda 3-4 milimetre çapında, yoğun ince granüllü, kenarları çentikli koloniler oluştururlar. Hemolitiktir. Yumurta sarılı agarda düzensiz kenarlı, etrafında ve altında presipitasyon sonucu radyal çemberler oluşturan koloniler verir. Sıvı besiyerlerinde, buyyonda bol üreme, gaz ve tüp dibinde tortu şekillenir. Kıymalı besi yerinde ürediğinde, besi yerindeki et kızarır ve fenadır. Et dijestе olmaz. Besi yerlerine serum katılması üremeyi kolaylaştırır.

Klinik Teşhis: Genellikle zordur.

Otopsi bulguları: Erken yapılmış otopsiler tanıya yardımcı olabilir. Karaciğerde fazla miktarda parazit Özellikle *F. hepatica* görülmesi

Laboratuvar muayeneleri: Hastalıktan yeni ölen hayvanlardan, vücut sıvıları ve oran parçaları lab.a gönderilir.

- Bakteriyoskopi: Frotillerden Gram Boyama
- Kültür: Etken izolasyonu zordur. Taze hazırlanmış besiyerlerine ekim yapılır. Sporlar incelenir.
- Toksin aranması: Kesin teşhis için yapılır. Toksin araştırması için otopsi materyali veya kültür kullanılır.

Tip tayini invitro ve invivo yapılmaktadır. İn-vitro test için, tüp nötralizasyon testi, agar jel presipitasyon ve opelasans testi uygulanır.

C. hemolyticum, bir toprak anaerobudur. Kontamine bölgelerde sağlam hayvanların karaciğerinde etkene rastlanmaktadır. Sporların toprakta ne kadar canlı kaldığı bilinmemektedir. Ancak hastalıktan ölen hayvanların kemiğinden iki yıl sonra etken izole edilmiştir. Sporlar, dezenfektanların çoğuna süresiz direnç gösterirler.

TEŞHİS

A-KLİNİK TEŞHİS: Hastalık, klinik olarak leptospirosis, piroplasmosis, pyelonefritis, cystitis, anthraks, pasteurellosis, yanıkara ve zehirlenmelerle karışabilir. Klinik olarak teşhis konulamaz.

B-OTOPSİ BULGULARI: Karaciğerde anemik infarktlar, deri altı dokularında hemoraji ve yaygın infiltrasyonlar ve diğer otopsi bulguları teşhiste yardımcı olabilir. Yalnız otopsi bulguları teşhis için yeterli değildir.

C-LABORATUAR MUAYENELERİ:

1-BAKTERİYOSKOPI: Karaciğerden hazırlanan preperatlarda, yeni sporlanmaya başlayan etkenleri görmek mümkündür. Yalnız bakteriyoskopide etkenin görülmesi teşhis için yeterli sayılmaz.

2-KÜLTÜR: Etken izolasyonu için kullanılan materyallerin taze olması ve kontamine olmaması gerekmektedir. Hazırlanan materyal kanlı agara ekilir ve anaerob koşullarda inkube edilir. Oluşan kolonilerden alınan etkenin biyokimyasal özellikleri incelenir. Etken identifikasyonunda indol oluşumu başlıca letal toksin olan beta lesitinazın varlığına bakılır.

3-HAYVAN DENEYİ

4-SEROLOJİK TESTLER: AGP, lesitin, nötralizasyon ve FAT tekniği uygulanabilir.



C. novyi mikroskopik görünümü



C. haemolyticum mikroskopik görünümü

Uygulamanın adı	Mycobacterium türlerinde Ziehl-Neelsen boyama
Yapılacağı hafta	10
Uygulamanın temel hedefi	Mycobacterium türleri identifikasyonu
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Besiyeri, öze, öze ucu, lam, serum fizyolojik, mikroskop, bünzen beki, gram boyama seti, mikroskop, , bakteri kültürü, dezenfektan, alkol, pamuk.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

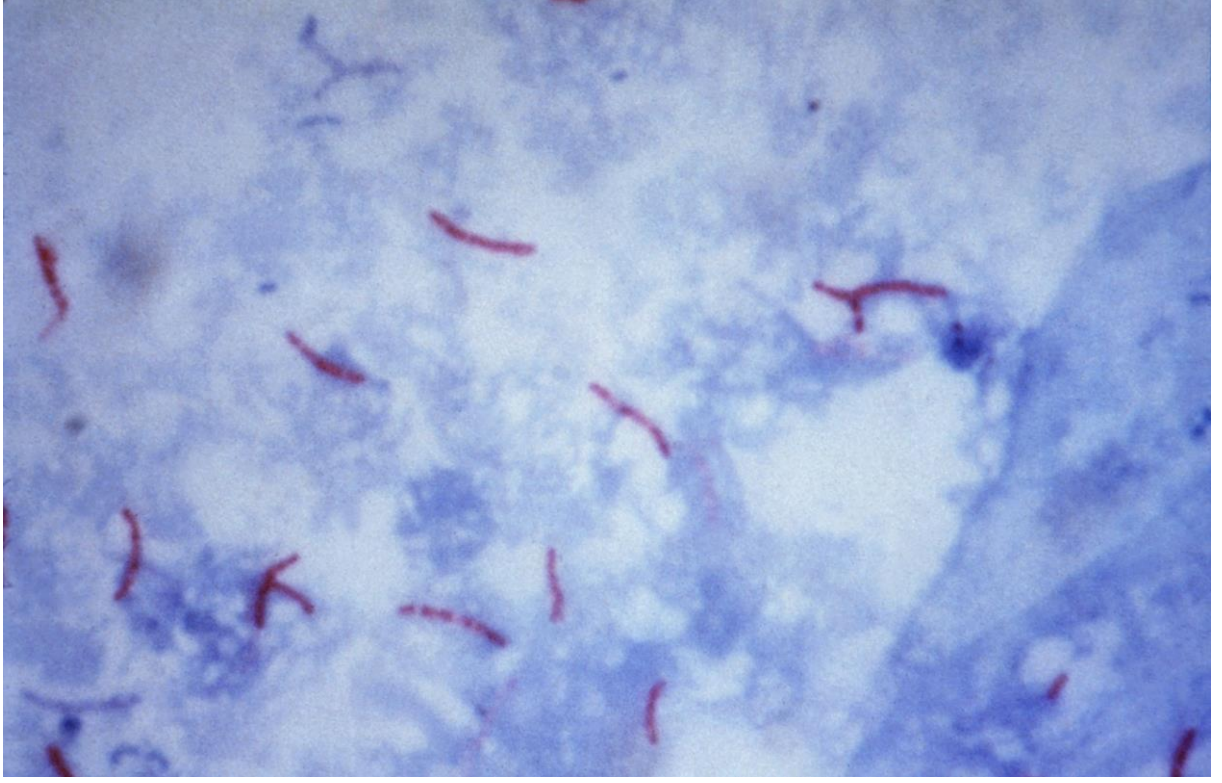
UYGULAMA BİLGİSİ

Sığır tüberkülozunun etkeni olan *M. bovis* Gram pozitif, asidorezistans karakterde aerobik, sporsuz bir bakteridir ve dört mikobakteri türünü içeren *Mycobacterium tuberculosis complex* olarak adlandırılan grup içinde yer alır. Bu grupta kendisi dışında *M. tuberculosis*, *M. africanum* ve *M. microti* yer alır. *M. bovis* 0.2-0.6 x1.4.0 mikrometre boyutlarındadır. Gerçek bir kapsülü yoktur. Tüberküloz etkenlerinin hücre duvarlarında diğer bakterilere göre çok daha fazla bulunan lipoidal maddeler bu bakterilerin normal laboratuvar boyaları ile boyanmamasına neden olur. Bu nedenle Ziehl-Neelsen boyama yöntemi ile boyanırlar.

Ehrlich-Ziehl - Neelsen (EZN) Mikobakterileri boyama yöntemi

- Preparat hazırlanır, kurutulur ve tespit edilir.
- Lam üzerine ve bütün lâmi kaplayacak tarzda karbol füksin solusyonu konur.
- Preparat alttan 4-5 dakika ve aralıklı olarak hafifçe ısıtılır. Preparatın yanmamasına ve kabarcıkların çıkmamasına dikkat edilir (preparat üzerinden hafif buharlar çıkabilir).
- Boya dökülür ve preparat asit-alkolde (% 95 alkol + % 3 HCl asit) dekolore edilir.
- Su ile yıkanır.
- Preparat üzerine metilen mavisi solusyonu konur ve 10-15 saniye boyanır.
- Boya dökülür ve su ile yıkanır.
- Kurutulur ve immersiyonla muayene edilir.

Mikobakteriler veya asidorezistens mikroorganizmalar pembe kırmızı renkte ve diğer mikroplar ise mavi renkte görülürler.



Ziehl-Neelsen boyamada tüberküloz basillerinin görünümü

Uygulamanın adı	Enterobakterilerin genel mikroskopik yapısı ve laboratuvar teşhisi
Yapılacağı hafta	11
Uygulamanın temel hedefi	Enterobakterilerin identifikasyonu
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Besiyeri, öze, öze ucu, lam, serum fizyolojik, mikroskop, bünzen beki, gram boyama seti, mikroskop, bakteri kültürü, dezenfektan, alkol, pamuk.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

Enterobacteriaceae familyasındaki mikroorganizmaların ortak özellikleri;

- Gram negatif,
- çomak tarzında,
- spor oluşturmamaları,
- aerobik veya fakültatif anaerobik üreme özelliğine sahip olmalarıdır.
- Ayrıca bu etkenler rutin laboratuvar besi yerlerinde kolaylıkla üreyebilmektedirler.
- Genellikle hareketli olan bu etkenler arasında hareketsiz olanlara da rastlanılmaktadır (Örneğin: *S.gallinarum* ve *S.pullorum*)
- Yine bu etkenler katalaz pozitif olup, genellikle nitratları nitritlere redükte etme özelliğine sahiptirler.

TEŞHİS

E. coli için;

1-Bakteriyoskopi: Septisemiden ölen hayvanlara ait organlardan yapılan preparatlarda Gram negatif çomakların görülmesi *E. coli*'yi düşündürülebilir.

2-Kültür: Bu amaçla kanlı agar, MacConkey agar ve EMB agar gibi besi yerlerine ekimler yapılır ve 24-48 saat 37°C'de inkubasyondan sonra üreyen koloniler *E. coli* yönünden değerlendirilir. Buyyon kültüründe 24 saatte homojen bulanıklık yapan *E. coli* biyokimyasal testlerle (karbonhidrat fermentasyon testleri, H₂S, Indol, MR, VP, Nitrat, vs) identifiye edilir. Üreyen *E. coli*'lerin virulens faktörlerinin PCR gibi moleküler yöntemlerle doğrulanması yapılabilir.

3-Hayvan deneyi: Özellikle ETEC suşlar belirlenmesi amacıyla, bağırsak lup testi, fare testi ve doku kültürü testlerinin kullanılması gerekmektedir.

4-Serolojik testler: Buzağılarda hastalık yapan *E. coli* serotiplerine karşı hazırlanmış antiserumlarla üreyen kolonilerin lam üzerinde yapılan aglütinasyon testi ile hangi serogruba ait oldukları, dolayısıyla antijenik özellikleri kesin olarak saptanabilir.

Salmonella türleri için;

1- Bakteriyoskopi: Bakteriyolojik muayene materyallerden hazırlanan preparatlar, Gram boyama yöntemi ile incelenmelidir. Gram negatif etkenlerin görülmesi, *S. abortus equi*'yi düşündürmesine rağmen mutlaka kültür yapılmalıdır.

2-Kültür: Laboratuvara gelen ana veya fetusa ait taze materyallerden kanlı agar, MacConkey agar nutrient, buyyon gibi besi yerlerine ekim yapılarak üreyen etkenler Salmonella yönünden değerlendirilir. Biyokimyasal testlerle identifiye edilebilen *S. abortus equi*'nin kesin teşhisi, tip spesifik antiserumlardan yararlanılarak doğrulanmalıdır.

3-Hayvan deneyi: Laboratuvarlarda izole edilen *S. abortus equi* şüpheli koloniler veya kontamine atık materyallerinden hazırlanan inokulumlar gebe kobaylara injekte edilmekte ve

injeksiyon sonucu oluşan atıklardan yapılan kültürel yoklamalarla etken izolasyon ve identifikasyonu kesin olarak yapılabilmektedir.

4-Serolojik testler: Atık yapmış hayvanlardan bakteriyolojik muayenelerin yapılmadığı durumlarda veya portör kısırakların belirlenmesi amacıyla serolojik yoklamalardan yararlanılmaktadır. *S. abortus equi*'ye karşı oluşmuş antikörlerin saptanması, ancak atıklardan en erken 20 gün sonra mümkün olmakta, bu amaçla kan alınarak, "O" ve "H" antijenleri kullanılmak suretiyle aglütinasyon testleri yapılmaktadır. Ancak, sağlıklı atlarda *S. abortus equi*'nin "O" antijenine karşı normal agltininler bulunabildiğinden, aglütinasyon titresinin 1/1000 ve üzerinde bulunması pozitif olarak değerlendirilir. Ya da sr taramalarında sağlıklı hayvanlara ait serumların aglütinasyon titreleri saptandıktan sonra atık yapan hayvanların aglütinasyon titreleri değerlendirilmelidir. "H" antijenine karşı saptanan antikörler, *S. abortus equi* için spesifik kabul edilmektedir. Bu nedenle, özellikle portrlerin saptanmasında "H" antijeni ile yapılan aglütinasyon testleri kullanılmalıdır.

Yersinia türleri için;

Bu amaçla, ölen veya agoni halinde kesilen hayvanlara ait iç organlar (karaciğer, kalp, dalak vs.) aseptik koşullarda ve süratle laboratuvara gönderilmelidir.

1-Bakteriyoskopi: Marazi maddelerden yapılan preparatlar Gram boyama yöntemi incelenir. Gram negatif etkenlerin görülmesi Yersinia etkenlerini düşündürür. Ancak kesin teşhiş kültürle konulabilir.

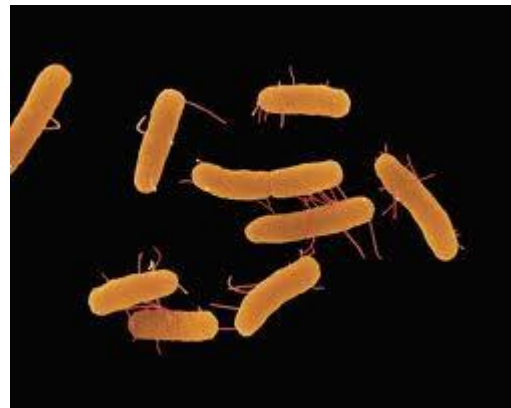
2-Kültür: Bu amaçla, marazi maddelerden, genel ve selektif besi yerlerine ekimler yapılır. İncelenen materyal dışkı veya gıda maddeleri ise, soğuk zenginleştirme yönteminden yararlanılmalıdır. Üreyen koloniler, ayırt edici biyokimyasal reaksiyonlar kullanılarak identifiye edilir. Ayrıca, 25°C' de ve 37°C' de hareket muayenelerinin de yapılması gerekmektedir.

3-Hayvan deneyi: *Y. enterocolitica*'nın patojenite denemeleri için çeşitli laboratuvar hayvanları kullanılabilir. Bu amaçla en çok gerbiller kullanılır. Gerbillerin intraperitoneal injeksiyonları sonucunda 4 gün içinde septisemiye bağlı ölümler şekillenmektedir. Kobaylarda da konjunktivitis oluşurmaktadır.

4- Serolojik testler: Hayvanlarda *Y. enterocolitica* infeksiyonlarının serolojik teşhişi pratik değildir.



E. coli mikroskopik görünümü



Salmonella türleri mikroskopik görünümü



Yersinia türleri mikroskopik görünümü

Uygulamanın adı	Pseudomonas türleri morfolojik yapıları ve laboratuvar teşhisi
Yapılacağı hafta	12
Uygulamanın temel hedefi	Pseudomonas türleri identifikasyonu
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Besiyeri, öze, öze ucu, lam, serum fizyolojik, mikroskop, bünzen beki, gram boyama seti, mikroskop, bakteri kültürü, dezenfektan, alkol, pamuk.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

Pseudomonadaceae familyasındaki bakteriler 0,5-1,0 x 1,0-5,0 µm boyutlarında, Gram negatif çomak şekilli ve zorunlu aerobik etkenlerdir. Karbonhidratları okside edebilirler. İzolatların birçoğu katalaz ve oksidaz pozitifdir. Sahip oldukları bir veya daha fazla polar flagella yardımı ile aktif hareket ederler. *P. aeruginosa* çok sayıda hayvan türünde çeşitli oportunistik infeksiyonlar meydana getirebilir. *P. fluorescens* ve *P. putida* gibi türler tatlı su balıklarının infekte ederlerken, klinik örneklerden diğer Pseudomonas türleri de izole edilebilmektedir.

Pseudomonas'lar orta büyüklükte, Gram negatif çomak şeklinde bakteriler olduğundan ve ayırt edici başka bir özelliği olmadığından, marazi maddelerden direkt bakteriyoskopi yapılmasının tanı açısından fazla bir önemi bulunmamaktadır

Laboratuvara gönderilen marazi maddelerden etken izolasyonu amacıyla kanlı agar ve MacConkey agara ekimler yapılır.

P. aeruginosa'nın üretilmesi için, genellikle %0,03 oranında cetrimide (cetyl trimethyl ammonium bromide) içeren ticari selektif besiyerleri de bulunmaktadır.

P. aeruginosa ayrıca, Enterobacteriaceae türlerinin üretilmesi için kullanılan MacConkey agar, brilliant green agar ve XLD agar gibi birçok selektif besiyerinde de rahatlıkla üreyebilmektedir.

Etkenin üretilmesi amacıyla pyocyanin ve pyoverdin üretimini destekleyen ve güçlendiren, sırasıyla Pseudomonas agar P ve Pseudomonas agar F gibi ticari besiyerleri de kullanılabilir.

Ekim yapıldıktan sonra kültürler aerobik koşullarda, 37°C'de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakılır.

İnkübasyon süresi sonunda şekillenen kolo-niler *P. aeruginosa* yönünden etken e ait S-, R- ve M-tipi koloni morfolojisi ve tipik üzüm-benzeri, meyvemsi koku yönünden incelenir.

Koyun kanlı agarda hemoliz görülmesi, metalik parlaklık olması, MacConkey agarda yeşilimsi-mavi renkte büyük, laktoz negatif; brilliant green ve XLD agarda ise kırmızı koloniler oluşması ve besi-yerinin kırmızıya dönmesi ve TSI agarda her hangi bir değişiklik olmaması, *P. aeruginosa* yönünden şüphe ettirir.

Kültürlerden hazırlanan Gram boyalı preparatlarda orta büyüklükte Gram negatif çomak şekilli bakterilerin görülmesi ile laboratuvar tanısına devam edilir.

Pyocyanin üretimi ve kuvvetli pozitif oksidaz reaksiyonu *P. aeruginosa*'nın ön identifikasyonu için yeterlidir.

Kuvvetli pozitif oksidaz reaksiyonu *P. aeruginosa*'nın Enterobacteriaceae familyasında bulunan oksidaz negatif bakterilerden ayırt edilmesinde oldukça faydalı bir özelliktir. Ayrıca hareket muayenesi, 42°C'de üreyebilme yeteneği, glukoz, laktoz ve sukroz oksidasyon testleri ile de etkenin kesin identifikasyonu gerçekleştirilir. *P. aeruginosa*'nın identifikasyonunda API 20E gibi ticari identifikasyon sistemlerinden de yararlanılabilir.



P. aeruginosa mikroskopik görünümü

Uygulamanın adı	Burkholderia türleri morfolojik yapıları ve laboratuvar teşhisi
Yapılacağı hafta	13
Uygulamanın temel hedefi	Burkholderia türleri identifikasyonu
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Besiyeri, öze, öze ucu, lam, serum fizyolojik, mikroskop, bünzen beki, gram boyama seti, mikroskop, bakteri kültürü, dezenfektan, alkol, pamuk.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

Burkholderia cinsi bakteriler Gram negatif, çomak şekilli, hareketli ve obligat aerobik koşullarda üreme fizyolojisine sahip bakterilerdir. Tüm dünyada her ısıdaki toprakta ve yüzey sularında bulunabilir. Bu bakteriler, 7°C'lik ısıya sahip Antartika topraklarında bile yaşayabilirler.

Özel üreme ihtiyacı olmamasına karşı *B. mallei* optimum üreme için besiyerlerinde gliserole gereksinim duyar. *B.mallei* izolatlarının %75'den fazlası MacConkey agarda iyi ürer. Optimal üreme sıcaklığı 37 °C olmasına karşın bakteri 22-24°C'ler arasında üreme gösterebilir. Katı besiyerlerinde 37 °C de 24-48 saat içinde küçük, S-tipli, kokusuz beyaz koloniler meydana getirir. Kanlı agarda hemoliz oluşturmaz. Gliserinli sıvı besiyerlerinde hafif bir bulanıklık ve tüpün üst kısmında pelikül oluşumu gözlenir. Zamanla sıvı kültürün rengi koyulaşır ve dip kısımda yapışkan bir tortu şekillenir. Tüpün hafifce çalkalanması ile tortu yukarı doğru kalkar fakat parçalanmaz.

Hastalığın endemik seyir gösterdiği bölgelerde, hayvanlarda şekillenen nodüller, ülserler, yaralar ve aşırı takatsızlık gibi klinik belirtiler hastalık için tanımlayıcı olabilir. Ruam'ın sporadik olduğu ve hastalığın latent veya subklinik bir seyir gösterdiği bölgelerde ise semptomlara bakarak hastalığı tanımlamak neredeyse olanaksızdır. Çünkü, Burun Ruamı rinitis, sinüzitis ve Gurm ile; Deri Ruamı dermatomikozis, sporotrikozis, lenfangitis ülseroza ve lenfangitis epizootika ile; Akciğer Ruamı da tüberkülozis, akciğer parazitleri ve diğer akciğer infeksiyonları ile karıştırılabilir.

Ruam şüphesiyle ölen hayvanlara nekropsi yapılması kanunen yasak olduğundan, laboratuvar muayeneleri için karkasdan organ veya doku örnekleri alınamaz. Hastalığın laboratuvar tanısında kültürel muayeneler için şüpheli canlı hayvanlardan lezyonlardan gelen akıntılar, serolojik muayeneler için de kan örnekleri alınabilir. *Ruam* şüpheli klinik örneklerin laboratuvarında çalışılması sırasında çok dikkatli davranılmalı ve steril kabinler kullanılmalıdır.

Laboratuvara gönderilen klinik örneklerden sürme preparatlar hazırlanarak Gram boyama yöntemiyle boyanır. Mikroskopik muayenede Gram negatif, çift veya gruplar halinde düz ya da hafif eğri çomaklar görülür. *B. mallei'nin* direkt bakteriyoskopisinde fluoresan antikor tekniği de kullanılabilir.

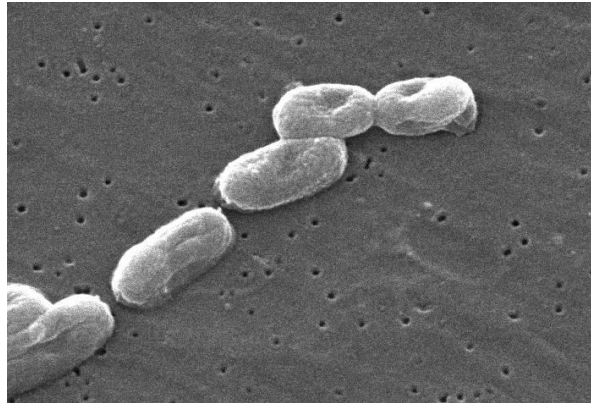
Şüpheli materyalden %1 gliserinli veya kanlı agara ekimler yapılarak, kültürler aerobik koşullarda, 37°C'de 48-72 saat süre inkübe edilirler. *B. mallei* suşlarının çoğu MacConkey agarda da üreme gösterebilir. İnkübasyon süresinin sonunda katı besiyerlerinde şekillenen

kolonilerin morfolojisine bakılır. *B. mallei* beyaz renkte, kokusuz ve S-tipli koloniler meydana getirir. Kültürün eskimesi ile birlikte koloniler granüler bir görünüm kazanır ve rengi de kahverengine döner. Kanlı agarda hemoliz oluşturmaz.

B. mallei suşlarının %75'den fazlası laktozu kullanmaksızın MacConkey agarda üreme gösterir. Besiyerlerinde pigment oluşması gözlenmez. *B. mallei'nin* selektif izolasyonunda 100 ml trypticase soy agara 1000 ünite polimiksin E, 1250  nite basitrasin ve 0,25 aktidion ilave edilmiş besiyerleri kullanılabilir. *B.mallei'nin*  remesi *B. pseudomallei'*ye göre daha yavaş olmasına karşın, 24-48 saat içinde 1-2 mm çapında yumuşak S-tipli ve beyazdan krem rengine kadar değişen renklerde koloniler şekillenir. Koloniler eskidikçe granüler bir görünüm alarak sarımsı veya kahverengine dönerler.

Ruam'ın serolojik tanısı komplement fikzasyon (CF) testi, aglutinasyon testleri, indirekt hemaglutinasyon (IHA) testi, counter-immunoelectrophoresis (CIE), indirekt fluoresan antikor (IFA) ve ELISA tekniği gibi çeşitli serolojik yöntemler kullanılabilir.

Ruam'ın allerjik tanısı için MALLE N testi uygulanır. Mallein testi hem hasta hayvanların doğrulanması hem de infekte hayvanlarla temas halinde bulunanların taranmasında kullanılan oldukça etkili bir saha testidir. *B. mallei'nin* %1 gliserinli sıvı besiyerinde üretilmesinden sonra bakterinin ısıyla veya alkolle çöktürülmesi ile elde edilen ve bakteriye ait endotoksinleri içeren bir glukoprotein ekstraktı mallein, intradermal, subkutan, intrapalpepral veya oftalmik yollarla uygulanabilir.



Burkholderia türleri mikroskopik görünümü

Uygulamanın adı	Brucella türleri morfolojik yapıları ve laboratuvar teşhisi
Yapılacağı hafta	14
Uygulamanın temel hedefi	Brucella türleri identifikasyonu
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Besiyeri, öze, öze ucu, lam, serum fizyolojik, mikroskop, bünzen beki, gram boyama seti, mikroskop, bakteri kültürü, dezenfektan, alkol, pamuk.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

Brucella cinsindeki mikroorganizmalar hareketsiz, Gram negatif, küçük kokobasiller tarzında olup, spor teşkil etmezler. Genellikle aerobiktirler, ancak Br. abortus ilk izolasyonlarında % 10 CO₂'ye gereksinim gösterir. Brucella ların neden olduğu Brusellozis sığır, koyun, keçi, domuz, koç vb. gibi hayvanlarda testis, meme, uterus gibi genital organlara yerleşerek yavru atmalara ve infertiliteye neden olan kronik, bulaşıcı, nekrotik ve yangısal enfeksiyonlarla ortaya çıkan zoonoz bir hastalıktır.

Brucella abortus: Sığırların enzootik yavru atma hastalığının etkenidir. 9 biyotipi bulunmaktadır. Koyun, keçi, domuz ve insanlara da bulaşır.

Brucella melitensis: Koyun ve keçilerin brucellosis etkenidir. İnsanlar için çok önemli zoonoz etkidir. Monospesifik serumlarla ortaya konulabilen 3 biyotipi bulunmaktadır.

Brucella suis: Etkenin 4 biyotipi bulunmaktadır. İlk 3 tip domuzlarda Brusellozisin başlıca etkenidir. Biyotip-2, epizootiyolojik çalışmalar sonucu Avrupa tavşanlarında, biyotip-3 ise ren geyiklerinde Bruselloziste oldukça patojendir. Koyun ve keçilerde de hastalık oluşturabilir.

Genellikle, yavru atımından başka klinik belirtiyeye rastlanmayan Brucella hastalığı, Campylobacteriosis, *Trichomonas fetus*, *Chlamydia psittaci*, mikotik abortuslar, viral abortuslar ve gıda zehirlenmeleri ile karıştırılabilir. Bu nedenle kesin teşhis için laboratuvar muayeneleri esastır. Laboratuvara gönderilen materyallerin muayenesini ise, başlıca 5 aşamada gerçekleştirilebilir. Laboratuvar muayeneleri için en çok kullanılan marazi maddeler atık yavruya ait kotiledonlar, fetal membranlar, fötusun mide içeriği, fötüs karaciğeri, ayrıca anaya ait vaginal akıntılar, atılmamış plasenta, süt ve kandır.

Laboratuvara ulaştırılan materyallerden, öncelikle, frotiler hazırlanarak, Gram, modifiye Ziehl Neelsen, Stamp ve Köster boyama yöntemleri ile boyamalar yapılarak mikroskop altında etken aranır. Özellikle, Stamp boyama yöntemi *Chlamydia psittaci*, *Coxiella burnetti* ve Brucella etkenlerini ayırmada önem taşımaktadır. Bakteriyoskopide ayrıca, Florescein'le hazırlanmış özel konjugatlar ile direkt Floresans Antikor Testinden de yararlanılmaktadır. Son yıllarda Ko-aglutinasyon testi de alternatif bir yöntem olarak kullanılmaktadır.

Gönderilen materyallerden çeşitli besi yerlerine ekimler yapılarak izolasyona gidilir. Bu amaçla en çok kullanılan besi yerleri, serumlu Tryptose Agar, Brucella Albimi Agar, Trypticase Soy Buyyon gibi zenginleştirilmiş besi yerleridir. İlk izolasyonlarda B.abortus için %10 CO₂'li atmosferden yararlanılır. Ekim yapılan besi yerlerini içeren petriler 37 °C'de 5-7 gün inkubasyona bırakılarak üreyen koloniler Brucella etkenleri yönünden değerlendirilerek identifikasyon için çeşitli biyokimyasal testlere başvurulur. Kontamine

materyallerden veya şüpheli kolonilerden etken izolasyon ve identifikasyonu için, genellikle, kobaylardan yararlanılır.

Erkek kobaylara periton içi inokulasyon yapıldıktan sonra 3-6 hafta süre içinde hayvanlar gözlem altında tutularak bu süre içinde kobaylardan kan alınır ve serolojik testler uygulanır. Ölen veya öldürülen kobayların nekropsilerinde, testislerde orşitis (Straus Reaksiyonu), lenf düğümlerinde büyüme, dalak ödemi ve karaciğerdeki değişiklikler kaydedilerek bunlardan Brucella için özel zenginleştirilmiş besiyerlerine ekim yapılarak etken izolasyonuna gidilir.

Brucellosis'in tanısında serolojik testlerin çok büyük önemi vardır. Kesin teşhis koyabilmek için bir serolojik testle yetinmeyip en az ikinci veya üçüncüsünü uygulamak gerekmektedir. Serolojik test uygulamasında abort yapmış hayvanlarda, kan veya kan serumunda gerçekleştirilecek testler için gereken kan örnekleri, en erken üç hafta geçtikten sonra alınmalıdır. Serolojik test uygulamalarını üç ana başlık altında toplamak mümkündür.

Kan Serumı Kullanılarak Yapılan Serolojik Testler

Bu amaçla, hayvanların vena jugularis'inden alınan kandan serum elde edilerek aşağıdaki testler uygulanır.

1-Çabuk Aglutinasyon Testi (Plate Test): Kan serumu üzerine boyalı ve konsantre antijenden bir damla konularak 5-10 dakika içinde oluşan aglutinasyon sonucuna göre değerlendirilen bu test, özellikle, sahada genel bir fikir vermesi yönünden önem taşıyan kalitatif bir testtir. Çabuk aglutinasyon testi taze kan ile de uygulanabilmektedir.

2-Rose Bengal Plate Test (RBPT): Lam üzerinde uygulanabilen bu testte Rose Bengal ile boyanmış standart antijen kullanılır. Ancak, antijen hazırlamada kullanılan Buffer'in pH'sı 3.6 civarındadır. Bu asidite, serumdaki IgM'lerin aktivitesini önleyerek, IgG'lerin, özellikle, IgG1'lerin reaksiyona katılmasına yardımcı olur.

3-Serum Aglutinasyon Testi (SAT): Hastalığın teşhisinde önemli olan temel testlerden birisidir. Genellikle, erken olguların ortaya konulmasında yararı bulunan bu testin uygulanmasında ve değerlendirilmesinde dikkat edilmesi gereken hususlar önemlidir.

*Bu test, gerek aşılama ve gerekse infeksiyon sonu oluşan spesifik ve ayrıca nonspesifik antikorları belirler ancak ayrımlarını yapamaz.

*Abortuslardan hemen sonra kandaki antikorları saptayamaz. Kronik olgularda ise negatif çalışabilir.

*Ayrıca, kullanılan antijenin hazırlanmasındaki ve uygulanmasındaki aksaklıklar da testi olumsuz yönde etkileyebilir.

4-Komplement Fiksasyon Testi (KBR): Serum aglutinasyon testine oranla, özellikle, kronik olgularda daha spesifik bir testtir.

*Ancak, spesifik olmayan ve inkomple antikorların araya girdiği durumlarda hemen daima negatiftir. İnfeksiyonun ortaya çıkarılmasında önemli bir test olarak değerini korumakta ise de araştırmacılar, bu testle birlikte Coombs (Antiglobulin) testinin uygulanmasıyla daha kesin sonuç alınacağını ileri sürmektedirler.

5-Coombs (Antiglobulin) Testi: Brucella etkenlerine karşı serumda bulunan bazı spesifik inkomple antikorların aglutinasyon oluşturmadağı bilinmektedir.

*Dolayısıyla bu testin uygulanmasındaki amaç, serum aglutinasyon testinde reaksiyon vermeyen bu antikorları ortaya koymaktır.

*Testin uygulanışında ilk olarak antijen ve şüpheli serum inkubasyona bırakılır, sonra yıkama işlemi yapılarak bağlanmamış antikorlar uzaklaştırılır. Sonra bu komplekse türe spesifik antiglobulin eklenir. Aglutinasyon şekillenmesi pozitif olarak değerlendirilir.

6-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA): Bu test antikor ya da antijeni saptamak için direkt veya indirekt olarak uygulanabilmektedir.

*Son yıllarda Brucellosis'in teşhisinde indirekt ELISA daha çok kullanılan duyarlı ve güvenilir bir test olup doğrulama testi olarak da yararlanılmaktadır.

*Yukarda açıklanan testlere göre daha spesifik ve çoğu zaman da duyarlı olan ELISA'dan, özellikle, saha taramalarında yararlanılmaktadır.

*Bu teknikte tercih edilen konjugata (anti-immunoglobulin) bağlı olarak tüm immunoglobulin sınıf ve alt sınıfları ayrı ayrı belirlenebilmektedir.

*Yakın zamanlarda, monoklonal antikor kullanılarak uygulanan Kompetitif ELISA'in de Ig sınıflarının saptanması ve aşılı hayvanları ayırmada yardımcı olan bir test olarak uygulandığı ileri sürülmektedir.

7-Pasif Hemaglutinasyon Testi: Spesifik ve duyarlı olduğu bildirilen bu yöntemden de Brucellosis'in teshisinde yararlanılmaktadır.

8-Fluoresans Antikor Tekniği (FAT): Bu testin, özellikle, sığır Brucellosis'inin teşhisinde yarar sağladığı, spesifik ve duyarlı bir test olarak uygulandığı ileri sürülmektedir.

B) Süt ve Süt Serumı ile Yapılan Serolojik Testler

1-Ring Test: Bir saha tarama testi olarak yararlanılan bu test, reaktör sürüleri ortaya koymada öneme sahiptir.

-Bu testin esası sütle çıkartılan antikorların saptanmasıdır.

-Hematoksilen veya tetrazolium'la boyanmış antijenden 1 ml. süt için 1 damla damlatılarak oda ısısında bekletilir. Şayet süt üzerinde kırmızı veya mavi renkte bir halka oluşursa pozitif olarak değerlendirilir. Homojen dağılım ise negatiftir.

2-Süt Serumı ile Aglutinasyon Testi:

-Hastalıktan şüpheli hayvanlardan alınan yeterli miktardaki süt örnekleri laboratuvarında 3000 dev/dak ile 10-15 dakika santrifüje edildikten sonra tortu ve yağ kısmı atılarak sadece süt kısmı alınır.

-Bunun her ml'sine peynir mayası (rennin) katılarak 37 °C'de su banyosunda 6 saat bekletilir. Berrak olan sıvı alınarak tekrar santrifüje edilir ve bu şekilde elde edilen süt serumu aynen kan serumu gibi işlenir.

-Süt serumu ile aglutinasyon tıpkı kan serumundaki gibi tüpte ve lamda uygulanabilir. Hastalığın teşhisinde, süt serumu kan serumu kadar değerli değildir.

C) Diğer Testler

1-Vaginal Mukus Aglutinasyon Testi: Hastalıktan şüpheli ineklerden alınan vaginal mukus, fenollü fizyolojik tuzlu su ve santrifügasyon yardımı ile klarifiye edildikten sonra yavaş tüp aglutinasyon testi uygulamak suretiyle değerlendirme yapılır.

2-Sperma ile Aglutinasyon Testi: Erkek hayvanlardan alınan sperma kuvvetlice santrifüje edildikten sonra üst kısım (seminal plazma) alınarak yavaş tüp aglutinasyon testine tabi tutularak değerlendirme yapılır.

3-Kas sıvısı ile Aglutinasyon (Myoaglutinasyon): Atılmış yavrunun kas parçaları ezilip, homojenize edilerek, santrifügasyondan sonra üst sıvı yavaş tüp aglutinasyon testinde kullanılır.

4-Bakteriyofaj Testi: Brucella etkenlerinin identifikasyonunda Tibilisi (Tb), Weybridge; Berkeley ve Anti Rough fajlarından yararlanılmaktadır.

-Steril bir pamuk tamponla çizgi halinde kesif bir Brucella suspansiyonundan ekim yapıldıktan sonra üzerinde bir damla faj dilusyonlarından (RTD) konulur ve 48 saat 37 °C'de inkubasyondan sonra lize olma durumu gözlenerek değerlendirme yapılır.

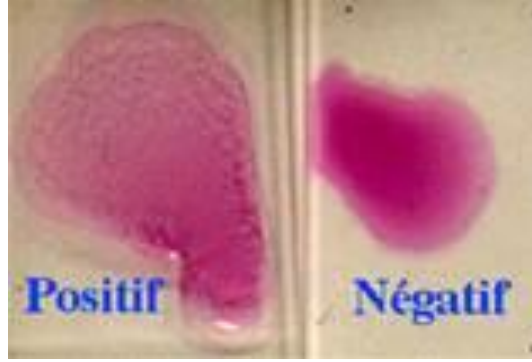
5-Allerjik Testler: Bazı ülkelerde sığır, koyun, keçi ve domuz Brucellosis'ini ortaya çıkarmak için allerjik testler kullanılmaktadır.

- Genellikle, Brucellin olarak bilinen allergenlerle (Brucella lysate, Brucellergen, Melitin, MBP vs.) yapılan bu test daha ziyade sığır, koyun ve keçilerin kuyruk altı derisine 0.1-0.2 ml miktarında uygulanmaktadır. Domuz ve keçilerin kulak üstü ve sığırların koyun derisi altına da 0.5 ml verilmektedir.

- Aşılanmamış sürülerde infeksiyonun belirlenmesinde büyük önem taşıyan bu test, aşı ve doğal bir infeksiyon sonucu iyileşen hayvanlarda geçerli olmamaktadır.



Brucella türleri mikroskopik görünümü



Rose Bengal testi yorumlanması

Uygulamanın adı	Bartonella türleri morfolojik yapıları ve laboratuvar teşhisi
Yapılacağı hafta	15
Uygulamanın temel hedefi	Bartonella türleri identifikasyonu
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Besiyeri, öze, öze ucu, lam, serum fizyolojik, mikroskop, bünzen beki, gram boyama seti, mikroskop, bakteri kültürü, dezenfektan, alkol, pamuk.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

Mikroskopik olarak bütün Bartonella türleri Gram negatif, kokobasil veya hafifçe kıvrık çomaklardır (0.6 x 1.0 μ m). *B. bacilliformis* ve *B. clarridgeiae* flagellalıdır. Diğer Bartonella türleri flagellasızdır. *B. tribocorum*'da fimbriaya benzeyen polar yapılar gözlenmiştir. *B. quintana* ve *B. henselae* pilusla ilişkili twitching (seğirme) şeklinde bir hareket gösterirler. İnfekte dokularda Warthin-Starry silver impregnation (gümüşle doyurulmuş) boyası ile sıkı şekilde yoğunlaşmış organizma kümeleri şeklinde, küçük basiller görülür. Benzer şekilde küçük organizmalar MayGrünwald Giemsa boyaması ile kırmızı kan hücreleri içerisinde identifiye edilebilir. Klinik olarak hastalığın teşhisi güçtür. Özellikle köpeklerde Bartonella infeksiyonlarının Borrelia, Babesia, Ehrlichia gibi kronik, subklinik infeksiyonlardan ayırt edilmesi gereklidir.

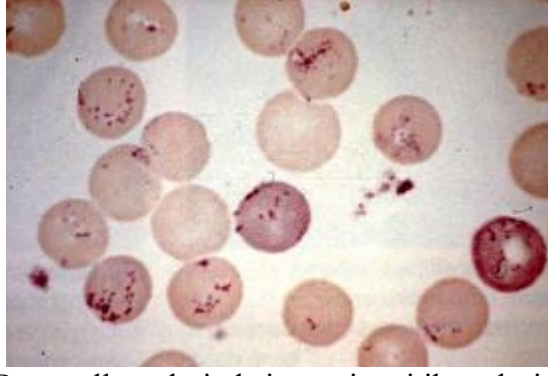
Etkenlerin spesifik konakçısında İntraeritrositik olması kanı kültür materyali larak ön plana çıkarmıştır. Bakterinin hemine bağımlı olması kullanılan agara %5-7 tavşan kanı, koyun kanı veya at kanı eklenmesini gerektirir. Besiyeri olarak kalp infüzyon agar, Columbia agar, Trypticase Soy agar, Mueller Hilton agar, çikolata agar kullanılabilir. Lizis solusyonu içeren izolatör santrifüj tüpleri veya EDTA'lı kan örneklerinin 70°C'de 24 saat dondurulup çözöldükten sonra bir kanlı agara inokulumun ekilmesi ile kandan Bartonella türlerinin izole edilmesi başarılmıştır.

Besiyerleri ekimler yapıldıktan sonra 35°C veya 37°C'de %5 CO₂'li ve yüksek oranda rutubetli ortamda inkube edilir. Koloniler 5-15 gün arasında görölmeye başlar, 45 gün inkübasyondan sonra üreme yok ise negatif olarak kabul edilir. Üreyen kolonilerin mikroskopik muayenesinde Gram negatif küçük çomaklar gözlenir. Biyokimyasal olarak Bartonella türleri katalaz, oksidaz, üreaz ve nitrat redüktaz negatiftir.

Bartonella türlerinin ayırımında PCR amplifikasyonu ve değişik genlerin sekans analizi kullanılır. Kültür süresinin uzun olması, etkenlerin zor üremesi ve bu süre zarfında saprofitik mantar kontaminasyonunun olması gibi olumsuzluklar karşısında üreyen kolonilerden tür tayini yerine direkt kandan PCR amplifikasyonu yapılmaktadır.

Bartonella türlerinin subtipinin, filojenik özelliklerinin sınıflandırılmasında ve identifikasyonunda;

16S/23S rRNA intergenik ara bölgesinin ısı şok protein geni (groEL),
sitraz sentez geni (gltA),
riboflavin sentez geni (Ribe) ve
pap31 gen dizilişleri kullanılmıştır.



Bartonella türlerinde intraeritrositik yerleşim