

VET 504
KLİNİK LABORATUVAR TANI
UYGULAMA KİTAPÇIĞI



2021

Uygulamanın adı	Biyogüvenlik uygulamaları, İnfeksiyonların bulaşması ve yayılması; mikroorganizmaların vücuda giriş yolları, vücutta yayılması, vücuttan çıkışı, mikroorganizmaların bulaşma şekilleri, infeksiyonların yayılması ile ilgili faktörler
Yapılacağı hafta	1
Uygulamanın temel hedefi	İnfeksiyonların bulaşması ve yayılması; mikroorganizmaların vücuda giriş yolları, vücutta yayılması, vücuttan çıkışı, mikroorganizmaların bulaşma şekilleri, infeksiyonların yayılması ile ilgili faktörler
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ			
MİKROORGANİZMALARIN	VÜCUDA	GİRİŞ	YOLLARI
<ul style="list-style-type: none"> • Mikroorganizmaların vücuda giriş yolları şunlardır •Sindirim sistemi yoluyla <ul style="list-style-type: none"> -İnfeksiyöz etkenler, kontamine yem ve sular ile vücuda girer. •Solunum sistemi yoluyla <ul style="list-style-type: none"> -Hava çok sayıda mikroorganizma içerir ve bu etkenler soluk havası ile alınabilirler. -Bu etkenlerin çoğu üst solunum yollarında tutulur, daha küçük yapıda olanlar (viruslar, mikoplazmalar) akciğerlere kadar inerler. -Solunum sistemine giren etkenler genellikle solunum sistemi infeksiyonlarına neden olurlar. •Ürogenital sistem yoluyla <ul style="list-style-type: none"> •Mikroorganizmalar dişi genital kanalına çiftleşme, suni tohumlama yoluyla veya vulvadan direk temas ile girerler. •Erkek genital kanalına ve üriner sisteme dışarıdan giriş ise çok ender görülür. Erkek ve dişi genital ve üriner sistemlerine desendens yolla yayılan etkenler de vardır. •Deri yoluyla <ul style="list-style-type: none"> -Sağlam deri çoğu etkenin vücuda girişine izin vermez, ancak yaralanma ve yanık gibi deri bütünlüğünün bozulduğu durumlarda deride bulunan veya çevreden bulaşan mikroorganizmalar bu yolla vücuda girebilirler. -Bazı etkenler sağlam deriden de vücuda girebilirler (örn; brusella, leptospira). •Göz ve kulak mukozası yoluyla <ul style="list-style-type: none"> -Çoğu göz patojenleri (örn; <i>Moraxella bovis</i>, <i>Mycoplasma conjunctivae</i>) ve bazı mukoza patojeni viruslar (örn; sığır vebası virusu) göz mukozasından girebilirler. -Kulak mukozası ile giriş yolunu daha çok fırsatçı patojenler kullanır. •Dolaşım sistemi yoluyla <ul style="list-style-type: none"> -Normal koşullarda mikroorganizmalar dolaşım sistemine direk olarak ulaşamazlar. Ancak, derin yaralanmalar, operasyonlar, injeksiyon ve kan emici arthropodların bulunduğu durumlarda kan dolaşımına direk mikroorganizma girişi olabilir. •Meme yoluyla <ul style="list-style-type: none"> -Çevrede veya meme başında bulunan mikroorganizmalar, meme başı kanalından 			

içeri girebilirler.

–Normal meme başı kanalı kapalıdır, ancak sağım ve sonraki bir saat için açık kalır ve etken girişine izin verir.

MİKROORGANİZMALARIN VÜCUTTA YAYILMASI

•Hücrelerarası yayılma

–Özellikle invazif karakterdeki mikroorganizmalar ve viruslar, vücuda giriş noktalarında veya kolonize oldukları yerlerde hücreden hücreye yayılabilirler.

–Bu yayılma şekli deride, mukoz membranlarda ve iç organ hücrelerinde görülebilir.

•Örneğin; *Salmonella typhi* barsak hücrelerinden bu şekilde yayılır.

•Deride bulunan stafilokok ve streptokoklar, uygun koşulları bulduklarında, hücreden hücreye yayılarak derinin derin katlarına ulaşırlar.

•Karaciğer lezyonlarındaki tüberküloz etkenleri de bu şekilde yayılır.

•Fagositik hücrelerle yayılma

–invazif bakterilerin çoğunluğu makrofajlar tarafından fagosite edilmelerine karşın, bu hücreler içinde öldürülemezler. Dolayısıyla, bakteriyi fagosite eden hücre vücudun bir bölgesinden diğerine göç ettiği zaman bakteriyide oraya taşımış olur.

•Tüberküloz olaylarındaki metastaz olayı genellikle bu şekilde olur.

•Kan yoluyla yayılma

–invazif bakterilerin bir kısmı kanı sadece yayılma, bir kısmı da hem yayılma hemde üreme aracı olarak kullanırlar.

–Kanı yayılma aracı olarak kullanan bakteriler, vücuda girdikten sonra kana geçer, burada bakteriyemi dönemi geçirdikten sonra affinite duydukları organa yerleşirler.

•Örneğin; *Brucella abortus* ve *Campylobacter fetus subsp fetus* vücuda girip kanda bakteriyemi dönemi geçirdikten plasentaya yerleşirler.

•Tavuk kolerasının etkeni *Pasteurella multocida* ise kanı hem yayılma aracı olarak hem de üreme aracı olarak kullanır.

•Lenf yoluyla yayılma

–Bazı mikroorganizmalar vücutta üredikten sonra lenf dolaşımı ile yayılır ve lenf yumrularına yerleşirler (Örn; *Francisella tularensis*, *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*).

•Sinir yoluyla yayılma

–Bazı enfeksiyöz etkenler sinir yoluyla yayılırlar

•Örn; Kuduz virusu periferik sinirden vücuda girer ve sinir boyunca beyine doğru ilerler.

MİKROORGANİZMALARIN VÜCUTTAN ÇIKIŞI

•Deri yoluyla

–Deride enfeksiyon oluşturan etkenler yine deri salgıları ile vücuttan çıkar ve çevreye yayılırlar

•Örneğin; çiçek virusu, Marek hastalığı virusu, anthraks etkeni, ruam etkeni ve deri tüberkülozu etkeni.

•Solunum sistemi yoluyla

–Solunum sisteminde yerleşen etkenler buradan burun akıntısı, mukoid salgı-lar ve öksürük (damlacık enfeksiyonu) vasıtasıyla dışarı çıkarlar. Damlacık enfeksiyonu kümes ve ahır gibi kapalı barınaklarda tutulan hayvanların solunum sistemi hastalıklarında önemli bir role sahiptir.

•Sindirim sistemi yoluyla

–enfeksiyöz etkenler sindirim sisteminden iki yolla çıkarlar; dışkı ve kusma.

•Ürogenital sistem yoluyla

–idrara ile ancak spesifik hastalık etkenleri vücut dışına çıkar.

•Örneğin; *Corynebacterium renale*, *Leptospira* türleri.

–infeksiyöz etkenler dişi genital kanalından vaginal akıntılar, amnion sıvısı ve atık fetus vasıtasıyla çıkarlar.

•Örneğin; genital infeksiyonlara neden olan *Mycoplasma* türleri, *Haemophilus somnus*, abortusa neden olan tüm mikroorganizmalar.

– infeksiyöz etkenler erkek genital kanalından sperm yoluyla çıkarlar

•örn; venereal infek-siyon etkenleri.

•Salgılar yoluyla

–Mastitis etkenleri ve bazı infeksiyöz etkenler süt ile vücut dışına çıkarlar.

•Örneğin; mastitis etkeni olan stafilokok ve streptokok türleri, veya *Brucella abortus* ve *Brucella melitensis*.

–Göz infeksiyonu oluşturan infeksiyöz etkenler (örn; *Moraxella bovis*, *Mycoplasma conjunctivae*) veya sistemik infeksiyon etkenleri (örn; sığır vebası virusu) gözyaşı ile de vücut dışına çıkarlar.

MİKROORGANİZMALARIN BULAŞMA ŞEKİLLERİ

•VERTİKAL BULAŞMA

•İnfeksiyöz etkenlerin bir generasyondan diğerine taşınmasına denir. Bu şekilde bulaşan yavru infekte olarak doğar.

–HEREDİTER BULAŞMA→ genetik olarak genoma bağlı olan bulaşma şeklidir. Örn: retroviruslar

–KONGENİTAL BULAŞMA→ çiftleşmenin herhangi bir anından doğuma kadar geçen sürede oluşan bulaşmadır. Memelilerde uterus, kanatlılarda yumurta yolu ile olur.3 şekilde olabilir:

•GERMİNAL BULAŞMA→ ovum vasıtası ile olan bulaşmadır. Genellikle kanatlılarda gözlenir.örn: salmonella-mycoplasma

•PLASENTAL B.→ örn; mavi dil – kedi panlökopenisi

•DOĞUMDA B.→ doğum anında ananın alt genital kanalında bulunan etkenler yavruyu bulaştırabilir. Bu yolla genellikle fekal etkenler bulaşır. Örn: C.jejuni

•HORIZONTAL BULAŞMA

•Populasyondaki bireyler arasında oluşan bulaşmadır. Diğer bir deyişle; postuterin bulaşmadır. Ve doğumdan sonraki dönemlerdeki bulaşma şekli bu gruba girer.

–DİREKT BULAŞMA

•Temas sonucu olur.→ venereal – fekal-oral – hava kökenli bulaşma=damlacık enfeksiyonu

–İNDİREKT BULAŞMA

•Hastalık etkeninin bir konakçıdan diğerine canlı veya cansız araçlar veya insan vasıtasıyla taşınmasıdır.

•İATROJENİK B.→Tıbbi veya cerrahi bir müdahale sırasında hekimin hayvanı infekte etmesidir.

•CANSIZ ARACILAR İLE B.→ yem vs.gibi. Rüzgarla taşınan infeksiyöz etkenler, Fomit

•CANLI ARACILAR İLE B.→ vertebralı olanlarına REZERVUAR; vertebrasız olanlara ise VEKTÖR denir. Vektörler;

–Mekanik Vektör : hastalık etkeni vektörde hiçbir üreme ve gelişme dönemi geçirmiyorsa M.V. denir.

–Biyolojik Vektör: hastalık etkeni duyarlı konakçı hayvana geçmeden önce vektörün vücudunda yaşam siklusunun bir bölümünü geçiriyorsa B.V. denir.

Uygulamanın adı	Epidemiyolojik araştırma tipleri; kalitatif araştırma, kantitatif araştırma; analitik deneysel araştırma, analitik gözlemsel araştırma, model çalışması ve sürekli gözlem
Yapılacağı hafta	2
Uygulamanın temel hedefi	Epidemiyolojik araştırma tipleri; kalitatif araştırma, kantitatif araştırma; analitik deneysel araştırma, analitik gözlemsel araştırma, model çalışması ve sürekli gözlem
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ
<ul style="list-style-type: none"> ⊙ Sahada hastalığın ve hastalık nedenlerinin gözlenmesi anlamına gelir. ⊙ Epidemiyolojik bir araştırmanın genellikle ilk adımıdır. ⊙ Hastalığın ; <ul style="list-style-type: none"> > dağılımı, > boyutları, > görülme zamanı, > etkilenen türler ve populasyonlar, > hastalık sıklığı , > yeni vakaların görülmesi, > olası etken,konakçı ve çevre faktörleri ve bulaşma yolları gibi yönlerini kapsar. ⊙ Seçilen veya oluşturulan gruplarda hastalığın gözlenmesi anlamına gelir. ⊙ Deneysel epidemiyolojide genellikle bir hipotezin test edilmesi amaçlanmıştır. ⊙ Deneysel epidemiyolojide; populasyon içinde mutlaka kontrol grupları bulunur. ⊙ Tanımlayıcı ve deneysel epidemiyoloji gözlemlerinin kantitatif veriler haline çevrilip, matematiksel ve istatistiksel yöntemler ile değerlendirilmesini kapsayan epidemiyoloji dalıdır. ⊙ Genellikle hipotez edilen ilişkilerin istatistiksel önemi belirlenir. <p>EPİDEMİYOLOJİK ARAŞTIRMA EPİDEMİYOLOJİK ARAŞTIRMA TIPLERİ</p> <ul style="list-style-type: none"> • Epidemiyolojik araştırmalar, amacına ve kullanılan yöntemlere göre çeşitli bölümlere ayrılabilir. <p>I.KALİTATİF İNCELEME II.KANTİTATİF ARAŞTIRMA</p> <p>A.Analitik deneysel araştırma B.Analitik gözlemsel araştırmalar</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.Kesit (kros-seksiyonel) çalışma 2.Longitudinal çalışmalar <ol style="list-style-type: none"> a.Vaka kontrol çalışması b.Kohort çalışma <p>C.Model çalışması D.Sürekli gözlem</p>

•I.KALİTATİF İNCELEME

Kalitatif epidemiyolojik inceleme, hastalık ve olası nedenleri üzerindeki subjektif gözlemlere dayanır. Bu gözlemler hastalığın doğal koşullardaki dağılımı, yayılması, konakçıları, ekolojisi ve infeksiyöz hastalıkların bulaşması ile ilgili olabilir. Kalitatif incelemede ölçüm veya sayım yapılmaz; bir hastalık üzerinde veya bir problem üzerinde subjektif gözlem yapılır. Bunun sonucunda, hastalıklara direk veya indirek yolla neden olabilecek etkenler ve hastalıkla ilişkili faktörler hakkında önfikir elde edilir. Bu nedenle kalitatif inceleme, tanımlayıcı epidemiyolojinin çalışma yöntemi olarak da nitelenebilir. Saha gözlemleri sırasında, bazı faktörlerin hastalıkla ilişkisi olduğundan şüphelenilirse, bu ilişkiyi değerlendirmek için sebep hipotezi kurulur.

- Kalitatif inceleme 1940'lı yıllara kadar epidemiyolojinin başlıca çalışma şekli olmuştur. Bu dönemden sonra epidemiyoloji daha çok kantitatif araştırmalara yönelmiştir. Ancak bu, kalitatif incelemelerin epidemiyolojik değeri olmadığı veya günümüzde kullanılmadığı anlamına gelmez. Bugün tüm yönleri ile anlaşılmış hastalıklar hakkındaki bilgilerin çoğu başlangıçta kalitatif gözlemler sayesinde elde edilmiştir. Böyle hastalıklarda artık kalitatif inceleme yapma gereği kalmamıştır. Ancak, bugün yeni bir hastalık ortaya çıkarsa, ilk olarak kalitatif gözlem yapılması gerekecek ve buna göre analitik çalışmalara geçilecektir. Diğer bir deyişle, kalitatif gözlem epidemiyolojik araştırmamanın ilk aşamasıdır.

•II.KANTİTATİF ARAŞTIRMALAR

- Kantitatif epidemiyolojik araştırma, hastalık olayları ve bununla ilgili faktörler hakkındaki sayısal verilerin edilmesi ve bunların numerik analizi-nin yapılması temeline dayanır. Kalitatif incelemenin aksine, bunda esas olan sayım veya ölçüm yapılması ve bunların analitik yöntemler kullanılarak yorumlanmasıdır. Bu nedenle, kantitatif araştırmalar, analitik epidemiyoloji-nin çalışma yöntemi olarak nitelenebilir.

•ANALİTİK DENEYSEL ARAŞTIRMALAR

- Belirli bir çiftlikte, hayvancılık işletmesinde veya araştırma kurumunda kontrollü koşullarda ve özel seçilmiş hayvanlarda deneysel yolla oluşturulan hastalıklar üzerinde yapılan çalışmaya deneysel araştırma denir. Bu tip araştırmada, araştırmacı hastalıkla ilgili faktörleri içeren gruplar oluşturabilir. Deneysel araştırmalardaki en önemli amaçlar, şüpheli hastalık etkenlerinin hastalık oluşumundaki rollerinin belirlenmesi veya hastalık oluşumunda konakçı özellikleri ve çevre koşullarının rollerinin saptanmasıdır. Bu yüzden hayvanlar, farklı yaş, cinsiyet, ırk ve kontrol gruplarına, şüpheli hastalık etkenlerine veya farklı çevre koşullarına maruz bırakılacak gruplara ayrılabilir. Yine bu tip araştırmalarda, çalışma devam ederken, gruplarda veya gruplarla ilgili faktörlerde değişiklikler yapmak mümkündür. Böyle araştırma-lardan elde edilen veriler analitik yöntemler kullanılarak yorumlanır ve hastalık özelliklerinin tanımlanmasında (tanımlayıcı epidemiyoloji) kullanılır.

- Deneysel araştırmaların, sahada yapılan araştırmalara (doğal hastalık vakalarının gözlenmesine dayanan araştırmalara) göre bazı avantajları ve dezavantajları vardır. Bunların başlıca avantajları; az sayıda araştırmacıya gereksinim göstermesi, kontrollü koşullarda gerçekleştirilebilmesi, birçok faktörün aynı anda değerlendirilebilmesi ve en önemlisi, hastalık nedenlerinin direk olarak saptanabilmesidir. Deneysel araştırmaların dezavantajları arasında, maliyetin yüksek olması ve sınırlı sayıda hayvan kullanılabilmesi-dir. Bu araştırma tipinin en önemli dezavantajı ise, hastalığın doğal koşul-lardaki davranışı ile özdeşleştirilememesidir. Diğer bir deyişle, hastalığın doğal koşullardaki davranışının, deneysel araştırmada belirlenen formlara mutlaka uyacağı hiç bir zaman söylenemez.

•ANALİTİK GÖZLEMSEL ARAŞTIRMALAR

• Doğal koşullarda oluşan hastalıkların, oluştukları ortamda izlenmesine ve analiz edilmesine dayanan araştırma tiplerine gözlemsel (obzervasyonel) araştırmalar denir. Böyle araştırmalar, doğal olayları kapsadığı "saha çalışması" şeklinde ve analitik yöntemler kullanıldığı için "analitik çalışma" şeklinde de nitelenebilirler. Gözleme dayalı araştırmaların amacı ve temel yaklaşımı, deneysel araştırmalar ile aynıdır. Gözlemsel araştırmalarda da hayvanlar bilgilerin toplanması veya değerlendirilmesi aşamasında gruplara ayrılabilir-ler; örneğin, hasta ve sağlıklı hayvanlar veya hastalık etkenine maruz kalanlar ve kalmayanlar şeklinde. Böyle çalışmalar sırasında, araştırmacının gruplarla ilgili faktörlerde değişiklik yapması söz konusu değildir, çünkü hastalık doğal seyrini takip etmektedir.

•Gözleme dayalı araştırmaların avantajları, hastalıkların çok sayıda hayvan üzerinde ve doğal ortamında izlenebilmeleridir. Bu nedenle, araştırmadan elde edilen bulgular hastalığın doğal koşullardaki davranışı hakkında fikir verir ve diğer hayvan popülasyonları için de genelleştirilebilir. Gözlemsel araştırmaların en önemli dezavantajları, çok sayıda araştırmacıya gereksinim duyması, sınırlı sayıda parametrenin değerlendirilebilmesi ve direk sebep-sonuç ilişkisinin kurulamaması yani tanımlayıcı amaçla kullanılamamasıdır.

• Analitik çalışmalar belli bir zaman kesitinde (kesit çalışma) ve belli bir periyotta (longitudinal çalışma) yapılabilir.

•Kesit Çalışma

• Kesit çalışma (kros-seksiyonel çalışma) belli bir zaman kesitinde hastalıkların veya enfeksiyonun saptanması esasına dayanır. Bu tip çalışmada çeşitli popülasyonlardaki veya popülasyon içi gruplardaki hastalık prevalansı saptanır ve hastalık determinantlarının hastalık üzerindeki etkileri incelenir. Bunun için hasta ve sağlıklı olarak veya etkene maruz kalma durumuna göre sınıflandırılan hayvanlarla ilgili bilgiler toplanır ve numerik analize tabi tutulur. Böylece çeşitli faktörlerin hastalık prevalansı üzerindeki etkisi belirlenir. Kesit çalışmada gözlem belli bir zamanda bir kez yapıldığı için, bu tip araştırma, zaman içinde değişmeyen determinantların (yaş, ırk, cinsiyet, yer) etkilerini saptamak için daha uygundur. Örneğin; bir popülasyondaki sığırlar, kısırılık yönünden klinik olarak ve üreplasmalar yönünden bakteriyolojik olarak bir kez taranmış olsun. Burada, popülasyon-daki infertilite ve üreplasma prevalansı saptanmış olacaktır. Ayrıca, üreplasma ile infertilite arasındaki ilişki olup olmadığı belirlenecektir. Ancak, bu tip çalışmalarda mantıklı olarak üreplasmaların infertiliteye yol açtığı kanısına varılsa bile, hiç bir zaman infertil sığırlarda üreplasmaların daha kolay yerleştiği şeklindeki bir görüş de reddedilemez.

Uygulamanın adı	Hastalıkların kontrolü ve eradikasyonu; hastalık kontrol ve eradikasyon yöntemleri, kontrol ve eradikasyonu etkileyen faktörler, önemli infeksiyöz hastalıkların kontrolü ve eradikasyonu
Yapılacağı hafta	3
Uygulamanın temel hedefi	Hastalıkların kontrolü ve eradikasyonu; hastalık kontrol ve eradikasyon yöntemleri, kontrol ve eradikasyonu etkileyen faktörler, önemli infeksiyöz hastalıkların kontrolü ve eradikasyonu
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ
<ul style="list-style-type: none"> Epidemiyolojik olarak, bu hastalıkların nedenlerinin, diğer faktörlerle ilişkilerinin, yayılmasının veya bulaşmasının araştırılmasına yönelik çalışmalar yapılır. Araştırma alanını belirlemek için öncelikle daha önce yapılmış çalışmaların (literatürün) bilinmesi gerekir. Literatürün incelenmesi, daha önce yapılmış çalışmalardaki bulguların ve metodların öğrenilmesine olanak sağlar. Böylece, daha önceden yapılmış bir çalışma tekrarlanmamış olur, bu çalışmalardaki aksaklıklar ve hatalar görülür ve planlanan çalışma için en uygun yol çizilir. Bunlar değerlendirildikten sonra araştırmanın amacı ve bu amaca ulaşmak için gerekli olan bilgiler belirlenir. Yukarıdaki değerlendirmeleri yapmak için sorulacak sorular şu şekilde özetlenebilir; Problem araştırmaya değer mi? <ul style="list-style-type: none"> EVET HAYIR Problemi açıklayabilecek veriler mevcut mu? (literatür ve kayıt) <ul style="list-style-type: none"> EVET HAYIR Bu çalışmayı yapmak için yeterli bilgi kaynağı varmı? <ul style="list-style-type: none"> EVET HAYIR Araştırma yapılmaya uygundur. Çalışmayı planlarken verilerin hangi kaynaklardan ve ne şekilde toplanacağı da göz önüne alınır. Bunun için hedeflenen amaca en uygun olan en ucuz veri kaynağı veya veri toplama yolu seçilir. Mevcut verilerin istenen amaca uygun olmadığı anlaşılırsa, yeni veri kaynakları belirlenir. Amacın kesin sınırları bir hipotez ile belirlenir. Epidemiyolojik bir hipotezde şu unsurlar bulunmalıdır; <p>Çalışılacak populasyon: Problem içeren populasyonun sınırları ve özellikleri belirlenir. Buna hedef populasyon denir. Pratik nedenlerle çoğunlukla hedef populasyonlardan daha küçük boyuttaki populasyonlar seçilir. Böyle durumlarda, örnek populasyonun, hedef populasyonlardan elde edilecek bulguları yansıtacak nitelikte olması gereklidir. Çoğunlukla hedef populasyon içindeki farklı gruplarda değerlendirilmeler yapılması gerekir. Örneğin, bir populasyonda hastalığın prevalansı yanında, populasyon içindeki çeşitli grupların hastalık prevalansının da saptanması amaçlanabilir. Bu durumda, gruplardaki hayvanların değerlendirme yapılabilecek sayıda olması gerekir. Populasyondaki örnek üniteleri belirlerken de göz önünde tutulması gereken noktalar vardır. Örneğin; çalışmanın başlangıcında buzağı olarak alınan bir ünite, zaman geçince ne olarak nitelenecektir? Veya sürü kavramının boyutu nedir? Bin hayvanlık bir sığır sürüsü gibi, 10 hayvanlık bir sığır</p>

grubu da sürü olarak nitelenebilir.

- *Dikkate alınacak determinantlar:* Çalışmada değerlendirilecek hastalık determinantlarının belirlenmesinde göz önüne alınacak noktalar vardır. Örneğin; stres, iklim ve bakım gibi determinantlar ne derecede belirlenebilir? Bu determinantlar nasıl ölçülür? Bu ölçüm yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları nelerdir? Bu yöntemler bu kriterleri ölçmede ne kadar yeterli olabilir?
- *Dikkate alınacak hastalık veya hastalıklar:* Hangi hayvanların incelenen hastalıktan etkilendiklerinin bilinmesi gerekir. Örneğin; hastalık sadece klinik belirtilere göremi saptanacaktır? Eğer böyleyse hangi belirtilere göre teşhis yapılacaktır? Ayırıcı teşhiste sorun olacaktır mı? Teşhisin laboratuvarında desteklenmesi gerekecektir? Eğer gerekecekse, bunun için yeterli laboratuvar yöntemleri var mıdır? Bu yöntemler tüm örnekler için uygulanabilecek midir? Diagnostik testler kullanılacaktır ve bunlar yeterlidir?
- Hangi oranlar hesaplanacaktır? Örneğin, insidens ve atak oranı kesit çalışmalarıyla saptanamaz. Eğer hastalığın yol açtığı ekonomik kayıplar hesaplanacaksa, çeşitli üretim verilerinin de bilinmesi gerekir.
- *Determinantın hastalık sıklığı üzerindeki etkisi:* Determinant sıklığının hastalık sıklığı üzerindeki etkisi göz önüne alınmalıdır. Determinantların etkilerini, hastalıktan önce gösterdiklerinin unutulmaması gerekir. Bu yüzden, örneğin, retrospektif çalışmalarda determinantın etkisini saptamak güçtür.
- *Biyolojik mantık:* Epidemiyolojide hastalık verileri üzerinde ilişkiler, özellikle neden ilişkileri kurulmaya çalışılır. Ancak şans eseri bir hastalık ile determinant arasında kurulan ilişkiyi mutlaka doğru olduğu söylenemez. Bu yüzden kurulan ilişkinin biyolojik anlamda mantıklı olması da gerekir.
- Unutmamak gerekirdi, bir hastalığı en basit şekilde açıklayan hipotez en doğru hipotezdir. Kompleks hipotezleri test etmek güçtür. Yukarıda belirtilen noktalar, bir epidemiyolojik araştırmanın dikkatli ve detaylı olarak planlanması gerektiğini göstermektedir. Ayrıca, araştırılacak konu hakkında detaylı bilgilere ihtiyaç vardır.

Uygulamanın adı	Mikroorganizmaların üretilmesi, besiyerleri hazırlanması ve ekim yöntemleri
Yapılacağı hafta	4
Uygulamanın temel hedefi	Mikroorganizmaların üretilmesi, besiyerleri hazırlanması ve ekim yöntemleri
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Besiyeri, otoklav, petri kabı, öze, svap, cam baget
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

Besiyerleri

○ Mikroorganizmaların uygun çevre koşulları sağlanarak in vivo veya in vitro ortamlarda üretilmeleri işlemine kültür yapmak, besleyici ortamda üretilmiş olan mikroorganizmaların tümüne kültür adı verilir.

○ Bakteri ve mantarların çoğu in vitro olarak besiyeri adı verilen cansız ortamlarda üretilirler.

○ Mikroorganizmaları ilk olarak besiyerinde üretebilen bilim adamı Robert Koch'tur.

○ Koch 1876 yılında *Bacillus anthracis*'i besiyerinde üretmiştir.

Agar

● Agar, agarophytes olarak tanımlanan *Gellidium*, *Gracilaria*, *Pterocladia* vb deniz yosunlarından elde edilen bir galaktoz polimeridir.

● Katılaştırma özelliğini içinde bulunan D-galakton sağlar.

● Normal inkübasyon ısı derecesinde erimemesi ve uzun dallanmış zincir yapısından dolayı mikroorganizmalar tarafından besin maddesi olarak kullanılmaması jelatine olan üstünlükleridir.

Fiziksel Özelliklerine Göre Besiyerleri

○ Sıvı besiyerleri

○ Yarı-katı besiyerleri

○ %0,05-0,5 agar

○ Katı besiyerleri

○ %0,5-3 agar

Kimyasal Özelliklerine Göre Besiyerleri

○ Sentetik veya kimyasal yapıları tam olarak bilinen besiyerleri

○ Sentetik olmayan veya kompleks besiyerleri

Kullanım Amaçlarına Göre Besiyerleri

○ Temel besiyerleri

○ Seçici besiyerleri

○ Zenginleştirici besiyerleri

○ Ayırt edici (identifikasyon) besiyerleri

○ Taşıma besiyerleri

○ Saklama besiyerleri

Temel Besiyerleri

○ Buyyon:

- Pepton (%1)
- Et özütü (%1)
- NaCl (%0,5)
- Distile su
- Adi agar (Jeloz):
- Buyyon+%2-3 agar
- Seçici Besiyeri
- EMB
- MacConkey

○Gram negatiflerin üremesi kristal viyole ve safra tuzları tarafından baskılanır.

Zenginleştirici Besiyeri

- Selenit F

○Salmonella ve Shigella için

İdentifikasyon Besiyeri

- Sitrat

- Üre

Taşıma Besiyeri

- Amies

- Stuard

○Amies besiyeri oksijeni absorbe eder. Bu nedenle anaerop örneklerin taşınması için uygundur.

Saklama Besiyeri

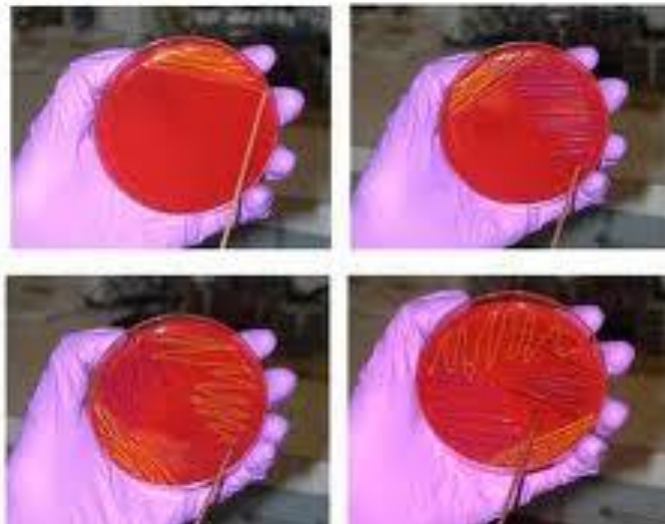
- Gliserinli Triptik soy broth

○İzole edilen kökenlerim -20 veya -70 C'de saklanmasında kullanılır.

Besiyerlerinde kalite kontrolü

- Sterilliği denetleme

○Mikroorganizmaları üretebilme, seçicilik, zenginleştirme ve biyokimyasal özelliklerini saptayabilme açısından uygunluğunu denetleme.



Seyreltme yöntemi ile katı besiyerine ekim yöntemi

Uygulamanın adı	Gram boyama, Ziehl-Neelsen boyama, Mantar boyama, Preparatların incelenmesi ve yorumlanması
Yapılacağı hafta	5
Uygulamanın temel hedefi	Gram boyama, Ziehl-Neelsen boyama, Mantar boyama, Preparatların incelenmesi ve yorumlanması
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Mikrobiyolojik boyalar
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

Gram boyama

- Hans Christian Joachim Gram
- Bakterilerin çoğu Gram olumlu ya da olumsuz boyanır
- Önce jansiyan moru ya da kristal moru ardından da mordan olarak lugol eriyiği uygulanır (tüm bakteriler boyayı alırlar)
- % 96 lık etil alkol ile renksizleştirme işlemi yapılır (Gram olumlular boyayı bırakmaz, olumsuzlar renksizleşir)
- Zit boya eriyiği ile Gram olumsuzlar boyanarak görünür hale getirilir
- Sulu fuksin kullanılırsa pembe, eozinle kırmızı , safraninle turuncu, parlak yeşili ile yeşil, pikrik asitle sarıya boyanırlar.

Gram boyama

- Bazı bakteriler sınırda tepkime verebilir
- Gram olumlu olduğu halde eskiyen kültürlerde olumsuz gibi boyanabilir
- Bazı Gram (+)'ler besiyerinde en az % 5 serum ya da kan bulunmadıkça Gr (-)leşme eğilimindedirler
- Ortam pH sınır asitleşmesi Gram olumsuzlaşmaya eğilimi artırır
- Kesin karar verilirken boyamanın yenilenmesi ve aynı preparatta kesin Gram (+) ya da (-) olduğu bilinen kontrol bakterilerin boyanması iyi olur

•Gram olumlu bakterilerdeki peptidoglikan tabaka Gram olumsuzlara göre daha kalındır ve hücre çeperinde teikoik asit içerirler.

•Gram (-) lerde ise farklı olarak peptidoglikan tabakanın dışında bir lipopolisakkarit tabaka bulunur

•Kristal viyole ve lugol her iki bakteride hücre çeperini geçerek hücre içine girer, Gram (4) lerde bu maddeler hücre çeperi ile zor ayrılabilen bileşikler oluşturur.

•Gram (+) lerin hücre çeperinde bulunan Mg ribonükleat, lipidler ve karbohidratlar ribonükleaz, eter ve sıcak su ile uzaklaştırıldığında Gram olumluluk özelliklerini kaybederler

•Gram olulu bakterilerden oluşan protoplastlar Gram (-) boyanırlar.

•Jensen'in değişik Gram boyama yöntemi

•A) kristal moru ya da jansiyan moru eriyiği

- Kristal viyole ya da jansiyan viyole 1 gr
- Asit fenik kristal 2 gr
- % 96 lık etil alkol 10 ml
- Saf su 100 ml

Bir cam havanda boya ezilirken yavaş yavaş alkol ve asit fenik kristalleri de atılıp karıştırılarak eritilirler

Suyun 2/3 ü eklenir

Eriyik dereceli mezure konur
Artan su ile havan çalkalanarak mezure aktarılır ve hacim 100 ml e tamamlanır
24 saat oda derecesinde bekletildikten sonra süzgeç kağıdından süzülerek saklanır

•B) Gram iyot eriyiği (Lugol eriyiği)

- İyot kristalleri 1 gr
- Potasyum iyodür 2 gr
- Saf su 300 ml
- Cam havanda I ve KI kristalleri ezilerek karıştırılır. Üzerlerine saf su eklenerek eritilir. Renkli şişelerde saklanır

•C) % 96 lık etil alkol (veya aseton alkol)

•D) Sulu fuksin eriyiği

Gram boyama

•Tespit edilen preparat üzerine kristal viyole eriyiği dökülüp 1-2 dk beklendikten sonra yıkanır.

•Lugol eriyiği dökülür, 30-60 sn beklendikten sonra yıkanır.

•Aseton alkol ile 10-15 saniye renksizleştirilir, preparat yıkanır

•Sulu fuksinle 30 sn boyanır, kurutulduktan sonra immersiyon objektifi ile incelenir

•Gram olumlu bakteriler mor, Gram olumsuzlar pembe-kırmızı renkte görülür

Gram boyamada diğer zıt boya eriyikleri

•Nötral kırmızısı

•Safranin

•Bismark kahverengisi

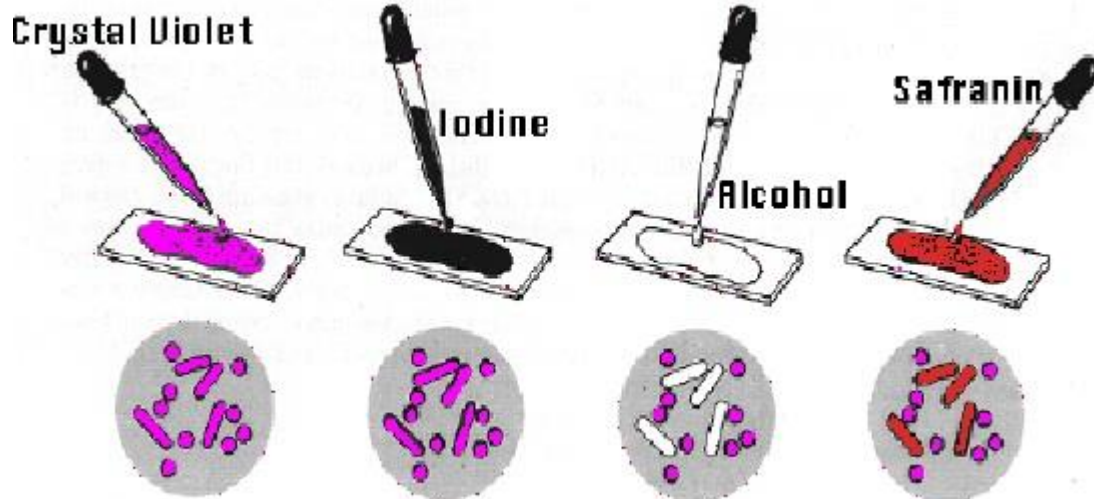
•Asit pikrik

•Malaşit yeşili

•Gram boyası ile olumlu ya da olumsuz kararı verilemeyen bakterilerin ayırt edilmesinde kullanılan yöntemler;

•KOH deneyi: Lam üzerine bir damla % 3 lük KOH eriyiği konur. Bakteri kolonisinden öze ile alınan bir parça bu eriyik içinde ezilerek 1 dk kadar karıştırılır. Öze yavaşça çekildiğinde iplikçikler halinde uzama görülürse bakteri Gram olumsuzdur. (KOH bakteri duvarını harab edip yapışkan DNA'yı ortaya çıkarmıştır)

•L-alanine-4-nitroanilide (LANA) aerop ya da fakültatif anaeroplara için kullanılır. Ticari olarak pamuklu silgiçlere emdirilmiş halde bulunur, Gram olumsuz bakteri kolonisine dokundurulduğunda sarı renge dönüşür.



Gram boyama basamakları

Aside dirençli bakterilerin boyanması

•Asiderezistan bakteriler diğer yöntemlerle kolay boyanmazlar

•Boyanmaları için fenollü ve yoğun boya eriyiklerinin uzun süre ya da sıcaklık etkisi

ile uygulanması gerekir

•Bu şekilde boyama sonrası asit, asitli alkol ve diğer renk gidericilerle boyalarını bırakmazlar

•Asidorezistan bakterilerin hücre çeperi yapısında diğer bakterilere oranla çok daha fazla lipid bulunur

•Fenollü fuksin lipid ortamda alkol ve sulu ortama göre daha kolay eridiğinden bakteri lipidlerini kolayca geçer, bakteriyi boyar. Renksizleştiricilerde daha az eridiğinden bunların uygulanması ile bakteriyi terk etmez

Erlich- Ziehl-Neelsen boyama yöntemi

•A) Ziehl-Neelsen fenollü fuksini (Karbolfuksin)

•Bazik fuksin 1 gr

•Fenol kristalize 5 gr

•Saf etil alkol 10 ml

•Saf su 100 ml

•Fenol saf suda eritilerek % 5 lik eriyik hazırlanır, 50 ml si balon jojeye aktarılır.

•Bazik fuksin cam havanda ezilirken alkolle karıştırılarak eritilir. Bu eriyik balon jojedeki fenollü suya eklenir. Arta kalan fenollü su ile havan çalkalanarak yıkantı suyu da balona aktarılır ve 100 ml e ulaşılır. 24 saat oda ısısında beklendikten sonrakığıt süzgeçten süzülür.

•B) Asit-alkol eriyiği

•HCL 3 ml

•% 95 lik etil alkol 97 ml

•Karıştırılır

•C) Löflerin metilen mavisi eriyiği

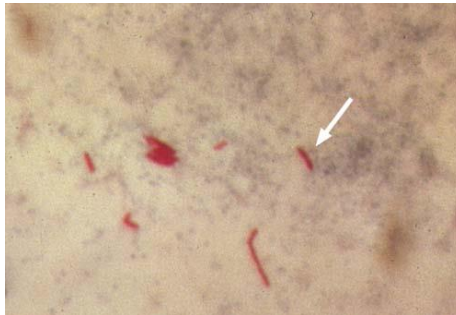
•Tespit edilmiş preparat üzerine karbolfuksin dökülür

•Alttan alev geçirilerek kaynatılmadan 3-5 dk ısıtılır. Boya azalırsa eklenir.

•Yıkayıp asit alkol ile 2 dk dekolarize edilir

•Zit boyama için 1-2 dk metilen mavisi ile boyanır, yıkayıp kurutulur ve X100 büyütmede incelenir. Mikobakteriler kırmızı, zemin mavi renkte görülür.

•Zit boyamada farklı boyalar kullanılabilir.



Ziehl-Neelsen boyama sonucu görülen kırmızı basiller

Mantarların incelenmesi

•Gram boyama: tüm mantarlar Gram olumludur.

•Laktofenol pamuk mavisi yöntemi

•Laktik asit 20 ml

•Fenol kristal 20 gr

•Gliserin 40 ml

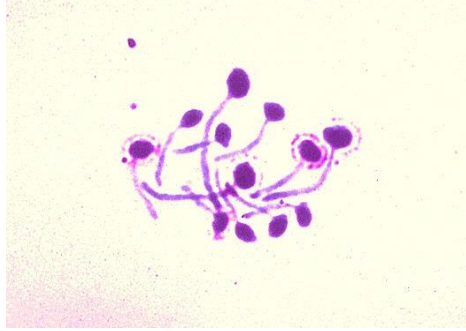
•Saf su 20 ml

•Pamuk mavisi (Poirrier mavisi) 0.075 gr

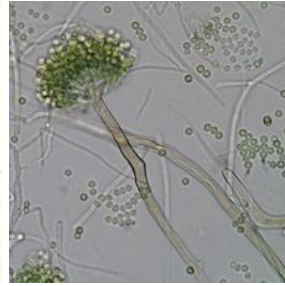
•Saf su, Laktik asit ve Gliserin karıştırılır. Isıtılırken Fenol kristalleri eklenir boya atılır ve eritilir.

- Lam üzerine bir damla % 96 lık etil alkol konur. İğne ile bir miktar kültür alıp ezilir
- Bir damla boya damlatılıp lamel kapatılır
- X40 büyütmede mantar elemanları açık mavi boyalı olarak görülür
- Saydam bant-Laktofenol pamuk mavisi yöntemi: saydam banttan 3 cm kesilerek yapışkan yüzü alt tarafa gelecek şekilde bir penset ile tutularak mantar kolonisine dokundurulur (küflerde)
- Üzerinde bir damla boya olan lam üzerine yapıştırılarak X40 büyütmede incelenir

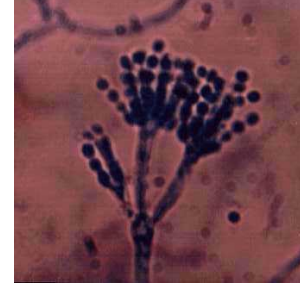
- Cryptococcus neoformans ve Histoplasma capsulatum gibi kapsüllü mantarların incelenmesinde çini mürekkep ile yaş preparat hazırlanır
- KOH ve NaOH preparatları
- Kıl, deri, tırnak gibi keratinize dokunun mantar infeksiyonlarında mantar aramasında kullanılır
- Örnek bölgesi etil alkol ile silinir. Bistüri ile kazıntı alınır. Materyal üzerine bir damla % 15 lik KOH veya NaOH eriyiği damlatılıp lamel kapatılır. Alttan hafifçe ısıtılır
- X40 büyütmede hifler, sporlar vs mantar elemanları görülür.



Candida etkenleri



Aspergillus etkenleri
etkenleri



Penicillium etkenleri

Preparatların Hazırlanması

- Lamlar temiz, yağsız, çiziksiz olmalı
 - % 50 lik etil alkolde tutulup silinebilirler
 - Kullanılan malzeme steril olmalı
 - İşi biten lamlar dezenfekte edilmeli
- Boyasız preparatlar
- Bakteri hareketlerinin incelenmesi
 - Karanlık alanda inceleme
 - Hücrelerin görülmesi
 - Protozoa ve parazitlerin görülmesi

- Lamlar silinerek temizlenir
- Preparat hazırlanacak yüzü alevden geçirilir
- Doğrudan sıvı madde ya da serum fizyolojikle sulandırılmış yarı katı materyal ile preparat hazırlanır.

- Karanlık alan mikroskopisi ile hareket inceleme yapılabilir.

- Karanlık alanda bakteri kirpiklerinin görülmesi

- Asılı damla preparatı: çukurlu lam kullanılır

Boyalı preparatların incelenmesi

- Temiz lamlarla uygun koşullarda preparat hazırlanır
- Havada kurutulur
- Materyal tespit edilir
- Havada kurularak (2-3 hatta 18 saat)
- Alevde tespit
- Kimyasal maddelerle tespit (etil alkolle 8-10 dk, metil alkolle 3 dk, aseton ile 5 dk)



Preperatlar

Uygulamanın adı	Biyokimyasal aktivitenin ölçülmesi, Antibiyogram testinin yapılması ve yorumlanması
Yapılacağı hafta	6
Uygulamanın temel hedefi	Biyokimyasal aktivitenin ölçülmesi, Antibiyogram testinin yapılması ve yorumlanması
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Kültür, besiyeri
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

Katalase Testi

Metot

- 1) Katı besi yerinde (kanlı agar hariç) üremiş olan mikroorganizma kolonilerinden platin öze (veya cam baget) yardımı ile yeterli miktarda alınarak temiz ve yağsız bir lamın üzerine konulur. Sonra buna % 30 luk hidrojen peroksidden bir damla damlatılır veya
- 2) Sıvı besiyerinde (5 ml) üremiş kültür üzerine % 3 lük hidrojen peroksit'den 3-4 damla ilave edilir.

Değerlendirme

Hidrojenperoksit katılmasından sonra kabarcıkların görülmesi veya çıkması pozitif reaksiyon olarak değerlendirilir. Şüpheli durumlarda mikroskop altında muayene yapılabilir. Reaksiyon en iyi pH 7.0 da meydana gelir ve oda sıcaklığında yapılır. Sonuçlar, negatif (-), zayıf (+), orta (++) ve kuvvetli (+++) pozitif olarak derecelendirilir.

Koagulase Testi

Bu test, özellikle stafilokoklarda bulunan ve kan plazmasını pıhtılaştırıcı koagulase enzimini (stafilokoagulase) ortaya koyma, patojenik olanlarla nonpatojenik olanları ayırmak amacı ile yapılır. Patojenik olan *S. aureus* pozitif reaksiyon vermesine karşın *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* negatif reaksiyon gösterir. Aslında koagulase'nin patojenite ile ilişkisi de tam olarak aydınlatılmamıştır.

Karbonhidrat Fermentasyon Testi

Bu test, mikroorganizmaların çeşitli spesifik karbonhidratları ayrıştırma yeteneklerini (sakkarolitik aktivite) belirlemek amacı ile yapılmaktadır. Mikroorganizmalar karbonhidratları, kendileri tarafından sentezlenen hidrolase (karbohidrase) enzimleri yardımı ile ayrıştırırlar. Ancak bu yetenek mikroplar arasında oldukça fazla değişiklik gösterdiği gibi, bir türe ait mikroorganizmalar arasında da ayrı fermentasyon özelliği gösteren variant suşlar da meydana çıkmaktadır. Bazı mikroorganizmaların fermentasyon özelliği yok denecek kadar az olmasına karşın Enterobacteriaceae familyasına ait olanlarda bu aktivite oldukça yüksektir.

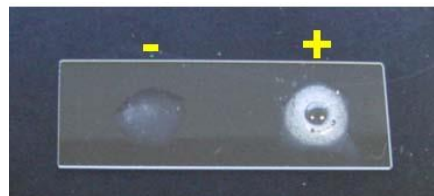
Karbonhidratlar (monosakkarid, polisakkarid ve alkoller), bakteriler tarafından değişik

tarzda (aerobik ve anaerobik) ayrıştırılarak çeşitli ürünler, organik asitler (asetik asit, butirik asit, formik asit, laktik asit, propionik asit, suksinik asit, vs.), nötral ürünler (Asetilmetilkarbinol, 2,3-butilenglikol, aseton, etil alkol, isopropil alkol, butil alkol, vs.) ve gazlar (hidrojen, oksijen, metan, karbondioksit) meydana gelirler.

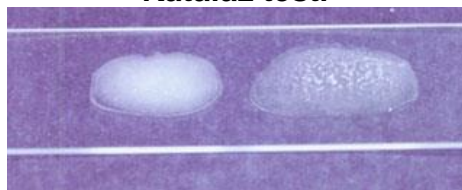
Bu maddeler çeşitli testler yardımı ile ortaya konabilir ve mikroorganizmaların identifikasyonunda önemli göreve sahip olurlar. Enerji ve karbon kaynağı olarak, karbonhidratların önemi fazladır. Metabolize olabilenlerin üreme üzerine olumlu etkileri vardır. Ancak, ayrışma sonu oluşan organik asitler, besi yerinin pH sını düşürerek belli bir süre sonra üremeyi sınırlar ve durdururlar. Bu yönden de zararlı etkisi olur. Karbonhidratların aerobik ayrışması sonu çok fazla enerji ortaya çıkmasına karşın anaerobik ayrışmada (fermentasyon) enerji daha az çıkmakta ve organik asit oluşumu daha fazla görülmektedir. Laboratuvarlarda kullanılan besi yerleri ve diğer koşulların etkisi altında, mikroorganizma türlerine göre değişmek üzere, karbonhidratların ayrışması, genellikle, 1-10 gün arasında değişmektedir. Bazen daha uzun bir süreye gereksinim duyulabilir. Ayrışmayı ortaya koyabilmek için besi yerlerine üreme üzerine olumsuz etkisi olmayacak yoğunlukta bazı indikatörler (Andrade, bromkrezol moru, brom timol mavisi, fenol kırmızısı, vs.) katılır. Bunların özelliklerine göre renklerinde meydana gelen değişimler ayrışmayı ve derecesini belirtir. Bu indikatörler besi yerlerine, yukarıdaki sıraya göre, % .005, % 0.0025, % 0.001 son konsantrasyonda olacak tarzda ilave edilirler. Andrade hariç olmak üzere diğerleri asit ortamlarda sarı renk meydana getirirler. Besi yerlerinde gaz oluşumunu saptamada, tersine yerleştirilmiş küçük Durham tüplerinden yararlanılır. Gaz, bu tüpün üst tarafında birikir. Bu amaçla özel Smith tüpleri de kullanılabilir. Nötral ürünlerden asetoin'i (asetil metilkarbinol) saptamada Voges Proskauer (VP) reaksiyonu laboratuvarlarca benimsenmektedir.

Oksidase Testi

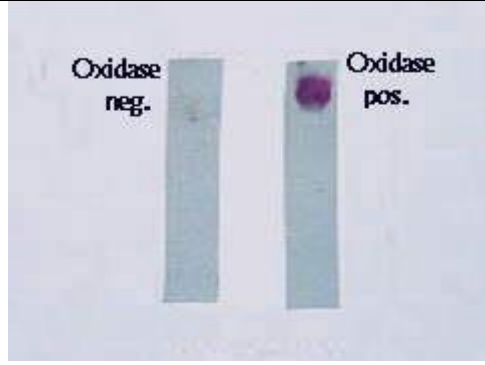
Bu test, mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ve intrasellüler olan oksidase enziminin (sitokrom C oksidase) varlığını ortaya koymada kullanılır. Deneyden aynı zamanda cinslerin (*Moraxella* (+), *Neisseria* (+), *Yersinia* (-), *Acinetobacter* (-), ve türlerin (*B. ovis* (-), *B. neotomae* (-) ve *B. abortus* (+)) ayırımında yararlanılır. Oksidase reaksiyonu, bakterilerde (aerobik olanlarda) sitokrom oksidase sisteminin bulunduğunu ifade eder. Üzerine ayıraç damlatılan kolonilerin 1-2 dakika içinde kırmızı mavi renk almaları pozitif oksidase testi olarak kabul edilir. Hiç bir renk değişikliğinin olmaması negatif olarak değerlendirilir. Kolonilerin siyah renk alması öldüklerini ifade eder.



Katalaz testi



Koagülaz testi



Oksidaz testi

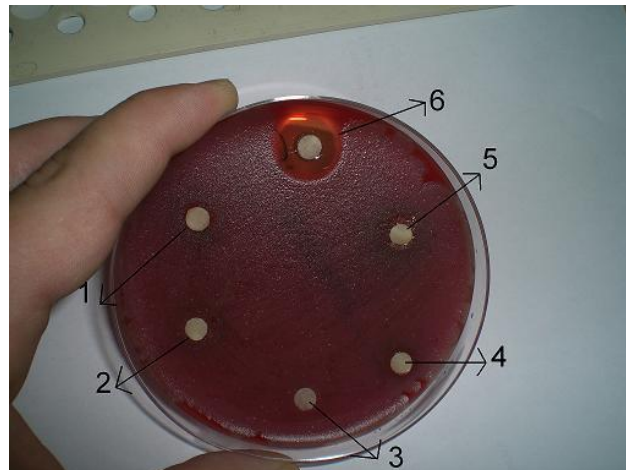
Belirli bir bakteri veya bir kaç türünün gelişmesini ve üremesini hangi antibiyotiğin önleyeceği veya hangi oranda azaltacağını ortaya koyan biyolojik metottur. Bir mikrobun alt gruplarının veya sonraki değişik döllerinin antibiyotiklere karşı aynı cevabı vermediği bilinmektedir. Halbuki muayyen bir mikroba veya bir mikrobun muayyen dölüne karşı hangi antibiyotiğin veya antibiyotiklerin tesirli olduğunu bilmek hem tedavi olan hasta açısından, hem de sağlıklı toplum açısından önemlidir. Hasta daha çabuk tedavi olur. Daha az antibiyotik dolayısıyla para harcanır ve daha ilerisi için direnç kazanmış mikrop dölleri bırakılmamış olur

Bazan antibiyogram, veya mikrop cinsini belirlemek imkansız olabilir. Hasta organ veya hastalıklı materyalden numune alınamaz veya enfeksiyon çok şiddetli olduğu için beklemeye tahammül olmayabilir. Böyle durumlarda yani antibiyogram elde edilemeyecek veya gecikecek durumlarda

kuvvetli antibiyotiklerden veya hasta sistem için özellik kazanmış antibiyotiklerden ikisi kombine olarak kullanılır. Bu arada bir yandan mümkün olursa, antibiyogram sonucunda belirlenen etkili antibiyotiklere geçilir.

Antibiyogram yapılırken, az etkilenenler ve dirençli olanlar diye derecelendirilir.

Antibiyogram yapımında halen en çok disk metodu kullanılmaktadır. Bu usülde mikrop petri kutusu içinde hazırlanan katı jeloz besi yerine ekildikten sonra üzerine çeşitli antibiyotik sıvılarına batırılmış yuvarlak kağıt parçaları konulur. Besi yerinde üreyen mikrop etkili olan antibiyotiğin çevresinde üremediğinden yasak bölge meydana gelir. Yasak bölgenin genişliği antibiyotiğin tesir kuvvetinin fazlalığına işarettir. Eğer antibiyotikli kağıdın hemen etrafında dahi çepe çevre mikrop kolonileri ortaya çıkabilmişse mikrobun bu antibiyotiğe dirençli olduğu gösterilmiş olur.



Antibiyogram testi sonucu oluşan zon çapları

Uygulamanın adı	Serolojik reaksiyonlar, mekanizmaları, kullanım alanları, Aglutinasyon testleri, çabuk lam aglutinasyon testi yapılması ve yorumlanması, Yavaş tüp aglutinasyon testinin yapılması ve yorumlanması
Yapılacağı hafta	7
Uygulamanın temel hedefi	Serolojik reaksiyonlar, mekanizmaları, kullanım alanları, Aglutinasyon testleri, çabuk lam aglutinasyon testi yapılması ve yorumlanması, Yavaş tüp aglutinasyon testinin yapılması ve yorumlanması
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Pleyt, mezür, kan alma tüpleri, santrifüj, pipet, pipet uçları
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

- Antijen : Organizmaya uygun yollardan girdiklerinde kendilerine karşı bağışık yanıtın oluşmasına yol açan, bu yanıt sonucunda ortaya çıkan ürünlerle (antikorlar ve duyarlı hücrelerin reseptörleri) özgül olarak birleşme özelliğinde olan, organizmanın kalıtsal yapısına yabancı maddelerdir.
- Antikor : Antijenlere karşı sıvısal bağışık yanıt sonucunda plazma hücreleri ve dolayısıyla duyarlı B lenfositleri tarafından oluşturulan ve antijenleri ile özgül olarak birleşme özelliğinde olan özgül globulinlerdir.

Serolojik reaksiyonlar antijen antikor komplekslerinin bağlanma durumlarına göre şekillenir ve yorumlanır.



Aglutinasyon bir antijen-antikor reaksiyonu olup serolojik testler arasında sekonder bağlanma testleri içinde yer alır. Partiküler karakterdeki antijenler , elektrolitli ortamda homolog antikorlarla birleşerek gözle görülebilecek büyüklükte kümeler halinde çökerler ki bu olaya AGLUTİNASYON denir.

Farklı Ig moleküllerinin aglutinasyon yöntemleri birbirinden farklıdır. Bu fark antikorların antijen ile bağlanma güçlerinden ileri gelir. Örneğin, Ig'lerin aglutinasyon gücü IgG'lerden daha fazladır.

Aglutinasyon testleri genelde uygulanması basit olan testlerdir. Oldukça duyarlı olan bu testler ile 1ml. serumdaki 0.1 µgm. miktarındaki antikorlar saptanabilir.

Aglutinasyon reaksiyonundan;

-İnfeksiyonların teşhisinde (Brucella, Listeria, Salmonella, Campylobacter, Ruam, Morexella, vs.)

-Mikroorganizmaların identifikasyonunda

-Bağışıklık durumunun belirlenmesinde (antikor titresi) yararlanılır.

Aglutinasyonun Mekanizması:

Aglutinasyon 0.5 M NaCl solusyonunda meydana gelir. Bu reaksiyonda iyon gücü önemlidir. Antijen ve antikor arasında yeterli oranda spesifik bağların oluşması için hücrelerin yüzeyindeki negatif yükün karşıt yükler tarafından nötralize edilmesi gerekir. Bu da nötral pH'da olur. Bu nedenle antikorlar antijenlerle özgül olarak bağlanmış olsalar bile 10^{-3} NaCl ve daha düşük tuz konsantrasyonunda aglutinasyon meydana gelmez. Ortamda fazla miktarda tuz bulunması halinde ise antikorların bulunmadığı durumlarda bile aglutinasyon oluşur.

Laboratuvarda aglutinasyon iki şekilde yapılır:

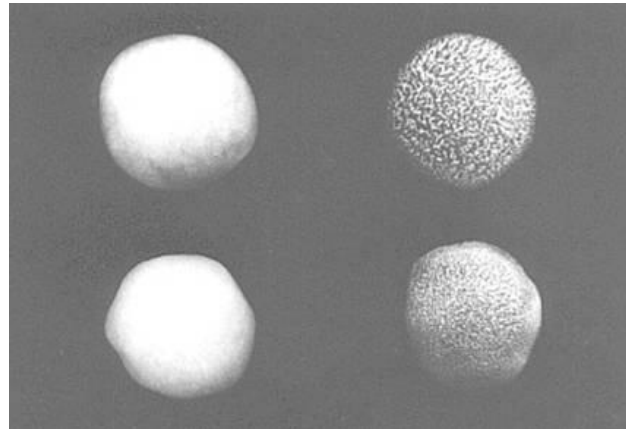
-Çabuk lam aglutinasyonu

-Yavaş tüp aglutinasyonu

Çabuk Lam Aglutinasyonu:

Bu yöntem, PLATE test veya CARD test olarak da isimlendirilir. Bu test daha çok bir tarama testi olarak kullanılır. Serum veya kan ile uygulanan testte kullanılan antijen tüp aglutinasyon antijenine göre 10-50 kat daha konsantredir ve boyanmıştır. Örneğin, pullorum antijeni kristal violet, Brucella antijeni rose bengal, Mycoplasma antijeni ise metilen mavisi ile boyanmıştır.

Bu test için temiz bir lam üzerinde bir damla (0.05 ml) kan veya kan serumu eşit miktarda lam aglutinasyon antijeni ile karıştırılır. Birkaç dakika içinde kum tanesi şeklinde görülen çöküntü pozitif reaksiyon olarak değerlendirilir. Negatif durumlarda ise homojen bir dağılım oluşur.



Lam aglutinasyon

Uygulamanın adı	Primer bağlanma testleri (ELISA, İmmunofluoresan testi, RIA) temel bilgiler, Diğer sekonder bağlanma testleri (komplement fikzasyon ve Coombs testi) temel bilgiler
Yapılacağı hafta	8
Uygulamanın temel hedefi	Primer bağlanma testleri (ELISA, İmmunofluoresan testi, RIA) temel bilgiler, Diğer sekonder bağlanma testleri (komplement fikzasyon ve Coombs testi) temel bilgiler
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Pleyt, mezür, kan alma tüpleri, santrifüj, pipet, pipet uçları
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

PRİMER BAĞLANMA TESTLERİ : Antijen ve antikorun reaksiyona girmesine müsaade edilir. Oluşan immun kompleksin miktarı direkt ya da dolaylı olarak ölçülür. Bu reaksiyonu ölçebilmek için Ag. Veya Ab. ; radyoizotop, floresan boya ve ya enzim ile işaretlenir. Reaksiyon tamamlandıktan sonra ; birleşmemiş materyaller ortamdaki uzaklaştırılarak, reaksiyona giren kısmın miktarı , işarete dayanılarak ölçülür.

KULLANILAN MATERYALLER :

- Mikroplate
- Antijen → normalden az ya da fazla kullanılmamalıdır.
- Wash buffer
- Şüpheli serum
- Substrat → renksizdir ve reaksiyona girince renk verir.
- Konjugat → substrat'a bağlanır. Bağlanma sonucu renk oluşur.

Oluşan immunolojik reaksiyonun, enzim-substrat sistemi ile görünür hale getirilmesi esasına dayanan teknikleri kapsar. Hem ag , hem de ab varlığı ve miktarı hassas olarak ölçülür.

(n) sayıdaki serum için (n) sayıda sulandırma yapılır. Her göz bir serumu temsil etmektedir.

Bir tane IB için özel mikroplate kiti alınır.
Her örnek serum için 1 göz kullanılmaktadır.
Göze 0,1 ml en son sulandırmadan koy.
30 dk beklenir.
Sıvı dökülür.
4 kez yıkama solusyonu ile yıkanır.
0,1 ml konjugat koy.
30 dk beklenir.
Yıkama
0,1 ml substrat koy
15 dk bekle
0,1 ml stop solusyonu koy.
650 nm de sonuçlar okunur.

*** Mikroorganizmaların izolasyonunda ve serumdaki antikorların tespitinde kullanılan çok duyarlı ve spesifik bir testtir.

Testin esası; şüpheli antijen veya antikorun homoloğu olan ve enzim ile işaretli bir konjugata bağlanması ve bu bağlantının substrat adı verilen kimyasal bir madde yardımı ile renginin değiştirilip görülür hale getirilmesidir.

1. DİREKT ELISA → şüpheli marazi maddede m.o. aranması için yapılır.
2. İNDİREKT ELISA → şüpheli serumda antikor aranması ve titre saptanması için yapılır.

NDV-IBV-IBD-Mg-Ms-ReoVirus v.b. için ticari kitler mevcuttur ve rutin olarak uygulanmaktadır.

ŞÜPHELİ SERUM daki Ab + Ag → birleşir.

Bu komplekse konjugat bağlanır ki enzim ile işaretlenmiştir.

Ortama substrat eklenir ve komplekse bağlanır.
Enzim substratı parçalar ve renk oluşur.
Stopper eklenerek reaksiyon durdurulur.
ELISA reader da okutulur.

KULLANILAN MATERYALLER

Şüpheli Serum
+/- kontrol
Serum sulandırıcısı
Ticari mikroye
Wash buffer= yıkama solusyonu
Konjugat
Substrat
Stopper
Reader

TESTİN YAPILIŞI

Enfeksiyona spesifik ticari mikroye vardır ve mikroyetin her gözü taranacak olan enfeksiyonun etkeni ile yani antijen ile kaplıdır.

Mikroye 8x12 olmak üzere 96 gözlüdür.

İlk göze negatif kontrol konur.

İkinci göze pozitif kontrol konur.

Diğer gözlere de serum sulandırıcısı ile 1/500 oranında sulandırılmış serumlar konur.

30 dk beklenir.

Wash buffer ile 4 defa yıkanır ve kurutulur.

Her göze konjugat eklenir.

30 dk beklenir.

Wash buffer ile 4 defa yıkanır ve kurutulur.

Her göze substrat eklenir.

15 dk beklenir.

Substratın üzerine stopper eklenerek, reaksiyon durdurulur.

ELISA reader da okutulur.

SONUÇ

Reader otomatik olarak renk değişikliklerini tespit eder ve bize antikor titresini verir. Böylece sürünün antikor titresini tespit edilir.

Hastalık durumu belirlenir.

Aşı zamanı belirlenebilir.

Yakın zamanda uygulanmış olan aşının sürüyü ne kadar koruduğu hakkında bilgi verir.

Immunofloresans Yöntemler

İmmünofloresan yöntem (immunofluorescence assay), doku veya hücrede bulunan antijenlerde olduğu gibi "in situ" antijenlerin ya da dokudaki veya hücreyel antijenlere karşı gelişmiş ve bunlara bağlanmış antikorların (ör. otoantikorlar) saptanması amacıyla sıkça kullanılmaktadır. Özellikle doku kesitlerinde antijen varlığı UV ışık kaynağı olan mikroskop yardımı ile ve flöresan bir madde ile işaretli özgül antikorlar kullanılarak saptanabilmektedir. Bu amaçla kullanılmak üzere antikorlar bazı florokrom maddeler ile işaretlenmektedir. Antikoru işaretlemek için en fazla fluorescein isothiocyanate (FITC) kullanılmaktadır

A. Direkt flöresan antikor testi:

Direkt flöresan antikor testi doku kesitlerinde viral antijenin saptanması (ör. enfekte beyin dokusunda kuduz virusuna ait antijenlerin gösterilmesi) gibi değişik amaçlar için kullanılmaktadır. Direkt immunofloresan yöntemde antijen varlığını saptamak amacı ile kullanılan birincil antikor FITC ile işaretlidir

B. İndirekt floresan antikor (IFA) testi

İndirekt flöresan yöntemde araştırılan antijene özgül birincil antikor ve birincil antikora bağlanabilen FITC ile işaretli ikincil antikor kullanılmaktadır.

Radioimmunoassay yöntemi özellikle düşük miktarlardaki antijen tayininde spesifitesi çok yüksek olan bir testtir. Radioimmunolojik testlerde antijen veya antikor bazı radioizotop maddeler ile (ör. ^{125}I , ^{57}Co) işaretlenerek daha çok kompetisyon esasına dayanmak üzere, sandwich-ELISA yöntemindeki gibi farklı şekillerde de yapılabilmektedir. Temel mekanizma radioizotop bir madde ile işaretli antijen veya antikor aracılığı ile karşılığı olan (özgül olduğu) antikor veya antijenin varlığını ve miktarını saptamaktır.

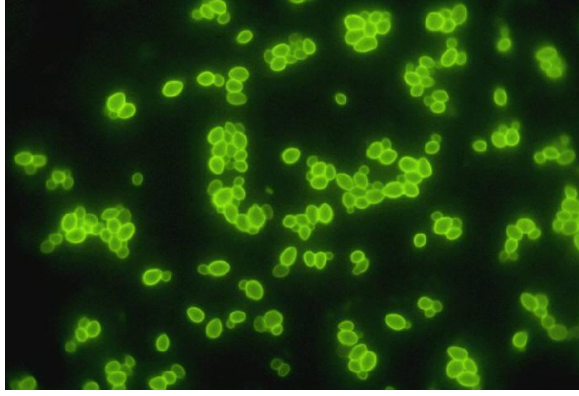
0,6 ml FTS + 25 μl şüpheli serum \rightarrow 1/25



0,9 ml FTS + 100 μl I.sulandırma \rightarrow 1/250



ELISA testi



Floresan antikor testi

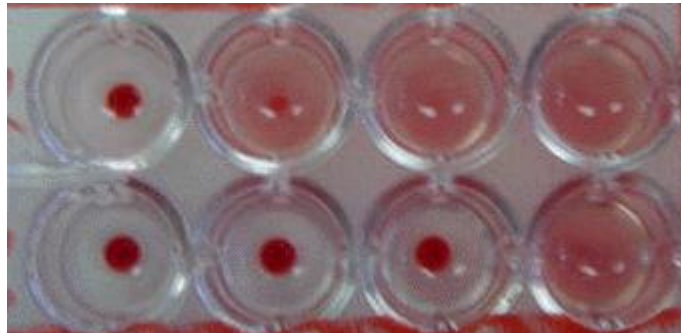
Coombs Testi

A. Direkt Coombs testi: Direkt Coombs testi ile yenidoğanın eritrositlerine bağlanmış olan anne kaynaklı antiRh antikorlarının varlığı gösterilir. Yenidoğandan alınan eritrositler yıkandıktan sonra üzerine antigamaglobülin (Coombs serumu) eklenir. Aglütinasyon oluşur ise bebeğin eritrositlerine anne kaynaklı antiRh antikorlarının bağlanmış olduğunu gösterir.

B. İndirekt Coombs testi: İndirekt Coomb testi Rh(-) anne kanında antiRh antikorların varlığını göstermek için yapılır. Rh pozitif 0 kan grubu eritrosit süspansiyonuna anne serumu eklendiğinde veya bu işlem sonrası Coombs serumu eklendiğinde aglütinasyon oluşursa anne kanında antiRh antikor varlığını gösterir.

Komplement Fiksasyon Testi

Antijen ve buna özgül antikorun birleşmesi ile immün kompleks oluşur. İmmün kompleks oluşumu antikorun Fc kısmında konfigürasyonel değişikliğe neden olur. Antikorun Fc kısmında oluşan bu değişiklik, kompleman proteinlerinin bağlanmasına ve aktivasyona neden olur. Söz konusu olan antijen eritrosit ise buna bağlanan antikorlar aracılığı ile aktive olan kompleman proteinlerinde zincirleme reaksiyon gelişerek eritrosit hücre membranında zımba delikleri şeklinde zedelenme olur ve hücre ölür (lizis). Antijen antikor birleşmesinin komplemanı uyarmasına dayanarak geliştirilen iki basamaklı bu teste "kompleman fiksasyon testi" denir. Kompleman fiksasyon testi ile 1 µg/ml'den daha düşük konsantrasyonlardaki antikor düzeyleri saptanabilmektedir.



Komplement Fiksasyon Testi

Uygulamanın adı	Serolojik testler ile elde edilen sonuçların hastalıkların tanısı veya aşı bağıışıklığının değerlendirilmesi amacı ile incelenmesi ve yorumlanması, Aşılar, aktif bağıışıklık oluşumu ve aşı uygulamaları
Yapılacağı hafta	9
Uygulamanın temel hedefi	Serolojik testler ile elde edilen sonuçların hastalıkların tanısı veya aşı bağıışıklığının değerlendirilmesi amacı ile incelenmesi ve yorumlanması, Aşılar, aktif bağıışıklık oluşumu ve aşı uygulamaları
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Pleyt, mezür, kan alma tüpleri, santrifüj, pipet, pipet uçları
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

•İmmünolojinin bir alt dalı olan seroloji antijenlerle bağıışıklık sistemi ürünlerinin etkileşimini invitro olarak inceler. Antijen ve antikor birleşmesi özgül bir reaksiyon olduğu için, bilinen bir antijen olduğunda örnek materyal içerisinde özgül antikor aranabilir veya bilinen bir antikor olduğunda örnek materyal içerisindeki özgül antijen değişik teknikler ile saptanabilir. Ayrıca örnek materyal içerisindeki özgül antijen veya antikor miktarları niceliksel testler kullanılarak saptanabilmektedir.

•Serolojik testlerden elde edilen sonuçlar;

- 1.Klinik tanı veya diğer laboratuvar bulguları ile tanısı konan hastalıklarda serolojik testler doğrulama amaçlı kullanılabilir.
- 2.Bir kişinin veya toplumun bağıışıklık durumunu saptamak amacı ile kullanılabilir.
- 3.Hastalığın gidişi, tedavi ve\veya prognozu serolojik testlerle izlenebilir.
- 4.Etken mikroorganizmanın serogrup, serotip veya immunotipi saptanabilir.
- 5.Etken mikroorganizmanın üretilmediği veya üretmenin pratik olmadığı durumlarda etkeni tanımlamak sadece serolojik testlerle mümkündür.

•Bir enfeksiyonun tanısında önemli olan, varolan enfeksiyonu yansıtan antikorların önceden geçirilmiş enfeksiyona ilişkin antikorlardan ayırdedilmesidir. Burada ayırımıda önemli olan, enfeksiyonu izleyen 2-3 hafta süresince antikor titresinin yükselip sonra yavaş yavaş düşmesidir 10-14 gün ara ile alınan iki serum örneği **antikor** titresinin yükseldiğini gösterirse yeni bir enfeksiyon söz konusudur. ilk serum örneğinin enfeksiyonun erken evresinde alınması önemlidir; tersi durumda, titre artışı atlanmış olur. Yeni enfeksiyonun tanınmasına olanak sağlayan bir başka durum enfeksiyondan sonra ilk ortaya çıkan antikorların çoğu kez IgM sınıfında olmalarıdır.

•Serolojik testlerin miktar tayininde duyarlılık bakımından ayrılıkları vardır. Örneğin basit presipitasyona bakarak agarda iki yönlü yayılma 15, bakteri aglütinasyonu ve kompleman bağlanması 300, dolaylı hemaglütinasyon 600, ELISA ve virüs nötrlenmesi 300000 kez daha hassas bildirilmiştir.

•Duyarlılık (sensitivite) : Belirli bir hastalığı olan kişilerde bir yöntemle alınan pozitif sonuçların yüzdesine o metodun duyarlılığı denir. Duyarlı bir testte yalancı negatiflik çok azdır.

•Özgüllük (spesifisite) : Sağlıklı kişilerde bir yöntem ile araştırılan hastalık bulgusunun negatif sonuç yüzdesine o yöntemin özgüllüğü denir.

•Bir testin duyarlılığı aranan hastalığı olan , özgüllüğü ise o hastalığı olmayan seçilmiş bir popülasyonda aranır.

Antijenin tek bir determinantının antikorun tek bir yanına yani bir epitopun bir paratop'a olan birleşme ilgisine afinite denir.

Doğal antijenlerin çoğunluğu çok valanslıdır. Antikorlarında en az iki valansı vardır. Bu şekilde çok valanslı(determinantlı) bir antijenin çok valanslı antikorlarla bağlanma gücüne avidite denir.

AŞILAR

Tanım: Verildikleri canlıda immun sistemi uyararak vücudu hastalıklara karşı aktif bağışık hale getiren maddelerdir.

Bağışıklık ise, vücuda giren immunojenlere (mikroorganizma , toksin, çeşitli protein ve kompleksleri gibi) karşı organizmanın hücresel ve humoral bir yanıt bir yanıt oluşturacak kısa veya uzun bir süre o immunojenin zararı etkisinden korunmasıdır.

Aşıların Sınıflandırılması

I- Klasik aşılar

a) Mikroorganizma aşıları (bakteri, virus, mantar, protozoon, vs.)

- Canlı (aktif) aşılar

- Ölü (inaktif) aşılar

b) Toksin aşıları

II- Biyoteknoloji yolu ile elde edilen aşılar (Rekombinant DNA aşıları, Rekombinant virus aşıları, mutant aşılar, anti-idiotip aşılar, sentetik aşılar)

Canlı aşılar: Hastalık etkeninin kendi konakçısı veya değişik konakçılarda olduğu gibi çeşitli besiyerleri, doku kültürleri ve embriyolu yumurtalarda uzun süre pasajları sonucu hastalık yapma yetenekleri kaybolmuş veya çok zayıflamış ancak, immunojenik yetenekleri korunmuş mikroorganizmalardan hazırlanırlar. Bu şekilde elde edilen suşlarla hazırlanan aşılara ATTENUAŞILAR, işleme ise ATTENUASYON denir. Attenuasyon mikroorganizmaların kendi doğal konakçılarında üretilmesiyle gerçekleşebilir ve utant suşlar elde edilebilir.

Örnek:

Veteriner Hekimlikte	Antraks	Mavi dil
	Br. abortus S19	At vebasası
	Newcastle (adale)	Avianize kuduz (Kelev)
	Marek	Koyun çiçeği
	Gumboro	Kanatlı encephalomyelitisi
	ILT	
	BCG	

İnsan Hekimliğinde Çiçek
Poliomyelit
Sarı humma

Kızamık
Kabakulak
Influenza

Ölü aşılar: Bu aşılar "Bakterin" adı da verilir. Aşı suşları besiyerlerinde üretilerek toplandıktan sonra çeşitli yöntemlerle öldürülerek (ısı, formol, fenol, UV, vs.) ml'deki bakteri sayısı aşı FTS ile standardize edilir. Aşıya koruyucu amaçla fenol veya merthiolat katılır.

Örnek:

Veteriner Hekimlikte Sığır ve mandaların P. multocida
Koyun vibriosisi
L. gryppotyphosa
Şap
Kanatlı korizası
Hindi erysipelası
Kanatlıların bazı kombine aşıları
İnsan Hekimliğinde Kolera
Tifo
Veba

Toksin aşıları: Bu aşılar toksine karşı bağışıklamada kullanılır. Toksin oluşturan mikroorganizmaların kültür filtratlarının süzülmesiyle elde edilen toksinin detosifikasyonundan (genellikle formolle) sonra uygun sulandırılmaları aşı olarak kullanılır (Toksoin).

Örnek:

Anaerob infeksiyon etkenlerine karşı hazırlanan aşılar.
Cl. haemolyticum (beta toksinine karşı)
Cl. botulinum
Cl. septicum
Cl. chauvoei vs.

Anaeroblarda bazen tüm kültür formolle muamele edilip aşı olarak kullanılır ki bunlara anakültür aşıları denir.

İnsanlar için: Difteri toksin aşıları
Tetanoz toksin aşıları
H. pertusisi aşıları vs.

CANLI AŞILAR

- Bağışıklık verme gücü fazla
- Meydana gelen bağışıklık uzun süreli
- Bağışıklamada tek doz yeterli
- Dozun miktarı az verilir
- Genellikle adjuvant kullanılmaz
- İmmun defekti olanlarda kullanılmaz
- Stres yaratır
- Canlı aşılar ile diğer infeksiyöz etkenler bulaşabilir
- Latent seyirli hastalıkları aktive edebilir
- Canlı aşı virüsleri doğada pasaja uğrayarak virulent olabilir ve çoğalma sırasında da spontan mutantlar oluşabilir

İNAKTİF AŞILAR

- Zayıf
- Bağışıklık kısa süreli
- Genellikle çift doz uygulanır
- Miktarı fazla verilir
- Adjuvant kullanılır
- Kullanılabilir
- Strese neden olmaz
- Bulaşma tehlikesi yok

Biyoteknoloji Yolu İle Elde Edilen Aşılar

1) Rekombinant DNA aşıları

Rekombinant DNA teknolojisi yardımı ile E. coli'de hazırlanan biyosentetik aşılar (Örn. Şap) kullanılmaktadır. Yine Newcastle, İnfluenza, vesiculer stomatitis, kuduz, herpes simplex vs. viruslarının yüzey proteinlerini kodlayan genler (DNA, RNA virus) saptanarak bunlara karşı çeşitli mikroorganizmalarda aşı hazırlama çalışmaları vardır.

2) Mutant Aşılar

Mikroorganizmaların herhangi bir antijenik determinantını kodlayan genin kodlanması ile elde edilen aşılar Subunit aşılar denir.

3) Sentetik Aşılar

Gelişen teknoloji ve moleküler kimya sayesinde antijenik karakterdeki yapıların açık kimyasal formüller ortaya konarak etkili aşıların hazırlanmasına bir basamak oluşturmaktadır.

Örnek: Str. pyogenes'in "M" yüzey proteini (A grubu Streptokokların fagositoza olan dirençlerinin bu yüzey proteininden ileri geldiği sanılır). "M" proteininin yapılmasına uygun 35 aa'den kurulu sentetik peptit aşısı (SCB7) tavşanlara verildiğinde "M" proteinine karşı hem hücresele hem de humoral yanıt oluşturmaktadır.

- Difteri toksini, difteriye karşı kobaylarda, difteri toksininin derideki nekrotik aktivitesi ve letel etkisini nötralize eden antikorları oluşturan 188-201 a.a.'den oluşan sentetik bir polipeptit aşısı da yapılmıştır.

4) Anti İdiotip Antikor Aşıları

Aşı hazırlamada dikkat edilecek noktalar

- Suşun antijenik özelliği
- Antijenik dterminantların sağlam olması
- Aşının canlı veya ölü oluşu
- Adjuvant

Aşılamada Oluşabilecek Bağışıklık Düzeyine Etki Eden Faktörler

- Aşının dozu
- Aşının hazırlanması
- Aşının titresi
- Aşının muhafazası, liyofilizasyonu
- Aşılama yolları
- Aşılama adedi
- Aşılanan canlının yaşı, cinsiyeti, beslenmesi, parazitleri
- Bireysel faktörler
- Maternal antikor durumu
- Adjuvantlar
- Antibiyotikler

Aşıların Kontrolü

- Hazırlanan aşıların uygulamaya konmadan önce çeşitli kontrollerinin yapılması gerekir.

- 1- Kontaminasyon, sterilizasyon testi
- 2- Potens (etkinlik) testi
- 3- Yabancı patojenler için test
- 4- Antijen içeriğinin kontrolü
- 5- Zararsızlık testi
- 6- Dayanıklılık testi

İyi bir aşı:

- Zararsız olmalı

- Etkili olmalı ve yeterince bağışıklık sağlamalı
- En az bir yıl süreyle bağışıklık sağlamalı
- Ekonomik olmalı
- Özellikle canlı aşılar bulaşıcı olmamalı
- Saklanması ve verilmesi kolay olmalı

Aşı Reaksiyonları

- Aşının genelleşmesi ve yayılması
- Allerjik reaksiyonlar
- Postvaksinal ensefalit
- Latent bakteriyel ve viral hastalıkların proaktivasyonu
- Onkojenik etki
- Aşının hastalığın klinik tablosunu değiştirmesi

İMMUNSERUMLAR

Hiperimmün serum: Antijen uygun deneme hayvanına belli kurallar ve süreler içinde enjekte edilerek elde edilen yüksek titrede homolog antikor içeren serumlardır (antibakteriyel, antiviral, antiparaziter vs.).

Antitoksik serum: Önce toksoid sonra da az miktarlardan başlayarak arttırmak üzere tosinin birkaç kez ve uygun aralıklarla enjeksiyonu sonucu elde edilen yüksek titrede antitoksin içeren serumlara denir.

Konvelesans serum:

AŞILAR VE İMMUNSERUMLARLA BAĞIŞIKLAMA

İnsanlar ve hayvanlar, canlı (attenué, patojenitesi zayıf veya zayıflatılmış) veya inaktif (fiziksel, kimyasal vs. yöntemlerle) mikroorganizmalar veya bunların çeşitli ürünleri (toksin, toksoid, toksik substanslar) ile hayatlarının belli dönemlerinde kısa veya uzun bir süre temas etmeleri halinde doğal aktif bir bağışıklık oluşur. Oysa, organizmaya etken koruma veya sağaltım amacıyla aşı olarak verildiğinde yapay aktif spesifik bir bağışıklık meydana getirilir. Yani aşılama ile vücutta immunolojik sistemler uyarılarak humoral veya sellüler (veya her ikisi birden) yanıt oluşturulur.

Oysa, başka bir şahısta bulunan veya hazırlanan antikorların (hiperimmün serum, antitoksik serum) hasta kişilere sağaltım amacıyla verilmesiyle pasif bir bağışıklık oluşur. Ancak, böyle elde edilen bağışıklık uzun ömürlü olmaz ve genellikle 2-3 ay sonra sona erer. Pasif bağışıklık oluşturmak için verilen antikorların katabolize olma oranları da yüksek olduğundan kısa bir süre sonra etkinliklerini kaybederler.

Yapay pasif bağışıklıkta, başka bir hayvandan veya insandan elde edilen hiperimmün serumun ya da antitoksik serumun korunma veya sağaltım amacıyla diğer hayvana veya insana verilmesi amaçlanır. Ancak, pasif bağışıklamada olumsuz sonuçlarla karşılaşılabilir. Bunlar: kısa bir bağışıklık oluşumu, serum hastalığı, anafaksi ve aktif immunizasyonun baskılanmasıdır.

Uygulamanın adı	Streptococcus, Staphylococcus ve Corynebacterium türlerinin Gram boyama ile incelenmesi, kolonilerinin incelenmesi, CAMP testi
Yapılacağı hafta	10
Uygulamanın temel hedefi	Streptococcus, Staphylococcus ve Corynebacterium türlerinin Gram boyama ile incelenmesi, kolonilerinin incelenmesi, CAMP testi
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 ayraçları, dezenfektan, alkol, pamuk.
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

****Anabilim dalının uygulama için öngördüğü bilgi/şekil/resim koyulacak****

Örneğin;

- Uygulamada yaptırılacak testin yapım aşamaları
- Uygulamada gösterilecek preparatın görünümü
- Uygulama materyalinin mikroskop görünüm resmi/şekli
- Uygulamada öğretilecek alet ekipman bilgisi
- Uygulamada öğretilecek konunun bilgi ve şemaları
- ve benzeri bilgiler

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

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

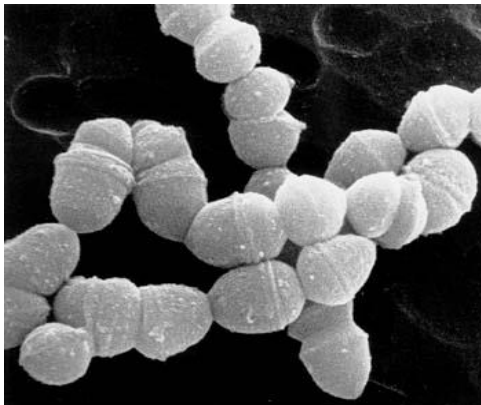
- 1) mikroorganizmaların dokuya girmesi,
- 2) mikroorganizmanın dokuya yapışması ve
- 3) çoğalarak yayılması olmak üzere genellikle üç safhada meydana gelir.

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 terkiindedir. 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 gözükür.

Streptokoklar, evcil çiftlik hayvanlarından sıklıkla izole edilen bakterilerdir. Doğada yaygın bulunmasından dolayı mastitis vakalarında da primer etiyolojik ajan konumunda bulunmaktadır. 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 ayırıştırıcı 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 difüziibl, 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 stafilocokların 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, stafilocok ekim çizgisine dokundurmamaya dikkat ederek, incelenecek 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 stafilocokların 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*'nin ekstrasellüler ürünü birlikte hareket ederek büyük bir beta hemoliz oluşturur.



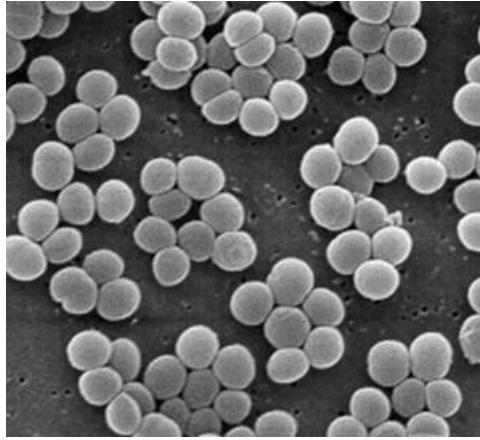
Streptokokların mikroskopik görünümü



CMT testinin uygulama prosedürü

Stafilokoklar, evcil çiftlik hayvanlarından sıklıkla izole edilen bakterilerdir. Doğada yaygın bulunmasından dolayı mastitis vakalarında da primer etiyolojik ajan konumunda bulunmaktadır. 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 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. 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 öze alındıktan sonra. Lam üzerine damlatılmış hidrojen peroksit ile katalaz testine tabi tutulur. Katalaz testinde eğer bakteride hidrojen peroksiti oksijen ve suya ayırıştırıcı enzim bulunuyorsa gaz çıkışı gözlenir. Reaksiyonun pozitif olması üreyen koloninin Stafilokok türü olduğunu göstermektedir. Patojenik Stafilokok ve Koagulaz Negatif Stafilokok türlerinin ayrımı için koagulaz testi yapılır. Koagulaz testinde ise EDTA'lı tavşan serumu ile koloni homojenize edilir ve aglutine yapılar görüldüğü zaman reaksiyon pozitif olarak değerlendirilir. Eğer bakteride koagulaz enzimi yoksa herhangi bir değişiklik gözlenmez ve bakteri Koagulaz Negatif olarak değerlendirilir. Diğer bir identifikasyon metodu ise CAMP testidir.



Stafilokokların mikroskopik görünümü

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

Corynebakterilerin hücre duvarları meso-diamino-pimelic acid (meso-DAP), arabinogalaktan 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 pleomorftir. 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 kateterlerin 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 fimbrialara 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.

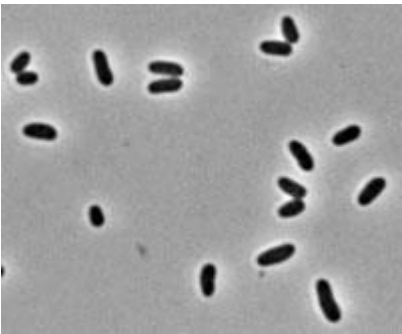

Laboratuvara apse içeriği, akciğer, lenf yumruları, uterus, burundan alınan svablar, diğer organlardan alınan parçalar, atılan yavru veya organ parçaları, eklem sıvısı, süt, sperma gibi maddeler gönderilir. Marazi maddelerden hazırlanan preparatlar Gram boyama tekniğine göre boyanır. Gram pozitif pleomorfik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

Marazi maddelerden zenginleştirilmiş kanlı agara ve serumlu agara ekimler yapılır. 37 °C 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, 1x5 µm boyutlarında görülen aerobik mikroorganizmalardır. Nutrient agar gibi zenginleştirilmemiş besi yerlerinin çoğunda, aerobik olarak, geniş bir ısı aralığında (10°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. İnfeksiyon direkt temas, inhalasyon, sindirim, umbilikal veya mukoz membran aracılığıyla konjenital 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 °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 hemoliziner, *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 odaklar	Mukoz membranlar, çevre
<i>C. pseudotuberculosis</i>			
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 Koyun, keçi	Sistit, pyelonefrit Ülseratif balanopostitis	Ürogenital kanal 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 haastalıklar			
			
Korinebakterilerin mikroskopik görünümü		R. equi mikroskopik görünümü	

Uygulamanın adı	Bacillus anthracis, Clostridium ve Mycobacterium türlerinde laboratuvar teşhisi
Yapılacağı hafta	11
Uygulamanın temel hedefi	Bacillus anthracis, Clostridium ve Mycobacterium türlerinde laboratuvar teşhisi
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, Piroplazmosis, 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:

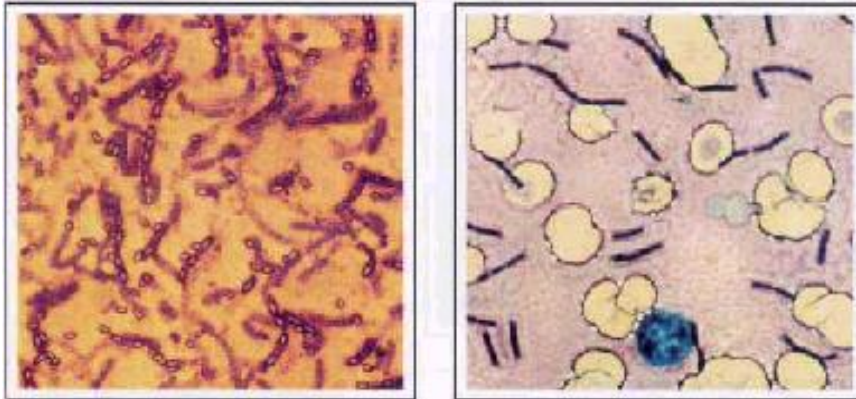
- A) KAPSÜL FORMASYONU: *B. anthracis* vücut içinde kapsül verir.

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 intraperitoenal verildikten 6-8 saat sonra, periton sıvısından yapılan frotiler Giemsa ile boyanırsa kapsüllü basillere rastlanır. Diğerlerinde bu kapsül formasyonu görülmez.

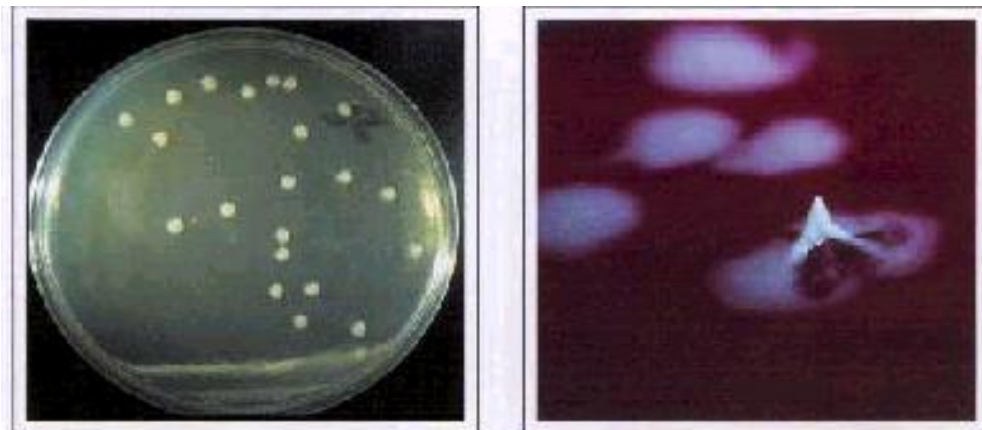
- B) BOYAMA: Kolonilerden yapılan boyamalarda antraks saç gibi uzun ve birbirine paralel filamentler meydana getirir.
- C) HAREKET: *B. anthracis* hareketsiz olmasına karşın *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium* hareketlidir.
- D) İNCİ REAKSİYONU: Eğer, *B. anthracis*, içinde 5-10 UI/ml penisilin içeren ortamlarda 8-9 saat üretildikten sonra frotiler yapıp Gramla boyanırsa, basillerin yuvarlaklaştığı ve tespik 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 ölürler. Ölen hayvanların otopsi yapılır, 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 mikrohemaglutinasyon 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

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, septisemi, 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 verir. Clostridium türleri Clostridium perfringens hariç hareketlidirler ve kapsül oluşturmazlar. *C. perfringens* kapsül oluşturur ve hareketsizdir. Klostridiumlar 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 tellüritli, 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 dijeste olur ve ette bazı değişiklikler şekillenir.



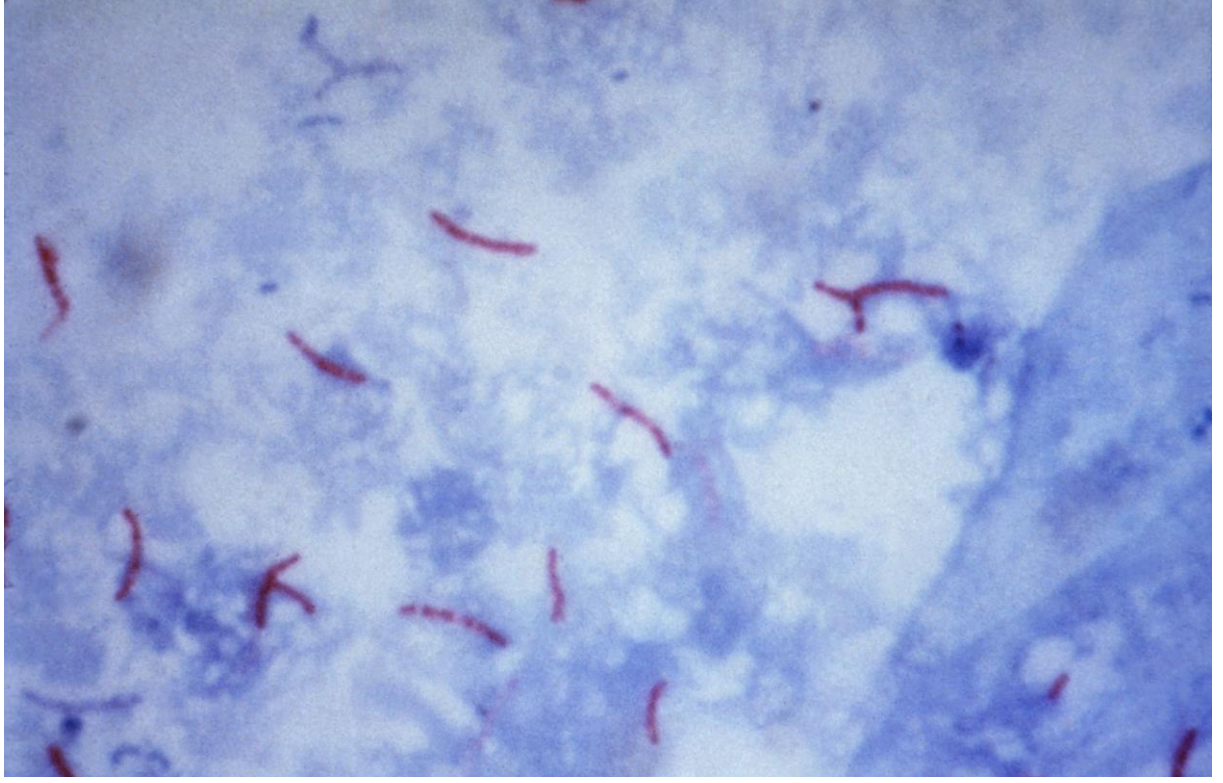
Clostridium türlerinin genel mikroskopik görünümü

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

- a) Preparat hazırlanır, kurutulur ve tespit edilir.
- b) Lam üzerine ve bütün lâmanı kaplayacak tarzda karbol füksin solusyonu konur.
- c) Preparat alttan 4-5 dakika ve aralıklı olarak hafifçe ısıtılır. Preparatın yanmamasına ve kabarcıkların çıkmamasına dikkat edilir (preparat üzerinden hafif buharlar çıkabilir).
- d)Boya dökülür ve preparat asit-alkolde (% 95 alkol + % 3 HCl asit) dekolore edilir.
- e) Su ile yıkanır.
- f) Preparat üzerine metilen mavisi solusyonu konur ve 10-15 saniye boyanır.
- g) Boya dökülür ve su ile yıkanır.
- h) 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, Burkholderia türleri morfolojik yapıları ve laboratuvar teşhisi, Brucella türleri morfolojik yapıları ve laboratuvar teşhisi
Yapılacağı hafta	12
Uygulamanın temel hedefi	Enterobakterilerin genel mikroskopik yapısı ve laboratuvar teşhisi, Burkholderia türleri morfolojik yapıları ve laboratuvar teşhisi, Brucella türleri morfolojik yapıları ve laboratuvar teşhisi
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) tanımlanır. Üreyen *E. coli*'lerin virulens faktörlerinin PCR gibi moleküler yöntemlerle de 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 enjeksiyon 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 aglütininler bulunabildiğinden, aglütinasyon titresinin 1/1000 ve üzerinde bulunması pozitif olarak değerlendirilir. Ya da sürü 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 portörlerin 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 teşhis kültürle konulabilir.

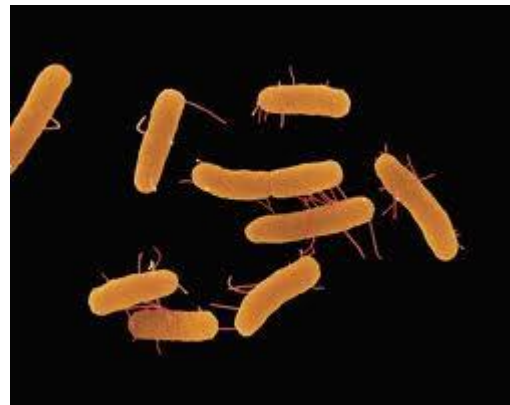
2-Kültür: Bu amaçla, marazi maddelerden, genel ve selektif besi yerlerine ekimler yapılır. İncelenen materyal dışkı veya gıda maddeleri ise, soğuk zenginleştirme yönteminden yararlanılmalıdır. Üreyen koloniler, ayırt edici biyokimyasal reaksiyonlar kullanılarak identifiye edilir. Ayrıca, 25°C' de ve 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 enjeksiyonları sonucunda 4 gün içinde septisemiye bağlı ölümler şekillenmektedir. Kobaylarda da konjunktivitis oluşturmaktadır.

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



E. coli mikroskopik görünümü



Salmonella türleri mikroskopik görünümü



Yersinia türleri mikroskopik görünümü

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 hafifçe 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.

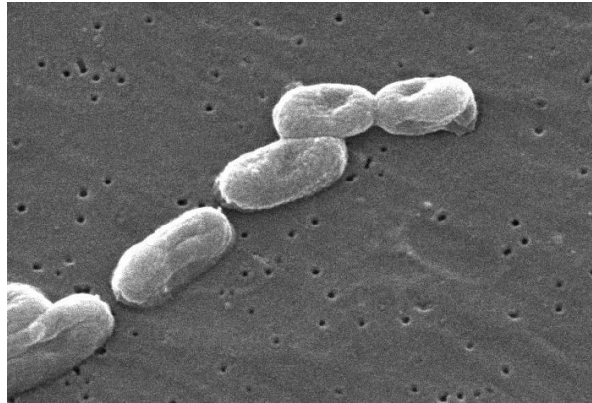
Laboratuvara gönderilen klinik örneklerden sürme preparatlar hazırlanarak Gram boyama yöntemiyle boyanır. Mikroskopik muayenede Gram negatif, çift veya gruplar halinde düz ya da hafif eğri çomaklar görülür. *B. mallei'nin* direkt bakteriyoskopisinde fluoresan antikör tekniği de kullanılabilir.

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 ünite basitrasin ve 0,25 aktidion ilave edilmiş besiyerleri kullanılabilir. *B.mallei'nin* üremesi *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 renklere koloniler şekillenir. Koloniler eskidikçe granüler bir görünüm alarak sarımsı veya kahverengine dönerler.

Ruam'ın serolojik tanısı komplement fiksasyon (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 MALLEİN 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, intrapalpebral veya oftalmik yollarla uygulanabilir.



Burkholderia türleri mikroskopik görünümü

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 infeksiyonlarla 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 etkenidir. 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, fetusun mide içeriği, fetus 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, Fluorescein'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 yararlanır. 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 yararlanır.

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 Serumu 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 antikoları belirler ancak ayrımlarını yapamaz.

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

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

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

*Ancak, spesifik olmayan ve inkomple antikoların 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 antikoların aglutinasyon oluşturmadığı bilinmektedir.

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

*Testin uygulanışında ilk olarak antijen ve şüpheli serum inkubasyona bırakılır, sonra yıkama işlemi yapılarak bağlanmamış antikolar 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 Competetif ELISA'in de Ig sınıflarının saptanması ve aşıllı hayvanları ayırmada yardımcı olan bir test olarak uygulandığı ileri sürülmektedir.

7-Pasif Hemaglutinasyon Testi: Spesifik ve duyarlı olduğu bildirilen bu yöntemden de Brucellosis'in teşhisinde 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 Serumuna ile Yapılan Serolojik Testler

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

-Bu testin esası sütle çıkartılan antikoların 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 Serumuna 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.

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



Brucella türleri mikroskopik görünümü

Uygulamanın adı	Pasteurella ve Mannheimia türlerinde gram boyama ve mikroskopik inceleme, Campylobacter türlerinin preparatlarının incelenmesi ve laboratuvar teşhis prosedürü, Mantarlarda izolasyon, identifikasyon prosedürü, mantarların boyanması ve incelenmesi
Yapılacağı hafta	13
Uygulamanın temel hedefi	Pasteurella ve Mannheimia türlerinde gram boyama ve mikroskopik inceleme, Campylobacter türlerinin preparatlarının incelenmesi ve laboratuvar teşhis prosedürü, Mantarlarda izolasyon, identifikasyon prosedürü, mantarların boyanması ve incelenmesi
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
<ul style="list-style-type: none"> •Pasteurella'lar Gram negatif, kokoid, oval, kısa küçük çomaklar ve bazen filamentler tarzında görünüme sahiptirler. •İnfekte dokulardan yapılan sürme preparatlarda karakteristik bipolar tarzda boyanırlar. •Aerob ve fakültatif anaerob koşullarda kolayca üreyebilirler. •Genel besi yerlerinde pek iyi üreme göstermemelerine karşın, kan ve serum içeren besi yerlerinde daha kolay gelişirler. Katı besi yerlerindeki kolonileri küçük boyuttadır. •Hafif veya orta şiddette bir asit oluşturmak suretiyle gaz yapmaksızın, karbonhidratları fermente ederler. •Nitratları nitritlere dönüştürürler. •Oksidaz ve katalaz testi pozitifdir. •Sütü koagüle etmezler ve jelatini eritmezler. •Ekzotoksinleri çok az patojenik olup endotoksinleri vardır. •Yeryüzünde çok yaygın olarak bulunurlar ve hayvanlar arasında büyük solunum yolu patojenleri olarak kayıplara ve ekonomik zararlara neden olan hemorajik, septisemik hastalıklara neden olurlar. <p>Patogenesis</p> <ul style="list-style-type: none"> •Pasteurella'lar vücuda girdikleri yerlerde yani infeksiyon bölgesinde çoğalarak dolaşım sistemine girerler. • •Kan damarlarında üreyen mikroorganizmalar damar cidarının zedelenmesine, kanın dışarı sızmasına (hemorajilere) neden olurlar. Kan vs. dokularda mikroorganizmalar çok çabuk üreyerek hayvanın 12-24 saat gibi kısa bir zamanda ölümüne (septisemi)

yol açarlar.

•Uzun süren olaylarda iç organlarda bakterinin ürediği ve yerleştiği yerlerde nekrotik odaklara rastlanır.

Patogenesis

•Pasteurella infeksiyonlarında, genellikle, süregen durumlarda diğer bakteriler de (Strep-tokok, Stafilokok, Korinebakteriler v.s.) işe karışarak sekonder olarak rol oynarlar ve hastalığın seyrinin değişmesine ve hem de prognozun ağırlaşmasına sebep olurlar.

•Bazen de tersi olur ve Pasteurella'lar sekonder olarak infeksiyonlarda bulunurlar. Bu durumun teşhiste önemi fazladır.

•Pastörellozda etkenin bu kadar çabuk çoğalması ve yayılmasında "agresin'lerin" rol oynadığı ileri sürülmektedir. Agresinler fagositoza ve bakteriolizise engel olduklarından vücudun direnci çabuk kırılmaktadır.

Klinik Belirtiler

•Hastalık sığırlarda akut, subakut ve kronik tarzda seyrederek.

•1- Akut (septisemik) form,

•2- Subakut (ödemli) form,

•3- Kronik (pektoral) form.

•**1-Akut (septisemik) form:** Bu formda hastalık aniden başlar ve kısa zaman içinde hayvanları öldürür. Bu nedenle de genellikle semptomlara rastlamak mümkün olmaz.

•Hastalarda vücut ısısı 40°C' nin üstüne çıkar.

•Nabız zayıflamış, hayvanlar durgun iştahsızdırlar.

•Mukozalar siyanoz bir durumdadır. Sonraları kolik ve ishal gözlenir.

•Gaita önceleri suludur, sonraları kan izleri içerir.

•Hastalığın diğer semptomları arasında epitaksis ve hematuria da vardır. Hastalık ya bu şekilde seyrederek hayvanın ölümüne neden olur veya diğer şekiller meydana gelir.

•**Nekropside:** Ölümünden sonra kaslarda, akciğerlerde, mukoz ve seröz membranlarda fazla derecede hemorajiler ve iç organlarda hiperemiler göze çarpar. Lenf yumruları şişmiş ve ödemlidir. Kesit yüzleri kırmızı renktedir. Akciğerlerde hemorajik odaklara rastlanır. Karaciğer ve böbreklerde çok hafif bir büyüme görülebilir. Seröz kaviteelerde kanlı bir eksudat bulunur.

•**2- Subakut (ödemli) form :** Bu hastalık tablosuna subakut olgularda tesadüf edilir.

•Hayvanda baş, boyun, göğüs bölgesinde ve gittikçe yayılma eğiliminde olan ödemler meydana gelir. Ödemler anus, genital organlar, dil, bacaklar ve eklemlerde de görülebilir.

•Ödemli yerlerdeki deri gergin, sıcak ve ağrılıdır.

•Gözlerde akut konjonktivitis ve lakrimasyon bulunur.

•Bukkal mukoza hiperemik ve ağrılıdır. Dil şişmiş ve ağrılı bir hal almıştır. Rengi koyu kırmızı esmerdir. Hayvan yutkunamaz ve salyası ağızından ak.ar.

•Barsakta hemorajik bir enterit bulunur.

•Hayvanlar asfeksi veya kanlı ishal sonucu meydana gelen bitkinliklerden ölürler.

•**Nekropside;** vücuttaki ödemli bölgelerde, deri altında hemorajik bir infiltrasyon bulunur. Dil siyanozi renkte, sert ve büyümüştür. Kesilince içinden sarı-seröz bir sıvı akar. Retrofarangial ve servikallenf yumrularında; akut bir şişme gözlenir.

Abomasum ve ince barsaklarda hemorajik bir enterit vardır. Barsak içeriği kanlıdır.

•**3-Kronik (pektoral) form:** Hayvanın derecesi 40-41°C' ye çıkar, solunum kısa ve hızlıdır; hayvanın genel durumu bozulmuştur.

•Hayvan kuru ve ağrılı bir şekilde öksürür.

•Burundan önce mukoz sonraları mukopurulent ve kanlı bir akıntı gelir.

•Akciğerlerde krepatasyon duyulur.

•Başlangıçta bir kabızlık sonra' yerini hemorajik bir ishale bırakır ve hayvan bitkinlikten ölür.

•**Nekropside;** Vücuttaki ödemli bölgelerde, deri altında hemorajik bir infiltrasyon bulunur. Dil siyanozi renkte, sert ve büyümüştür. Kesilince içinden sarı-seröz bir sıvı akar. Ön ve üst solunum yollarında kataral bir yangı bulunur. Retrofarengial, servikallenf yumrularında; akut bir şişme müşahede edilir. Abomasum ve ince bağırsaklarda hemorajik bir enterit vardır.

•Afettede akciğer bölgesi sertleşmiş, kesit yüzü koyu kırmızı-esmer veya kırmızıgrı bir manzara arz eder. İnterlobuler septa kalınlaşmış olduğundan damarlı bir mermer manzarası görünümündedir. Bu duruma kontagiyöz pleurapönomonida da rastlanır. Akciğerin diğer kısımları hiperemik ve ödemlidir.

• **Laboratuvar muayeneleri**

• **1-Bakteriyoskopi:** Akut olaylarda, mikroorganizma her yerde bulunduğu için, gönderilen kalp kanı, ödem sıvıları, dalak, karaciğer, kemik iliği ve dokulardan preparatlar hazırlanarak Giemza ile boyanır ve frotide bipolar mikroorganizmalar aranır. Kronik olgularda mikroorganizmalar daha ziyade organlarda lokalize olmuşlardır. Frotilerde bipolar mikroorganizmaların görülmesi ile kesin teşhis konamaz.

• **2-Kültür:** Gönderilen marazi maddelerden petri kutularındaki kanlı agara veya diğer serumlu ve özel besi yerlerine ekimler yapılarak 37°C'de 24-48 saat bırakılır. Üreyen mikroorganizmaların koloni morfolojileri, mikroskopik morfolojileri ve biyokimyasal özellikleri incelenir.

• **3-Hayvan deneyi:** Gerek gönderilen marazi maddelerden ve gerekse izole edilen mikroorganizmalardan fare ve güvercine şırıngalar yapılır. Hayvanlar virulent şuşlar 24-48 saat içinde ölürler. Ölen hayvanın kanından froti ve ekimler yapılarak teşhis doğrulanır. Tavşanlar da *P. multocida* infeksiyonlarına hassastırlar.

•*M. haemolytica* koyun, sığır ve domuzlarda enzootik pnömonilere neden olur.

•Son yıllarda yapılan toksonomide *Pasteurella haemolytica*, *Mannheimia* cinsi içerisinde yer almıştır. *P. haemolytica*'nın biotip A'sı, *Mannheimia haemolytica* olarak kabul edilmiştir.

Etiyoloji

•*M. haemolytica* taze izole edilmiş kültürlerde *P. multocida* ile aynı morfolojik özelliklere sahiptir.

•Gram negatif hareketsiz, sporsuz, kapsüllü çomakçıklar halinde gürülür.

•Metilen mavisi veya Giemsa ile boyanan bipolar karakteri farkedilirse de *P. multocida* kadar bariz değildir.

•Laboratuvarda adi besiyerlerinde kolayca ürer.

•Buyyonu homojen olarak bulandırır ve tüpün dibinde tortu oluşturur.

•Kati besi yerlerinde 24 saat içinde kenarları yuvarlak, nemli ve parlak koloniler meydana getirir.

•At, koyun ve tavşan kanlı agarında beta hemoliz oluştururlar. Bu özellik besi yerlerinde devamlı pasajlar ile azalır, fakat hayvan pasajları ile tekrar kazanılır.

Klinik Belirtiler

•Mikroorganizma kuzularda septisemilere neden olur.

•Akciğerlerde pleuresie ve plöra üzerinde fibrin oturması göze çarpar. Akciğerler kostalara yapışık bir hal alabilirler.

•Akciğerlerde lenf yumruları hiperemik ve ödemlidir.

•Seröz ve mukoz membranlarda hemorajiler vardır.

•Plöra ve periton boşluğunda eksudat bulunur. Bu sıvı içinde fazla miktarda

mikroorganizmaya rastlanır.

•*M. haemolytica* koyun, sığır ve domuzlarda enzootik tarzda seyreden pnömonilere neden olduğu gibi, koyunlarda gangrenöz mastitislere de yol açar.

•*M. haemolytica*'dan ileri gelen infeksiyonlar çok sayıdadır. Bu nedenle büyük ekonomik zararlara neden olmaktadır. Hastalık kuzularda septisemi, koyun ve sığırlarda ise plöra-pnömonia tarzında seyir takip eder. Prognozu *P. multocida*'daki gibidir.

•Teşhis

•*P. multocida*'daki teşhis yöntemleri burada da aynen uygulanır.

•Sağaltım

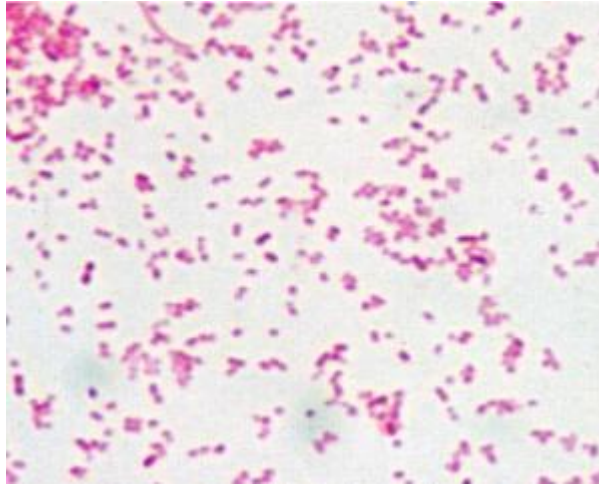
•Sülfanamid ve antibiyotiklerle hastalar tedavi edilebilirler.

•

Koruma

•**1-Aktif immunizasyon:** Hem monovalan bakteriler (*M. haemolytica*) ve hem de polivalan bakterilerle (*P. multocida* ve *M. haemolytica*) aktif immunizasyon sağlanabilir.

•**2-Pasif immunizasyon:** Hiperimmün serumlarla olur. Gerek hasta hayvanlara ve gerekse profilaktik olarak kullanılabilirler.



Pasteurella türlerinin mikroskopik görünümü

- Kampilobakterle çeşitli evcil ve yabani hayvanların normal bağırsak floralarında bulunmakta ve bu hayvanlarda enterik ve genital sistem infeksiyonlarına neden olmaktadır. Ayrıca bu etkenler insanlarda da infeksiyon oluşturmaktadır.
- Birçok türünün Vibrio cinsi içinde olduğu sanılan Kampilobakterlerden Campylobacter fetus gebe koyun-keçi ve sığırlarda salgın şeklinde yavru atmaların, Campylobacter jejuni ve Campylobacter coli insanlarda gastorenteritisin başlıca nedenleri arasındadır.
- Başta kanatlılar olmak üzere hayvansal gıdalar, kontamine yeryüzü suları, pastörize edilmemiş sütler, infekte hayvanlarla direkt temas, hastalığın bulaşma kaynakları arasında yer almaktadır.
- Gram negatif, "S"harfi, helical veya daha uzun spiral şeklinde, mikroaerofilik, sporsuz, kapsülsüz ve aside dirençli olmayan bakterilerdir.
- Bakterinin tek her ucuna yerleşmiş kılıfsız polar flagellalar ile aktif hareketlidirler.
- Fimbria veya pilusları yoktur.
- Karbonhidratları kullanmayan sınırlı respiratorik bir mekanizmaya sahiptirler.
- Enerjilerini tirkarboksilik asit mekanizmasından sağlarlar.

- Türlerin çoğu zorunlu mikroaerofiliktir.
- Optimal üreme için ortamda %3-5 oksijen, %7-10 kabondioksit bulunması gerekir.
- Türlerin çoğu aerobik ve anaerobik ortamda üremez.
- Optimal üreme ısıları 37 °C dir.
- Oksidaz pozitifler
- Asit veya nötral son ürünler oluşturmazlar.
- Jelatin, üre, MR ve VP negatiftirler. Üreme ısı limitleri, katalaz, nitrat, hippurat, H₂S, selenit reaksiyonları, glisin ve tuz toleransları yönünden türler arasında farklılıklar vardır.
- 42 °C de üreyebilen türler "Termofilik Campylobacter" grubunu oluşturur.

TEŞHİS

- Klinik Teşhis: Diğer abortus vakalarından ayırmak zordur.

- Otopsi bulguları:

- Fokal karaciğer nekrozu

- Kotiledonların üzeri süte benzer veya peynirimsi bir kitle ile kaplı ve ödematözdür.

- Laboratuvar Muayeneleri:

- Atık fötüs, steril koşullarda alınan mide, karaciğer ve diğer iç organlar, kotiledonlar ve yavru zarları kısa sürede laboratuvara yollanır.

- BAKTERİYOSKOPİ: Mide içeriği ve kotiledonlardan hazırlanan sürme preparatlar Gram boyama yöntemi ile boyandığında "S" veya daha uzun spiral şekilli gram negatif bakteriler görülebilir.

- KÜLTÜR: Mide içeriği, karaciğer ve diğer iç organlardan %7 defibrine kan ilave edilmiş BHI agar, kolombiya agar, brusella agar, tiyoglukonat agar gibi besiyerlerine ekim yapılır.

- Eğer fötüs taze değilse veya kotiledonlardan ve yavru zarlarından ekim yapılacaksa bu besiyerlerine SKIRROW veya BUTZLER selektif suplemanları konulur. Besiyerleri mikroaerofilik ortamda 37 °C de 3-5 gün inkube edilir. Daha sonra biyokimyasal testlerle tanıya gidilir.

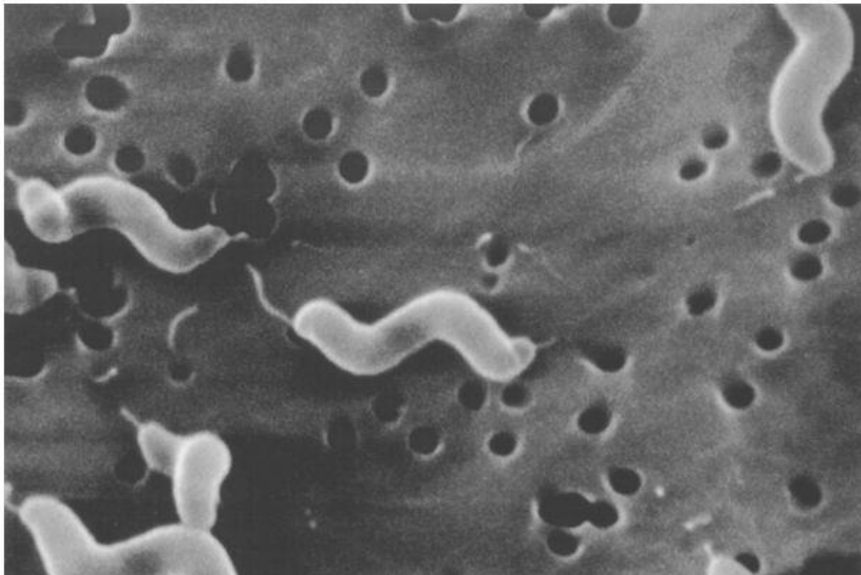
- HAYVAN DENEYİ: Bu amaçla fare, embriyolu yumurta ve kobaylar kullanılır.

- SEROLOJİK TESTLER: Bu amaçla atık yapan koyunlardan 15 gün sonra kan alınır. Serolojik teşhis için;

- ELISA

- Aglutinasyon

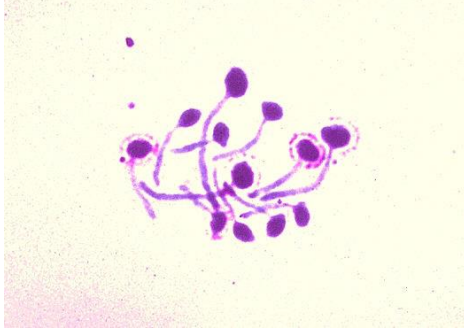
- Komplement fiksasyon testleri kullanılır.



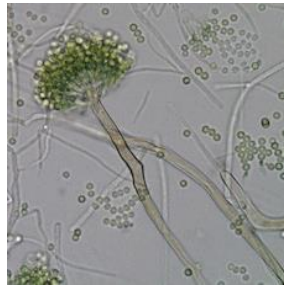
Campylobacter türlerinin mikroskopik görünümü

Mantarların incelenmesi

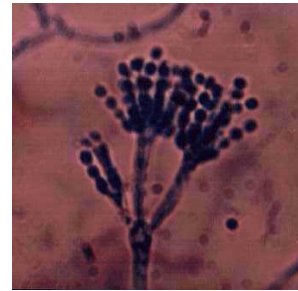
- Gram boyama: tüm mantarlar Gram olumludur.
 - Laktofenol pamuk mavisi yöntemi
 - Laktik asit 20 ml
 - Fenol kristal 20 gr
 - Gliserin 40 ml
 - Saf su 20 ml
 - Pamuk mavisi (Poirrier mavisi) 0.075 gr
 - Saf su, Laktik asit ve Gliserin karıştırılır. Isıtılırken Fenol kristalleri eklenir boya atılır ve eritilir.
 - Lam üzerine bir damla % 96 lık etil alkol konur. İğne ile bir miktar kültür alıp ezilir
 - Bir damla boya damlatılıp lamel kapatılır
 - X40 büyütmede mantar elemanları açık mavi boyalı olarak görülür
 - Saydam bant-Laktofenol pamuk mavisi yöntemi: saydam banttan 3 cm kesilerek yapışkan yüzü alt tarafa gelecek şekilde bir penset ile tutularak mantar kolonisine dokundurulur (küflerde)
 - Üzerinde bir damla boya olan lam üzerine yapıştırılarak X40 büyütmede incelenir
-
- Cryptococcus neoformans ve Histoplasma capsulatum gibi kapsüllü mantarların incelenmesinde çini mürekkep ile yağ preparat hazırlanır
 - KOH ve NaOH preparatları
 - Kıl, deri, tırnak gibi keratinize dokunun mantar infeksiyonlarında mantar aramasında kullanılır
 - Örnek bölgesi etil alkol ile silinir. Bistüri ile kazıntı alınır. Materyal üzerine bir damla % 15 lik KOH veya NaOH eriyiği damlatılıp lamel kapatılır. Alttan hafifçe ısıtılır
 - X40 büyütmede hifler, sporlar vs mantar elemanları görülür.



Candida etkenleri



Aspergillus etkenleri
etkenleri



Penicillium

Uygulamanın adı	Kanatlılarda görülen bakteriyel ve viral infeksiyonlarda izolasyon ve identifikasyon yöntemleri
Yapılacağı hafta	14
Uygulamanın temel hedefi	Kanatlılarda görülen bakteriyel ve viral infeksiyonlarda izolasyon ve identifikasyon yöntemleri
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Besiyeri, öze, öze ucu, mastitisli süt, 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	
<p><u>PRİMER BAĞLANMA TESTLERİ</u> : Antijen ve antikorun reaksiyona girmesine müsaade edilir. Oluşan immun kompleksin miktarı direkt ya da dolaylı olarak ölçülür. Bu reaksiyonu ölçebilmek için Ag. Veya Ab. ; radyoizotop, floresan boya ve ya enzim ile işaretlenir. Reaksiyon tamamlandıktan sonra ; birleşmemiş materyaller ortamdaki uzaklaştırılarak, reaksiyona giren kısmın miktarı , işarete dayanılarak ölçülür.</p>	
<p><u>KULLANILAN MATERYALLER :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Mikroplate • Antijen→normalden az ya da fazla kullanılmamalıdır. • Wash buffer • Şüpheli serum • Substrat → renksizdir ve reaksiyona girince renk verir. • Konjugat → substrat'a bağlanır. Bağlanma sonucu renk oluşur. 	
<p>Oluşan immunolojik reaksiyonun, enzim-substrat sistemi ile görünür hale getirilmesi esasına dayanan teknikleri kapsar. Hem ag , hem de ab varlığı ve miktarı hassas olarak ölçülür.</p>	
<p>(n) sayıdaki serum için (n) sayıda sulandırma yapılır. Her göz bir serumu temsil etmektedir.</p>	
<div style="text-align: center;"> <p>0,6 ml FTS + 25 µl şüpheli serum → 1/25</p> </div>	
<div style="text-align: center;"> <p>0,9 ml FTS + 100 µl I.sulandırma → 1/250</p> </div>	
<div style="text-align: center;"> <p>200 µl serum diluent + 200 µl II. Sulandırma → 1/500</p> </div>	

Bir tane IB için özel mikropate kiti alınır.
Her örnek serum için 1 göz kullanılmaktadır.
Göze 0,1 ml en son sulandırmadan koy.
30 dk beklenir.
Sıvı dökülür.
4 kez yıkama solusyonu ile yıkanır.
0,1 ml konjugat koy.
30 dk beklenir.
Yıkama
0,1 ml substrat koy
15 dk bekle
0,1 ml stop solusyonu koy.
650 nm de sonuçlar okunur.

*** Mikroorganizmaların izolasyonunda ve serumdaki antikorların tespitinde kullanılan çok duyarlı ve spesifik bir testtir.

Testin esası; şüpheli antijen veya antikorun homoloğu olan ve enzim ile işaretli bir konjugata bağlanması ve bu bağlantının substrat adı verilen kimyasal bir madde yardımı ile renginin değiştirilip görülür hale getirilmesidir.

3. DİREKT ELISA → şüpheli marazi maddede m.o. aranması için yapılır.

4. İNDİREKT ELISA → şüpheli serumda antikor aranması ve titre saptanması için yapılır.

NDV-IBV-IBD-Mg-Ms-ReoVirus v.b. için ticari kitler mevcuttur ve rutin olarak uygulanmaktadır.

ŞÜPHELİ SERUM daki Ab + Ag → birleşir.

Bu komplekse konjugat bağlanır ki enzim ile işaretlenmiştir.

Ortama substrat eklenir ve komplekse bağlanır.

Enzim substratı parçalar ve renk oluşur.

Stopper eklenerek reaksiyon durdurulur.

ELISA reader da okutulur.

KULLANILAN MATERYALLER

Şüpheli Serum

+/- kontrol

Serum sulandırıcısı

Ticari mikropleyt

Wash buffer= yıkama solusyonu

Konjugat

Substrat

Stopper

Reader

TESTİN YAPILIŞI

Enfeksiyona spesifik ticari mikropleytler vardır ve mikropleytin her gözü taranacak olan enfeksiyonun etkeni ile yani antijen ile kaplıdır.

Mikropleyt 8x12 olmak üzere 96 gözlüdür.

İlk göze negatif kontrol konur.

İkinci göze pozitif kontrol konur.

Diğer gözlere de serum sulandırıcısı ile 1/500 oranında sulandırılmış serumlar

konur.
30 dk beklenir.
Wash buffer ile 4 defa yıkanır ve kurutulur.
Her göze konjugat eklenir.
30 dk beklenir.
Wash buffer ile 4 defa yıkanır ve kurutulur.
Her göze substrat eklenir.
15 dk beklenir.
Substratın üzerine stopper eklenerek, reaksiyon durdurulur.
ELISA reader da okutulur.

SONUÇ

Reader otomatik olarak renk değişikliklerini tespit eder ve bize antikor titresini verir. Böylece sürünün antikor titresini tespit edilir.

Hastalık durumu belirlenir.

Aşı zamanı belirlenebilir.

Yakın zamanda uygulanmış olan aşının sürüyü ne kadar koruduğu hakkında bilgi verir.

HEMAGLUTİNASYON TESTİ

Eritrositlerin serum ya da m.o. etkisiyle bir araya gelerek, kümeler halinde çökmeleridir. Pek çok m.o. ve viruslar; HA yeteneğine sahiptir. Burada olay bir ag-ab reaksiyonu değil ; doğrudan doğruya m.o.da bulunan ve eritrositlerdeki reseptörlere yapışma ve onları çöktürme özelliğidir.

MEKANİZMA : HA özelliğnde olan m.o.ların duyarlı eritrositlerin yüzeylerine yapışma eğiliminde olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda; HA özelliği bulunan m.o.ların yüzeylerinde kısa ,çivi benzeri organeller bulunduğu gözlenmiştir. Bunların eritrositlerin yüzeylerindeki mukopolisakkarit içeren reseptör bölgelerine özgün olarak bağlandıkları saptanmıştır. HA sırasında pek çok virus partikülü duyarlı eritrosite etki eder. Virus 2 eritrosit arasında kalacak şekilde bağlanır.

Bu bağlanma sürekli değildir. Virus , salgıladığı Neuroamidase enzimi ile reseptör bölgelerini tahrip eder. Ve eritrositlerden ayrılır. Bu olaya ELUSYON denir. Ayrılmadan sonra eritrosit yüzeyindeki reseptörler tahrip olduğu için; aynı eritrosit ile aynı virus tekrar bağlanamaz. Ancak başka bir virus ile bağlanma olabilir. Çünkü eritrositler yüzeyinde her virus için ayrı bir spesifik reseptör bulunmaktadır.

AMAÇLARI :

1. etken varlığını saptamak
2. HI testinde kullanılacak olan virus ya da bakterinin HA ünitesini belirlemek.

KULLANILAN REAKTİFLER :

1. Yıkanmış Tavuk Eritrositi (YTE)
2. antijen
3. FTS

ÇABUK HA = LAMDA HA : virus yada bakterinin varlığını ortaya koymak için yapılır.
→ lamın üzerine → 1 damla Ag + 1 damla YTE → suspanse edilir → çökme varsa = HA +

YAVAŞ HA = TÜPTE/MİKROPLATE'TE HA : bu yöntemle virusun HA titresini hesaplanır.

1. şüpheli virus log₂ tabanına göre sulandırılır.
2. bütün gözlemlere %2'lik eritrosit süspansiyonundan virus sulandırmalarına eşit miktarda konur.
3. oda sıcaklığında 2 saat ya da 37°C'de 30 dk. inkübasyona bırakılır. Ve sonuçlar değerlendirilir.

DEĞERLENDİRME :

- HA + → tütün dibinde dantela tarzında irili ufaklı kümeleşme vardır.
- HA - → düğme çöküntü oluşur.

HEMAGLUTİNASYON BİRİMİ (HB) : HA oluşturan en son sulandırma oranı, o virus için HA Birimidir.

HEMAGLUTİNASYON İNHİBİSYON TESTİ = HI

HA yeteneğine sahip olan m.o.ların bu yeteneklerini, bu m.o.ya karşı oluşmuş spesifik ab.tarafından inhibe edilmesidir. Yani spesifik serum ile virus birleşerek, onun HA yeteneğini ortadab kaldırır.

AMAÇ :

1. HI özelliğindeki m.o.ların identifikasyonu
2. serumdaki ab.ların titrelerinin ölçülmesi.

YAPILIŞI :

1. tüm gözlere FTS konur ve şüpheli serum \log_2 tabanına göre sulandırılır.
2. serum sulandırmalarına eşit hacimde 4HB oranında sulandırılmış olan bilinen virustan ilave edilir.
3. 37°C'de 45 dk inkubasyona bırakılır.
4. her göze virus+serum toplamı kadar %2'lik YTE ilave edilir.
5. 37°'de 45 dk beklenip → sonuçlar değerlendirilir.

DEĞERLENDİRME :

- HA meydana gelmesi bilinen virus ile ag nin birleştiğini yani bilinen virus ile şüpheli serum ab larının birleşmediğini gösterir. Dolayısı ile şüpheli serumda – bilinen virusa spesifik ab yoktur. HA (-) ise HI (+) tir. → düğme tarzındaki reaksiyonun görüldüğü son göz, tespit edilir. Ve 4 ile çarpılır. Bulunan rakam SERUM HI TİTRESİ'dir.

Uygulamanın adı	Kanatlı hastalıklarında serolojik ve moleküler teşhis yöntemleri
Yapılacağı hafta	15
Uygulamanın temel hedefi	Kanatlı hastalıklarında serolojik ve moleküler teşhis yöntemleri
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Besiyeri, öze, öze ucu, mastitisli süt, 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

Temel olarak mekanizma yüksek sıcaklıkta yapısı bozulmayan bir DNA polimeraz kullanılarak ,bir Thermo Cycler (Isı Düzenleyici) yardımıyla Dna replikasyonunu in vitro ortamda tekrarlanması sonucu dna nın çoğaltılmasını sağlamaktır.Bu mekanizma günümüzde moleküler biyoloji ve genetik laboratuvarlarının sıkça kullandığı bir yöntemdir.

Genetik tanı, gen klonlaması , Babalık tayini ,Nokta mutasyonları analizi ,prenatal tanı da ve birçok diğer uygulama alanı olması nedeniyle çok önemli bir keşif olarak biyoloji biliminde yeni ufuklar açmıştır.

PCR (POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU)

Laboratuvar ortamında spesifik DNA dizilerinin ;primer denilen sentetik oligonükleotid diziler yardımıyla çoğaltılması işlemidir Standart bir **PCR** Protokolü yoktur. Bileşenler çoğaltılacak DNA bölgesinin özelliklerine göre değişir.

KLASİK PCR: Hedef DNA dizisinin her iki ucuna özgü spesifik primerler kullanılarak termostabil DNA polimeraz yardımıyla uygulanan **PCR** çeşididir.Daha sonraki analizler için döngü sayısına göre üstel oranda artan düzeyde ürün elde edilir.Tipik bir **PCR** üç temel basamakta gerçekleşir:

*Denatürasyon:İlk aşamada DNA molekülünün çift zincirli yapısı yüksek ısı yardımıyla birbirinden ayrılır(denatürasyon) .Çoğunlukla 94°C- 97°C arasında 15-60 sn süresince uygulanır.(İlk denatürasyon tek saykıl olarak 15 dakikaya kadar uygulanır)

*Annealing(Bağlanma):Denatürasyonu takiben daha düşük ısılarda oligonükleotid primerler, ayrılmış olan tek zincirli DNA üzerinde kendi eşlenikleri olan bölgelere bağlanırlar.Bu olay çoğunlukla 47°C- 60°C arasında 30-60 sn 'de gerçekleşir.(G/C oranı yüksek olan bölgelerde bağlanma ısı 68°C'ye kadar arttırılabilir)

*Elongasyon(uzama):Son aşamada ısı 72°C'ye kadar arttırılarak DNA polimeraz enziminin tamamlayıcı DNA zincirini uzatması sağlanır.Elongasyon basamağının süresi kullanılan polimerazın cinsine ve amplifiye edilecek DNA'nın uzunluğuna göre

30sn ile 3 dakika arasında değişir.

Termal saykılının bu üç basamağı her tekrarında DNA miktarı teorik olarak iki katına çıkar.Oluşan ürün; ilk koyulan DNA miktarı ve saykıl sayısına bağlıdır. 25-40 saykıl uygulanır.

Klasik **PCR** normalde sayısal (quantitatif) bir değerlendirme ölçüsü değildir fakat quantitatife dönüştürülür.Jel elektroforez de ürünler karşılaştırılarak veya most probable number (MPN) yardımıyla sonuca ulaşılır.MNP yönteminde ardarda seyreltmeler ve MNP hesaplayıcısı kullanılır. Tercih edilmeyen bir yöntemdir.Bir diğer yöntem de competitive (karşılaştırmalı) **PCR**'dir. Karşılaştırmada delesyon veya insersiyon taşıyan örneklerle (farklı uzunlukta bant oluştururlar) elde edilen ürün jel elektroforezde karşılaştırılır.

MULTİPLEX PCR: Klasik veya Real-time **PCR**'nin modifikasyonu ile iki veya daha fazla farklı **PCR** amplifikasyonunun aynı reaksiyonda gerçekleştirilmesine dayanır.Klasik **PCR** ile aynı basamaklarda gerçekleşir fakat her bir reaksiyonda çoklu primer setleri kullanılır.Multiplex **PCR** ile daha az zamanda daha çok hedef bölge amplifikasyonu gerçekleştirildiğinden kullanışlı bir inceleme yöntemidir.Fakat önemli derecede optimizasyon gerektirir.Değişik hedeflerin aynı reaksiyon şartlarında amplifikasyonunu sağlamak için kullanılacak primerlerin dikkatli seçilmesi ,annealing ısılarının birbirine uygun olması, birbirleriyle dimerizasyona girmemeleri gibi bazı önemli şartları gerçekleştirilmesi gereklidir.Farklı primer çiftlerinin en iyi konsantrasyonlarının seçimi ve non spesifik amplifikasyonların önlenmesi birçok deneme gerektirir.

Reverse Transcription (RT)-**PCR:** mRNA ve viral RNA gibi RNA hedef dizilerinin amplifikasyonu amacıyla kullanılır.Bu **PCR** çeşidinde bir reverse transkriptaz enzimi ve DNA primeri kullanılır.DNA primeri genellikle dT oligonükleotidi içerir (sadece hexamer yapıda thymidine nükleotidi) veya bir spesifik primerdir.dT messenger RNA' nın poli A kuyruğuna bağlanır (5' ucunda). dT hexameri tüm RNA çeşitlerinde bulunmakla birlikte dezavantajı 25°C de hibridize olması ve ortamda RNase inhibitörü bulunmaz ise çabuk bozunmasıdır.

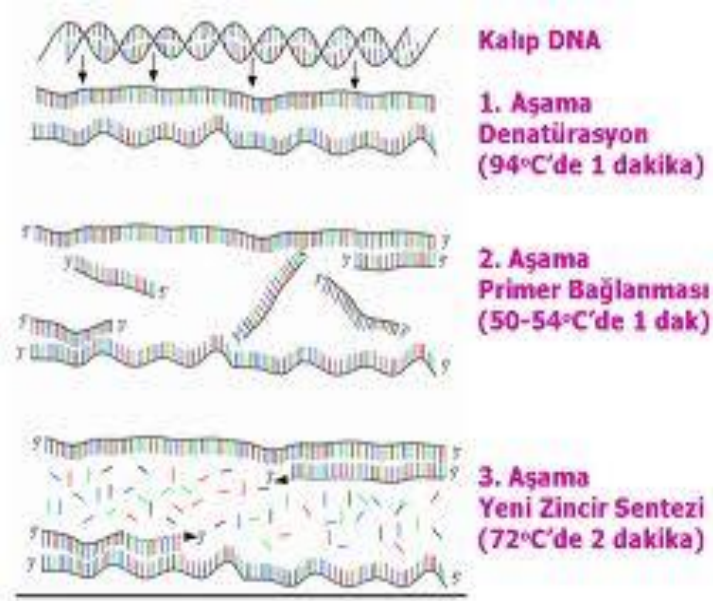
Reverse transcription ve **PCR** amplifikasyonu bir veya iki aşamada uygulanabilir.Ayrı ayrı iki aşama halinde uygulanan RT-**PCR** daha hassas ; tek aşamalı ise daha az kontaminasyon riski taşır (çünkü tüp transkripsiyondan sonra açılmamaktadır).Hangi yöntemin kullanılacağına belirlenmesi bizim hassasiyetmi yoksa kontaminasyondan kaçınmakmı istediğimize bağlıdır.RT-**PCR** için birkaç çeşit reverse transcriptase enzimi vardır.Bir veya iki aşamalı reaksiyon seçimi ve daha sonraki aplikasyonlara göre enzim karakteristiği seçilir.Bu seçimde RNase aktivitesinin olup olmaması , iyon gerekliliği,dUTP ekleyebilme yeteneği ve optimum çalışma ısı gibi etmenlerde önemlidir.

NESTED PCR: Kompleks mikrobiyal popülasyonlara ait hedef dizilerin spesifik bir şekilde amplifikasyonu klasik **PCR** yöntemleriyle bazen mümkün olmayabilir.Eğer amplifikasyonunu yapmaya çalıştığımız fragment uzunluğunda non-spesifik fragment(ler) amplifiye olmuş ise bu bizi yanlış sonuca götürebilir.Bundan kaçınmak için Nested **PCR** yöntemleri uygulanır.Bu metod ; klasik **PCR**'ye farklı primer takımlarıyla ikinci bir amplifikasyon uygulamaktan ibarettir.İlk amplifikasyonda elde edilen ürün ikinci **PCR** için kalıp olarak kullanılır.Kullanılan ikinci primer takımı diziye özgüdür.

KULLANILAN ENZİMLER: Termofilik bir bakteri olan Thermus aquaticus' dan elde edilen Taq DNA polimeraz ve modifikasyonları neredeyse tüm DNA

amplifikasyonlarında kullanılır. Diğer DNA polimerazlar da birbirlerinden nükleotid ekleme hızları, yarılanma ömürleri, ısı tolerans farklılıkları, eksonükleaz özelliklerinin olup olmaması gibi yönleriyle ayrılırlar. Hot-start DNA polimeraz enzimleri non-spesifik ürün oluşumunu engellemesi, yüksek ısıya dayanabilmesi, düşük annealing ısılarında da çalışabilmesi gibi nedenlerle tercih edilmektedir.

Enzim tipinin seçimini yapılacak amplifikasyonun koşulları belirler. Bir tek enzim kullanıldığı gibi kombinasyon da oluşturulabilir.



PCR aşamaları