



# **TIBBİ LABORATUVAR TEKNİKLERİ**

## **1.SINIF**

### **UYGULAMA LABORATUVARI**

#### **FÖYLERİ**

**Öğr. Gör. Abdulhamit ÇALI**

<b>Föy</b>	<b>İçindekiler</b>	<b>Sayfa</b>
<b>1</b>	Laboratuvar Kuralları .....	2
<b>1</b>	Laboratuvarda Kullanılan Araç ve Gereçler .....	3
<b>2</b>	Besiyeri Hazırlama .....	12
<b>3</b>	Besiyeri Ekim Yöntemleri .....	21
<b>4</b>	Mikrobiyolojide Kullanılan Boyama Yöntemleri .....	33
<b>5</b>	Mikroskopik Yöntemler .....	43
<b>6</b>	Biyokimyasal Testler .....	51
<b>7</b>	Antimikrobiyal Testler .....	62
<b>8</b>	Serolojik Testler .....	71
<b>9</b>	Çözelti Hazırlama .....	79
<b>10</b>	Kalın Damla ve Periferik Yayma .....	87
<b>11</b>	Kan Sayımı .....	96
<b>12</b>	Kan Alma .....	103



# **TIBBİ LABORATUVAR TEKNİKLERİ**

## **1.SINIF**

**UYGULAMA LABORATUVARI**

**FÖYLERİ**

# **1**

**LABORATUVARDA KULLANILAN ARAÇ ve GEREÇLER**

**Öğr. Gör. Abdulhamit ÇALI**

## LABORATUVAR KURALLARI

Laboratuvar ortamları dikkatsiz davranışlar ve ihmal sonucunda tehlikeli ortamlara dönüşebilmektedir. Bu sebeple laboratuvarda çalışırken kendimizin ve çevremizdeki insanların sağlığını korumak için bilinmesi ve uygulanması gereken birtakım kurallar mevcuttur. Bu kurallardan önemli olan bazıları aşağıda listelenmiştir.

1. Genel hijyen tedbirlerine uyulması gerekmektedir.
2. Laboratuvarlarda düzeni bozacak veya tehlikeye yol açabilecek şekilde asla hareket edilmemelidir.
3. Laboratuvarda asla şaka yapılmamalı, öğrenciler deney esnasında kendi aralarında sohbet etmemelidir. Bu dikkat dağıtacağından hem tehlikeli hem de yasaktır.
4. Laboratuvar sorumlusunun izni dışında hiçbir deney düzeneğine, kimyasala ve başka malzemelere dokunulmamalıdır.
5. Çalışırken laboratuvar önlüğü giyilmesi gerekmektedir. Önlüğün önü kapalı olmalıdır.
6. Laboratuvarda enfeksiyon riski yüksek olan mikroorganizmalarla çalışırken eldiven giyilmesi gerekmektedir.
7. Laboratuvarda yiyecek, içecek tüketilmesi yasaktır.
8. Laboratuvar benci çalışmaya başlamadan önce ve çalıştıktan sonra dezenfektan ile silinmesi gerekmektedir.
9. Çalışırken elleri ağza, yüze, göze veya burna sürmemeli, kullanılan malzemeler de ağza temas ettirilmemelidir.
10. Çalışırken uzun saçlar mutlaka toplanmalı sallanan takılar çıkarılmalıdır.
11. Ekim yaparken pencere açılmamalı, konuşulmamalı, gereksiz el kol hareketleri yapılmamalıdır.
12. Deneysel esnasında kesinlikle asidin üzerine su ilave edilmemeli, asitler suya yavaş yavaş ilave edilmelidir.
13. Zehirli buharları ve gazları solumaktan kaçınılmalıdır. Bu tür maddeler ile derişik asit, baz ve uçucu çözücülerle çalışırken çeker ocak kullanılmalıdır.
14. Mikroskoplar her kullanımdan sonra temizlenmelidir.
15. Kirli tüp-pipet, lam-lamel vb. malzemeler dezenfektanlı bir kaba konulmalıdır. Özeler alevde yakılarak yerlerine kaldırılmalıdır.
16. Petri kutuları veya kültürler kapağı açık olacak şekilde masa üzerine bırakılmamalıdır.
17. Çalışma programı laboratuvara girmeden hazırlanmalıdır.
18. Çalışma bittikten sonra eller sabunlu su ile yıkanmalı, dezenfektan madde ile dezenfekte edilmelidir.
19. Test tüpleri mutlaka tüp sporunda dik olarak tutulmalı, bankolara yatık şekilde bırakılmamalıdır.
20. Kullanılacak pipetlerin ağza gelen uçları sterilizasyondan önce pamukla tıkanmalı ve özellikle pipetlemede ağza kaçma riskleri önlenmelidir. Bu durum her ne kadar çalışma hızı biraz yavaşlarsa da güvenceyi arttırlar. Gerekecekçe ağızla çekilmemeli puarlar kullanılmalı.
21. Çalışmanın sonunda çalışılan alan ve masalar mutlak temizlenmelidir.
22. Kontamine malzeme ve kültürler otoklavlanarak sterilize edilmelidir.
23. Tezgahlar ve zemin temizlik sonunda dezenfekte edilmelidir.

**DERSİN AMACI**

Tıbbi laboratuvar kullanılan araç ve gereçlerin tanıtılması ve kullanım amaçlarının öğrenilmesi

**DERSİN HEDEFLERİ****BİLGİ**

Bu dersi alacak olan öğrenciler;

Tıbbi laboratuvarda kullanılan araç ve gereçleri sıralar

**TUTUM**

Kullanılan araç ve gereçlerin ne amaçla kullanıldığını açıklar

Laboratuvara gelirken kurallara uygun giyinir

Laboratuvarda kurallara uyar

Laboratuvarda kullandığı araç ve gereçleri temizleyerek bırakır





Laboratuvardan çıkmadan önce ellerini yıkar



**GEREKLİ MALZEMELER**



Tıbbi Laboratuvarda kullanılan araç ve gereçler




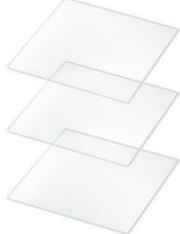

**GENEL BİLGİLER**

Tıbbi laboratuvarda en sık kullanılan aletler aşağıda sıralanmıştır.







<p><b>1. Deney Tüpleri</b></p> <p>Serolojik deneyler, besiyeri hazırlanması, santrifüj ve çeşitli amaçlar için kullanılan farklı boyut ve hacimlerde olan silindirik şekilde cam veya ısıya dayanıklı plastikten yapılmış malzemelerdir.</p>	
<p><b>2. Plastik Santrifüj Tüpleri</b></p> <p>1.5, 2, 15, 50ml hacimlere sahip kapaklı tüplerdir. Mikro santrifüj Tüpü (Ependorf) Falkon Tüpleri</p>	
<p><b>3. Cam Pipet</b></p> <p>Çeşitli boyutlarda ve kapasitede olan, istenilen miktarda sıvıyı alarak başka bir yere aktarmada kullanılan, ince, uzun, üzeri dereceli silindirik şekilde malzemelerdir.</p>	
<p><b>4. Puar</b></p> <p>Cam pipetlerde pipetleme işlemleri için kullanılan, kauçuk balona sahip pipetleme aracıdır.</p>	

<p><b>5. Otomatik Pipet</b></p> <p>Özellikle mikro yöntemlerle çalışıldığında çok küçük hacimleri aktarmaya ve dağıtmaya yarayan pipetlerdir.</p>	
<p><b>6. Otomatik Pipet Ucu</b></p> <p>Otomatik pipetlerde az miktarda sıvı aktarımında kullanılan plastik uçlardır.</p>	
<p><b>7. Mezür</b></p> <p>Çeşitli boyut ve hacimlerde olan silindir şeklinde üzeri dereceli cam veya plastikten yapılmış kaplardır. Sıvı maddelerin ölçümünde kullanılır.</p>	
<p><b>8. Pastör Pipeti</b></p> <p>Az miktarda sıvı aktarımında kullanılan, uç kısmı ince cam veya plastik pipetlerdir.</p>	
<p><b>9. Balon</b></p> <p>Geniş küre şeklinde gövdesi ve dar silindir şeklinde boynu bulunan, tabanı düz cam malzemelerdir. Çeşitli hacimlerde olabilir. Besiyeri ve çözeltilerin hazırlanmasında kullanılır.</p>	
<p><b>10. Beher</b></p> <p>Silindir şeklinde, su bardağını andıran, çeşitli hacimlerde olabilen cam veya plastik kaplardır.</p>	

<p><b>11. Erlenmayer</b></p> <p>Kısa silindir şeklinde boynu, koni şeklinde gövdesi olan geniş ve düz tabanlı cam malzemelerdir. Çeşitli hacimlerde olabilir.</p>	
<p><b>12. Damlalıklı Şişeler</b></p> <p>Çeşitli boyut ve hacimlerde olabilen ve çeşitli amaçlarla kullanılabilen cam malzemelerdir</p>	
<p><b>13. Mavi Kapaklı Otoklav Şişesi</b></p> <p>Yüksek sıcaklık ve hemen hemen tüm kimyasallara dayanıklı olarak üretilen 121 °C'de otoklavlanabilen şişelerdir. Besiyeri hazırlama işlemlerinde kullanılırlar.</p>	
<p><b>14. Tüp Taşıyıcıları (Sporlar)</b></p> <p>Çeşitli büyüklükteki tüpleri taşımaya yarayan araçlardır.</p>	
<p><b>15. Eküvyon Çubuk ve Tüplü Eküvyon</b></p> <p>Eküvyon çubuk, uçlarına su emici (hidrofil) pamuk sarılmış steril çubuklardır. Çeşitli vücut bölgelerinden inceleme örneklerinin alınması ve bazı ekimlerin yapılmasında kullanılır.</p> <p>Tüplü Eküvyon, genellikle inceleme örneği alınmasında kullanılan, içerisinde tek bir eküvyon bulunan steril tüplerdir.</p>	


<p><b>16. Özeler</b></p> <p>Daha çok sıvı ortamlardan örnek alıp ekim yapmaya yarayan aletlerdir. Uç kısmı platin veya tungsten gibi kolay ısınıp soğuyan ve oksitlenmeyen telden yapılmış ya da tek kullanımlık steril plastik malzemelerdir. Genellikle ucu halka şeklindedir. Standart bakteriyolojik öze 0,01ml sıvı alır. Ucunda halkalı tel yerine düz tel bulunan, batırma kültürü yapmaya, tek koloniden örnek almaya ve katı ortamlardan örnek alıp aktarmaya yarayan iğne özeler, genellikle mantar ekimlerinde kullanılan ve ucu L şeklinde kıvrılmış olan çengel özeler de mikrobiyolojide sıkça kullanılan malzemelerdir.</p>	
<p><b>17. Petri Kutuları</b></p> <p>Katı besiyeri hazırlanmasında ve antibiyogram yapılmasında kullanılan geniş yuvarlak, yaklaşık 2cm derinlikte, birbirine geçen kapak ve alt kısımdan oluşan cam veya plastik malzemelerdir.</p>	
<p><b>18. Lam</b></p> <p>Direkt inceleme ve boyama için preparat hazırlanmasında kullanılan dikdörtgen şeklinde ince camlardır.</p>	
<p><b>19. Lamel</b></p> <p>Genellikle 2x2 cm boyutlarında çok ince camdan yapılmış malzemelerdir. Çeşitli amaçla kullanılabilen farklı şekilleri de olabilir.</p>	
<p><b>20. Şale</b></p> <p>İçerisinde boyanacak preparatların (lamların) tek tek yerleştirilebildiği camdan yapılmış özel boya kaplarıdır.</p>	
<p><b>21. Gram Boyama Seti</b></p> <p>Gram boyamada kullanılan boyaları içeren boya setidir.</p>	



<p><b>22. Saat camı</b></p> <p>Ortası çukur, analiz ve deneylerde tartma, kurutma ve kristallendirme gibi işlemlerde kullanılan, dış etkenlere karşı dayanıklı cam malzemedir</p>	
<p><b>23. Piset</b></p> <p>Laboratuvarlarda genellikle saf su ve bazı durumlarda da yıkama çözeltisi kullanımı için gerekli kaplardır. Yaygın olarak plastikten yapılanları kullanılmaktadır.</p>	
<p><b>24. Büret</b></p> <p>Titration işlemlerinde ve belli hacimde sıvı alınmasında kullanılan altı musluklu, genellikle 50 ml hacimli, üzeri çizgilerle derecelendirilmiş boru şeklindeki cam malzemedir.</p>	
<p><b>25. Nuçe Erlen</b></p> <p>Vakumlu süzme işleminde kullanılan cam malzemedir. Borosilikat camdan üretilmiş, kalın, dayanıklı bir cam malzemedir. Değişik hacimde olanları vardır.</p>	
<p><b>26. Ayırma Hunisi</b></p> <p>Sıvı-sıvı heterojen karışımların kontrollü bir şekilde ayrılmasını sağlayan cam malzemelerdir</p>	
<p><b>27. Anaerobik Kavanoz</b></p> <p>Anaerobik ve mikroaerofilik bakterilerin üretilmesinde kullanılır.</p>	

<p><b>28. Desikatör</b></p> <p>Maddelerin nem almasını önleyen, katı maddelerin kurutulması ya da besiyerlerinin mikroaerofilik ya da anaerobik ortamda inkübe edilmesini sağlayan camdan yapılmış kapağı bulunan bir nevi kavanozdur.</p>	
<p><b>29. Bunzen Beki</b></p> <p>Bek, alev denemelerinde, doğrudan ısıtma ya da yakma işlemlerinde kullanılan hava gazı ya da bütan gazı ile çalışan bir araçtır. Gazın uygun miktarda havayla yanmasını sağlayan, ayarlanabilir laboratuvar aracıdır</p>	
<p><b>30. Su Banyosu (Benmari)</b></p> <p>Reaksiyonun gerçekleştiği deney tüpü, erlen vb. cam malzemelerin içindeki kimyasalların belli bir sıcaklıkta tutulmasını sağlayan, sıcaklığı ayarlanabilen içi su dolu kaptır.</p>	
<p><b>31. Manyetik Karıştırıcı ve Isıtıcı</b></p> <p>Çözeltileri homojen şekilde karıştırmaya yarayan alettir.</p>	
<p><b>32. Vorteks</b></p> <p>Deney tüpü içerisindeki sıvıyı girdaplayarak homojen bir şekilde karıştırmaya yarayan alettir.</p>	
<p><b>33. Porselen Krozeler</b></p> <p>Laboratuvarlarda çok sık kullanılan temel araçlardan biridir. Ateşe dayanıklı kilden yapılmış, gravimetrik analizlerde kullanılan alettir.</p>	
<p><b>34. Etüv</b></p> <p>Mikroorganizmaların üretilmesi için kullanılan, istenilen ısıya ayarlanabilen elektrikli cihazlardır.</p>	

<p><b>35. Pastör Fırını</b></p> <p>Yüksek sıcaklıklara ayarlanabilen sterilizasyon ve dezenfeksiyon işlemlerinde kullanılan cihazlardır.</p>	
<p><b>36. Santrifüj</b></p> <p>Tüp içerisinde bulunan yoğunlukları farklı maddeleri birbirinden ayırma amacı ile yüksek hızla döndürme işlemi yapan cihazlardır.</p>	
<p><b>37. pH Metre</b></p> <p>PH değerlerinin ölçülmesinde kullanılan aletlerdir.</p>	
<p><b>38. Biyogüvenlik Kabini</b></p> <p>Çalışan kişiyi ve çalışılan örneği korumaya yarayan çalışma ortamlarıdır.</p>	
<p><b>39. Distile Su Cihazı</b></p> <p>Saf (distile) su elde edilmesinde kullanılır.</p>	
<p><b>40. Hassas Terazi</b></p> <p>Çok küçük miktarlardaki maddelerin ölçümlerini yapabilen terazidir.</p>	
<p><b>41. Hücre Kültürü Malzemeleri</b></p> <p>Hücre kültürü yapılırken kullanılan pleytler, flasklar gibi malzemelerdir.</p>	

<p><b>42. Thermocycler</b></p> <p>Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) işleminde denaturasyon, primerlerin bağlanması ve zincirin uzaması aşamalarını otomatik olarak yürütebilen programlanabilir bir cihazdır.</p>	
<p><b>43. Elektroforez Tankı</b></p> <p>Agaroz veya poliakrilamid jellerine yüklenen ürünlerin elektroforetik yüklerine göre ayrıştırılmasına olanak sağlayan bir sistemdir.</p>	
<p><b>44. UV İllüminatör</b></p> <p>Floresan boyalı ürünlerin görüntülenmesini sağlar.</p>	
<p><b>45. Real-Time PCR Cihazı</b></p> <p>Nükleik asit miktarlarının kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla kullanılır. Nükleik asit amplifikasyonları döngü sayısı olarak gerçek zamanlı (eş zamanlı) görüntülenmektedir.</p>	

## ÖLÇME ve DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki form, uygulama faaliyetinizin değerlendirilmesi amacıyla hazırlanmıştır. Performansınız aşağıdaki kriterlere göre değerlendirilecektir.

Değerlendirme Kriterleri		Çok iyi (16-20)	İyi (11-15)	Orta (6-10)	Geliştirilebilir (1-5)
1	Laboratuvar kurallarını açıkladı				
2	Kişisel koruyucu ekipmanları kullandı				
3	Gösterilen laboratuvar aletlerinin adlarını söyledi				
4	Gösterilen laboratuvar aletlerinin kullanım amaçlarını açıkladı				
5	İsmi söylenen laboratuvar aletlerini gösterdi				
<b>TOPLAM PUAN</b>					

Aşağıdaki soruların doğru cevaplarını işaretleyiniz.

- Aşağıdakilerden hangisi laboratuvarda kullanılan koruyucu malzemelerden değildir?**  
A) Maske      B) Önlük      C) Kontakt lens      D) Eldiven      E) Koruyucu gözlük
- Bakterilerin üretilmesi için uygun sıcaklığın oluşturulmasını sağlayan laboratuvar aletine verilen isim nedir?**  
A) Etüv      B) Pastör fırını      C) Desikatör      D) Otoklav      E) Benmari
- Laboratuvarda kuru bir ortam sağlayan alete verilen isim nedir?**  
A) Etüv      B) Pastör fırını      C) Desikatör      D) Otoklav      E) Benmari
- Besiyerlerine ekim yapmak için kullanılan plastik veya platin olarak bulunan alete ne denir?**  
A) Eküvyon      B) Saat camı      C) Lam      D) Petri      E) Öze
- Deney tüpü içerisindeki sıvıyı girdaplayarak homojen bir şekilde karıştırmaya yarayan alete ne denir?**  
A) Benmari      B) Desikatör      C) Şale      D) Vorteks      E) Bek

## LABORATUVARDA YAPILACAK İŞLEMLER

Laboratuvarda gösterilen araç ve gereçleri inceleyiniz

## KAYNAKLAR

Bilgehan H (2009) Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Beşinci Baskı. Barış yayınları, İzmir.  
Demirtaş S, Can M ve Güven B (2014) Tıbbi Laboratuvar El Kitabı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul



**TIBBİ LABORATUVAR TEKNİKLERİ  
UYGULAMA LABORATUVARI  
FÖYLERİ**

**2**

**BESİYERİ HAZIRLAMA**

**Öğr. Gör. Abdulhamit ÇALI**

### DERSİN AMACI

Mikrobiyolojide kullanılan besiyerlerinin öğrenilmesi  
Mikrobiyolojide kullanılan besiyerlerinin hazırlanmasının öğrenilmesi

### DERSİN HEDEFLERİ

<b>BİLGİ</b>	Bu dersi alacak olan öğrenciler; Mikrobiyolojide kullanılan besiyerlerinin adlarını sayar. Mikrobiyolojide kullanılan besiyerlerinin hazırlanmasında kullanılan temel maddeleri sayar. Mikrobiyolojide kullanılan besiyerlerini kullanım amaçlarına göre gruplandırır. Mikrobiyolojide kullanılan besiyerlerini fiziksel özelliklerine göre sınıflandırır. Mikrobiyolojide kullanılan besiyerlerinin özelliklerini açıklar.
<b>BE CERİ</b>	Mikrobiyolojide kullanılan besiyerlerini tanıyıp ayırır.
<b>TUTUM</b>	Laboratuvara gelirken kurallara uygun olarak giyinir. Laboratuvardaki malzemeleri kullandıktan sonra temizleyerek bırakır. Laboratuvardan çıkmadan önce ellerini yıkar.

### GENEL BİLGİLER

#### MİKROBİYOLOJİDE KULLANILAN BESİYERLERİ

Besiyerleri; mikroorganizmaların üretilmesi, canlılıklarının devam ettirilmesi, saf kültürlerin elde edilmesi, morfolojik ve biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi, biyolojik ürünlerinin elde edilmesi, hastalık yapıcı mikroorganizmaların tanımlanması gibi amaçlarla kullanılır.

#### Mikroorganizmaların Üretilme Ortamları

Mikroorganizmaların üretilme ortamları iki grupta incelenir. Bunlar, canlı (invivo) ve cansız (invitro) ortamlardır.

#### Canlı ortamlar:

- Deney hayvanları:** Kobay, fare, sıçan, tavşan, hamster, maymun vb. deney hayvanlarına çeşitli yöntemlerle inoküle (aşılama) edilen mikroorganizmalar deney hayvanlarında yaptıkları enfeksiyona özgü tipik belirti ve bulgular oluştururlar.
- Hücre kültürleri:** İnsan ve hayvan dokularından alınan hücrelerin, uygun besleyici sıvılarda üretilerek elde edildiği hücre kültürlerinde mikroorganizmaların üretilmesidir.
- Embriyonlu yumurta:** Bazı bakterilerin ve virüslerin üretilmesinde kullanılır.

#### Cansız Ortamlar:

Tıbbi mikrobiyolojide, hastalık yapıcı mikroorganizmaların tanımlanmasında en çok cansız ortamlar kullanılmaktadır. Mikroorganizmaların; üretilmeleri, saf olarak elde edilmeleri, koloni ve biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi, biyolojik ürünlerinin elde edilmesi ve üretilmesi amacıyla kullanılan cansız besleyici ortamlara, **besiyeri** denir.

#### Besiyeri Hazırlanmasında Kullanılan Temel Maddeler

Besiyeri hazırlanırken asıl amaç, üretilmek istenen mikroorganizmanın en hızlı üremesini sağlamak için en uygun miktarlarda gerekli besin maddelerinin dengeli şekilde karışımlarını sağlamaktır. Besiyeri bileşimlerine giren başlıca maddeler şunlardır:

- Su:** Besiyeri hazırlanırken distile (saf) su ya da deiyonize su kullanılmalıdır.
- Peptonlar:** Çeşitli proteinlerin pepsin, tripsin, papain gibi enzimlerle hidrolize edilmeleri sonucunda suda kolayca eriyebilen ve ısıtıldığında yeniden koagüle olmayan polipeptid,

dipeptid ve aminoasit gibi maddelerden oluşur. Besiyerine eklenen bu maddelerin karışımı bakteriler tarafından **azot kaynağı** olarak kullanılır.

3. **Karbon ve enerji kaynağı maddeler:** Glikoz, laktoz, mannitol, sakkaroz, eskülin, selüloz, dekstroz, fruktoz, galaktoz, glikojen, nişasta vb. gibi karbonhidratlar mikroorganizmaların enerji ve karbon kaynağı olarak kullanılmaları için besiyerlerine katılır.
4. **Kimyasal maddeler ve tuzlar:** Besiyerine eklenecek olan maddeler kimyasal olarak saf olmalıdır. Bu maddeler uygun çözücülerde çözülerek besiyerine eklenir.
5. **Ekstraktlar:**
  - a. **Et ekstraktı:** Yağsız ve kaslarından ayrılmış etin hidroliziyle elde edilir, çoğu besiyerlerinde et peptonu yerine kullanılır.
  - b. **Malt ekstraktı:** Arpadan elde edilerek maya ve küflerin gelişmesi için besiyerlerine eklenir.
  - c. **Kalp ve beyin ekstraktı:** Pnömonokoklar, gonokoklar, streptokoklar vb. zor üreyen mikroorganizmaların üreyebilmeleri için besiyerlerine eklenir.
6. **İndikatörler:** Mikroorganizmaların, metabolizmalarına bağlı olarak oluşturdukları ürünleri belirleyerek tanımlamak amacıyla kullanılan maddelerdir.
7. **İnhibitörler:** Üretilecek mikroorganizmanın üremesini etkilemeden, istenmeyen mikroorganizmanın üremesini önlemek veya baskılamak için besiyerlerine belirli oranlarda katılan çeşitli boyalar, antibiyotik, safra tuzları, selenit, sodyum azid vb. maddelerdir.
8. **Agar:** Tıbbi mikrobiyolojide, besiyerlerini katılaştırmasında en çok kullanılan maddedir. Agar 85-90°C de erir, 40-45°C de katılaştır.
9. **Zenginleştirici Maddeler:**
  - a. Kan
  - b. Serum
  - c. Safra
  - d. Maya özütü
  - e. Yumurta

#### Besiyerlerinin Sınıflandırılması

1. **Kimyasal Özelliklerine Göre Besiyerleri**
  - a. **Sentetik besiyerleri:** İçeriğinde bulunan saf kimyasal maddelerin bileşimi ve miktarı tam olarak bilinen besiyerleridir.
  - b. **Sentetik olmayan besiyerleri:** Tıbbi mikrobiyolojide en çok kullanılan besiyeri çeşididir. Besiyeri içine konan maddenin miktarı bilinir; ancak bu maddenin doğal olarak içinde bulundurduğu diğer maddelerin miktarı net olarak bilinmez. Örnek: Sıvı buyyon besiyeri içerisinde konulan et suyunun (buyyon) miktarı bellidir; fakat buyyonun birleşiminde bulunan protein, glikoz vb. maddelerin kesin miktarları bilinmez.
2. **Fiziksel Özelliklerine Göre Besiyerleri**
  - a. Sıvı besiyerleri
  - b. Yarı katı besiyerleri
  - c. Katı besiyerleri
3. **Kullanım Amaçlarına Göre Besiyerleri**

Kullanılış amaçlarına göre başlıca besiyeri grupları şunlardır:

  - a. **Genel üretim besiyerleri:** Güncel laboratuvar çalışmalarında kullanılan, normal vücut florasında bulunan veya patojen özellikler gösteren mikroorganizmaların çoğunun üretilebildiği besiyerleridir. Sıvı ya da katı biçimde hazırlanan bu besiyerleri üreticilik özelliklerine göre ikiye ayrılırlar.



- **Basit genel besiyeri:** Birçok mikroorganizmanın üremesini sağlayacak yeterlilikte az sayıda besin maddesi içeren besiyerleridir. Örnek; buyyon, adi agar (jeloz) (Şekil 1-2).
- **Zenginleştirilmiş genel besiyeri:** Basit besiyerinde üremekte güçlük çeken, bazı bakterilerin daha kolay üremesini sağlamak amacıyla basit besiyerine kan, serum, glikoz, yumurta vb. besleyici maddeler katılarak elde edilen besiyerleridir. Örnek; kanlı agar, çikolatamsı agar (Şekil 3-4).



Şekil 1. Buyyon



Şekil 2. Adi Agar



Şekil 3. Kanlı Agar



Şekil 4. Çikolatamsı Agar

**b. Özel besiyerleri:** Üremede güçlük gösteren bazı mikroorganizmaların üretilmesi için özel olarak hazırlanan besiyerleridir. Bu besiyerlerine belirli maddeler ve ayıraçlar konularak bazı mikroorganizmaların üremeleri sağlanırken diğerlerinin üremeleri engellenmiştir.

- **Seçici besiyerleri:** Bazı mikroorganizmaların üremelerini önleyici maddeler içeren, bu suretle karışık buldukları ortamlardan belirli mikroorganizmaların seçilerek üretilmelerini sağlayan besiyerleridir. Örneğin dışkıdaki Salmonella'ların çoğaltılmasını sağlayan Selenit F besiyeri (Şekil 5). Bu besiyerleri temel ya da zenginleştirilmiş katı ya da sıvı besiyerlerine bir kısım bakterilerin üremesini önleyen antibiyotikler, kimyasal maddeler, boyalar konularak hazırlanırlar. Örnek; Eozin Methylene Blue (EMB) Agar (Şekil 6), SS Agar (Şekil 7) vb.
- **Ayırıcı besiyerleri:** İçerdikleri ayıraçlar aracılığı ile benzer bakterilerin ayrı görünümde koloniler oluşturmalarını sağlayarak karışık bakterileri birbirinden ayırmaya yarayan besiyerleridir. Örneğin; laktoza etkili bakterileri etkisizlerden ayırmaya yarayan Eozin Methylene Blue (EMB) agar (Şekil 6), hemoliz yapan ve yapmayanları ayırmada kullanılan kanlı agar (Şekil 3).
- **Özgül besiyerleri:** Yalnız bir çeşit ya da sınırlı sayıda mikroorganizmanın üretilmesi için hazırlanan besiyerleridir. Örneğin; Mycobacterium tuberculosis'in üretilmesinde kullanılan Löwenstein-Jensen besiyeri (Şekil 8).
- **Ayıraçlı besiyerleri:** Mikroorganizmaların metabolizmalarına bağlı biyokimyasal özelliklerini incelemek amacıyla besiyerlerine çeşitli maddeler ve mikroorganizmaların bu maddeleri değişikliğe uğrattıklarını gösteren ayıraçlar

eklenerek hazırlanan besiyerleridir. Örneğin; şekerli besiyerleri (TSI) (Şekil 9), fenol kırmızılı besiyerleri (Üre agar) (Şekil 10.).



Şekil 5. Selenit F Besiyeri



Şekil 6. Eosin Methylen Blue (EMB) Agar



Şekil 7. SS Agar



Şekil 8. Löwenstein Jensen Besiyeri



Şekil 9. Triple Sugar Iron (TSI) Agar



Şekil 10. Fenol Kırmızılı Besiyerleri (Üre Agar)

## Besiyeri Çözeltisi Hazırlama

Tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarında besiyeri çözeltileri; hazır olarak ticari dehidre besiyeri ya da besiyerleri birleşenleri ayrı ayrı tartılıp, distile suyla eritilerek hazırlanır. Dehidre besiyeri, çeşitli ticari firmalar tarafından üretilip marketlerde satılan hazır çorbalara benzetebiliriz. Çorbanın çeşidine göre içine giren besin maddeleri belirli oranlarda karıştırılıp toz haline getirilip paketlenmiş halde satışa sunulur. Biz evde paket üzerindeki bilgilere bakarak toz halindeki ürünü istenen miktarda su üzerine ekleyip kaynatarak çorbamızı yaparız. Dehidre besiyerleride değişik üretici firmalar tarafından besiyerleri bileşenleri formülde belirtilen miktarları karıştırıp toz haline getirilmiş besiyerleridir.

## UYGULAMA

### Besiyeri Hazırlama

#### Kullanılacak Malzemeler

Dehidre Besiyeri, hesap makinesi, balon, erlen, şişe, alüminyum folyo, pamuk, spatül, mezür, Otoklav, manyetik karıştırıcı ısıtıcı tabla, pH metre, steril petri kutusu, bek

#### İşlem Basamakları

1. MHA dehidre besiyeri hassas terazide tartılır.
  - Hassas terazide tartımı doğru ve dikkatli yapılmalıdır.
  - Temiz spatül kullanılmalıdır.
  - Tartım sırasında toz bulutu oluşmaması için dikkatli olunur.
2. Tarttığınız karışım balon veya erlene aktarılır.
3. Hazırlayacağınız besiyeri hacmi kadar distile su (1000 mL) ölçülür.
4. Karışımı koyduğunuz kaba distile suyun yarısı eklenip çalkalanır.
5. Geri kalan distile suyla hacim 1000 mL'ye tamamlanır.
6. Distile suda maddeler eriyene kadar manyetik karıştırıcı karıştırılarak ısıtılır.
7. pH 7.2'ye ayarlanır.
  - Hazırlanacak besiyerinin pH değeri besiyeri etiket bilgilerinden okunmalıdır. Okuduğunuz değer çalışmanız için uygunsa pH ayarlamaya gerek yoktur.
  - pH metre tekniğine uygun kullanılmalıdır.
  - Besiyeri istenen pH'da değilse seyreltik asit veya baz çözeltileri ile ayarlanmalıdır.
8. Otoklavda 121°C'da 15 dakika steril edilir.
  - Sterilizasyon için uygun yöntem seçilmelidir.
  - Kurallarına ve tekniğine uygun olarak sterilizasyon işlemi yapılmalıdır
9. Döküm yapılacak petri kutuları hazırlanır.
  - Steril petri kutuları; masa üzerine, kapakları üste gelecek şekilde dizilmelidir
10. Sterilizasyon sonrası besiyeri 45-50°C'ye soğutulur.
11. Besiyeri aseptik ortamda steril petri kutularına dökülür.
  - Besiyerini dökmeden önce kabın ağzı alevden geçirilmelidir.
  - Petri kutularına göz kararı eşit miktarlarda dökülmelidir.
  - Dökerken çevreye bulaşma olmaması için kapak gereğinden fazla açılmamalıdır.
12. Agarlı besiyeri yüzeyinde hava kabarcığı oluşmuşsa alev tutularak giderilir.
  - Bu işlem besiyeri katılaşmadan yapılmalıdır.
13. Besiyeri katılaşmaya kadar beklenir.
14. Petri kutularının üzerine gerekli bilgiler yazılır.
  - Besiyeri adı, hazırlanma tarihi ve hazırlayan kişi bilgileri yazılmalıdır.
15. Hazırlanan besiyerleri buzdolabında muhafaza edilir

## ÖLÇME ve DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki form, uygulama faaliyetinizin değerlendirilmesi amacıyla hazırlanmıştır. Performansınız aşağıdaki kriterlere göre değerlendirilecektir.

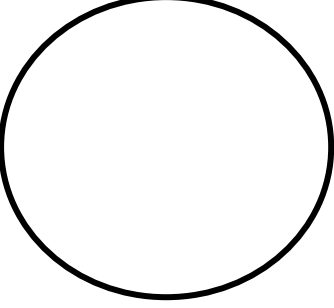
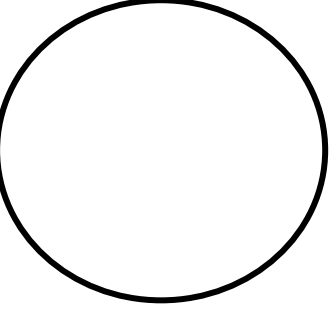
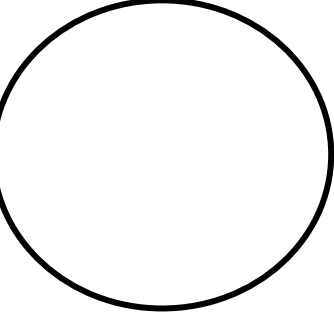
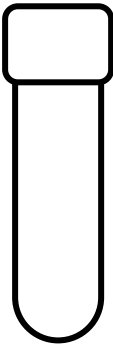
Değerlendirme Kriterleri		Çok iyi (7-8)	İyi (5-6)	Orta (3-4)	Geliştirilebilir (1-2)
1	Tartım işlemini yaptı.				
2	Tekniğine uygun aktarma işlemlerini yaptı.				
3	Çözündürme işlemini yaptı.				
4	Tekniğine uygun pH ayarlaması yaptı.				
5	Tekniğine uygun sterilizasyonu yaptı.				
6	Petri kutularını hazırladı.				
7	Besiyerini istenen sıcaklığa getirdi.				
8	Aseptik tekniğini uyguladı.				
9	Tekniğine uygun petri kutularına döküm yaptı.				
10	Tekniğine uygun kurutma işlemini yaptı.				
<b>TOPLAM PUAN</b>					

Aşağıdaki soruların doğru cevaplarını işaretleyiniz.

- 250 mL MHA agar (40 g/L) hazırlamak için kaç g dehidre besiyeri maddesinden kullanmak gerekir?  
A) 10                      B) 20                      C) 40                      D) 80                      E) 160
- Aşağıdakilerden hangisi besiyerini katılaştırmak amacıyla kullanılır?  
A) Agar                      B) Pepton                      C) Tuz                      D) Kan                      E) Maya ekstraktı
- Aşağıdaki besiyerlerinden hangisi üremekte güçlük çeken mikroorganizmaların daha kolay üremesi için kullanılır?  
A) Zenginleştirilmiş besiyeri                      B) Ayırt edici besiyeri                      C) Genel besiyeri  
D) Seçici besiyeri                      D) Özgül besiyeri
- Besiyeri petri kutularına dökülürken besiyerinin sıcaklığı kaç derece olmalıdır?  
A) 95-100°C                      B) 85-90°C                      C) 75-80°C                      D) 65-70°C                      E) 45-50°C
- Aşağıdaki besiyerlerinden hangisi sıvı besiyeridir?  
A) EMB                      B) Selenit F                      C) Kanlı agar                      D) SS agar                      E) TSİ

## LABORATUVARDA YAPILACAK İŞLEMLER

Besiyeri gruplarına örnek olarak getirilen besiyerlerini inceleyip adlarını, besiyeri grubunu ve ne amaçla kullanıldığını yazınız.

	Besiyerinin Adı	Besiyerinin Grubu	Ne Amaçla Kullanılmaktadır
1.			
2.			
3.			
4.			

Öğrenci Adı Soyadı:

Öğrenci Numarası:

İmza:

## KAYNAKLAR

Bilgehan H (2009) Klinik Mikrobiyoloji Tanı. Beşinci Baskı. Barış yayınları, İzmir.

Editörler: Günalp A, Yılmaz YA, Pınar A: Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar Eğitim Kitabı. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 2003, s-44-54.

Wiim Jr. W, Ailen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G, Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostik Microbiology, Sixth edition, Lippincott Williams and Wilkins, s.29-38.



# **TIBBİ LABORATUVAR TEKNİKLERİ**

## **LABORATUVAR UYGULAMA**

**FÖYÜ**

# **3**

## **BESİYERİ EKİM YÖNTEMLERİ**

**Öğr. Gör. Abdulhamit ÇALI**

### DERSİN AMACI

Mikrobiyolojide kullanılan besiyerlerine ekim yöntemlerinin öğrenilmesi  
Bakterilerin besiyerlerinde oluşturdukları koloni tiplerinin öğrenilmesi  
Bakterilerin besiyerlerinde oluşturdukları hemoliz çeşitlerinin öğrenilmesi

### DERSİN HEDEFLERİ

<b>BİLGİ</b>	Bu dersi alacak olan öğrenciler; Ekim yöntemlerini sıralar. Koloni tiplerini özellikleri ile sıralar.
<b>BECERİ</b>	Besiyerlerini tanıyıp ayırır. Ekim yöntemlerini uygular. Koloni tiplerini değerlendirir. Hemoliz tiplerini değerlendirir.
<b>TUTUM</b>	Laboratuvara gelirken kurallara uygun olarak giyinir. Laboratuvardaki malzemeleri kullandıktan sonra temizleyerek bırakır. Laboratuvardan çıkmadan önce ellerini yıkar.

### GENEL BİLGİLER

**Ekim işlemi** (inokülasyon) incelenecek örneğin steril bir besi yerine uygun bir şekilde aktarılması olayıdır. Diğer bir ifade ile içerisinde bulunan mikroorganizmaları üretmek veya mikroorganizma bulunup bulunmadığını araştırmak amacıyla, alınan numunelerin özel aletler kullanılarak uygun besi yerlerine aktarılmasına “**ekim**”, herhangi bir besi yerinde üremiş olan mikroorganizmaların başka bir besi yerlerine aktarılmasına ise “**pasaj**” denir.

Ekimleri yapılacak örnekler ya doğrudan doğruya hastalardan alınan hastalık örnekleridir ya da daha önce üretilmiş olan bakteri kültürleridir. Ekim yapılacak materyal sıvı ise öze, pipet, eküvyonlu çubuk; katı ise öze kullanılarak ekim yapılır. Ekim yapılmadan önce ve sonra çalışılacak bankonun üzeri antiseptik eriyiklerle silinmeli ve daima güvenlik kabinin de çalışılmalıdır.

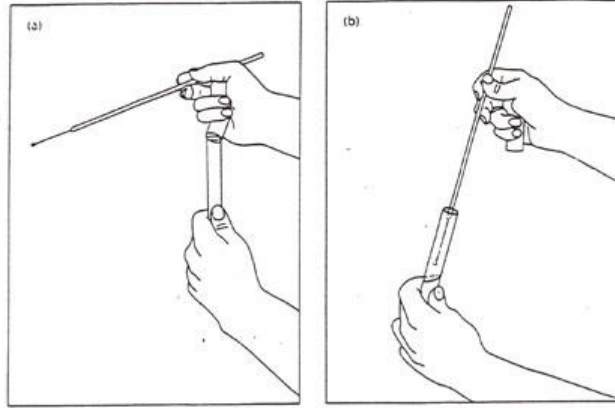
#### Ekim Yöntemleri

##### 1. Tüpte Sıvı Besiyerine Ekim Yöntemi

Sıvı ortama ekim, genellikle öze ya da pipet ile yapılır. Bazı durumlarda eküvyonlarda kullanılmaktadır. Tüpte sıvı Besiyerine ekim yönteminin aşamaları aşağıdaki gibidir.

- Tüp içerisindeki besiyerine ekim yapılırken tüp eğik olarak tutulur.
- Ekim materyali öze ile alınmış ise öze tüpe yavaşça sokulur ve özedeki materyal bırakılır.
- Materyal katı ise önce öze tüp duvarına dairesel hareketlerle sürülerek daha sonra yavaşça sıvı besiyeri ile karıştırılarak ezilir.
- Pipetle alınan sıvı materyal besiyerine damlatılarak ekim yapılır.
- Eküvyonlu çubuklar besiyerine daldırılır ve tüp kenarına bastırılarak içeriğinin tüpteki besiyerine geçmesi sağlanır.

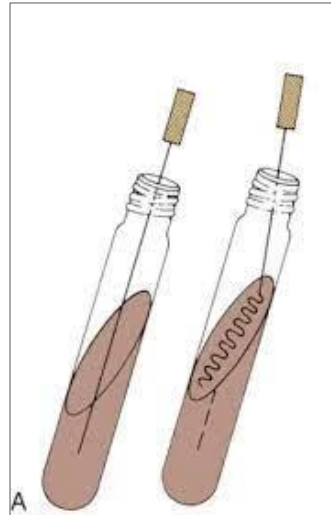




Şekil 1. Tüpte Sıvı Besiyerine Ekim Yöntemi

## 2. Tüpte Yatık Katı Besiyerine Ekim Yöntemi

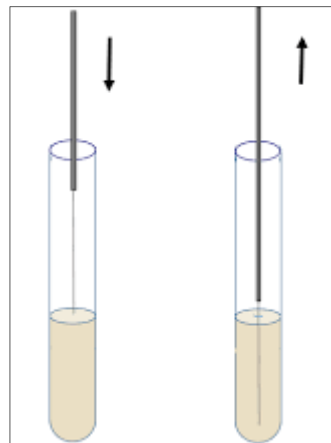
İğne öze ile alınan materyal hiçbir yere değdirilmeksizin tüpteki besiyerinin alt noktasına deney tüpünün dibine 2-3 mm mesafe kalacak kadar batırılır ve aynı doğrultuda geri çekildikten sonra besiyerinin yüzeyinde zikzaklar çizilerek yayılır.



Şekil 2. Tüpte Yatık Katı Besiyerine Ekim Yöntemi

## 3. Tüpte Dik Katı Besiyerine Ekim Yöntemi

İğne öze ile alınan materyal tüpteki besiyerinin dip kısmına şişenin dibine 2-3 mm. mesafe kalacak kadar batırılıp aynı doğrultuda çıkarılarak ekim yapılır.



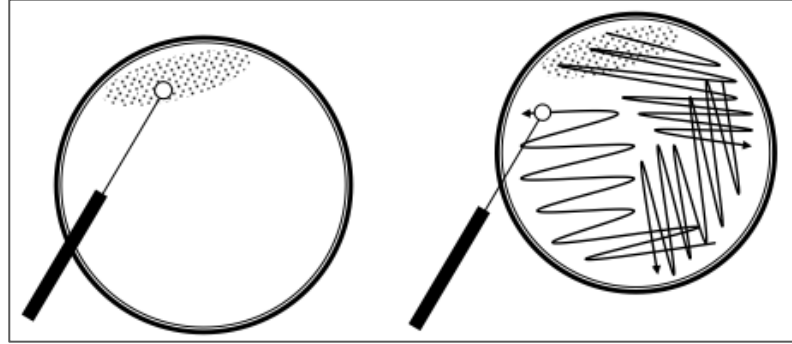
Şekil 3. Tüpte Dik Katı Besiyerine Ekim Yöntemi

#### 4. Plak Besiyerine Ekim Yöntemleri

##### a. Azaltma Ekim Yöntemi

Bu ekim yönteminde amaç bakterilerin katı besiyerine seyreltilerek ekilmeleri, bu şekilde besiyerine tek tek düşmelerinin sağlanması ve böylece birbirinden ayrı koloniler elde edilmesidir.

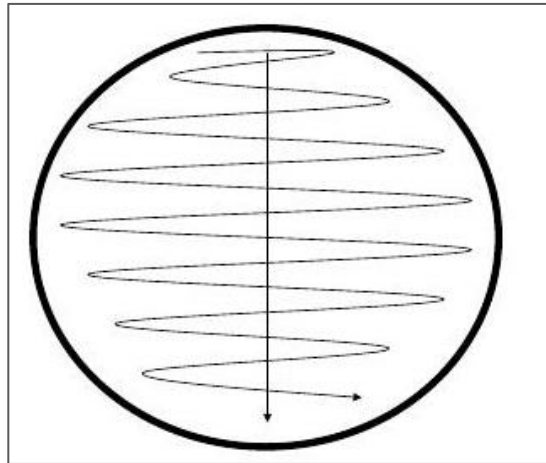
- Bu amaçla petri kutusundaki katı besiyeri dört bölge olarak düşünülür.
- Öze ile alınan materyal ilk bölgede bir noktadan başlayıp sık zikzaklar çizilerek ekilir ve ikinci ekim sahasına geçilir.
- Birinci bölgeden ikinciye doğru daha az sıklıkta zikzaklar çizilir.
- Üçüncü bölgede zikzaklar daha da seyrek olmalıdır.
- En son dördüncü bölgede bir-iki zikzak yapılarak ekim tamamlanır.
- Bu ekim yönteminde, her ekim sahasına geçmeden önce besiyeri 90 derece açıyla döndürülerek yeni ekim sahasına geçilir.
- Her ekim sahasına geçildiğinde öze sterilize edildikten sonra veya farklı öze kullanılarak ekim yapılır.
- Eküvyon ile materyal alınmış ise önce bu pamuklu çubuk ilk ekim sahasına sürülür. Daha sonra öze ile yukarıdaki işlemlere devam edilir.



Şekil 4. Azaltma Ekim Yöntemi

##### b. Tam Saha Ekim Yöntemi

İdrar gibi klinik materyallerde mililitredeki mikroorganizma sayısını tespit etmek için, belirli miktarda materyal (gerekirse sulandırılarak) besiyerine ekilir. Sık kullanılan yöntem, kalibreli öze ile besiyerinin çapı boyunca bir çizgi ekimi yapmak ve aynı öze ile, alevden geçirmeksizin, ilk ekim çizgisine dik zig-zak'lar çizmektir. Amaç, materyalin besiyeri yüzeyine dağılmasını sağlayarak seyreltmek ve kolonileri ayrı ayrı elde etmektir. İnkübasyondan sonra besiyeri yüzeyinde gelişen koloniler sayılarak mililitredeki mikroorganizma sayısı hesaplanır.

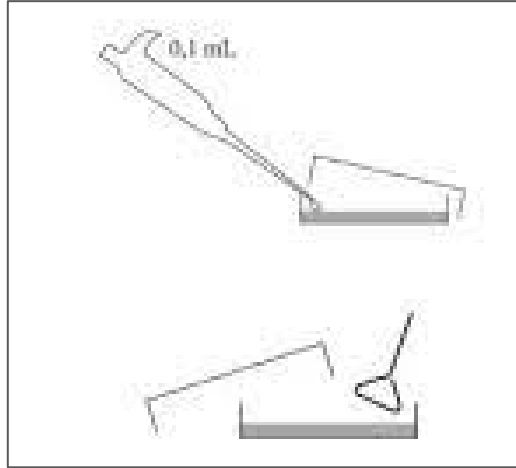


Şekil 5. Tam Saha Ekim Yöntemi

### c. Yayma Plak Yöntemi

Antibiyotik duyarlılık testleri, faj tiplendirme deneyleri gibi amaçlar için bakterilerin plak besiyerinin yüzeyine homojen olarak dağıtılması suretiyle yaygın ekim yapmak gerekir.

- Ekim yapılacak plak yüzeyine örnekten pastör pipeti ya da otomatik pipet ile birkaç damla damlatılır.
- Steril bir cam çubuk ya da eküvyonlu çubuk ile besiyerinin ortasına kadar sık zikzaklar çizilir. Daha sonra aynı işlem besiyerinin diğer yarısında da uygulanır.
- Besiyeri 90 derece çevrilerek yapılan işlemler tekrarlanır.
- Böylece besiyerinin her tarafına homojen olarak ekim yapılmış olur.



Şekil 6. Yayma Plak Yöntemi

### d. Dökme Plak Yöntemi

Numunenin veya dilüsyonunun 45–50 °C'ye kadar soğutulmuş agarlı besi yeri ile petri kutusunda karıştırılarak ekilmesi şeklindeki yöntemdir. Bu yöntemde katı numunelerin dilüsyonlarından ve sıvı numunelerin kendisinden veya dilüsyonlarından ekim yapılabilir.



Şekil 7. Dökme Plak Yöntemi

### Koloni Tipleri

#### 1. S (smooth—düz) tipi koloni

En sık görülen şekildir. Yuvarlak, düz kenarlı, kabarık, düz yüzeyli, nemli ve homojen kolonilerdir.

#### 2. R (rough-pürtüklü) tipi koloni

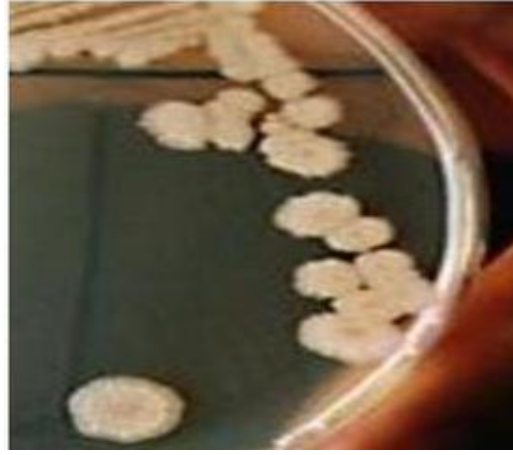
S tipi koloni yapan bakterilerin eski kültürlerinde ve uygunsuz koşullarda üretimi ile meydana gelen koloniler bu tipte olabildiği gibi bazı tür bakteriler doğal olarak R tipi koloni yaparlar. Yüzeyleri buruşuk veya tanecikli, kenarları girintili ve çıkıntılı, basık görünümdedirler. S tipi koloni, R tipi koloni şekline dönerse virülansı azalır.

#### 3. M (mucoid) tipi koloni

Bir kısım bakterilerde hücre çeperlerinin dış tabakasında polisakkarit ve bazen polipeptid yapısında, az veya çok miktarda kapsül maddesi bulunur. Bu kapsüllü bakterilerin uygun ortamlarda (serumlu, habenli, kanlı, vs) sümüksü görünüşlü, yapışkan ve akıcı koloniler oluşturdukları görülür. Uygunsuz koşullarda bu bakteriler S tipi koloni oluştururlar.



Şekil 8. S Tipi Koloni Morfolojisi



Şekil 9. R Tipi Koloni Morfolojisi



Şekil 10. M Tipi Koloni Morfolojisi

## Hemoliz Tipleri

### 1. $\alpha$ (Alfa) Hemoliz

Bakteri kolonisi etrafında hemoliz sahalarına mikroskopun küçük büyütmesi ile bakıldığında ortamda sağlam eritrositlerin varlığı görülür. Hemoliz bölgesi yeşilimsi renktedir.

### 2. $\beta$ (Beta) Hemoliz

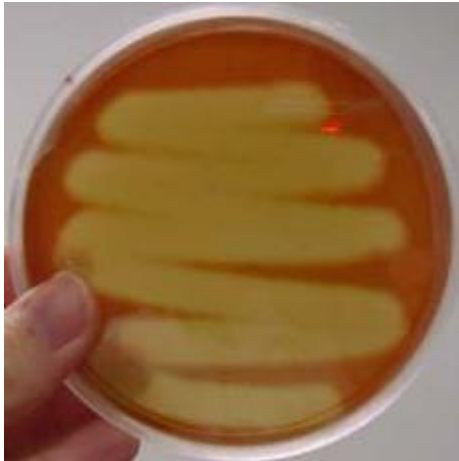
Tam hemolizdir. Bakteri kolonileri etrafında tam bir saydam alan görülür. Bu bölgedeki eritrositler tamamen erimiştir. Petri kutusunun arkası görülebilir.

### 3. $\gamma$ (Gama) Hemoliz

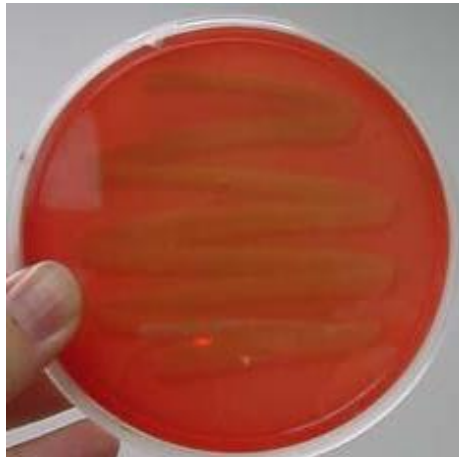
Kanlı agarda üreyen bakteri kolonisi hiç hemoliz oluşturmamıştır.



Şekil 11.  $\alpha$  (Alfa) Hemoliz



Şekil 12.  $\beta$  (Beta) Hemoliz



Şekil 13.  $\gamma$  (Gama) Hemoliz

### UYGULAMA-I

#### Sıvı Besiyerine Ekim

Kullanılacak Malzemeler	Peptonlu su besiyeri, halka öze (loop), iğne öze, otomatik pipet ve pipet uçları, bunzen beki veya insenaratör, sıvı numune, katı numune
-------------------------	--

#### A. Sıvı Numuneden Tüpteki Sıvı Besiyerine Ekim

##### İşlem Basamakları

1. Çalışılacak ortamın aseptik koşulları sağlanır.
2. Sıvı numune karıştırılarak homojen hale getirilir.
3. Ekim için kullanılacak halka öze tekniğine uygun sterilize edilir.
  - Bek alevinde veya insenaratörde akkor hale gelene kadar ısıtılır.
  - Soğutulduktan sonra işlemlere devam edilir.
4. Bir öze dolusu sıvı numune alınarak besiyerine Şekil 1'deki gibi ekim yapılır.
5. Ekim yapıldıktan sonra tüpün ağız kısmı alevden geçirilerek kapatılır.
6. Halka öze tekrar sterilize edilir ve besiyeri ve halka öze spora yerleştirilir.

#### B. Katı Numuneden Tüpteki Sıvı Besiyerine Ekim

##### İşlem Basamakları

1. Numune kabı sağ ele, iğne öze ise sol ele alınır.
2. İğne öze tekniğine uygun şekilde sterilize edilir.
3. Katı numuneden iğne öze yardımıyla örnekten bir miktar alınır.
4. İğne öze ile alınan örnek, besiyeri tüpünün sıvı kısmının biraz üzerindeki çeperde ezilerek sürtme hareketi yapılır.
  - Böylece numunenin yayılması sağlanır.
5. Öze ucu besiyerinin içine daldırılıp karıştırılır.
6. Ekim yapıldıktan sonra tüpün ağız kısmı alevden geçirilerek kapatılır.
7. İğne öze tekrar sterilize edilir ve besiyeri ve halka öze spora yerleştirilir.

### UYGULAMA-II

#### Katı Besiyerine Ekim

Kullanılacak Malzemeler	Yatık katı besiyeri, Plak besiyeri, halka öze (loop), iğne öze, bunzen beki veya insenaratör, sıvı numune
-------------------------	---

#### A. Tüpte Yatık Katı Besiyerine Ekim

##### İşlem Basamakları

1. Çalışılacak ortamın aseptik koşulları sağlanır.
2. Sıvı numune karıştırılarak homojen hale getirilir.
3. Ekim için kullanılacak iğne öze tekniğine uygun sterilize edilir.
  - Bek alevinde veya insenaratörde akkor hale gelene kadar ısıtılır.
  - Soğutulduktan sonra işlemlere devam edilir.
4. Bir öze dolusu sıvı numune alınarak besiyerine Şekil 2'deki gibi ekim yapılır.
  - İğne öze tüpteki yatık besiyerinin dip kısmına doğru batırılır.
  - İğne öze yavaşça yukarı doğru çekilir.
  - İğne öze çıkarılmadan yatık kısma çizgi ekimi yapılır ve öze dışarı çıkarılır.
5. Ekim yapıldıktan sonra tüpün ağız kısmı alevden geçirilerek kapatılır.
6. İğne öze tekrar sterilize edilir ve besiyeri ve iğne öze spora yerleştirilir.

## B. Plak Besiyerine Azaltma Ekim Yöntemi ile Ekim

### İşlem Basamakları

1. Çalışılacak ortamın aseptik koşulları sağlanır.
2. Sıvı numune karıştırılarak homojen hale getirilir.
3. Ekim yapılacak petri kutunun alt kısmına gerekli bilgiler asetat kalem ile yazılır.
4. Halka özeyi sağ elle tutarak tekniğine uygun sterilize edilir.
  - Bek alevinde veya insineratörde akkor hale gelene kadar ısıtılır.
  - Soğutulduktan sonra işlemlere devam edilir.
5. Numune tüpünün ağzını tekniğine uygun şekilde açtıktan sonra bir öze dolusu numune alınır.
6. Ardından numune tüpünün ağzı alevden geçirilerek kapağı tekrar kapatılır.
7. Ekim yapılacak petri kutusu, sol elin baş ve işaret parmağı serbest kalacak şekilde, avuç içinde kavrayarak tutulur.
8. Ekim yapılacak alanlar göz kararı tasarlanır.
9. Öze, birinci ekim alanının üst kısmına ters düz ederek sürtülür. Sonra sağa sola sık aralıklı paralel zikzaklar çizerek birinci sürme işlemi tamamlanır.
  - Sürme işlemi kesintisiz olmalıdır.
10. Petri kutusunu kapatılıp öze sterilize edildikten sonra soğuması sağlanır.
11. Petri kutusu saat yönünün tersine döndürülerek ilk ekim sahası sol tarafımıza gelecek şekilde tekrar alınır.
12. Öze birinci ekim bölgesinden bir veya iki defa kestikten sonra birinci ekim alanına göre daha seyrek şekilde paralel zikzaklar çizilir.
13. Petri kutusu tekrar kapatılır ve öze sterilize edilir.
14. Tekrar petri kutusu saat yönünün tersine doksan derece olacak şekilde çevrilir.
15. Öze soğuduktan sonra ikinci ekim bölgesine birkaç defa temas ederek daha seyrek zikzaklar çizilir.
16. Son işlemde petri kutusu tekrar çevrilir ve üçüncü ekim alanı solumuza alınır. Öze sterilize edilip soğutulur.
17. Öze üçüncü ekim alanında birkaç defa temas ettikten sonra daha seyrek bir şekilde besiyerinin ortasına doğru çizilir.
  - Son saha kesinlikle diğer sahalarla özellikle birinci saha ile temas etmemelidir.
18. Öze tekniğine uygun sterilize edilip ekim işlemi tamamlanır.

## ÖLÇME ve DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki form, uygulama faaliyetinizin değerlendirilmesi amacıyla hazırlanmıştır. Performansınız aşağıdaki kriterlere göre değerlendirilecektir.

Değerlendirme Kriterleri		Çok iyi (7-8)	İyi (5-6)	Orta (3-4)	Geliştirmeli (1-2)
1	Aseptik koşullara dikkat etti.				
2	Halka öze ile tekniğine uygun şekilde sıvı besiyerine ekim yaptı.				
3	İğne öze ile tekniğine uygun şekilde sıvı besiyerine ekim yaptı.				
4	Yatık katı besiyerine saplama ve yüzey ekimi yaptı.				
5	Petri kutusu ve öze tutuş tekniklerini uyguladı				
6	Petri sürme alanlarını doğru bir şekilde uyguladı				
7	Etüvün sıcaklığını ayarlayıp besiyerlerini etüve yerleştirdi.				
8	İnkübasyon sonunda besiyerlerinde üreyen bakterilerin değerlendirmesini yaptı.				
9	İnkübasyon sonunda koloni morfolojilerini değerlendirdi.				
10	İnkübasyon sonunda bakterilerin hemoliz durumlarını değerlendirdi.				
<b>TOPLAM PUAN</b>					

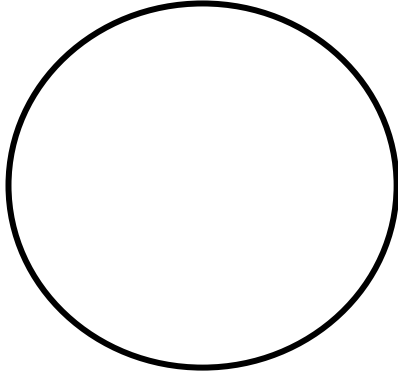
Aşağıdaki soruların doğru cevaplarını işaretleyiniz.

- Aşağıdakilerden hangisi düzgün kenarlı koloni tipine verilen isimdir?  
A) S koloni      B) R koloni      C) M koloni      D) L koloni      E) Bomba koloni
- Aşağıdakilerden hangisi ekim araçlarından değildir?  
A) İğne öze      B) Halka öze      C) Pens      D) Pipet      E) Eküvyon çubuk
- Aşağıdakilerden hangisi hem besiyeri içine hem de yüzeyine yapılan ekim yöntemidir?  
A) Yayma plak yöntemi      B) Tüpte yatık besiyerine ekim      C) Azaltma yöntemi  
D) Tüpte dik besiyerine ekim      E) Tam Saha ekim
- Bakterileri üretmek için gerekli olan en ideal sıcaklık aşağıdakilerden hangisidir?  
A) 60°C      B) 55°C      C) 42°C      D) 37°C      E) 24°C

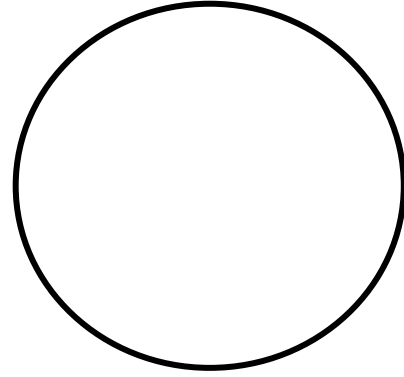


## LABORATUVARDA YAPILACAK İŞLEMLER

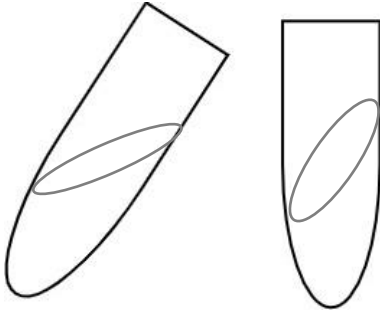
1. Besiyerlerine verilen numunelerden uygun şekilde ekimler yaparak yaptığınız ekimleri şematize ederek çiziniz.



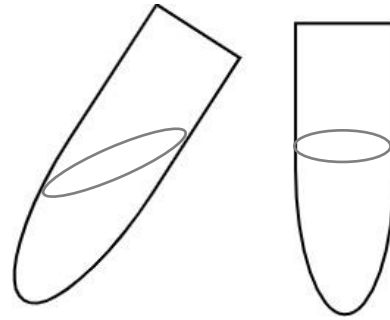
a. Tek koloni ekimi



b. Tam saha ekimi

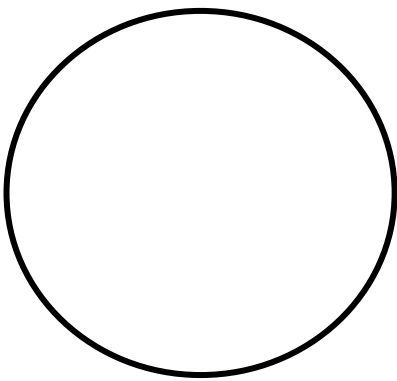


c. Yatık besiyerine ekim

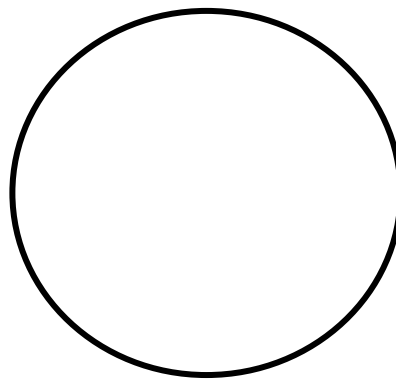


d. Sıvı besiyerine ekim

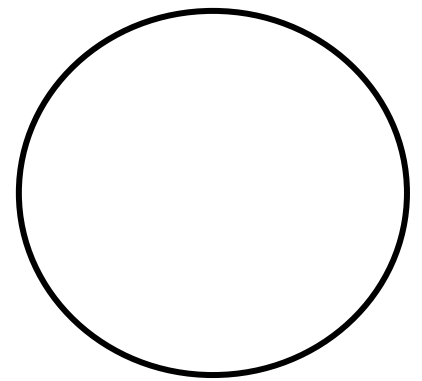
1. Laboratuvara hazır olarak getirilen kültürlerde koloni görünümünü değerlendirerek, hangi tip koloni olduğunu çiziniz.



a. ....



b. ....



c. ....

2. Laboratuvara hazır olarak getirilen kültürlerde hemoliz özelliklerini değerlendirerek, hangi tip hemoliz olduğunu çiziniz.

a. ....

b. ....

c. ....

## KAYNAKLAR

Bilgehan H (2009) Klinik Mikrobiyoloji Tanı. Beşinci Baskı. Barış yayınları, İzmir.

Editörler: Günalp A, Yılmaz YA, Pınar A: Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar Eğitim Kitabı. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 2003, s-44-54.

Win Jr. W, Ailen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G, Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostik Microbiology, Sixth edition, Lippincott Williams and Wilkins, s.29-38.

Mikrobiyolojik Kültür, Laboratuvar Hizmetleri, mikrobiyolojik kültür, Megep, Ankara, 2015.

Wellesley College-BISC 209 Microbiology -Spring 2010

Mehmet Kıyan, Bakterilerin Metabolizması İzolasyon (üretim) ve İdentifikasyon (tanımlama) Yöntemleri

[https://mospace.umsystem.edu/xmlui/bitstream/handle/10355/69341/4.6-](https://mospace.umsystem.edu/xmlui/bitstream/handle/10355/69341/4.6-DTGH%20Gelatin%20Hydrolysis%20Test.pdf?sequence=20&isAllowed=y)

DTGH%20Gelatin%20Hydrolysis%20Test.pdf?sequence=20&isAllowed=y (Son Erişim 19.04.2021)



# **TIBBİ LABORATUVAR TEKNİKLERİ**

## **LABORATUVAR UYGULAMA**

**FÖYÜ**

# **4**

## **MİKROBİYOLOJİDE KULLANILAN BOYAMA YÖNTEMLERİ**

**Öğr. Gör. Abdulhamit ÇALI**

**DERSİN AMACI**

Mikrobiyolojide kullanılan boyama yöntemlerinin öğrenilmesi  
Basit boyama ve Gram boyama yöntemlerinin öğrenilmesi

**DERSİN HEDEFLERİ**

<b>BİLGİ</b>	Bu dersi alacak olan öğrenciler; Bakteri boyalarını sıralar. Basit boyama yönteminin basamaklarını sıralar.
<b>BE CERİ</b>	Gram boyama yönteminin basamaklarını sıralar. Basit boyama yöntemini kurallara uygun şekilde uygular. Gram boyama yöntemini kurallara uygun şekilde uygular. Basit boyama yöntemi ile boyanmış preparatları mikroskopik olarak değerlendirir. Gram boyama yöntemi ile boyanmış preparatları mikroskopik olarak değerlendirir.
<b>TUTUM</b>	Mikroskobu başkalarının yardımına ihtiyaç duymaksızın kullanır Laboratuvara gelirken kurallara uygun olarak giyinir. Mikroskobu kullandıktan sonra temizleyerek bırakır. Laboratuvardaki malzemeleri kullandıktan sonra temizleyerek bırakır. Laboratuvardan çıkmadan önce ellerini yıkar.

**GENEL BİLGİLER**

Mikrobiyolojik tanıda morfolojik incelemeler büyük değer taşır. Mikroorganizmaların tanısının koyulmasında kısa sürede ön sonuç vermesi açısından boyama yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır. İyi bir incelemenin en azından tanıya doğru yönlendirici değeri vardır. Morfolojik incelemelerden olan boyama işlemi, bakterilerin identifikasyonu ve sınıflandırılmalarında önemli bir işlemdir. Bunlar içinde en sık kullanılanlar şunlardır;

1. Basit boyama
2. Gram boyama
3. Asido rezistan boyama (Ehrlich - Ziehl-Neelsen boyama)
4. Metilen mavisi boyama
5. Giemsa boyama
6. Çini mürekkebi boyama
7. Laktofenol pamuk mavisi boyama
8. Spor boyama
9. Kapsül boyama
10. Neisser boyama

Bütün boyama işlemlerinde ilk aşama preparat hazırlanması ve tespit işlemidir.

**Preparat Hazırlanması:**

Preparatlar doğrudan hastalık örneklerinden, kültürlerden ya da deney hayvanlarındaki patolojik lezyonlardan hazırlanır. Bunun için temiz lamlar kullanılır. Sıvı materyalden preparat hazırlanıyor ise öze ya da otomatik pipet yardımı ile bir damla örnek alınarak lamın orta kısmına bırakılır. Öze yardımı ile dairesel hareketler ile küçük bir bozuk para büyüklüğünde yayılır. Bakteri kolonisi ya da katı bir klinik materyalden preparat hazırlarken önce bir damla steril serum fizyolojik lamın ortasına damlatılır. Örnek öze ile alınarak damlanın kenarında ezilir. Dairesel hareketlerle sıvı ile karışması sağlanır. Preparat oda ısısında kurumaya bırakılır.

## Tespit Yöntemleri:

Preparatın tespit edilmesinde amaçlanan, üzerindeki materyalin lama yapışmasını sağlamaktır. Üç yöntemle tespit işlemi yapılabilir:

- Havada kurutularak tespit:** En az güvenilir olanıdır. Hazırlanan preparat 2-18 saat bekletilmelidir.
- Alevde tespit:** En çok kullanılan yöntemdir. Preparat havada kurutulduktan sonra materyalli yüzü yukarı gelecek şekilde bir ucundan tutulur. Lamin alt yüzü yanmakta olan alevin mavi kısmına, yukarıdan aşağıya doğru yavaş yavaş hareket ettirilerek yalıtılır.
- Kimyasal maddeler ile tespit:** Alevde tespit edildiğinde morfolojisini kaybedebilecek materyali (protozoa, lökosit, eritrosit, epitel hücresi vs.) tespitinde kulanır. Etil alkol (8-10 dakika), metil alkol (3 dakika) ve aseton (5 dakika) tespit işleminde en çok kullanılan kimyasallardır. Bu maddeler hazırlanan preparatın üstüne, materyal bulunan kısmını kaplayacak şekilde dökülerek kullanılır.

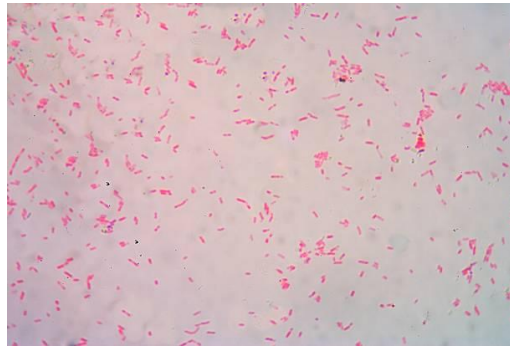
## Basit Boyama Yöntemi

Bu yöntemde, boyama için genellikle tek bir boya kullanılır ve mikroorganizmaların morfolojileri incelenir.

### Basit Boyama Yöntemi

1. Preparat hazırlanıp tespit edilir.
2. Metilen mavisi, safranin veya kristal viyole gibi boyalardan birisi ile 1 dakika boyanır.
3. Su ile yıkanır.
4. Havada kurutulur.
5. İmmersiyon objektifi ile incelenir.

Bu boyama sonucu bakteriler, metilen mavisi ile **mavi**, safraninle **pembe/kırmızı**, kristal viyole ile **mor/lacivert** boyanır.



Şekil 1. Safranin ile basit boyama yöntemi

## Gram Boyama Yöntemi

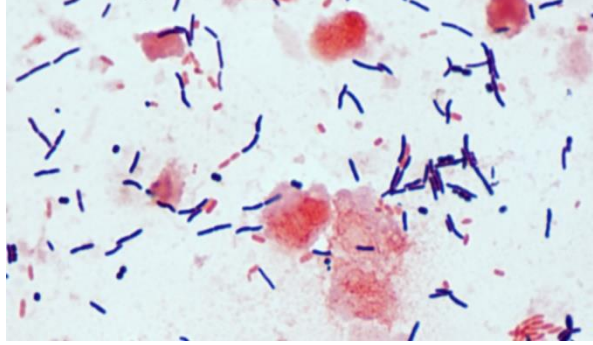
Bakterilerin hücre duvar yapılarındaki farklılıklara dayalı bir boyama yöntemi olup, bakterileri gram pozitif ve gram negatif olarak sınıflayan bir boyama yöntemidir.

### Gram Boyama Yöntemi

1. Preparat hazırlanıp tespit edilir.
2. Preparat yatay konumda iken üzerine kristal viyole dökülerek 1 dakika bekletilir.
3. Preparat tazyikli olmayan su ile boya tamamen akıncaya kadar yıkanır.
4. Preparat yatay konumda iken üzerine lügol dökerek 1 dakika bekletilir.
5. Preparatın üzerindeki lügol solüsyonunu dökülür.
6. Preparatın üzerine damla damla aseton-alkol dökülerek dekolorizasyon (renksizleştirme) yapılır. Bu işlem kristal viyole tamamen akana kadar sürdürülür.

7. Preparat tazyikli olmayan su ile yıkanır.
8. Preparat yatay konumda iken üzerine safranin (zıt boya) dökerek 30 saniye bekletilir.
9. Preparat tazyikli olmayan su ile yıkanır.
10. Preparat oda ısısında kurutulur.
11. Preparat immersiyon objektifi ile incelenir.

Bu boyamayla gram pozitif bakteriler **mor**, gram negatif bakteriler **pembe** boyanır.



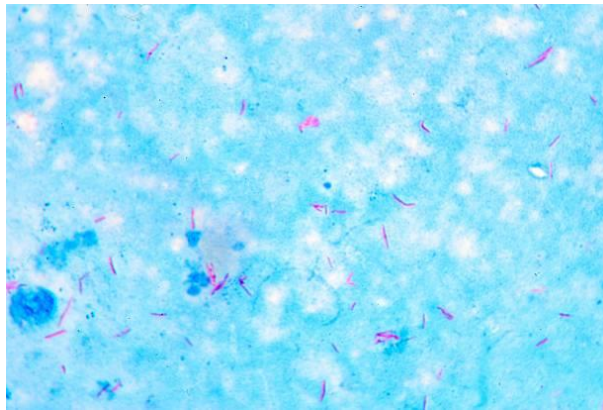
Şekil 2. Gram boyama yöntemi

## Asido Rezistan Boyama Yöntemi (EZN)

Özellikle Mycobacterium'lar olmak üzere Nocardia'lar gibi hücre duvarlarında bol miktarda lipid içeren mikroorganizmaların boyanmasında kullanılan bir yöntemdir. Bu boyama yönteminde asit-alkole dirençli boyanan bakteriler kırmızı (karbol fuksin ile), diğer bakteriler ve zemin mavi (metilen mavisi ile) boyanır.

### EZN (Erlich-Ziehl-Nelseen) Boyama Yöntemi

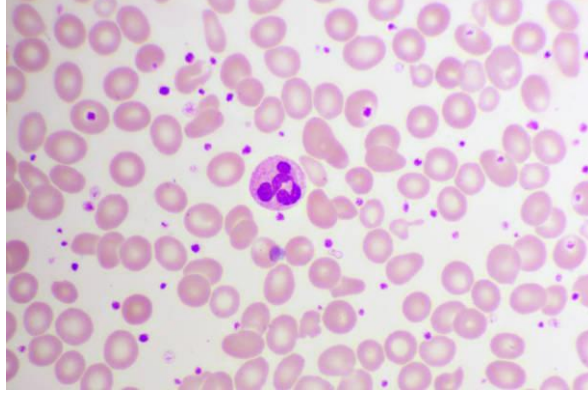
1. Preparat hazırlanıp tespit edilir.
2. Preparat yatay konumda iken üzerine karbol fuksin dökülür.
3. Boya kaynamayacak şekilde preparat alttan ısıtılır. 5 dakika bekletilir.
4. Preparat tazyikli olmayan su ile yıkanır.
5. Preparat yatay konumda iken üzerine asit-alkol dökülür ve 15-20 saniye bekletilir.
6. Preparat tazyikli olmayan su ile yıkanır.
7. Preparat yatay konumda iken üzerine metilen mavisi (zıt boya) dökerek 1-2 dakika bekletilir.
8. Preparat tazyikli olmayan su ile yıkanır.
9. Preparat oda ısısında kurutulur.
10. Preparat immersiyon objektifi ile incelenir.



Şekil 3. ARB boyama yöntemi

## Giemsa Boyama Yöntemi

Protozoa (Plasmodium vs.) türlerinin ve kan hücrelerinin gözlenmesi amacıyla uygulanır. Parazitler mavi-mor renkte ve kırmızı çekirdekli olarak gözlenir. Beyaz kan hücrelerinin çekirdekleri mor, sitoplazmaları mavi renkte görülür. Eritrositler ise açık kahverengi olarak gözlenir.



Şekil 4. Giemsa boyama yöntemi

## Çini Mürekkebi Boyama Yöntemi

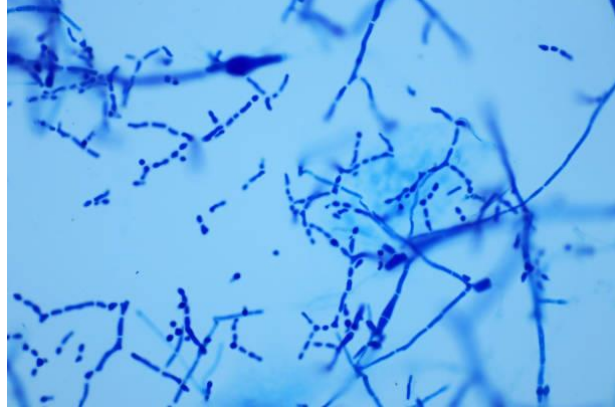
Çini mürekkebi ile boyama, en sık *Cryptococcus neoformans*' in kapsülünün gözlenebilmesi amacıyla uygulanır. Çini mürekkebi kapsülü boyamadığından, siyah zemin üzerinde mayayı çevreleyen açık renkli kapsül gözlenir.



Şekil 5. Çini mürekkebi boyama yöntemi

## Laktofenol Pamuk Mavisi Boyama Yöntemi

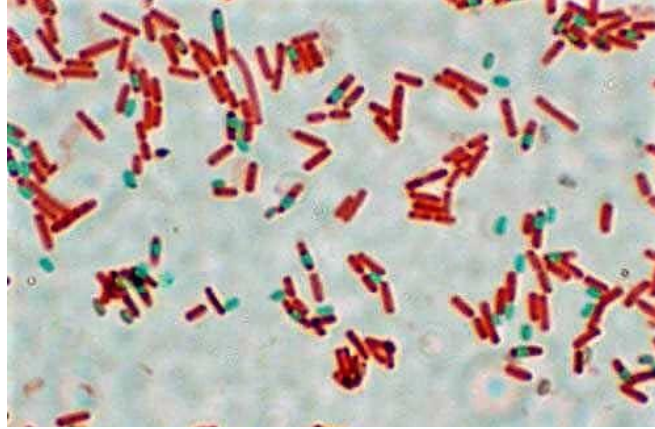
Küf mantarlarının tanınması amacıyla uygulanır. Mavi boyanmış hifa ve spor morfolojileri incelenir.



Şekil 6. Laktofenol pamuk mavisi boyama yöntemi

## Spor Boyama Yöntemi

Spor yapan bakterilerin, sporlarının varlığını ve yerleşimini gözlemek için kullanılan bir boyama yöntemidir. Bu yöntemle bakteri kırmızı (safranin ile), içindeki spor yeşil (malaşit yeşili ile) boyanır.



Şekil 7. Spor boyama yöntemi

## Neisser Boyama Yöntemi

*Corynebacterium diphteriae*'larda bulunan metakromatik cisimcikleri boyamada kullanılan bir boyama yöntemidir. Bakteriler sarı, metakromatik cisimcikler kahverengi boyanır.



Şekil 8. Neisser boyama yöntemi



## UYGULAMA-I Gram Boyama Yöntemi

**Kullanılacak Malzemeler** Bunzen bek, lam, öze, kültür, kristal viyole, lugol çözeltisi, sulu fuksin veya safranin, aseton alkol, kurutma kağıdı

### İşlem Basamakları

1. Preparat hazırlanır.
  - **Yayma, kurutma ve tespit işlemleri yapılır.**
2. Preparat kristal viyole çözeltisi ile 1 dakika boyanır. Ardından distile su ile yıkanır.
  - **Boyama işlem basamaklarının hepsi plastik boyama kabının içerisinde yapılmalıdır.**
  - **İşlemler sırasında boya ların çevreye sıçramamasına özen gösterilmelidir.**
3. Preparata lügol çözeltisi damlatılır ve 1 dakika bekletilir. Ardından distile su ile yıkanır.
  - **Preparatın üzerini tamamen kapatacak şekilde lügol damlatılmalıdır.**
4. Preparat üzerine aseton alkol damlatılır ve 15-20 saniye bekletilir. Ardından distile su ile yıkanmalıdır.
  - **Renksiz sıvı akana kadar bekletilir.**
  - **Çok fazla bekletilmemelidir.**
5. Preparat sulu fuksin veya safranin ile 30 saniye boyanır. Ardından distile su ile yıkanır.
6. Preparat kurutmaya bırakılır ve sonra 100x immersiyon objektifi ile incelenir.
  - **Mikroskopta mor renkli görünen bakteriler Gram pozitif, pembe renkli görünen bakteriler Gram negatif olarak tanımlanır.**

## UYGULAMA-II EZN Boyama Yöntemi

**Kullanılacak Malzemeler** Bunzen bek, lam, öze, tel, pamuk, kültür, karbol fuksin, metilen mavisi, asit alkol karışımı ( 3 mL HCl, 97 mL ethanol), kurutma kağıdı

### İşlem Basamakları

1. Preparat hazırlanır.
  - **Yayma, kurutma ve tespit işlemleri yapılır.**
2. Preparat karbol fuksin çözeltisi ile kaplanır.
3. Bir telin ucuna pamuk sarılır ve pamuğa alkol damlatılır. Ardından bu pamuk yakılıp preparatın altından geçirilerek ısıtılır.
  - **Isıtma işlemi kaynama olmadan devam edilmeli. Buhar çıkmalıdır.**
  - **Preparat üzerindeki boya eksildikçe tamamlanmalı**
  - **Bu işlem 5 dakika devam etmeli**
4. Preparata soğuduktan sonra distile su ile yıkanır.
5. Preparat üzerine asit alkol damlatılır ve renksiz sıvı akana kadar 15-20 saniye bekletilir. Ardından distile su ile yıkanır.
6. Preparat metilen mavisi ile 1 dakika boyanır. Ardından distile su ile yıkanır.
7. Preparat kurutmaya bırakılır ve sonra 100x immersiyon objektifi ile incelenir.

## ÖLÇME ve DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki form, uygulama faaliyetinizin değerlendirilmesi amacıyla hazırlanmıştır. Performansınız aşağıdaki kriterlere göre değerlendirilecektir.

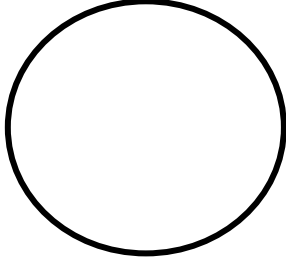
Değerlendirme Kriterleri		Çok iyi (7-8)	İyi (5-6)	Orta (3-4)	Geliştirmeli (1-2)
1	Preparatı tekniğine uygun hazırladı.				
2	Kristal viyole boya uygulamasını yaptı.				
3	Lugol uygulamasını yaptı.				
4	Dekolorizasyon ve yıkama işlemlerini yaptı.				
5	Sulu fuksin uygulamasını yaptı.				
6	Mikroskopun 100x'lük objektifini tekniğine uygun olarak kullandı.				
7	100x'lük objektifte bakterileri gördü.				
8	Bakterilerin Gram özelliklerini doğru bir şekilde belirledi.				
9	Gram pozitif ve Gram negatif bakterileri ayırt etti.				
10	EZN boyama yöntemi ile boyanmış preparatı mikroskopta ayırt etti.				
<b>TOPLAM PUAN</b>					

Aşağıdaki soruların doğru cevaplarını işaretleyiniz.

- Gram boyamada Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler sırasıyla hangi renkte görülür?**  
A) Kırmızı/yeşil B) Kırmızı/mavi C) Mor/mavi D) Mor/pembe E) Renksiz/mor
- Gram boyamada, dekolorizasyon işleminde aşağıdaki maddelerden hangisi kullanılır?**  
A) Kristal viyole B) Lugol C) Aseton alkol D) Asit alkol E) Metilen mavisi
- Gram boyamada kullanılan mordant madde aşağıdakilerden hangisidir?**  
A) Kristal viyole B) Lugol C) Aseton alkol D) Asit alkol E) Metilen mavisi
- Preparatı ışık mikroskopunda incelemek için kaçlık objektif kullanılmaktadır?**  
A) 10x B) 20x C) 40x D) 80x E) 100x
- Gram boyama işlemleri sırasında dekolorizasyon aşaması uzun tutulursa aşağıdaki durumlardan hangisi meydana gelir?**  
A) Gram pozitif bakteriler pembe boyanabilir B) Gram negatif bakteriler mor boyanır  
C) Gram pozitif bakteriler mor boyanır D) Gram negatif bakteriler boyanmaz  
E) Gram pozitif bakteriler boyanmaz

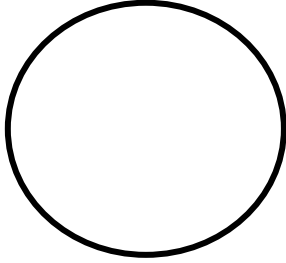
## LABORATUVARDA YAPILACAK İŞLEMLER

1. Kendi yaptığınız boyama yöntemine göre mikroskopta gördüğünüz bakterilerin boyama yöntemini, şekillerini ve renklerini yazınız ve çiziniz.

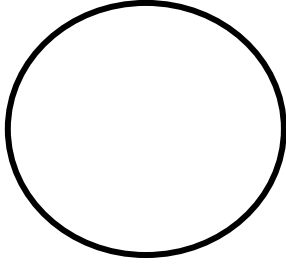


Boyama Yöntemi: .....  
Bakterinin Şekli: .....  
Bakterinin Rengi: .....

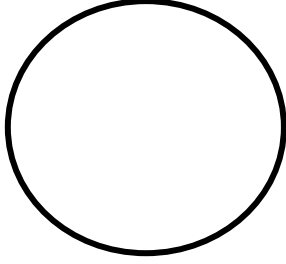
2. Mikroskoplarda hazır bulunan preparatları inceleyerek mikroorganizmaların boyama yöntemlerini, şekillerini ve renklerini yazınız ve çiziniz.



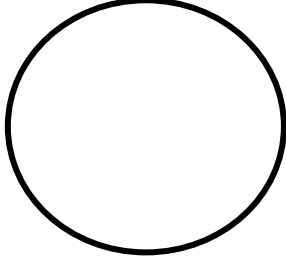
Boyama Yöntemi: .....  
Mikroorganizmanın Şekli: .....  
Mikroorganizmanın Rengi: .....



Boyama Yöntemi: .....  
Mikroorganizmanın Şekli: .....  
Mikroorganizmanın Rengi: .....



Boyama Yöntemi: .....  
Mikroorganizmanın Şekli: .....  
Mikroorganizmanın Rengi: .....



Boyama Yöntemi: .....  
Mikroorganizmanın Şekli: .....  
Mikroorganizmanın Rengi: .....

Öğrencinin Adı ve Soyadı:  
Numarası:  
İmzası:

## KAYNAKLAR

- Bilgehan H (2009) Klinik Mikrobiyoloji Tanı. Beşinci Baskı. Barış yayınları, İzmir.  
Editörler: Günalp A, Yılmaz YA, Pınar A: Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar Eğitim Kitabı. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 2003, s-44-54.
- Win Jr. W, Ailen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G, Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostik Microbiology, Sixth edition, Lippincott Williams and Wilkins, s.29-38.
- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (2009). Manual of Clinical Microbiology. Klinik Mikrobiyoloji. Cilt 1. 9th ed., Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti., Ankara, 183184.
- Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar Eğitim Kitabı (2003). Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 55-61.



# **TIBBİ LABORATUVAR TEKNİKLERİ**

## **LABORATUVAR UYGULAMA**

**FÖYÜ**

# **5**

**MİKROSKOBİK YÖNTEMLER**

**Öğr. Gör. Abdulhamit ÇALI**

### DERSİN AMACI

Cihaz kullanma talimatlarına uygun mikroskop ile boyasız ve boyalı preparat incelemesinin öğrenilmesi  
Neubauer/Thoma lamının kullanımının öğrenilmesi

### DERSİN HEDEFLERİ

<b>BİLGİ</b>	Bu dersi alacak olan öğrenciler; Mikroskopun kısımlarını sayar. Bakteri boyama yöntemlerini sıralar. Boyasız inceleme yöntemlerini sıralar.
<b>BE CERİ</b>	Mikroskopta preparat inceleme basamaklarını uygular. Mikroskobu başkalarının yardımına ihtiyaç duymaksızın kullanır Basit boyama yöntemi ile boyanmış preparatları mikroskopik olarak değerlendirir. Gram boyama yöntemi ile boyanmış preparatları mikroskopik olarak değerlendirir.
<b>TUTUM</b>	Boyasız preparat incelemesi yapar Laboratuvara gelirken kurallara uygun olarak giyinir. Mikroskobu kullandıktan sonra temizleyerek bırakır. Laboratuvardaki malzemeleri kullandıktan sonra temizleyerek bırakır. Laboratuvardan çıkmadan önce ellerini yıkar.

### GENEL BİLGİLER

Mikroskop, gözle görülmeyen, küçük canlı veya cansız nesnelerin incelenmesini sağlayan optik araçtır. İnsan gözü mikroorganizmaları ayırt edemediği için mikroorganizmaları görerek inceleyebilmek için mikroskoplara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaç için birçok mikroskop çeşidi vardır:

- 1. Işık mikroskobu:** Mikroskoplar içerisinde en sık kullanılan mikroskop çeşididir. Mikrobiyoloji, biyokimya, hematoloji, mikoloji, parazitoloji, histoloji gibi birçok laboratuvarda kullanılmaktadır. Büyütme özelliği 40-2000 kat aralığındadır.
- 2. Karanlık alan mikroskobu:** Bu mikroskopların kondansör yapıları farklı olduğu için ışık mikroskoplarından ayrılır. Bu mikroskopta ışık preparata alttan değil, yandan gelir ve preparatta bulunan nesnelere aydınlatırken zeminin karanlık görünmesine neden olur. Böylece incelenen nesne, karanlık sahada parlak yapılar olarak görülmektedir. Işık mikroskobunda görülemeyen spiroket gibi bazı ince yapıları mikroorganizmaların incelenmesinde kullanılmaktadır.
- 3. Faz Kontrast Mikroskobu:** Bu mikroskoplar özel kondansatör ve optik sisteme (özel faz objektifleri) sahip olduklarından dolayı ışık mikroskobundan farklıdır. Sıvı bir ortamda mikroorganizmaların hücre içi yapılarının incelenmesinde kullanılır.
- 4. Floresan Mikroskobu:** Işık kaynağı olarak ultraviyole ışınları kullanıldığı için diğer mikroskoplardan ayrılır. Bu mikroskoplarda görüntü elde edebilmek için florescein, rodamin, auramin gibi floresans boyalar kullanılmaktadır.
- 5. Elektron Mikroskobu:** Bu mikroskoplarda ışık kaynağı olarak elektronlar kullanılmaktadır. 20 000-1.000.000 kat büyütme özelliğine sahiptir. Elektromanyetik kondansatörler ve elektronlar kullanıldığı için diğer mikroskoplardan çok farklıdır. Taramalı ve geçirimli elektron mikroskopları olmak üzere iki çeşit elektron mikroskobu vardır.

#### Işık Mikroskopunun Kısımları

Genel olarak ışık mikroskobu mekanik ve optik kısımları olmak üzere iki ana kısımdan oluşmaktadır.

- 1. Mekanik Kısım:** Bu kısım, oküler ve objektifleri taşıyan tüp, mikroskobu tutmaya yarayan kol, preparatı koymak için tabla ve mikroskopun zemine oturmasını sağlayan ayakta oluşur (Şekil 1).



**Şekil 1.** Işık mikroskopunun kısımları

- 2. Optik Kısım:** Mikroskopta incelenen nesnelere büyütme gücü elde edilmesini sağlayan kısımdır. Bu kısım ışık kaynağı, objektif ve okülerden meydana gelir (Şekil 1). Objektifler farklı büyütme özelliğine sahiptir. Genel olarak 4x, 10x, 40x, 100x objektifler kullanılmaktadır. Objektifler, kendi ekseninde dönebilen bir tablaya (revolver) sabitlenmiştir. Kullanılacak objektif, revolver yardımıyla ışık yolunun üzerine getirilerek görüntü alınır. Oküler mikroskopta gözle bakılan kısımlardır. Genel olarak 5x, 10x, 15x, 20x okülerler kullanılmaktadır. Bazı mikroskoplarda tek bir oküler (monoküler) bulunmasına rağmen genellikle çift oküler (binoküler) bulunur.

### Mikroskopun Büyütme Gücü

Mikroskopun büyütme gücü, objektif büyütme gücü ile okülerin büyütme gücünün çarpımı ile hesaplanır. Örneğin 10x oküler ve 100x objektif kullanılan bir mikroskopun büyütme gücü 1000'dir.

### Mikroskop Kullanılırken Dikkat Edilmesi Gereken Kurallar

- Mikroskop taşınırken bir elle altından diğer elle kolundan tutularak iki elle taşınmalıdır.
- Mikroskopun konulduğu masa, sağlam olmalı; oturulacak sandalyenin boyu mikroskoba rahatça bakılacak boyda olmalıdır.
- Mikroskop, kullanılmadığı zamanlarda kılıfı içinde korunmalıdır.
- Her kullanımdan sonra yumuşak dokulu, kalıntı bırakmayan temiz bir bezle temizlenmelidir.
- Kullanımı bittikten sonra tabla en alt konuma alınmalı, objektifte en küçük objektife alınmalıdır.
- Mikroskopların merceklerine elle dokunulmamalıdır.

### Sayma Lamları ile Mikroskopik İnceleme

Thoma veya Neubauer lamları kullanılarak eritrosit ve lökosit sayımları yapılmaktadır. Neubauer lamı üzerinde özel karelerden oluşan ve  $\text{mm}^3$ 'teki hücre sayısının hesaplanmasında kullanılan özel bir lamdır (Şekil 2). Bu lamda bulunan "L" harfi ile gösterilen alandaki 16 kare lökosit sayım alanıdır. "E" harfi ile gösterilen alandaki 25 kare ise eritrosit sayım alanıdır. Bir büyük lökosit alanı  $1 \text{ mm}^2$ 'dir. Bir küçük kare eritrosit alanı da  $0,04 \text{ mm}^2$ 'dir. Toplam 25 kare ise  $1 \text{ mm}^2$ 'dir. Lamin derinliği ise  $0,1 \text{ mm}$ 'dir.



Şekil 2. Neubauer lamı

**Lökosit Sayımı:**

Lökosit sayısı hesaplanırken aşağıdaki formüle göre hesaplama yapılır.

- İncelenecek örnek lökosit açısından yoğun bir örnek ise uygun sulandırma çözeltisi ile sulandırılmalıdır. Sulandırma kat sayısı belirlenmelidir.
- Sulandırma yapıldıktan sonra homojen hale getirilen numune Neubauer lamındaki alana bir damla koyulur ve lamel kapatılır.
- Mikroskopta 400 büyütme gücü ile incelenir.
- Dört büyük lökosit sayım alanında sadece birinin sayılması yeterlidir. Sayımın daha sağlıklı olması için 4 büyük alan sayılıp çıkan sayı dörde bölünmesi gerekir.
- Aşağıdaki formülle hesaplama yapılır.

$$\text{Lökosit sayısı/mm}^3 = \frac{\text{sayılan lökosit} \times \text{dilüsyon faktörü}}{\text{sayım alanı (mm}^2\text{)} \times \text{derinlik (mm)}}$$

**Örneğin;** İdrar örneğinden yapılan sayımda bir lökosit sayma alanında 10 lökosit sayımı yapılmış olsun, buna göre  $\text{mm}^3$ 'teki lökosit sayısı kaçtır.

Cevap: Bir lökosit sayım alanı  $1 \text{ mm}^2$ 'dir. Derinlik ise  $0,1 \text{ mm}$ 'dir. Buna göre;

$$\text{Lökosit sayısı} = \frac{10 \text{ lökosit} \times 1}{1 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm}} = 100 \text{ lökosit/mm}^3$$

**Eritrosit Sayımı:**

Genel olarak lökosit sayımına benzer şekilde sayım yapılır. Tek fark Orta kısımdaki 25 kare sayılarak eritrosit sayımı yapılır. Daha pratik bir yöntem olarak eritrosit sayım alanında beş küçük kare sayılıp 5 ile çarpılabilir. Aşağıdaki formüle göre hesaplama yapılmaktadır.

$$\text{Eritrosit sayısı/mm}^3 = \frac{\text{sayılan eritrosit} \times \text{dilüsyon faktörü}}{\text{sayım alanı (mm}^2\text{)} \times \text{derinlik (mm)}}$$

**Örneğin;** İdrar örneğinden yapılan sayımda beş küçük karede 10 eritrosit sayımı yapılmış olsun, buna göre  $\text{mm}^3$ 'teki eritrosit sayısı kaçtır.

Cevap: Bir küçük eritrosit karesi  $0,04 \text{ mm}^2$ 'dir. Beş kare sayıldığı için alan  $5 \times 0,04 = 0,2 \text{ mm}^2$ 'dir. 25 karenin sayılması gerektiğinden sayım alanını 5 ile çarpmak gerekmektedir. Derinlik ise  $0,1 \text{ mm}$ 'dir. Buna göre;

$$\text{Eritrosit sayısı} = \frac{50 \text{ eritrosit} \times 1}{1 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm}} = \frac{50 \text{ eritrosit}}{0,1 \text{ mm}^3} = 500 \text{ eritrosit/mm}^3$$



## UYGULAMA I

## Mikrospkta Preparat İnceleme

Kullanılacak Malzemeler

Mikroskop, hazır preparat, temizleme bezi

## İşlem Basamakları

1. Preparat mikroskop tablasına yerleştirilir.
  - **Tablaya yerleştirilirken preparat kısıklara tutturulmalıdır**
2. İlk olarak 4x'lık objektif preparat üzerine dik gelecek şekilde yerleştirilir.
  - **Objektifin revolverde yuvasına oturduğundan emin olunmalıdır.**
3. Okülerler arasındaki mesafe göze göre ayarlanmalı
4. Mikroskopun ışığı açılarak ışık ayarı yapılmalı
  - **Boyasız ve ince yayılmış preperatlarda ışık miktarı azaltılmalıdır.**
5. Diyafram ayarı yapılmalıdır.
  - **Boyasız, az boyalı veya yoğun olmayan preparatlarda diyafram kısık olmalıdır.**
  - **Boyalı veya yoğun preparatlarda diyafram açık olmalıdır.**
6. Şaryo ile incelenecek alan ışık kümesinin üzerine getirilmelidir.
7. Makrovida ile görüntü bulununcaya kadar çevrilmelidir.
8. Görüntü elde edilince mikrovida ile görüntü netleştirilmelidir.
9. Preparattaki görüntü incelenir, alan değiştirmek için şaryo kullanılır.
10. Sırasıyla 10x, 40x'lık objektiflerde görüntü incelenir. 100x'lük objektif kullanılacağı zaman immersiyon yağı damlatılır.
11. İşlemler bittikten sonra mikroskop temizlenir.

## UYGULAMA-II

## Neubauer Lamında Eritrosit ve Lökosit Sayımı

Kullanılacak Malzemeler

Mikroskop, Neubauer lamı, öze, içerisinde lökosit ve eritrosit olduğu bilinen idrar örneği

## İşlem Basamakları

1. Neubauer lamının örnek alanlarından birisine bir öze dolusu örnek damlatılır.
2. Neubauer lamının üzerine lamel kapatılır.
  - **Lamel kapatılınca hava kabarcığı oluşmaması için 45°lik açı ile kapatılmalıdır.**
3. Lam mikroskopun tablasına yerleştirilir. Kıskaç tutturularak hareket etmesi engellenir.
4. 10x'luk objektif ayarlanır ve makrovida ile görüntünün bulunması sağlanır.
5. Daha sonra 40x'lık objektife geçilir ve görüntünün netliği mikrovida ile ayarlanır.
6. Eritrosit sayım alanında eritrosit sayımı yapılır.
  - Eritrosit sayımı için ortadaki 25 kare sayılabilir.
  - Pratik yol olarak eritrosit sayım alanından 5 küçük kare sayılabilir. Beş karedeki sayım elde edildikten sonra çıkan sayının 5 ile çarpılması gerekir.
7. Lökosit sayım alanında lökosit sayımı yapılır.
  - Lökosit sayımı için bir büyük lökosit alanın sayılması yeterlidir.
  - Dört lökosit alanı sayılacak olursa çıkan sayı dört ile bölünmelidir.
8. Sayımlar yapıldıktan sonra net sayıyı elde etmek için 10 sabit sayısı ile çarpılması gerekmektedir.
9. İşlemler bittikten sonra mikroskop temizlenip kaldırılır.

## ÖLÇME ve DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki form, uygulama faaliyetinizin değerlendirilmesi amacıyla hazırlanmıştır. Performansınız aşağıdaki kriterlere göre değerlendirilecektir.

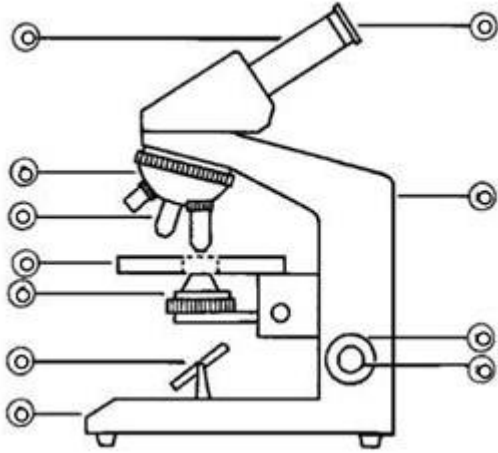
Değerlendirme Kriterleri		Çok iyi (7-8)	İyi (5-6)	Orta (3-4)	Geliştirmeli (1-2)
1	Mikroskobu kullanıma hazır hale getirdi.				
2	Preparatı tablaya yerleştirdi.				
3	Işık ve şaryo ayarı yaptı.				
4	Makrovida ve mikrovida ile görüntüyü buldu				
5	10x ve 40x'lık objektiflerde de inceleme yaptı.				
6	100x'lük objektifle immersiyon yağı kullanarak inceleme yaptı.				
7	Farklı görüş alanlarını inceledi.				
8	Neubauer lamında eritrosit sayımı yaptı.				
9	Neubauer lamında lökosit sayımı yaptı.				
10	Mikroskobun temizliğini yaptı.				
<b>TOPLAM PUAN</b>					

Aşağıdaki soruların doğru cevaplarını işaretleyiniz.

- İmmersiyon objektifinin büyütme gücü aşağıdakilerden hangisidir?**  
A) 4                      B) 10                      C) 20                      D) 40                      E) 100
- Okülerin büyütme gücü 10, objektifin büyütme gücü 40 ise bu mikroskopta incelenen preparat kaç kat büyütülmüş olur?**  
A) 40                      B) 200                      C) 400                      D) 800                      E) 4000
- Işık kaynağı olarak ultraviyole ışınları kullanan mikroskop çeşidi aşağıdakilerden hangisidir?**  
A) ışık mikroskobu                      B) Karanlık alan mikroskobu                      C) Faz Kontrast mikroskobu  
D) Floresan mikroskobu                      E) Elektron mikroskobu
- Dilüsyon sıvısı ile 10 kat seyreltilen bir idrar örneğinden Neubauer lamı ile mikroskopta eritrosit sayımı yapılmıştır. 25 karede toplam 5 eritrosit sayıldığına göre idrar örneğinin mm<sup>3</sup>'ündeki eritrosit sayısı kaçtır?**  
A) 125                      B) 250                      C) 500                      D) 1000                      E) 2500
- Laboratuvara gelen bir idrar örneğinden direkt olarak Neubauer lamında incelemeye alınmıştır. Bir lökosit alanında toplam 10 lökosit sayıldığına göre idrar örneğindeki lökosit sayısı kaç olur?**  
A) 50                      B) 100                      C) 200                      D) 400                      E) 500

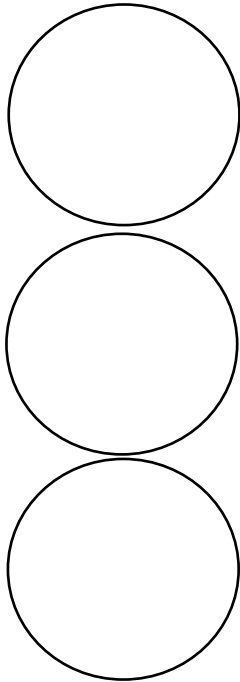
## LABORATUVARDA YAPILACAK İŞLEMLER

1. Aşağıdaki şekilde verilen mikroskopun kısımları ile eşleştirmesini yapınız



1. Ayak kısmı
2. Mikrovida
3. Tabla
4. Gövde kolu
5. Oküler
6. Objektif
7. Revolver
8. Işık kaynağı (Aydınlatma)
9. Objektif
10. Diyafram
11. Tüp
12. Makrovida

2. Mikroskopik incelemeler sonucunda aşağıdaki boşlukları doldurunuz.



Boyalı preparat incelemesi

Boyama yöntemi: .....

Bakterinin şekli: .....

Bakterinin rengi:.....

Neubauer Lamında;

Eritrosit sayısı: ..... eritrosit/mm<sup>3</sup>

Eritrositin görünümünü çiziniz.

Neubauer Lamında;

Lökosit sayısı: ..... eritrosit/mm<sup>3</sup>

lökositin görünümünü çiziniz.

Öğrencinin Adı ve Soyadı:

Numarası:

İmzası:

## KAYNAKLAR

- Bilgehan H (2009) Klinik Mikrobiyoloji Tanı. Beşinci Baskı. Barış yayınları, İzmir.
- Editörler: Günalp A, Yılmaz YA, Pınar A: Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar Eğitim Kitabı. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 2003, s-44-54.
- Wiim Jr. W, Ailen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G, Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostik Microbiology, Sixth edition, Lippincott Williams and Wilkins, s.29-38.
- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (2009). Manual of Clinical Microbiology. Klinik Mikrobiyoloji. Cilt 1. 9th ed., Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti., Ankara, 183184.
- Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar Eğitim Kitabı (2003). Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 55-61.
- Megep, (2013) Tıbbi Hizmetler Mikroskopik Sayım, Ankara.



# **TIBBİ LABORATUVAR TEKNİKLERİ**

## **LABORATUVAR UYGULAMA**

**FÖYÜ**

# **6**

### **BİYOKİMYASAL TESTLER**

**Öğr. Gör. Abdulhamit ÇALI**

### DERSİN AMACI

Çalışma amacına uygun renk değişimine bağlı biyokimyasal testlerin yapılmasının öğrenilmesi  
Gaz ve hava kabarcığı oluşumuna bağlı biyokimyasal testlerin yapılmasının öğrenilmesi  
Pıhtı oluşumuna bağlı biyokimyasal testlerin yapılmasının öğrenilmesi

### DERSİN HEDEFLERİ

<b>BİLGİ</b>	Bu dersi alacak olan öğrenciler; Renk değişimine dayalı biyokimyasal testleri sayar. Gaz ve hava kabarcığı oluşumuna dayalı biyokimyasal testleri sayar. Pıhtı oluşumuna dayalı biyokimyasal testleri sayar.
<b>BE CERİ</b>	Renk değişimine dayalı biyokimyasal testleri uygular. Gaz ve hava kabarcığı oluşumuna dayalı biyokimyasal testleri uygular. Pıhtı oluşumuna dayalı biyokimyasal testleri uygular. Renk değişimine dayalı biyokimyasal testlerin sonuçlarını değerlendirir. Gaz ve hava kabarcığı oluşumuna dayalı biyokimyasal testlerin sonuçlarını değerlendirir.
<b>TUTUM</b>	Pıhtı oluşumuna dayalı biyokimyasal testlerin sonuçlarını değerlendirir. Laboratuvara gelirken kurallara uygun olarak giyinir. Laboratuvardaki malzemeleri kullandıktan sonra temizleyerek bırakır. Laboratuvardan çıkmadan önce ellerini yıkar.

### GENEL BİLGİLER

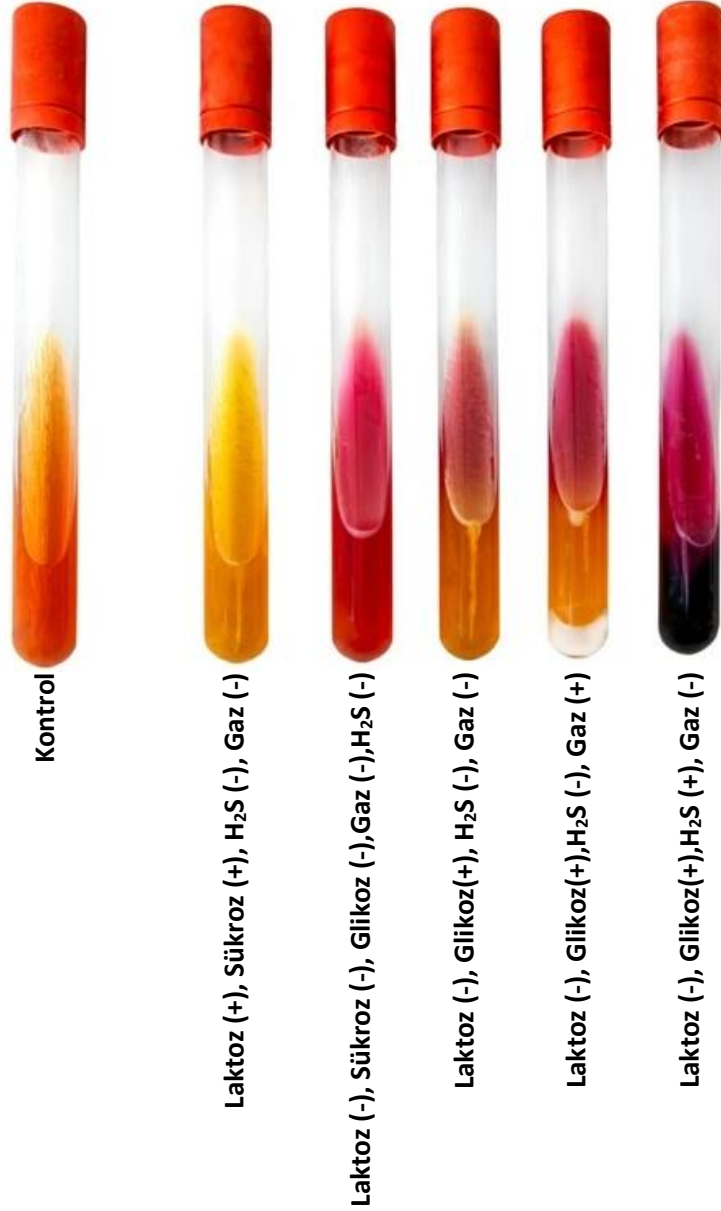
Her bakterinin kendisine özgü biyokimyasal özellikleri vardır. Her bakteri kendine özgü enzimleri aracılığıyla çeşitli metabolik faaliyetler göstermektedir. Bu metabolik faaliyetler sonucunda yapım ve yıkım ürünlerine göre bakterilerin tür tanımlaması yapılabilmektedir. Biyokimyasal testler kolay, ucuz ve kısa sürede sonuç verme gibi özelliklerinden dolayı sıklıkla kullanılmaktadır. Birçok biyokimyasal test olması rağmen bu föyde bunlardan bazı önemli olanları üzerinde durulacaktır. Bakterilerin tanımlanmasında (identifikasyon) renk değişimi, gaz oluşumu veya hava kabarcığı oluşumu ve pıhtı oluşumuna dayalı biyokimyasal testler kullanılmaktadır.

#### Renk Değişimine Dayalı Biyokimyasal Testler

Renk değişimine dayalı biyokimyasal testler genel olarak besiyerinin içerisine koyulan indikatörler aracılığıyla besiyerinin renginin değişimini göstererek bakterilerin tanımlamasını sağlamaktadır. Bu testler örnek olarak, Triple Sugar Iron Agar (TSI), IMViC grubu (İndol, metil kırmızısı, Voges-Proskauer, sitrat) ve üre testi verilebilir.

#### 1. Triple Sugar Iron Agar (TSI)

TSI testi özellikle *Salmonella* ve *Shigella* bakterilerinin tanımlanmasında kullanılan biyokimyasal bir testtir. Üç şekerli ve demirli tüpte yatık bir besiyeridir. İndikatör olarakta fenol kırmızısı içermektedir. Şeker olarak laktoz, glikoz ve sükroz içerir. Bu şekerler sayesinde bakterilerin hangi şekeri kullandığı ortaya çıkarılmaktadır. Demirliği bileşiği kullanabilen bakterilerde oluşan H<sub>2</sub>S sayesinde besiyerinde siyahlık oluşmaktadır. Eğer bakteri laktoz ve sükrozu parçalayamazsa besiyerinin pembe-kırmızı rengi korunur. Eğer laktoz ve sükroz parçalanırsa besiyerinin rengi sarı renge dönüşür. Besiyeri siyah olursa demirli bileşik kullanılmıştır. Besiyerinde gaz delikleri olursa da gaz pozitif olarak değerlendirilir. Şekil 1'de TSI agarda çeşitli renk değişimlerine göre değerlendirmesi gösterilmiştir.



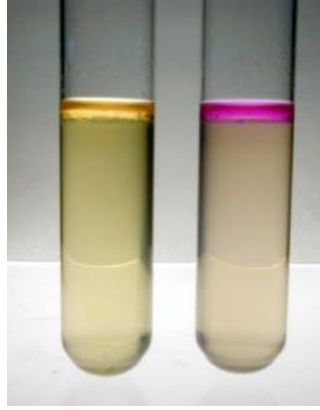
Şekil 1. TSI testinin değerlendirilmesi

## 2. İndol Testi

Bu test ile bakterilerin besiyerinde bulunan triptofanı kullanıp indol denilen molekülü oluşturup oluşturmadıklarını incelemek için kullanılmaktadır. Test sonucunda besiyerine damlatılan kovaks ayırıcının sıvı besiyerinin üzerinde kırmızı/pembe halka oluşturması pozitif olarak değerlendirilmektedir. Halka renksiz olursa negatif sonuçlanır (Şekil 2).

İndol pozitif olan bazı önemli bakteriler; *E.coli*, *Enterobacter*, *P. vulgaris*

İndol negatif olan bazı önemli bakteriler; *Salmonella*, *Klebsiella*, *P. Mirabilis*



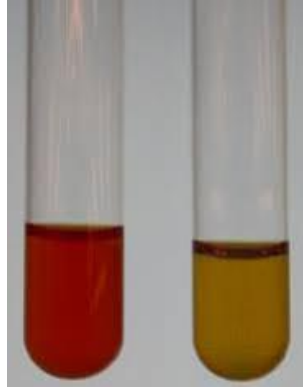
Şekil 2. IMViC test grubundaki İndol testinin değerlendirilmesi

### 3. Metil Kırmızısı

Bu testte incelenecek bakteri türünün glikozu parçalayarak organik asit oluşturup oluşturmadığını belirlemede kullanılmaktadır. Organik asit oluşması ortam pH değerinin düşmesine neden olmaktadır. Ortam pH'ının düştüğünü belirlemek için besiyerine metil kırmızısı indikatörü damlatılır. Eğer besiyerinin rengi kırmızıya dönüşürse test pozitif olarak değerlendirilir. Örneğin *E. coli* metil kırmızısı testinde pozitif, *Klebsiella pneumoniae* negatif sonuç verir (Şekil 3).

### 4. Voges-Proskauer Testi

Bu test metil kırmızısı testinin zıttı bir testtir. Yani metil kırmızısı testi pozitif olan bir bakterinin Voges-Proskauer testi negatif çıkmaktadır. Bu test ile incelenecek bakteri türü glikozu parçalayarak acetoin gibi nötral ürünler oluşturup oluşturmadığını belirlemede kullanılmaktadır. Bu testte besiyeri rengi pembe olursa pozitif sarı olarak kalırsa negatif olarak değerlendirilir. Örneğin *E. coli* negatif, *Klebsiella pneumoniae* pozitif sonuç verir (Şekil 3).



Şekil 3. Voges-Proskauer ve Metil kırmızısı testlerinin değerlendirilmesi

### 5. Sitrata Testi

Karbon kaynağı olarak sitratı kullanabilen bakterileri ayırt etmek için kullanılan bir besiyeridir. Bu besiyerinde indikatör olarak brom timol bulunmaktadır. Eğer bakteride sitritaz enzimi bulunursa bu enzim aracılığıyla sitrat parçalanarak oluşan ürünler brom timol ile reaksiyona girip besiyerinin rengini yeşilden maviye dönüştürür. Böylece besiyerinin rengi mavi olursa pozitif olarak değerlendirilir (Şekil 4). Örneğin *E. coli* sitrat negatiftir, *Klebsiella aerogenes* ise sitrat pozitifdir.

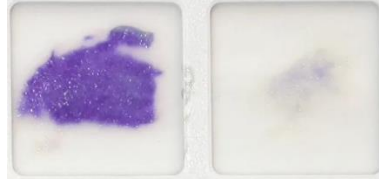




Şekil 4. Sitrat testinin değerlendirilmesi

### 6. Oksidaz Testi

Oksidaz enzimini aerobik bakteriler tarafından üretilmektedir. Bu test *Pseudomonas* türlerini *Enterobacteriaceae* türlerinden ayırt etmek için kullanılmaktadır. Test prosedüründen direkt besiyerindeki koloniden yapılır. Test solüsyonu 100 mL saf suda 1 g tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorür içerir. Bu solüsyondan filtre kağıdına damlatılır. Test edilecek koloni örneği platin öze ile alınır ve filtre kağıdına sürülür. 10 saniye sonra mavi-mor renk oluşursa pozitif olarak değerlendirilir (Şekil 5).



Şekil 5. Oksidaz testinin değerlendirilmesi

### 7. Üreaz Testi

Bazı mikroorganizmalar üreyi parçalayan üreaz enzimine sahiptirler. Bu bakterileri diğer bakterilerden ayırt etmek için kullanılan teste üreaz testi denilmektedir. Üre parçalandığı zaman karbondioksit ve amonyak oluşmaktadır. Besiyerinde amonyak oluşumu ortamın pH'ını yükseltmektedir. Besiyeri içerisinde bulunan nessler ayırıcı nedeniyle pH alkali olunca besiyerinin rengi pembe renge dönüşür. Böylece pozitif olarak değerlendirilir (Şekil 6). Örneğin *Proteus vulgaris* üreaz pozitif, *E.coli* üreaz negatiftir.



Şekil 6. Üreaz Testinin değerlendirilmesi

### Gaz veya Hava Kabarcığı Oluşumuna Dayalı Biyokimyasal Testler

Bazı bakteriler metabolik faaliyetleri sonucunda enzimlerini kullanarak çeşitli kimyasal maddeleri ayrıştırırlar. Bu ayrışma sonucunda gaz veya hava kabarcığı oluşabilmektedir. Oluşan bu gaz ve hava kabarcıklarını görünür hale getirerek bakteri türlerinin tanımlamasının yapıldığı birkaç biyokimyasal test mevcuttur.

#### 1. Katalaz Testi

Aerobik mikroorganizmalar oksijenden üretilen serbest radikalleri parçalayan katalaz enzimine sahiptirler. Genel olarak stafilokokları streptokoklardan ayırt etmek için kullanılan yaygın bir testtir. Test tüpte ve lamda olarak iki şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Testin genel prensibi bakteri kolonisi ile hidrojen peroksit karıştırıldığında hava kabarcıklarının oluşumunun değerlendirilmesini kapsamaktadır. Bu karıştırma işlemi lamda veya tüpte yapılabilmektedir (Şekil 7).



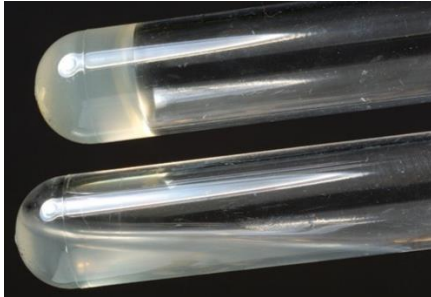
Şekil 7. Katalaz testinin değerlendirilmesi

### Pıhtı Oluşmaya Dayalı Biyokimyasal Testler

Bazı bakteriler ise sahip oldukları enzimler aracılığıyla ortamdaki maddeleri koagüle ederek pıhtı oluşumuna neden olmaktadır. Bu testlere pıhtı oluşumuna dayalı yöntemler denir.

#### 1. Koagülaz Testi

Koagülaz enzimi, fibrinojeni fibrine dönüştürerek plazmayı pıhtılaştırır bir enzimdir. Bu testte plazma içine alınan bakteriler belirli bir süre inkübe edildikten sonra plazmayı katı jel haline getirirler. Böylece pozitif olarak değerlendirilirler (Şekil 8). Özellikle *Staphylococcus aureus*'u diğer Stafilokoklardan ayırt etmek için kullanılmaktadır.



Şekil 8. Koagülaz testinin değerlendirilmesi

## UYGULAMA I

Renk Değişimine Dayalı Biyokimyasal Testler  
İndol Testi

Kullanılacak Malzemeler	İnkübatör, öze, damlalık, tüp standı, deney tüpü, bunzen bek, Kovac's ayıracı, Triptofanlı sıvı besiyeri, saf kültür
-------------------------	--

## İşlem Basamakları

1. Triptofanlı sıvı besiyeri deney tüpü içerisine alınır
2. İncelenek bakteri kültüründen triptofanlı besiyerine ekim yapılır.
  - Öze aracılığıyla saf koloniden alınarak sıvı besiyerine ekim yöntemi uygulanarak ekim işlemi yapılır.
3. Tüp etüvde 37°C'de 2-7 gün inkübasyona bırakılır.
4. İnkübasyon bittikten sonra tüp içerisine 0,5 mL Kovac's ayıracından damlatılır.
  - Damlatma işlemi yavaş olmalıdır.
5. 1-2 dakika içerisinde sonuçlar değerlendirilir
  - Pembe renkli halka oluşursa pozitif, şeffaf renksiz halka oluşursa negatif olarak değerlendirilir (Şekil 2).

Renk Değişimine Dayalı Biyokimyasal Testler  
Metil Kırmızısı ve Voges-Proskauer Testi

Kullanılacak Malzemeler	İnkübatör, öze, damlalık, tüp standı, deney tüpü, bunzen bek, saf kültür, Glikoz-Fosfat broth besiyeri, metil kırmızısı indikatörü, %40'lık KOH çözeltisi, %5'lik alfa naftol çözeltisi
-------------------------	---

## İşlem Basamakları

1. Glikoz-fosfat broth besiyeri deney tüpü içerisine alınır
2. İncelenek bakteri kültüründen Glikoz-fosfat broth besiyerine ekim yapılır.
  - Öze aracılığıyla saf koloniden alınarak sıvı besiyerine ekim yöntemi uygulanarak ekim işlemi yapılır.
3. Tüp etüvde 37°C'de 2-7 gün inkübasyona bırakılır.
4. İnkübasyon bittikten sonra tüp içerisine dört beş damla metil kırmızısı ayıracından damlatılır.
5. Damlatma işleminden sonra değerlendirilir (Şekil 3).
  - Eğer besiyeri kırmızı renkli olursa pozitif olarak değerlendirilir. Bu durumda Voges-Prosker testi negatif olarak çıkacaktır.
  - Eğer Besiyerinin rengi sarı olursa metil kırmızısı testi negatif olarak değerlendirilir. Bu durumda Voges-Proskauer testi pozitif çıkacaktır.
6. Metil kırmızısı negatif çına tüpün içerisine 1 mL %40'lık KOH çözeltisi koyulur ardından %5'lik alfa naftol damlatılır.
7. Renk değişimine göre değerlendirilir. Bu durumda renk değişimi kırmızı olursa Voges-Proskauer testi pozitif olarak değerlendirilir (Şekil 3).

### Renk Değişimine Dayalı Biyokimyasal Testler Sitrat Testi

**Kullanılacak Malzemeler** İnkübatör, öze, damlalık, tüp standı, deney tüpü, bunzen bek, saf kültür, Simmon's sitrat agar besiyeri

#### İşlem Basamakları

1. Simmon's sitrat agar besiyerine iğne öze yardımıyla alınan koloniden besiyerinin yatık kısmına yüzey ekimi yapılır.
  - İğne öze kullanımının nedeni organik madde bulaşının en aza indirilmesi sağlanır.
2. Tüp etüvde 37°C'de 2-7 gün inkübasyona bırakılır.
3. İnkübasyondan sonra renk değişimi izlenir (Şekil 4)
  - Besiyerinin rengi maviye dönüşürse test pozitif olarak değerlendirilir
  - Besiyerinin rengi değişmezse yani yeşil renkte kalması testin negatif değerlendirilmesine neden olur.

### Renk Değişimine Dayalı Biyokimyasal Testler Üreaz Testi

**Kullanılacak Malzemeler** İnkübatör, öze, damlalık, tüp standı, deney tüpü, bunzen bek, saf kültür, Christensen üre agar besiyeri,

#### İşlem Basamakları

1. Christensen üre agar besiyerine ekim yapılır.
2. Tüp etüvde 37°C'de 2-7 gün inkübasyona bırakılır.
3. İnkübasyondan sonra değerlendirilir (Şekil 6).
  - Eğer besiyeri pembe renkli olursa pozitif olarak değerlendirilir.
  - Eğer Besiyerinin rengi sarı olursa negatif olarak değerlendirilir.

### Renk Değişimine Dayalı Biyokimyasal Testler TSI Agar Testi

**Kullanılacak Malzemeler** İnkübatör, öze, damlalık, tüp standı, deney tüpü, bunzen bek, saf kültür, TSI agar besiyeri,

#### İşlem Basamakları

1. TSI agar besiyerine ekim yapılır.
2. Tüp etüvde 37°C'de 2-7 gün inkübasyona bırakılır.
3. İnkübasyondan sonra değerlendirilir (Şekil 1).
  - Bazı bakterilerin değerlendirilmesi aşağıdaki tabloya göre yapılır.

Bakteriler	Sonuçlar			
	Dip	Yüzey	Gaz	H <sub>2</sub> S
<i>E. coli</i>	Asit (sarı)	Asit (sarı)	+	-
<i>Salmonella</i>	Asit (sarı)	Alkali (kırmızı)	+	+
<i>Pseudomonas</i>	Alkali (kırmızı)	Alkali (kırmızı)	-	-
<i>Shigella</i>	Asit (sarı)	Alkali (kırmızı)	-	-

## UYGULAMA II

Gaz ve Hava Kabarcığı Oluşumuna Dayalı Biyokimyasal Testler  
Katalaz Testi

Kullanılacak Malzemeler	İnkübatör, öze, damlalık, bunzen bek, saf kültür, %30'luk H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> çözeltisi, lam, serum fizyolojik
-------------------------	--

## İşlem Basamakları

1. Temiz bir lam üzerine bir damla serum fizyolojik damlatılır.
2. Saf kültürden öze yardımıyla alınna koloni lam üzerinde ezilerek serum fizyolojik ile karıştırılır.
3. Lam üzerine %30'luk hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) damlatılır
4. Karıştırılıp hava kabarcığı oluşu oluşmaması değerlendirilir (Şekil 7).
  - Hava kabarcığı oluşumu pozitif olarak değerlendirilir.

## UYGULAMA III

Pıhtı Oluşumuna Dayalı Biyokimyasal Testler  
Koagülaz Testi

Kullanılacak Malzemeler	İnkübatör, öze, damlalık, tüp standı, deney tüpü, bunzen bek, saf kültür, kan plazması
-------------------------	--

## İşlem Basamakları

1. İki tüpe 0,5 mL kan plazması ilave edilir.
2. Birinci tüpe Stapylococcus aureus şüphesi olan koloniden aktarım yapılır. İkinci tüpe ise koagülaz negatif bakteri türünden aktarılır.
3. Tüpleri ayrı özelerle karıştırılır. Tüplerin ağzı parafilm veya pamukla kapatılır
4. 37oC'de 24 saat inkübe edilir.
5. İnkübasyon sonucunda değerlendirme yapılır (Şekil 8).
  - Pıhtı oluşumu pozitif olarak değerlendirilir.
  - Pıhtı oluşumu olmazsa inkübasyona devam edilip 6. ve 24. Saatlerde tekrar kontrol edilir.

## ÖLÇME ve DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki form, uygulama faaliyetinizin değerlendirilmesi amacıyla hazırlanmıştır. Performansınız aşağıdaki kriterlere göre değerlendirilecektir.

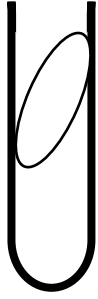
Değerlendirme Kriterleri		Çok iyi (7-8)	İyi (5-6)	Orta (3-4)	Geliştir meli (1- 2)
1	Renk değişime dayalı testler için uygun besiyerlerini seçti				
2	Tekniğine uygun ekim yaptı.				
3	İndikatör ekleme işlemlerini yaptı.				
4	Renk değişime dayalı testlerin değerlendirmesini yaptı				
5	Gaz oluşumuna dayalı testler için uygun besiyerlerini seçti				
6	Tekniğine uygun ekim yaptı.				
7	Gaz oluşumuna dayalı testlerin değerlendirmesini yaptı				
8	Gaz oluşumuna dayalı testler için uygun besiyerlerini seçti				
9	Tekniğine uygun ekim yaptı.				
10	Gaz oluşumuna dayalı testlerin değerlendirmesini yaptı				
<b>TOPLAM PUAN</b>					

Aşağıdaki soruların doğru cevaplarını işaretleyiniz.

- Aşağıdakilerden hangisi IMViC testlerinden değildir?**  
A) İndol B) Metil kırmızısı C) Voges-Proskauer D) Sitrat E) Safrada lizis
- Stafilokokları streptokoklardan ayırt etmek için aşağıdaki testlerden hangisi kullanılır?**  
A) Katalaz B) Koagülaz C) Üreaz D) İndol E) Sitrat
- Staphylococcus aureus*'u diğer stafilokoklardan ayırt etmek için aşağıdaki testlerden hangisi kullanılır?**  
A) Katalaz B) Koagülaz C) Üreaz D) İndol E) Sitrat
- Aşağıdakilerden hangisi, gaz veya hava kabarcığı oluşumuna dayalı biyokimyasal testlerdendir?**  
A) Katalaz B) Koagülaz C) Üreaz D) İndol E) Sitrat
- Aşağıdakilerden hangisi, pıhtı oluşumuna dayalı biyokimyasal testlerdendir?**  
A) Katalaz B) Koagülaz C) Üreaz D) İndol E) Sitrat

## LABORATUVARDA YAPILACAK İŞLEMLER

1. Laboratuvar getirilen TSI agar besiyerlerinin değerlendirilmesini yapınız. Tüpün dik, yatık kısım renklerini , gaz ve H<sub>2</sub>S durumlarını değerlendiriniz.



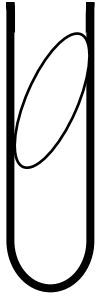
Yatık kısım:.....  
Dik kısım:.....  
Gaz:.....  
H<sub>2</sub>S:.....

Hangi bakteri olabilir?  
.....



Yatık kısım:.....  
Dik kısım:.....  
Gaz:.....  
H<sub>2</sub>S:.....

Hangi bakteri olabilir?  
.....



Yatık kısım:.....  
Dik kısım:.....  
Gaz:.....  
H<sub>2</sub>S:.....

Hangi bakteri olabilir?  
.....



Yatık kısım:.....  
Dik kısım:.....  
Gaz:.....  
H<sub>2</sub>S:.....

Hangi bakteri olabilir?  
.....

2. Laboratuvara getirilen biyokimyasal testlerin isimlerini ve sonuçlarını yazınız.
  - a. .... → Testin sonucu:.....
  - b. .... → Testin sonucu:.....
  - c. .... → Testin sonucu:.....

Öğrencinin Adı ve Soyadı:

Numarası:

İmzası:

## KAYNAKLAR

Bilgehan H (2009) Klinik Mikrobiyoloji Tanı. Beşinci Baskı. Barış yayınları, İzmir.

Editörler: Günalp A, Yılmaz YA, Pınar A: Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar Eğitim Kitabı. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 2003, s-44-54.

Wiim Jr. W, Ailen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G, Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostik Microbiology, Sixth edition, Lippincott Williams and Wilkins, s.29-38.

Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (2009). Manual of Clinical Microbiology. Klinik Mikrobiyoloji. Cilt 1. 9th ed., Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti., Ankara, 183184.

Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar Eğitim Kitabı (2003). Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 55-61.

Megep (2013). Laboratuvar Hizmetleri, Biyokimyasal Testler. Ankara



# **TIBBİ LABORATUVAR TEKNİKLERİ**

## **LABORATUVAR UYGULAMA**

**FÖYÜ**

# **7**

## **ANTİMİKROBİYAL TESTLER**

**Öğr. Gör. Abdulhamit ÇALI**



### DERSİN AMACI

Çalışma amacına uygun antimikrobiyal testlerin yapılmasının öğrenilmesi  
Disk difüzyon ve tüp dilüsyon testlerin yapılmasının öğrenilmesi

### DERSİN HEDEFLERİ

<b>BİLGİ</b>	Bu dersi alacak olan öğrenciler; Antimikrobiyal testlerini sayar. Antimikrobiyal testlerini gruplandırır.
<b>BECERİ</b>	Tekniğine uygun bir şekilde disk difüzyon testlerini uygular. Tekniğine uygun bir şekilde tüp dilüsyon testlerini uygular Disk difüzyon testlerin sonuçlarını değerlendirir. Tüp dilüsyon testlerin sonuçlarını değerlendirir.
<b>TUTUM</b>	Laboratuvara gelirken kurallara uygun olarak giyinir. Laboratuvardaki malzemeleri kullandıktan sonra temizleyerek bırakır. Laboratuvardan çıkmadan önce ellerini yıkar.

### GENEL BİLGİLER

Mikroorganizmaların üremesini engelleyen veya direkt olarak öldürücü etki gösteren maddelere **antimikrobiyal maddeler** denir. Bazı bakteri ve mantar türleri tarafından doğal olarak sentezlenen ya da sentetik olarak elde edilen ve mikroorganizmaların üremesini engelleyen veya öldüren maddelere **antibiyotik** ismi verilir. Eğer bir antibiyotik bakterinin üremesini engelliyor ise bu antibiyotik **bakteriyostatik** etkilidir. Direk olarak öldürücü etki gösteriyor ise bu antibiyotik **bakterisid** etkilidir.

Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde antibiyotikler kullanılmaktadır. Ancak bu antibiyotikler canlılarda olumsuz yan etkilere sebep olmaktadır. Bu yüzden antibiyotiklerin en düşük miktarda en etkili düzeyde kullanılması önem taşımaktadır. Bu durum göz önüne alındığında laboratuvarında antimikrobiyal testlerin önemli bir yeri vardır.

Antibiyotiklerin etkinliğini belirlemek için **minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK)** belirlenmesi gerekmektedir. Antibiyotiklerin etkinliğini değerlendirildiği testlere **antimikrobiyal testler** veya **antibiyogram** ismi verilmektedir. Antimikrobiyal testler;

- Tüp dilüsyon yöntemi
- Mikrodilüsyon yöntemi
- Disk difüzyon yöntemi
- E-test yöntemi
- Otomatize yöntemler
- Moleküler yöntemler olmak üzere sınıflandırılmaktadır.

#### 1. Tüp dilüsyon yöntemi

Bu yöntemde mikroorganizmanın antibiyotiğe olan duyarlılığının belirlenmesi için kademeli olarak seyreltilen antibiyotik çözeltisi ile bakteri kültürünün süspansiyonu edilmiş ve ardından inkübasyon işleminden sonra MİK değerinin belirlenmesi esasına göre yapılmaktadır. Eğer bu işlem tüpte yapılırsa tüp dilüsyon, mikrotitre plaklarda yapılırsa mikrodilüsyon yöntemi adını alır.

#### Testin Yapılışı

##### a. Antibiyotik çözeltisi hazırlama:

Üreticiden sıvı stok çözeltisi hazır olarak alınabildiği gibi toz halinde alınıp bu tozdan antibiyotik çözeltisi elde edilebilir. Stok çözeltisi hazırlanırken test edilecek konsantrasyonun 10 katı olacak şekilde bir stok solüsyonu hazırlanmalıdır. Mesela 256 µg/mL test edilecekse 2560 µg/mL stok solüsyonu hazırlanmalıdır. Hazırlanacak stok solüsyonu aşağıdaki formüle göre hesaplanmalıdır.

$$\text{Ağırlık (mg)} = \frac{\text{Hacim (mL)} \times \text{Konsantrasyon} (\mu\text{g/mL})}{\text{Potens} (\mu\text{g/mg})}$$

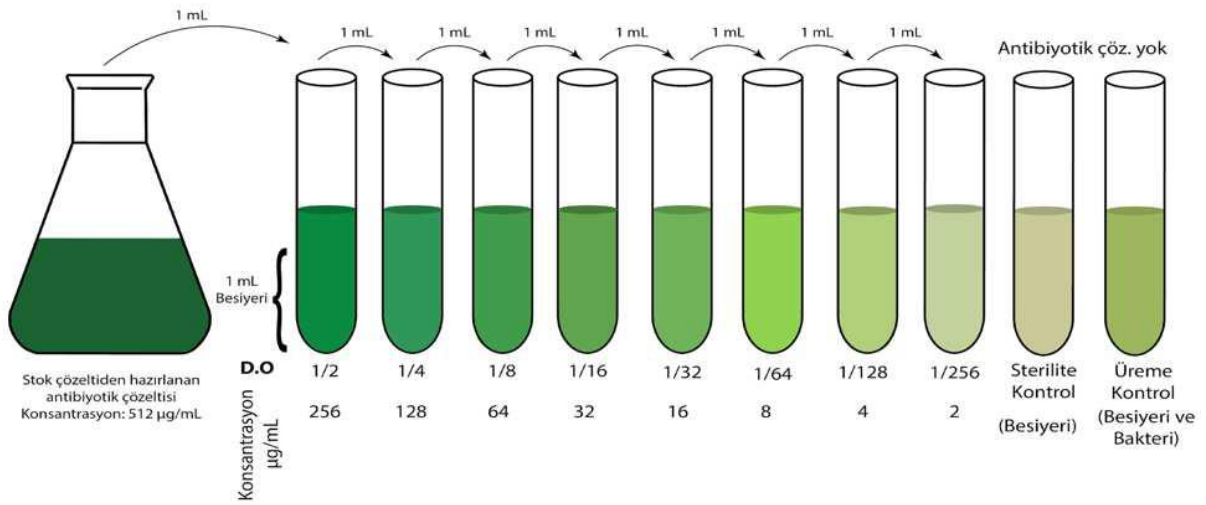
**Ağırlık:** Tartılması gereken toz miktarı.  
**Hacim:** Çözücü miktarı.  
**Konsantrasyon:** Çözelti konsantrasyonu.  
**Potens:** İlacın gücü (etkili olduğu konsantrasyon)

## b. Tüp dilüsyon için besiyeri hazırlanması:

Bu test için Mueller Hinton broth (MHB) besiyeri hazırlanması gerekmektedir.

## c. Dilüsyon hazırlanması:

Dilüsyon hazırlığı şekil 1’de gösterildiği gibi iki katlı dilüsyon yapılması gerekmektedir.



Şekil 1. Seri dilüsyon hazırlanması

## d. İnokülümün hazırlanması:

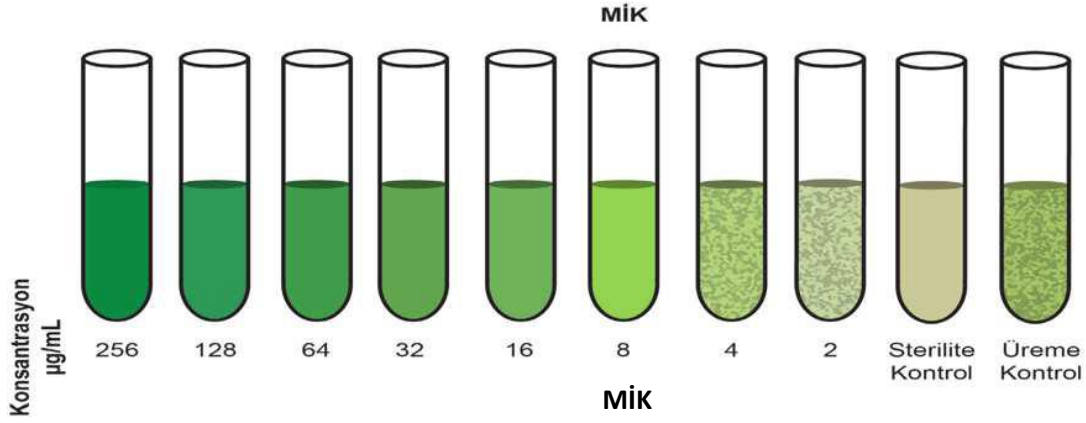
İncelenecek olan bakteri kolonilerinden McFarland cihazı kullanılarak 0,5 McFarland bulanıklığa sahip inokülüm hazırlanır.

## e. Bakteri inokülasyonu ve inkübasyonu:

Hazırlanan bakteri solüsyonu 1/100 oranında sulandırıldıktan sonra tüplere süspansiyondan aktarılır. Ayrıca içerisinde sadece besiyeri olan bir tüp (sterilite kontrolü) ve içerisinde sadece besiyeri ve bakteri olan bir tüp (Üreme kontrolü) te test düzeneğine koyulur. Çünkü doğru bakterinin incelendiğini ve işlemlerin sterilitesi kontrol edilmiş olur. Ardından 37°C’de etüvde inkübasyona bırakılır.

## f. Değerlendirme:

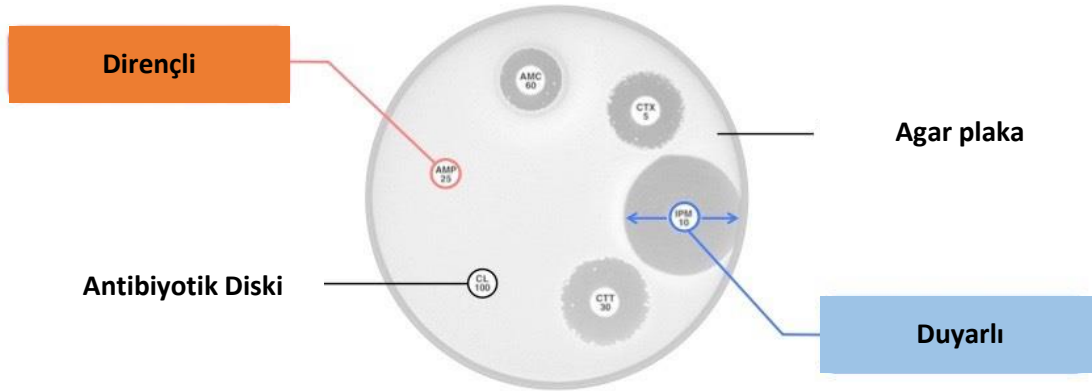
İnkübasyondan sonra tüplerdeki üreme durumu kontrol edilir. Besiyerinde bulanıklık oluşumu üremenin olduğunu göstermektedir. Üreme olmayan en düşük antimikrobiyal madde içeren tüp seçilir ve o tüp MİK değeri (minimal inhibitör konsantrasyonu) olarak kabul edilir (Şekil 2).



Şekil 2. MİK değerinin belirlenmesi

## 2. Disk Difüzyon Testi

Katı plak besiyerine bakteri ekimi yapıldıktan sonra besiyeri üzerine antibiyotik diskleri yerleştirilerek yapılan bir test yöntemidir. Bu yöntem Kirby-Bauer yöntemi ismiyle verilmektedir. Testin temel mantığı antibiyotik besiyeri içerisinde difüze olması ve bakterilerin üremesini durdurması veya öldürmesi üzerinedir. İnkübasyondan sonra disk etrafında bakteri üremesinin gözlenmediği bir **inhibisyon zonu** oluşmaktadır. Bu zon çapı ölçülerek bakterinin antibiyotiğe duyarlılığı belirlenmektedir (Şekil 3).



Şekil 3. Disk difüzyon yöntemine göre bakterilerin duyarlılık durumları

### Testin Yapılışı

#### a. Besiyerinin hazırlanması:

Bu test yönteminde genellikle Mueller Hinton agar (MHA) besiyeri kullanılmaktadır.

#### b. İnokülümün hazırlanması:

İncelenecek olan bakteri kolonilerinden McFarland cihazı kullanılarak 0,5 McFarland bulanıklığa sahip inokülüm hazırlanır.

#### c. Ekim işleminin yapılması:

Antibiyoqram testinde ekim işlemi plağın tüm yüzeyine olacak şekilde yapılmalıdır. Eküvyon çubuk yardımıyla alınan inokülüm örneği besiyerinin tüm yüzeyine eşit bir şekilde sık zikzaklar çizerek sürülür.

#### d. Antibiyotik disklerinin yerleştirilmesi:

Antibiyotik diskleri whatman kağıdından oluşan 6mm çaplı disk şeklinde malzemelerdir. Bu diskler ekim yapılmış agar plağın yüzeyine aralarında 25-30 mm mesafe olacak şekilde yerleştirilmesi gerekmektedir. Zonların iç içe girmesi bu şekilde engellenmiş olur. Disk yerleştirilmesi bek alevinin yanında pens veya disk dağıtı ile yapılabilir.

#### e. İnkübasyon işlemi:

Diskler yerleştikten sonra 37°C’de bir gece inkübasyon işlemi yapılır.

#### f. Değerlendirilmesi:

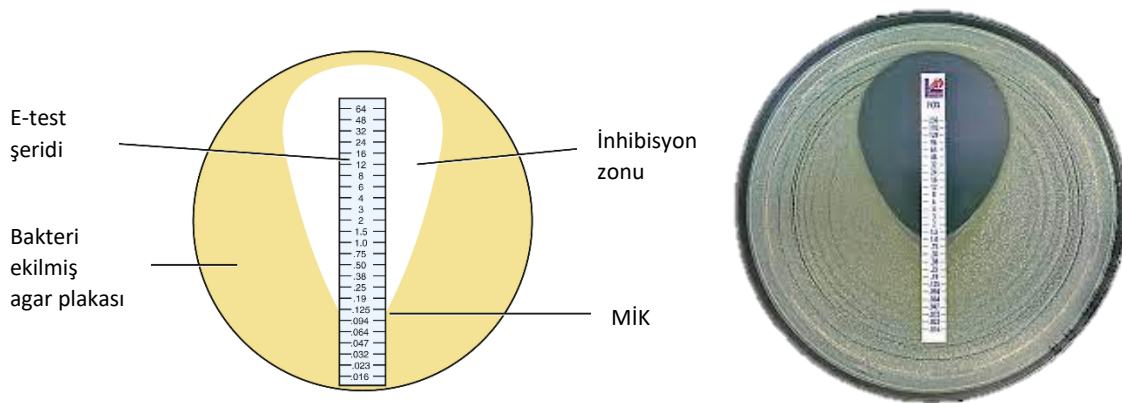
İnkübasyon işlemlerinde sonra zon ölçümü cetvel ya da kumpas aracılığıyla ölçüm yapılır. Belirli standartlara göre antibiyotik direnç ve duyarlılık değerlendirilmesi yapılır. Genellikle EUCAST ve CLSI standartları kullanılmaktadır. Örnek bazı antibiyotiklerin değerlendirilmesi aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. EUCAST’a göre disk difüzyon zon çapları, S: duyarlı, I: orta duyarlı, R: dirençli

Antibiyotikler	S ≥	I	R <
Piperasilin	20	20-17	17
Aztreonam	26	26-21	21
Ofloksasin	24	24-22	22
Sefotaksim	20	20-17	17
Levofloksasin	23	23-19	19

### 3. E-test Yöntemi

Bu test yöntemi hem dilüsyon hemde difüzyon yönteminin bir arada uygulaması şeklindedir. Antibiyotiğin çeşitli konsantrasyonlarının emdirilmiş olduğu E-test şeriti katı besiyeri üzerine yerleştirilir. Katı besiyeri üzerinde MİK değerinin hesaplanmasını sağlar. Elips şeklinde inhibüsyon alanının şerit üzerindeki ölçekle kesiştiği nokta MİK değerini verir (Şekil 4).



Şekil 4. E-test yöntemi

## UYGULAMA I

## Tüp Dilüsyon Yöntemi ile Antibiyotik Testi

Kullanılacak Malzemeler	Serum fizyolojik, Mueller-Hinton broth, antibiyotik çözeltisi, spatül, erlen, balon, bunzen bek, deney tüpü, baget, eküvyon, pipet, öze, McFarland cihazı, inkübatör, otoklav, hassas terazi.
-------------------------	---

## İşlem Basamakları

- MHB içeren tüplerde seri dilüsyon olacak şekilde antibiyotik çözeltisi hazırlanır.
  - Seri dilüsyon Şekil 112de gösterildiği gibi hazırlanmalıdır.
- Test edilecek bakteri kolonisi seçilir ve serum fizyolojikte süspansiyon haline getirilir.
  - Bu işlemler sırasında aseptik koşullara uyulmalıdır.
  - Homojen bir bulanıklık elde edilmelidir.
- McFarland cihazı ile süspansiyonun bulanıklığı 0,5 McFarlanda ayarlanmalıdır.
- Hazırlanan süspaniyondan eşit hacimde tüp tüplere dağıtım yapılır.
  - Sadece sterilite kontrolü tüpüne bakteri süspansiyonu koyulmaz
  - Her tüpe 0,1 mL, 1 mL veya antibiyotik çözeltisine eşit miktarda bakteri süspansiyonu koyulabilir.
- Tüpler etüvde  $36\pm^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyondan sonra üreme olup olmaması kontrol edilir.
- Üremenin olmadığı en düşük antimikrobiyal madde içeren tüpün konsantrasyonu MİK değeri olarak değerlendirilir.

## UYGULAMA II

## Disk Difüzyon Yöntemi

Kullanılacak Malzemeler	Serum fizyolojik, Mueller-Hinton agar, antibiyotik diskleri, pens, cetvel, bunzen bek, deney tüpü, eküvyon, pipet, öze, McFarland cihazı, inkübatör, otoklav, hassas terazi.
-------------------------	--

## İşlem Basamakları

- Test edilecek bakteri kolonisi serum fizyolojikte 0,5 McFarland olacak şekilde ayarlaması yapılır.
- MHA (Mueller-Hinton agar) besiyerine eküvyon aracılığıyla tüm saha ekimi yapılır.
  - Sık zikzaklar çizilerek tüm sahaaya yayılması sağlanır.
- Farklı antibiyotik içeren diskler pens yardımıyla besiyeri üzerine yerleştirilir.
  - Her disk arası 25-30 mm olacak şekilde yerleştirilmelidir.
  - Diskler plağın çeperinden en az 15 mm uzaklıkta olması gerekmektedir.
- Plaklar etüvde  $36\pm^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona bırakılır
- İnkübasyon işlemi bittikten sonra zon çapları ölçülür.
  - Antibiyotik direnç tablolarına göre bakterinin direnç durumları belirlenir.

## ÖLÇME ve DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki form, uygulama faaliyetinizin değerlendirilmesi amacıyla hazırlanmıştır. Performansınız aşağıdaki kriterlere göre değerlendirilecektir.

Değerlendirme Kriterleri		Çok iyi (8-10)	İyi (5-7)	Orta (3-4)	Geliştir meli (1- 2)
1	Tüp dilüsyon yöntemi için; besiyerini tüplere eşit şekilde dağıttı.				
2	Tüp dilüsyon yöntemi için; antibiyotik çözeltisinden seri dilüsyon yaptı.				
3	Tüp dilüsyon yöntemi için; sıvı kültür ekleme işlemlerini yaptı.				
4	Tüp dilüsyon yöntemi için; MİK değerini belirledi.				
5	Difüzyon yöntemi için; inokülüm süspansiyonu hazırladı.				
6	Difüzyon yöntemi için; katı besiyerine ekim yaptı.				
7	Difüzyon yöntemi için; diskleri doğru yerleştirdi.				
8	Difüzyon yöntemi için; zon ölçümünü yapıp değerlendirdi.				
<b>TOPLAM PUAN</b>					

Aşağıdaki soruların doğru cevaplarını işaretleyiniz.

1. Aşağıdakilerden hangisi test edilecek mikroorganizmanın üremesini engeleyen en düşük antibiyotik konsantrasyonunu ifade eder?

- A) MİK B) MBC C) MBİK D) MBK E) MLK

2. I. Disk difüzyon testi  
II. Dilüsyon testi  
III. Moleküler testler

**Yukarıdakilerden hangisi/hangileri antibiyotik testlerindendir?**

- A) Yalnız I B) Yalnız III C) Yalnız I ve II D) Yalnız II ve III E) I, II ve III

3. I. Diskler agar yüzeyine aralarında 25-30 mm mesafe olacak şekilde yerleştirilmelidir.  
II. Diskler yerleştirildikten sonra yerinden oynatılmamalıdır.  
III. Diskler aseptik tekniğe uygun yerleştirilmelidir.

**Yukarıda disklerin yerleştirilmesi ile ilgili verilen bilgilerden hangisi/ hangileri doğrudur?**

- A) Yalnız I B) Yalnız III C) Yalnız I ve II D) Yalnız II ve III E) I, II ve III

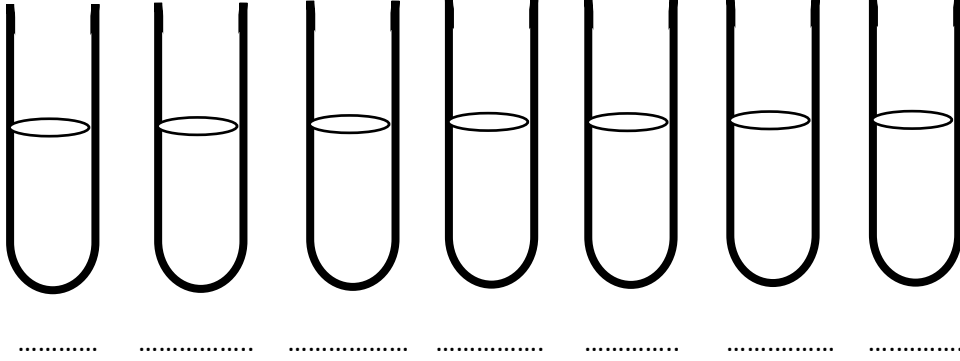
4. Tüp dilüsyon yönteminde MİK değeri nasıl belirlenir?

- A) Antibiyotik çözelti konsantrasyonu en yüksek olan tüp ile  
B) Üremenin en fazla, antibiyotik çözelti konsantrasyonunun en az olduğu tüp ile  
C) Üremenin olmadığı en düşük antibiyotik çözelti konsantrasyonunun olduğu tüp ile  
D) Bulanıklığın olduğu ancak antibiyotik çözeltinin olmadığı tüp ile

E) En az üremenin olduğu en düşük antibiyotik çözelti konsantrasyonunun olduğu tüp ile

### LABORATUVARDA YAPILACAK İŞLEMLER

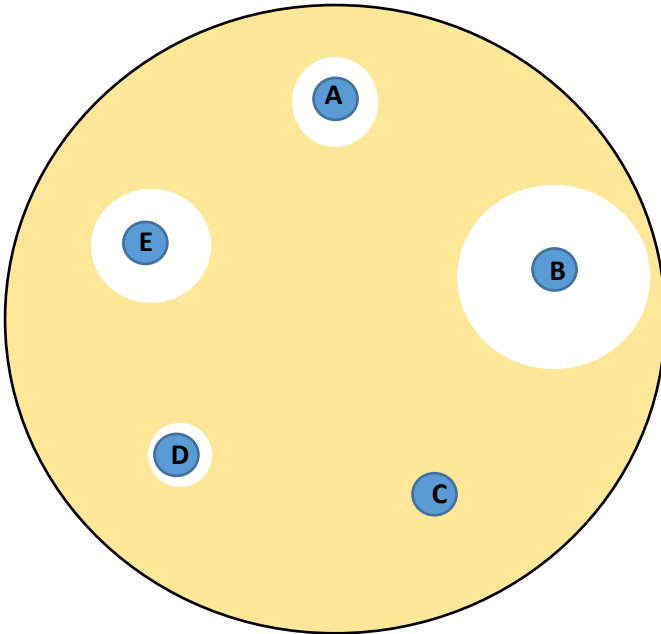
1. Laboratuvarda yaptığınız dilüsyon yönteminde her bir tüpün antibiyotik konsantrasyonunu altına yazınız.



2. Laboratuvarda çalışılan dilüsyon yöntemi ile bulunan MİK değeri kaçtır?

.....

3. Aşağıdaki disk difüzyon testine göre bakterinin aşağıdaki antibiyotiklere duyarlılık durumları nelerdir? (Sınır değerleri için Tablo 1'e bakınız).



- A antibiyotiği piperasilindir. Ölçülen zon çapı:**18 mm**  
 B antibiyotiği sefotaksimdir. Ölçülen zon çapı:**25 mm**  
 C antibiyotiği ofloksasindir. Ölçülen zon çapı:**0 mm**  
 D antibiyotiği levofloksasindir. Ölçülen zon çapı:**8 mm**  
 E antibiyotiği aztreonamdır. Ölçülen zon çapı:**21 mm**

**Buna göre;**

- Bakteri piperasiline .....
- Bakteri sefotaksime .....
- Bakteri ofloksasine .....
- Bakteri levofloksasine.....
- Bakteri aztreonama .....

Öğrencinin Adı ve Soyadı:

Numarası:

İmzası:

## KAYNAKLAR

- Bilgehan H (2009) Klinik Mikrobiyoloji Tanı. Beşinci Baskı. Barış yayınları, İzmir.  
Editörler: Günalp A, Yılmaz YA, Pınar A: Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar Eğitim Kitabı. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 2003, s-44-54.
- Wiim Jr. W, Ailen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G, Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostik Microbiology, Sixth edition, Lippincott Williams and Wilkins, s.29-38.
- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (2009). Manual of Clinical Microbiology. Klinik Mikrobiyoloji. Cilt 1. 9th ed., Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti., Ankara, 183184.
- Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar Eğitim Kitabı (2003). Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 55-61.





# **TIBBİ LABORATUVAR TEKNİKLERİ**

## **LABORATUVAR UYGULAMA**

**FÖYÜ**

**8**

**SEROLOJİK TESTLER**

**Öğr. Gör. Abdulhamit ÇALI**

### DERSİN AMACI

Aglütinasyon testlerinin tekniğine uygun yapılmasının öğrenilmesi  
İmmünokromatografik testlerin yapılmasının öğrenilmesi

### DERSİN HEDEFLERİ

<b>BİLGİ</b>	Bu dersi alacak olan öğrenciler; Serolojik testleri gruplandırır. Aglütinasyon testlerini sayar. Dilüsyon yöntemini pekiştirir.
<b>BECERİ</b>	Tekniğine uygun bir şekilde tüp aglütinasyon testini uygular. Tekniğine uygun bir şekilde lam aglütinasyon testini uygular. Tekniğine uygun bir şekilde immünokromatografik testi uygular. Tüp aglütinasyon testinin sonuçlarını değerlendirir. Lam aglütinasyon testinin sonuçlarını değerlendirir. İmmünokromatografik testin sonuçlarını yorumlar.
<b>TUTUM</b>	Laboratuvara gelirken kurallara uygun olarak giyinir. Laboratuvardaki malzemeleri kullandıktan sonra temizleyerek bırakır. Laboratuvardan çıkmadan önce ellerini yıkar.

### GENEL BİLGİLER

Vücuda yabancı olan ve vücuda girdikten sonra bağışıklık sistemi tarafından antikor oluşumuna neden olabilen maddeler **antijen** ismi verilmektedir. **Antikorlar**, antijenlere karşı oluşan ve antijenlerle spesifik olarak bağlanabilen glikoprotein yapısındaki maddelerdir. Her antijenin kendisine özgül antikoru vardır. Antijen ve antikor birleşmesinin in vitro ortamda gözle görünür hale getirilmesi temeline dayalı test yöntemlerine **serolojik test** yöntemleri denilmektedir. Elimizde belirli bir antijen hazır olarak bulunuyorsa serum/plazma örneğinde antikor araştırması yapılabilmektedir. Aynı şekilde elimizde hazır olarak bulunan bir antikor varsa serum/plazmada antijen araştırması yapılabilmektedir. Serolojik testler içerisinde bazı farklılıklara sahip birçok yöntem bulunmaktadır:

- Aglütinasyon Testleri
  - Tüp Aglütinasyon Yöntemleri
  - Lam Aglütinasyon Yöntemleri
  - Hemaglütinasyon Yöntemleri
- Presipitasyon Testleri
  - Halkalı Presipitasyon Yöntemleri
  - Jel İçinde Yayılma Presipitasyon Testleri
- Kompleman Birleşmesi Testleri
- Flokülasyon Testleri
- Nötralizasyon Testleri
- İmmünokromatografik Testler
- İşaretli Katı Faz Yöntemleri
  - Enzimle İşaretli İmmünsorbent Deneyi (ELİSA)
  - İmmünofloresan Deneyi (İFA)
  - Radyoimmün Deneyi (RİA)
- Otoanalizör Yöntemleri

### Aglutinasyon Testleri

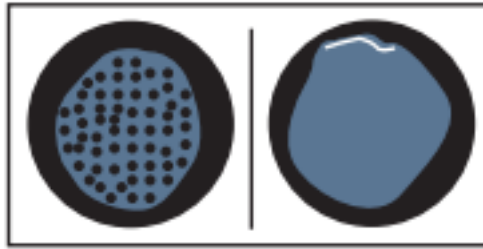
Partiküler yapıdaki antijen ile özgül antiserumun bir araya gelmesi sonucu oluşan reaksiyonlara aglutinasyon ismi verilmektedir. Bu reaksiyonda antijenler partiküler halde ve spesifik antikorlarla reaksiyona girdiklerinde kümelenirler. Partiküler haldeki bu antijenlere **aglutinojen** denilmektedir. Genellikle bakteri hücresi, eritrosit aglutinojen olarak kullanılmaktadır. Antikora ise **aglutinin** denilmektedir. IgG ve IgM antikorları en güçlü aglutininlerdir.

Aglutinasyon reaksiyonu iki basamaktan oluşmaktadır. Birinci basamakta aglutinojen ve spesifik aglutinin bir araya gelir ve spesifik determinantları ile bağlanır. Bu basamak geri dönüşümlüdür, ısı, pH ve elektrolit dengesi gibi etkenlerden etkilenebilmektedir. İkinci basamakta ise antijen ve antikorlar arasında bağlar ve köprüler ile immünkompleksler oluştururlar. Bu aşama geri dönüşümsüzdür. Oluşan bu kompleks yapı daha sonra ağırlığından dolayı dibe çöker. Gözle görülebilen çökeltiye **aglinat** adı verilir.

Aglutinasyon testleri; kan serumunda spesifik antikor saptanması veya vucut sıvılarında antijen saptanması, kan grubu belirlenmesi amaçları ile uygulanan ve kısa sürede sonuç veren testlerdir. Laboratuvarında bu amaçla kullanılan birçok çeşit aglutinasyon testleri vardır.

#### 1. Lam Aglutinasyon Testi

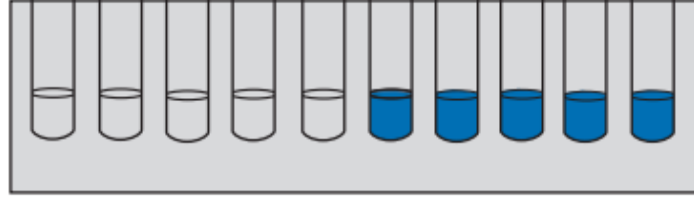
Lam aglutinasyon testleri bir lam üzerinde birkaç dakika gibi kısa sürede sonuç veren testlerdir. Bu testler bakterilerin tanımlanmasında veya şüpheli kan serumunda antikor varlığını göstermek için kullanılmaktadırlar. Ayrıca kan grubu testlerinde de bu yöntem uygulanabilmektedir. Bakteri tanımlanması için bir öze dolusu bakteri süspansiyonu bir öze dolusu antiserum ile lam üzerinde karıştırılır. Birkaç dakika içinde oluşan tipik çökeltilerin oluşması pozitif olarak değerlendirilir. Herhangi bir çökelti oluşmazsa negatif olarak değerlendirilir (Şekil 1). Bu test yönteminde incelenen örnekte antijen veya antikorun titresinin saptanması mümkün olmayıp sadece pozitif veya negatif şeklinde sonuç elde edilir. Örnek olarak CRP testi, streptokok tür tayini, kan grubu testleri verilebilir.



Şekil 1. Lam aglutinasyon testi .Birinci örnek pozitif, ikinci örnek negatiftir.

#### 2. Tüp Aglutinasyon Testi

Antijen veya antikorun titresinin belirlenmesi isteniyorsa tüp aglutinasyon testleri uygulanması gerekmektedir. Genellikle şüpheli kan serumundaki antikor titresinin belirlenmesi amacı ile bu test uygulanmaktadır. Bu teknikte serumun seri dilüsyonu yapılarak üzerine bilinen antijenden eşit miktarda eklenir. Belirli bir süre inkübasyondan sonra antijen antikor kompleksi oluşarak tüpün dibinde dantela şeklinde çökelti olursa test pozitif olarak değerlendirilir. Bu tüpte dipte çökelti oluşunca sıvı kısmı ise berrak bir görüntü kazanır. Negatif reaksiyonda ise bir değişiklik olmaz ve tüpün sıvı kısmının bulanıklık görüntüsü devam eder (Şekil 2). Örnek olarak kan grubu testleri, Wright, Gruber-Widal, Weil-Felix testleri verilebilir.



Şekil 2. Tüp aglütinasyon testi. İlk beş tüp pozitif, sonraki tüpler negatiftir.

### 3. İmmünokromatografik Testler

İmmünokromatografik testlere kısaca kaset testler ismi de verilmektedir. Bu testlerin kullanımı kolay, hızlı sonuç verme, uzun raf ömrü, düşük maliyet, yüksek duyarlılık gibi özelliklerinden dolayı dünyada sıklıkla kullanılan testler içerisinde yer alır. Genellikle gebelik testlerinde kullanılan bir yöntem iken aynı zamanda mikrobiyolojik analizlerde, gıda güvenliği, uyuşturucu tarama gibi çok geniş alanlarda kullanımı mevcuttur. Test kitinde bulunan nanopartiküller sayesinde sonuç gözle görünür hale geldiği için ekstra bir detektöre gerek duyulmamaktadır. Bu testler sıklıkla kalitatif bir yöntem olarak kullanılmaktadır.

Kaset testleri, gözlem penceresindeki kontrol ve test çizgilerinin gözle görülebilen çizgi oluşup oluşmamasına göre sonuç vermektedir (Şekil 3). Normalde test yapılmadan önce bu alanda hiçbir çizgi bulunmamaktadır. Bu testlerde esas reaksiyon antijen-antikör kompleksinin oluşmasına bağlıdır. Antijen veya antikörden birisi nitroselüloz membranda sabit şekilde bulunur. Diğeri ise reaksiyon pedinde hareketli kalması sağlanır. Bu hareket esnasında kompleks oluşarak çizgi oluşması sağlanır. Bu çizginin varlığına göre test sonucu değerlendirilir. Kaset testlerinde bir test çizgisi ve birde kontrol çizgisi bulunmaktadır. Kontrol çizgisinin tüm çalışmalarda oluşması gerekmektedir. Bu çizgi testimizin çalışıp çalışmadığını göstermektedir. Test çizgisi bölümünde çizgi oluşması pozitif olarak değerlendirilirken çizgi oluşmaması negatif olarak değerlendirilir.



Şekil 3. İmmünokromatografik test kitleri

## UYGULAMA I

## Lam Aglutinasyon Testi (Rose-Bengal)

Kullanılacak Malzemeler	Rose-Bengal Antijeni, üzerinde 1,5 cm çaplı halkalar bulunan lamalar, hasta serumu, kürdan, otomatik pipet, rotator
-------------------------	---

## İşlem Basamakları

- Lam üzerindeki halkalardan birine 50 µl hasta serumu eklenir.
  - Hasta serumu mikropipet yardımıyla alınabilir.
- Hasta serumunun üzerine 25 µl Rose-Bengal antijeni eklenir.
- Bir kürdan yardımıyla iki sıvı birbirine karıştırılır ve 1,5 cm'lik halkanın içine iyice yarılr.
- Elle veya rotator üzerinde dört dakika boyunca çevrilir.
- Süre sonunda test değerlendirilir.
  - Sonuçta iri tanecikli çökeltiler (aglutinasyon) olmuşsa = pozitif
  - İnce tanecikli çökelti oluşmuşsa= şüpheli
  - Homojen görüntü oluşmuşsa= negatif olarak değerlendirilir

## UYGULAMA II

## Tüp Aglutinasyon Testi (Wright Aglutinasyon)

Kullanılacak Malzemeler	Brucella antijeni, hasta serumu, SAT solüsyonu (%0,5'lik fenollü fosfat tamponu) cam tüpler, otomatik pipet, tüp sporu.
-------------------------	---

## İşlem Basamakları

- Kontrol tüpü de dahil 6 tüp spora yerleştirilir
- Birinci tüpe 0,9 mL SAT solüsyonu koyulur.
- Diğer tüplere 0,5'er mL SAT solüsyonu koyulur.
- Birinci tüpün içine 0,1 mL hasta serumu ilave edilir.
  - Böylece birinci tüpün titresi 1/10 olacaktır.
- Birinci tüp tamamen karıştırıldıktan sonra bu tüpten 0,5 mL alınır ve ikinci tüpe aktarılır.
  - İkinci tüpte pipetaj yapılarak tamamen karışıma sağlanmalı.
  - İkinci tüpün titresi 1/20 olacaktır.
- İkinci tüpten 0,5 mL alınarak üçüncü tüpe, üçüncü tüpten 0,5 mL alınarak dördüncü tüpe ve dördüncü tüpten 0,5 mL alınarak beşinci tüpe kadar seyreltme işlemi yapılır.
- Son tüpte herhangi bir seri sulandırım yapılmaz negatif kontrol olarak kullanılacaktır
- İçerisinde 0,5 mL sıvı bulunan tüm tüplerin üzerine 0,5 mL antijen solüsyonu dağıtılır.
  - Böylece son titreler sırası ile 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 ve negatif kontrol
- 37°C'de etüvde 18-24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra değerlendirmeye alınır.
- Değeri 1/80 ve üzerinde çıkan sonuçlar pozitif olarak değerlendirilir.

## UYGULAMA III

## İmmünokromatografik Test (Kaset Testi)

Kullanılacak Malzemeler	Hasta örneği, sulandırma solüsyonu, kaset test kiti, kronometre, vorteks
-------------------------	--

## İşlem Basamakları

- Kaset testin olduğu poşet yırtılarak kit çıkarılır ve benç üzerine koyulur.
- Hasta örneğinden bir miktar sulandırma solüsyonu içerisine alınır.
- Homojenizasyonu sağlamak için vortekste karıştırılır.
- Kaset üzerindeki numune gözüne 9-4 damla solüsyondan damlatılır.
- 10-15 dakika sonra tets sonucu değerlendirilir.
  - Kontrol çizgisi ile test çizgisi oluşursa pozitif
  - Sadece kontrol çizgisi oluşursa negatif
  - Kontrol çizgisi oluşmazsa test geçersiz

## ÖLÇME ve DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki form, uygulama faaliyetinizin değerlendirilmesi amacıyla hazırlanmıştır. Performansınız aşağıdaki kriterlere göre değerlendirilecektir.

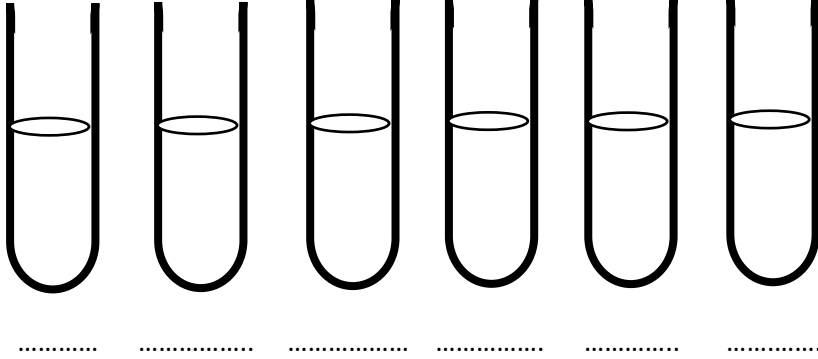
Değerlendirme Kriterleri		Çok iyi	İyi	Orta	Geliştir meli
1	Rose-Bengal testini kuralına uygun şekilde yaptı				
2	Rose-Bengal testinin sonuçlarını doğru yorumladı				
3	Tüp dilüsyon yöntemini yaptı				
4	Wright testini kuralına uygun şekilde uyguladı				
5	Wright testinin sonuçlarını doğru yorumladı.				
6	Kaset testini uygun şekilde çalıştı				
7	Kaset testinin sonuçlarını doğru yorumladı				
<b>TOPLAM PUAN</b>					

Aşağıdaki soruların doğru cevaplarını işaretleyiniz.

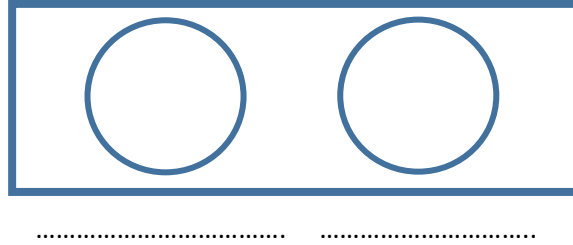
- Aşağıdakilerden hangisi, *Brucella abortus*'un tanısında kullanılan yöntemlerdendir?  
A) Paul bunnel testi                      B) Rose bengal testi                      C) Rivanol testi  
D) Gruber –widal testi                      E) Weil Felix testi
- Serolojik testlerle ne ölçülür veya gösterilir?  
A) Enfeksiyon etkenine karşı oluşan özgül antikorlar gösterilir.  
B) Serumdaki hücreler gösterilir.  
C) Eritrosit sedimentasyon hızı ölçülür.  
D) Kanın basıncı ölçülür  
E) Direkt bakteriler gösterilir
- Aşağıdakilerden hangisi, serolojik test değildir?  
A) Hemaglutinasyon                      B) Presipitasyon                      C) Ziehl- Neelsen  
D) Aglutinasyon                      E) Kaset testi
- Helicobacter pylori* kaset testi sonucunda sadece kontrol çizgisinin oluşması nasıl değerlendirilir?  
A) Test negatiftir                      B) Test pozitiftir                      C) Test geçersizdir  
D) Test şüphelidir                      E) Test tekrar edilmeli
- I. Rose-Bengal testi  
II. Wright testi  
III. Paul-bunnel testi  
Yukarıdakilerden hangisi buruselloz tanısında kullanılan serolojik testlerdendir?  
A) Yalnız I                      B) Yalnız II                      C) Yalnız III                      D) Yalnız I ve II                      E) I, II ve III

## LABORATUVARDA YAPILACAK İŞLEMLER

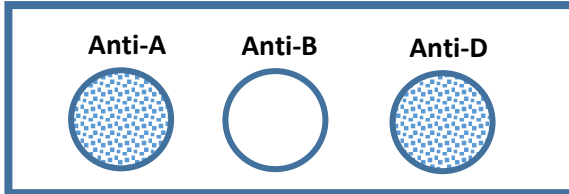
1. Laboratuvarda yaptığınız Wright aglütinasyon testinde tüm tüplerin titrelerini altlarına yazıp tetsin sonucunu belirleyiniz.



2. Laboratuvarda yaptığınız Rose-Bengal testinin sonucunu aşağıdaki lamda gösterip değerlendiriniz.

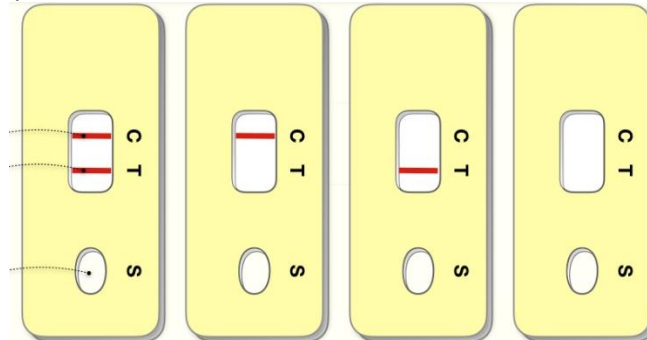


3. Laboratuvara gelen bir kan örneğinden lamda kan grubu testi çalışılmıştır. Bu testin sonucu aşağıdaki gibidir. Buna göre hastanın kan grubu nedir?



Kan grubu = .....

4. Gaitada gizli kan testi kaset testi olarak çalışıldıktan sonra aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir. Sonuçları altlarına yazınız.



Öğrencinin Adı ve Soyadı:

Numarası:

İmzası:

## KAYNAKLAR

- Bilgehan H (2009) Klinik Mikrobiyoloji Tanı. Beşinci Baskı. Barış yayınları, İzmir.
- Editörler: Günalp A, Yılmaz YA, Pınar A: Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar Eğitim Kitabı. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 2003, s-44-54.
- Wiim Jr. W, Ailen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G, Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostik Microbiology, Sixth edition, Lippincott Williams and Wilkins, s.29-38.
- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (2009). Manual of Clinical Microbiology. Klinik Mikrobiyoloji. Cilt 1. 9th ed., Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti., Ankara, 183184.
- Demirtaş S, Can M ve Güven B (2014) Tıbbi Laboratuvar El Kitabı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul





# **TIBBİ LABORATUVAR TEKNİKLERİ**

## **LABORATUVAR UYGULAMA**

**FÖYÜ**

# **9**

**ÇÖZELTİ HAZIRLAMA**

**Öğr. Gör. Abdulhamit ÇALI**

**DERSİN AMACI**

Yüzde derişim, molarite ve normalite kavramlarına uygun çözelti hazırlanılmasının öğrenilmesi

**DERSİN HEDEFLERİ**

<b>BİLGİ</b>	Bu dersi alacak olan öğrenciler; Çözeltileri gruplandırır. Konsantrasyon terimlerini sayar.
<b>BECERİ</b>	Tekniğine uygun bir şekilde yüzde derişim ile çözelti hazırlar. Tekniğine uygun bir şekilde molariteye göre çözelti hazırlar. Tekniğine uygun bir şekilde normaliteye göre çözelti hazırlar.
<b>TUTUM</b>	Laboratuvara gelirken kurallara uygun olarak giyinir. Laboratuvardaki malzemeleri kullandıktan sonra temizleyerek bırakır. Laboratuvardan çıkmadan önce ellerini yıkar.

**GENEL BİLGİLER**

Kimyasal veya biyokimyasal çalışmalarda çözeltiler önemli bir yer tutmaktadırlar. Çözelti, geniş anlamda, bir maddenin (katı, sıvı veya gaz olabilir) başka bir madde içerisinde dağılması sonucu meydana gelmektedir. Dağılan maddeye çözünen madde, dağılma ortamına ise çözücü, solvent veya dispersiyon ortamı denir. Saf su en çok kullanılan çözücü olarak örnek verilebilir.

Çözeltiler birçok özellikleri bakımından sınıflandırılabilir. Bir çözeltilde bir tek çözünmüş madde olabileceği gibi iki veya daha fazla madde de olabilir. Yani çözelti basit veya kompleks olabilir.

**Çözücü ve çözünenin fiziksel hâllerine göre çözeltiler**

**Katı-Katı Çözeltiler:** Katı bir maddenin başka bir katı madde içerisinde homojen bir karışım oluşturmasıdır.

**Katı-Gaz Çözeltileri:** Bir gazın bir katı içerisinde çözünmesiyle oluşan çözeltilerdir.

**Katı-Sıvı Çözeltiler:** Katı bir maddenin sıvı içerisinde çözünmesi ile oluşan çözeltilerdir.

**Sıvı-Sıvı Çözeltiler:** Bir sıvının başka bir sıvı madde içerisinde çözünmesi ile oluşan homojen karışımlardır.

**Gaz-Gaz Çözeltiler:** En az iki gazın karışımıdır. Bütün gaz karışımları homojen özellik gösteren çözeltilerdir.

**Gaz-Sıvı Çözeltileri:** Bir gazın bir sıvı içerisinde çözünmesi ile oluşan çözeltilerdir.

**Tablo 1.** Çözücü ve çözünenin fiziksel hâllerine göre çözeltilere örnekler

Çözücü ve çözünenin fiziksel hâllerine göre çözeltiler	Çözücüsü katı olanlar	Katı-Katı Çözeltiler	Alışımlar, pirinç, çelik, tunç vb.
		Katı-Gaz Çözeltileri:	Paladyum içinde H <sub>2</sub>
Çözücüsü sıvı olanlar	Katı-Sıvı Çözeltiler	Tuzlu su, şekerli su	
	Sıvı-Sıvı Çözeltiler	Alkol+su	
	Gaz-Sıvı Çözeltileri	Amonyaklı su	
Çözücüsü gaz olanlar	Gaz-Gaz Çözeltiler	Hava	

**Çözünmüş madde miktarına göre çözeltiler:**

**Doymamış Çözelti:** Belirli bir sıcaklıkta, belirli bir miktar çözücünün çözebileceğinden daha az çözünen madde içeren çözeltilerdir.

**Doymuş Çözelti:** Belirli bir sıcaklıkta, belirli bir miktar çözücünün çözebileceği miktarda çözünen madde içeren çözeltilerdir.

**Aşırı Doymuş Çözelti:** Belirli bir sıcaklıkta, belirli bir miktar çözücünün çözebileceğinden daha fazla çözünen madde içeren çözeltilerdir. Bu çözeltiler belirli bir dereceye kadar soğutulduğu takdirde belli bir miktar çözünen madde dibe çökebilir.

Çözeltideki çözünmüş olan maddenin miktarını belirtmek için "**konsantrasyon** (derişim)" terimi kullanılır. Sıklıkla kullanılan konsantrasyon terimleri yüzde derişim, molarite ve normalitedir. Aşağıda bu terimlerin açıklamaları ve formülleri yer almaktadır.

## 1. Yüzde Derişim

Ağırlıkça ve hacimce olmak üzere ikiye ayrılır.

**Ağırlıkça % konsantrasyon (m/m):** Sıklıkla katı bir madde sıvı veya katı bir madde içerisinde çözüldürüldüğünde bu terim kullanılmaktadır. 100 g çözeltide çözünen maddenin g olarak ağırlığıdır.

$$\% \text{ Derişim } m/m = \frac{\text{Çözünenin ağırlığı (g)}}{\text{Çözeltinin ağırlığı (g)}} \times 100$$

Ör: %10 (m/m)'luk 300 g NaOH çözeltisinin hazırlanması:

$$\%10 = \frac{\text{NaOH ağırlığı}}{300 \text{ g}} \times 100$$

$$\text{NaOH ağırlığı} = \frac{10 \times 300 \text{ g}}{100}$$

$$\text{NaOH ağırlığı} = 30 \text{ g}$$

Yukarıdaki hesaplama göre 30 g NaOH alınır ve 270 g çözücüde (su) çözülürse %10 (m/m)'luk 300 g NaOH çözeltisi elde edilir.

**Hacimce % konsantrasyon (v/v):** sıklıkla sıvı bir madde sıvı bir çözücü içerisinde çözülerek hazırlanan çözeltilerde kullanılmaktadır. 100 mL çözeltide çözünen maddenin mL cinsinden değeridir.

$$\% \text{ Derişim } v/v = \frac{\text{Çözünenin hacmi (mL)}}{\text{Çözeltinin hacmi (mL)}} \times 100$$

Ör: %10 (v/v)'luk 500 mL metanol çözeltisinin hazırlanması:

$$\%10 = \frac{\text{Metanolün hacmi}}{500 \text{ mL}} \times 100$$

$$\text{Metanolün hacmi} = \frac{10 \times 500 \text{ mL}}{100}$$

$$\text{Metanolün hacmi} = 50 \text{ mL}$$

Yukarıdaki hesaplama göre 50 mL metanol alınır ve 450 mL çözücüde (su) çözülürse %10 (m/m)'luk 500 mL metanol çözeltisi elde edilir.

## 2. Molarite

1 litre çözeltide çözünmüş olan maddenin mol sayısıdır. Birimi molar (M) yada mol/L'dir.

$$\text{Molarite (M)} = \frac{\text{Çözünenin mol sayısı (n)}}{\text{Çözeltinin hacmi (L)}}$$

Ör: 1 M'lık 1000 mL NaCl çözeltisinin hazırlanması ( $M_{A(\text{NaCl})}$ :58,5 g/mol)

$$1 \text{ mol/L} = \frac{\text{NaCl mol sayısı (n)}}{1 \text{ L}}$$

$$\text{NaCl mol sayısı (n)} = 1 \text{ mol}$$

$$n (\text{mol sayısı}) = \frac{m}{M_A} \rightarrow 1 \text{ mol} = \frac{\text{NaCl kütlesi (m)}}{58,5 \text{ g/mol}} \rightarrow \text{NaCl kütlesi (m)} = 58,5 \text{ g}$$

58,5 g NaCl hassas terzide tartıldıktan sonra 1 L'lik balona alınır. Bir miktar çözücü (su) ilave edilerek çözdürülür. Ardından hacim 1 L'ye tamamlanır. Böylece 1 M 'lık 1000 mL NaCl çözeltisi elde edilmiş olur.

### 3. Normalite

1 litre çözeltide çözülmüş olan maddenin eşdeğer-gram sayısına denir. Tesir değeriği (t), asitlerde proton ( $H^+$ ) sayısı, bazlarda ( $OH^-$ ) iyonu sayısı, tuzlarda ise pozitif yüklü iyon sayısıdır. Normalite N ile gösterilmektedir. Normalite, molarite ile tesir değeriğinin çarpımına eşittir.

$$\text{Normalite (N)} = \frac{m \times t}{M_A \times V} \rightarrow \text{Normalite (N)} = \text{Molarite (M)} \times t$$

Ör: 0,5 N 250 mL NaOH çözeltisinin hazırlanması ( $M_{A(\text{NaOH})}$ : 40 g/mol):

NaOH ın tesir değeriği yani  $t=1$  dir.

$$0,5 \text{ N} = \frac{m \times 1}{40 \text{ g/mol} \times 0,250 \text{ L}}$$

$$m (\text{NaOH kütlesi}) = 0,5 \times 40 \times 0,25 = 5 \text{ g}$$

Yukarıdaki hesaplama göre 5 g NaOH tartılıp balona aktarılır ve bir miktar su ile çözdürülür. Ardından hacim 250 mL'ye tamamlandığı zaman 0,5 N 250 mL NaOH çözeltisi elde edilmiş olur.

### Çözelti hazırlarken dikkat edilmesi gerekenler:

- Çözücü ve çözünen maddelerin etiket kontrolü yapılmalı
- Çözünen madde katı ise saklama koşullarına dikkat edilmeli, nem alan, saflığını yitiren maddeler kullanılmamalı
- Çözelti hazırlamadan önce hesaplama işlemleri doğru bir şekilde yapılmalıdır.
- Çözelti hazırlanacak kapların temiz olmasına dikkat edilmelidir.
- Çözücü olarak su kullanılacaksa saf su kullanılmasına dikkat edilmelidir.
- Asit çözeltisi hazırlanacak ise öncelikle kaba bir miktar saf su koyulur ve bunun üzerine asit ilavesi yavaş yavaş yapılmalıdır. Bunun nedeni asitin üzerine direkt su koyulduğunda aşırı ısı artışından dolayı cam malzemenini çatlaması veya patlaması gibi kazaların oluşmasına neden olacaktır.

## UYGULAMA I

### Yüzde Derişim Hesaplama (m/m)

Kullanılacak Malzemeler NaCl, distile su, balon, mezür, hassas terazi

**%5 (m/m)'lik, 50 g NaCl çözeltisi hazırlayınız**

#### İşlem Basamakları

1. Tartılacak olan NaCl miktarı hesaplanır.
2. Hassas terazide hesaplanan miktar kadar NaCl tartılır.
3. Tartılan NaCl temiz bir balona aktarılır.
4. Balon üzerine 50 g'mı tamamlayana kadar su eklenir.
5. Böylece %5'lik 50 g NaCl çözeltisi elde edilir.

## UYGULAMA II

### Molarite ile Çözelti Hazırlama

Kullanılacak Malzemeler NaCl, distile su, balon, mezür, hassas terazi

**0,6 M 100 mL NaCl çözeltisi hazırlayınız.**

#### İşlem Basamakları

1. Tartılacak olan NaCl miktarı hesaplanır.
2. Hassas terazide hesaplanan miktar kadar NaCl tartılır.
3. Tartılan NaCl temiz bir balona aktarılır.
4. Bir mezür yardımıyla 100 mL su ölçülür.
5. Balon içerisine bir miktar distile su koyulur ve çalkalanır.
6. İyice çözüldükten sonra mezür içerisindeki su balona boşaltılır.
7. Böylece hacim 100 mL'ye tamamlanmış olur.

## UYGULAMA III

### Seyreltme

Kullanılacak Malzemeler 0,6 M NaCl çözeltisi, distile su, balon, mezür, hassas terazi

**Bir önceki uygulamada hazırlanan 0,6 M NaCl çözeltisinden 0,15 M 100 mL NaCl çözeltisi hazırlayınız.**

#### İşlem Basamakları

1. Bir önceki uygulamada hazırlanan 0,6 M çözeltiden alınacak hacim hesaplanır
  - Hesaplama  $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$  formülüne göre yapılır
  - C: konsantrasyon, V: hacimdir.
2. Hesaplanan hacimdeki çözelti mezür yardımıyla ölçülür.
3. Ölçülen çözelti balona aktarılır.
4. Geri kalan kısım 100 mL olacak şekilde tamamlanır.
  - Hesaplanan hacim 100 mL'den çıkarılarak hesaplanır.
5. Böylece hacim 100 mL'ye tamamlanmış olur ve 0,15 M 100 mL NaCl çözeltisi elde edilmiş olur.

ÖLÇME ve DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki form, uygulama faaliyetinizin değerlendirilmesi amacıyla hazırlanmıştır. Performansınız aşağıdaki kriterlere göre değerlendirilecektir.

Değerlendirme Kriterleri		Çok iyi	İyi	Orta	Geliştir meli
1	Yüzde derişim hesabını doğru şekilde yaptı				
2	Yüzde derişime göre çözeltiyi hazırladı				
3	Molarite hesabını doğru şekilde yaptı				
4	Molariteye göre çözeltiyi hazırladı				
5	Seyreltme hesabını doğru şekilde yaptı				
6	Çözeltiyi doğru şekilde seyreltti				
<b>TOPLAM PUAN</b>					

Aşağıdaki soruların doğru cevaplarını işaretleyiniz.

- 0.1 M, 250 mL KCl çözeltisi hazırlamak için kaç gram KCl tartılması gerekmektedir?** ( $M_{A(KCl)}:74,55 \text{ g/mol}$ )  
 A) 15 g      B) 18,64 g      C) 74,55      D) 93,18      E) 186,4 g
- Aşağıdakilerden hangisi sıvı-katı çözeltiye örnektir?**  
 A) Tuzlu su      B) Pirinç      C) Amonyaklı su      D) Alkollü su      E) Tunç
- 400 ml 0.5 M glikoz ( $C_6H_{12}O_6$ ) çözeltisi hazırlamak için kaç g glikoz gereklidir?** ( $M_{A(C_6H_{12}O_6)}: 180 \text{ g/mol}$ )  
 A) 9      B) 18      C) 36      D) 72      E) 180
- Çözeltideki çözünmüş olan maddenin miktarını ifade etmek için kullanılan terim aşağıdakilerden hangisidir?**  
 A) Çözücü      B) Çözen      C) Solvent      D) dispersiyon      E) Konsantrasyon
- 0,5 N 250 mL HCl çözeltisi elde etmek için kaç g HCl gereklidir?** ( $M_{A(HCl)}: 36,5$ )  
 A) 1      B) 2,23      C) 4,56      D) 22,8      E) 45,6

## LABORATUVARDA YAPILACAK İŞLEMLER

**1. Uygulamanın hesaplaması:**

TARTILMASI GEREKEN MİKTAR : .....

**2. Uygulamanın hesaplaması:**

TARTILMASI GEREKEN MİKTAR : .....

**3. Uygulamanın hesaplaması:**

TARTILMASI GEREKEN MİKTAR : .....

**Üçüncü uygulama sonucunda elde edilen çözeltinin ismi nedir? .....**

Öğrencinin Adı ve Soyadı:

Numarası:

İmzası:

## KAYNAKLAR

- Demirtaş S, Can M ve Güven B (2014) Tıbbi Laboratuvar El Kitabı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul
- ÖZDEMİR Haluk M., İnönü Üniversitesi Kimya Bölümü Ders Notları, "Çözeltiler ve Değişim Birimleri", Malatya,2006
- DEMİR Mustafa, Analitik Kimya (Nicel), S.H.Ç.K. Basımevi, Ankara, 2001





**TIBBİ LABORATUVAR TEKNİKLERİ  
UYGULAMA LABORATUVARI  
FÖYLERİ**

**10**

**KALIN DAMLA ve PERİFERİK YAYMA**

**Öğr. Gör. Abdulhamit ÇALI**

### DERSİN AMACI

Parazitolojide ve hematolojide kullanılan kalın damla ve periferik yayma preparatlarının hazırlanmasının öğrenilmesi

### DERSİN HEDEFLERİ

<b>BİLGİ</b>	Bu dersi alacak olan öğrenciler; Kalın damla preparat hazırlama aşamalarını sıralar. Periferik yayma preparat hazırlama aşamalarını sıralar. Beyaz kan hücrelerini gruplandırır. Kırmızı kan hücrelerini şekillerine göre sınıflandırır.
<b>BE CERİ</b>	Kalın damla preparat hazırlar. Periferik yayma preparat hazırlar.
<b>TUTUM</b>	Laboratuvara gelirken kurallara uygun olarak giyinir. Laboratuvardaki malzemeleri kullandıktan sonra temizleyerek bırakır. Laboratuvardan çıkmadan önce ellerini yıkar.

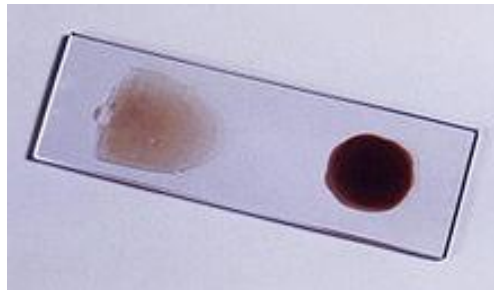
### GENEL BİLGİLER

#### Kalın Damla Yöntemi

Periferik yayma gibi kalın damla yöntemi de özellikle sıtma gibi parazitler hastalıklarının tanısının koyulması için yapılan basit ve etkili yöntemlerden biridir. Periferik ya da kapiler şekilde alınan kan örnekleri çalışma için kullanılabilir.

Çalışmaya başlamadan önce gerekli olan malzemeler (lamlar, steril pamuk, tek kullanımlık lanset, alkol vb.) hazır hale getirilmelidir. Çünkü işlemler hızlı bir şekilde yapılmalıdır. Kan pıhtılaşsa yayma yapılamayacağı için tüm işlemler seri bir şekilde yapılmalıdır. Gerekli antisepsi işlemlerinden sonra hastanın orta parmak lansetle küçük bir delik açılarak kan lam üzerine alınabilir. Kan alınırken kesinlikle kanın çıkması için parmak sıkılmamalıdır. Aksi halde kan dokular arasındaki sıvıyla karışacağı için seyrelmiş olacaktır. Kan alınırken lam kana değdirilerek alınabilir. Bu aşamada lamın ele değdirilmemesi önem taşır. Çünkü eldeki mikroorganizmalar, yağ veya ter lama geçerek iyi bir preparatın elde edilmesi zorlaşır.

Lama aktarılan kan pıhtılaşmadan ikinci bir lamın sivri ucu ile karıştırılarak kalın bir damla elde edilmesi sağlanır (Şekil 1). Preparatın altına bir yazı koyulup okumaya çalışılır eğer okuma işlemi yapılamazsa preparatın ideal kalınlıkta hazırlandığı anlaşılar. Kurutma işlemi yapıldıktan sonra tespit işlemi yapmadan boyama işlemi yapılır. Bunun için Giemsa boyası kullanılır. Preparat daha sonra mikroskopta incelenmeye alınır.



Şekil 1. Kalın Damla Yöntemi

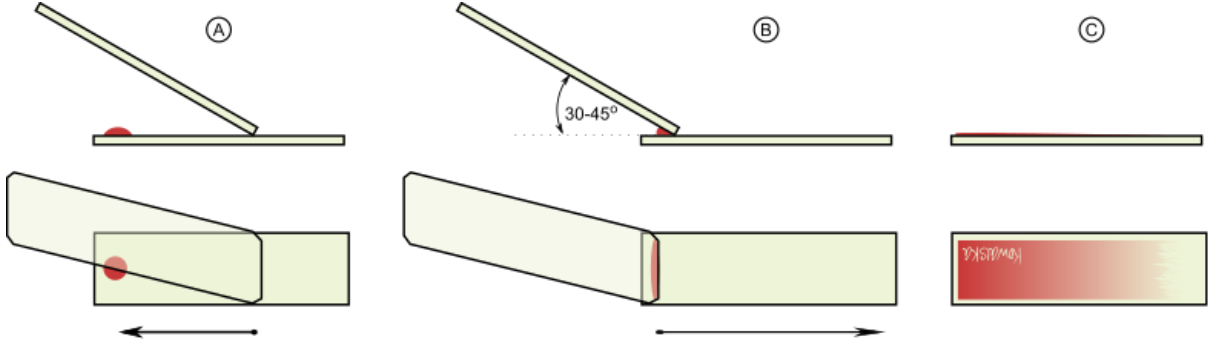
İncelemede tüm sahalar incelenmelidir. Çünkü enfeksiyon tablosuna göre parazit yapıları çok az miktarda olabilmektedir.

### Periferik Yayma Yöntemi

Dikkatli bir şekilde yapılan periferik yayma kan hücrelerinin düzgün bir şekilde görünmelerini sağlar. Böylece kan hücrelerinin morfolojileri belirlenebilir. Kırmızı kan hücreleri, beyaz kan hücreleri ve trombositler, sayı, yapı, büyüklük ve olgunluk açısından incelenebilirler. Ayrıca parazitolojide sıtma gibi enfeksiyon hastalıklarının tanısının koyulmasında kullanılabilir.

Periferik yayma tam kan sayımının önemli bir kısmıdır. EDTA'lı tüpe alınan veya kalın damla için lansetle parmakta açılan yerden küçük bir damla kan örneği lama aktarılır. İkinci bir lamın kısa kenarı kullanılarak yaymayapılır, kurutulur ve boyanıp incelenir.

Şekil 2'de periferik yayma hazırlamada kullanılan çift lam yöntemi gösterilmektedir. Bu yöntemle temiz bir lamın üzerine bir damla kan koyulur ve ikinci bir lamın kısa kenarının kan ile temas etmesi sağlanır. İkinci lam ile birinci lam arasında 30-45°C'lik açı olması sağlanır. Ardından bu lam yardımıyla yumuşak ve hızlı bir şekilde kan birinci lamın  $\frac{3}{4}$ 'lük kısmına yayılması sağlanır. Yayma kurutulduktan sonra metanolle tespit işlemi yapılır. Metanol hücresel elemanların şeklinin bozunmasını engellemektedir. Ardından kurutulduktan sonra Giemsa ile boyama işlemine alınır.



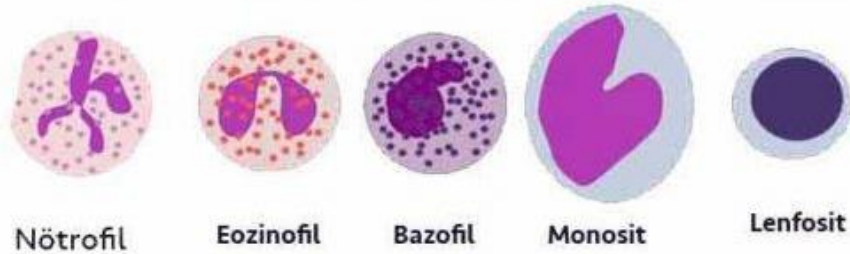
Şekil 2. Periferik Yayma

### Diferansiyel Sayım = Formül

Diferansiyel sayım tam kan sayımının ikinci basamağıdır. İmmersiyon yağı ile en az 100 lökosit sayılacak şekilde yaymanın ince ucundan başlanarak horizontal olarak zikzaklar ile alan incelenir.

### Beyaz Kürelerin İncelenmesi:

Lökositlerin hücre yapısı, çekirdek yapısı, sitoplazma rengi, içerdiği inklüzyon tipleri değerlendirilir. Şekil 3'de beyaz kürelerin normal şekilleri verilmiştir. Nötrofil, eozinofil ve bazofil granülosit yapıdayken Lenfosit ve monosit agranülosit yapıdadırlar.



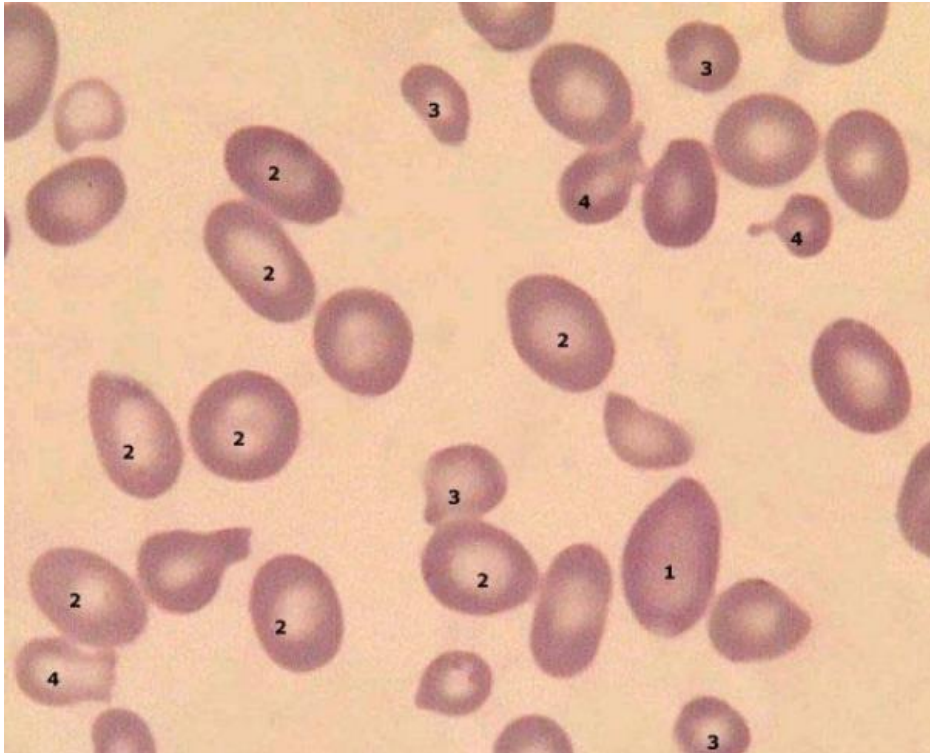
Şekil 3. Beyaz küreler.

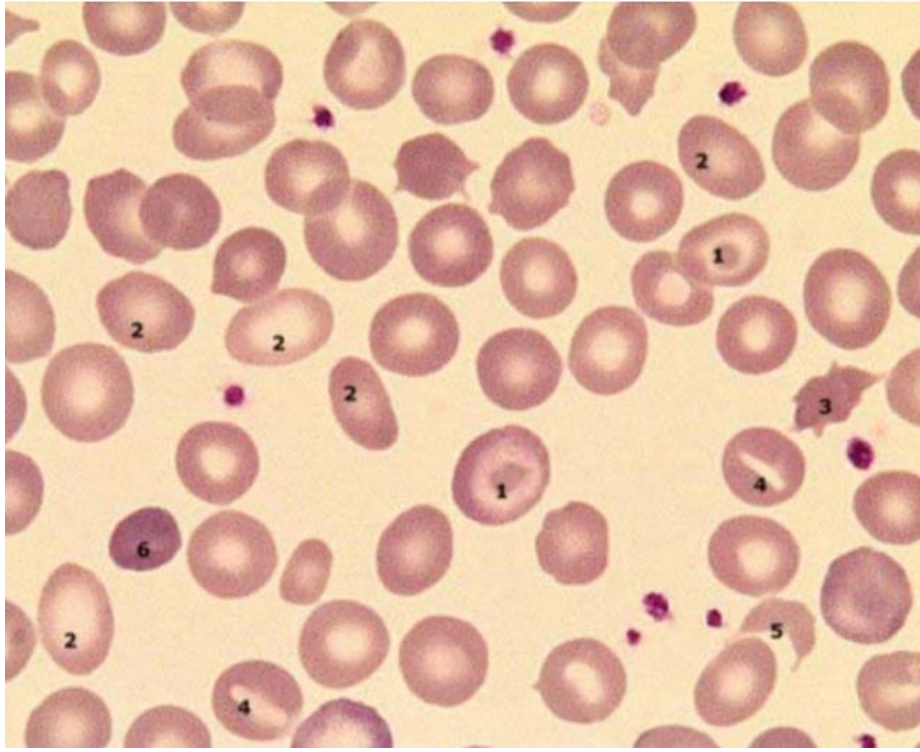
**Kırmızı Kürelerin ve Trombositlerin İncelenmesi:**

Kırmızı kürelerin büyüklük ve morfolojilerini tanımlayıcı terimler Tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 1.** Kırmızı kan hücrelerinin özellikleri

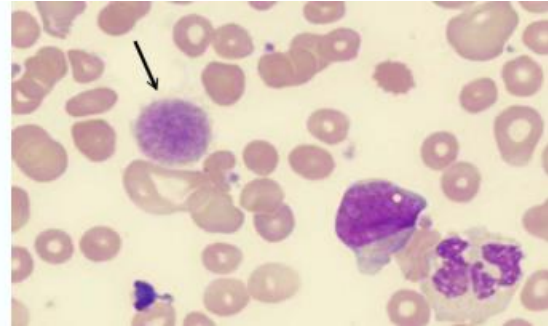
Terim	Özellik	Hücre Yapısı
Normositik	Normal boyut	Şekil 4
Megalosit	Normalden daha büyük boyut	Şekil 5.1
Makrositik	Büyük boyut	Şekil 5.2
Mikrositik	Küçük boyut	Şekil 5.3
Poikilositoz	Hücrelerin şekillerinde değişiklik	Şekil 6


**Şekil 4.** Normal eritrosit hücreleri

**Şekil 5.** 1. Megalositin görünümü, 2. Makrositin görünümü, 3. Mikrositin görünümü



Şekil 6. Poikilositoz. Hücre şekilleri değişen eritrosit görünüşleri

Şekil 7'de trombositlerin yapısı gösterilmiştir.



Şekil 7. Birinci resimde normal boyutlardaki trombositler görülmektedir. İkinci resimde okla gösterilen dev trombosit görünümü

## UYGULAMA I

### Kalın Damla Preparat Hazırlama

#### Kullanılacak Malzemeler

Steril tek kullanımlık lanset, pamuk, alkol, lam, Giemsa boya çözeltisi

#### İşlem Basamakları

1. Kalın damla preparat için kullanılacak malzemeler hazırlanır.
2. Alkol ile cilt temizliği yapıldıktan sonra lanset ile delik açılır.
3. Birinci damla kuru bir pamuk ile alınır.
4. İkinci damla lamın ortasına olacak şekilde aktarılır.
5. Veya EDTA'lı tüpten bir damla kan alınarakta yapılabilir.
6. İkinci bir lamın sivri ucu ile damla preparat üzerine hafifçe yayılır.
7. Kurutmaya bırakılır.
8. Tespit işlemi yapılmaz.
9. Kurutma işleminden sonra preparat boyama köprüsüne alınır ve üzeri Giemsa boyası ile kaplanır.
10. 45 dakika sonra boya dökülüp distile su ile yıkama işlemi yapılır.
11. Kurutulduktan sonra mikroskopta inceleme yapılır.

## UYGULAMA II

### Periferik Yayma Preparat Hazırlama

#### Kullanılacak Malzemeler

Steril tek kullanımlık lanset, pamuk, alkol, lam, Giemsa boya çözeltisi

#### İşlem Basamakları

1. Yukarıda anlatıldığı yöntemle kan damlası birinci lamın üzerine alınır.
2. Preparat düz bir yüzeye yerleştirilir ve sol elin iki parmağı ile tutulur.
3. İkinci lam ile şekil 2'de anlatıldığı şekilde ince yayma yapılır.
4. Direkt kurumaya bırakılır.
5. Kurutma işleminden sonra preparat boyama köprüsüne alınır ve üzeri metanolle kapatılır. Böylece tespit işlemi yapılmış olur.
6. Kuruduktan sonra Giemsa boyası ile kaplanır.
7. 30 dakika sonra boya dökülüp distile su ile yıkama işlemi yapılır.
8. Kurutulduktan sonra mikroskopta inceleme yapılır.

## ÖLÇME ve DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki form, uygulama faaliyetinizin değerlendirilmesi amacıyla hazırlanmıştır. Performansınız aşağıdaki kriterlere göre değerlendirilecektir.

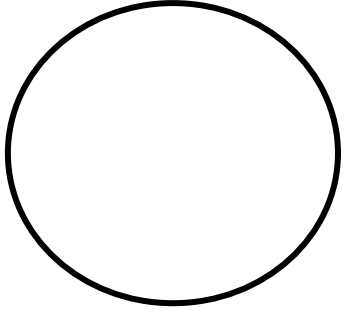
Değerlendirme Kriterleri		Çok iyi	İyi	Orta	Geliştirilebilir
1	Parmaktan kan alımı için cilt antisepsisi yaptı				
2	Lanset ile uygun şekilde parmakta delik açtı.				
3	Bir damla kanı lam üzerine alırken lamı ciltle temas ettirmedi				
4	Kalın damla preparat hazırlamayı kuralına uygun şekilde yaptı				
5	Kalın damla preparatı kuralına uygun şekilde Giemsa ile boyadı				
6	Periferik yayma preparat hazırlamayı kuralına uygun şekilde yaptı				
7	Periferik yayma preparatı kuralına uygun şekilde Giemsa ile boyadı				
8	Kalın damla preparatı mikroskopta inceledi				
9	Periferik yayma preparatı mikroskopta inceledi				
<b>TOPLAM PUAN</b>					

Aşağıdaki soruların doğru cevaplarını işaretleyiniz.

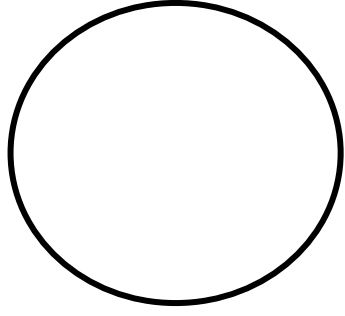
- Periferik yayma ile aşağıdakilerden hangisi incelenmez?**  
A) Eritrosit      B) Lökosit      C) Parazit      D) Epitel      E) Nötrofil
- Normalden daha küçük boyutta olan eritrosit hücresine verilen isim aşağıdakilerden hangisidir?**  
A) Normosit      B) Megalosit      C) Mikrosit      D) Makrosit      E) Poikilositoz
- Kalın damla ve ince yayma preparatlarını boyarken hangi boya kullanılmaktadır?**  
A) Gram      B) Giemsa      C) Malaşit yeşili      D) ARB      E) Metilen mavisi
- I. Monosit  
II. Lenfosit  
III. Nötrofil**  
**Yukarıdaki beyaz kan hücrelerinden hangisi ya da hangileri granülosit yapıdadır?**  
A) Yalnız I      B) Yalnız II      C) Yalnız III      D) Yalnız I ve II      E) I, II ve III

## LABORATUVARDA YAPILACAK İŞLEMLER

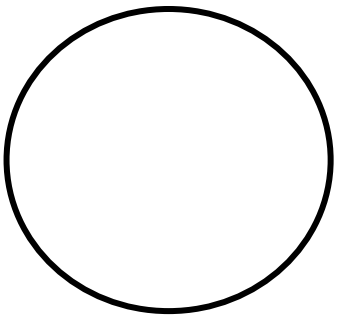
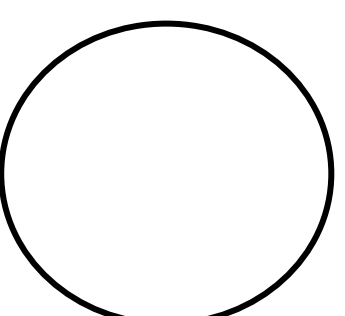
Laboratuvarda hazırlanılan **kalın damla** preparattan yapılan incelemede görülen yapıları çiziniz ve adlarını yazınız.

	Mikroskop görünümü	Yapıların isimleri
1.		

Laboratuvarda hazırlanılan **periferik yayma** preparatından yapılan incelemede görülen **kırmızı kan hücresi** yapılarını çiziniz.

2.		
----	--	--

Laboratuvarda hazırlanılan **periferik yayma** preparatından yapılan incelemede görülen **beyaz kan hücresi** yapılarını çiziniz.

3.		
4.		

Öğrenci Adı Soyadı:

Öğrenci Numarası:



## KAYNAKLAR

Akbay A, Öztaş Y, Bozdayı G (2000), Laboratuvarda Temel Kavramlar, Ankara Üniversitesi Dikimevi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Yayınları.

<https://www.gunceltipderneği.org/pdf/7/seval-akpınar.pdf>

Akdur R. (1997). Sıtma Laboratuvar Teknisyeni El Kitabı. Ankara.

Demirtaş S, Can M ve Güven B (2014) Tıbbi Laboratuvar El Kitabı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul



**TIBBİ LABORATUVAR TEKNİKLERİ  
UYGULAMA LABORATUVARI  
FÖYLERİ**

**11**

**KAN SAYIMI**

**Öğr. Gör. Abdulhamit ÇALI**

**DERSİN AMACI**

1 mm<sup>3</sup>'te kanda bulunan eritrosit ve lökosit sayısının hesaplanmasının yapılması amaçlanmaktadır.

**DERSİN HEDEFLERİ****BİLGİ**

Bu dersi alacak olan öğrenciler;  
Eritrosit sayım aşamalarını sıralar.  
Lökosit sayım aşamalarını sıralar.  
Thoma/Neubauer lamının kullanımını açıklar.

**BE CERİ**

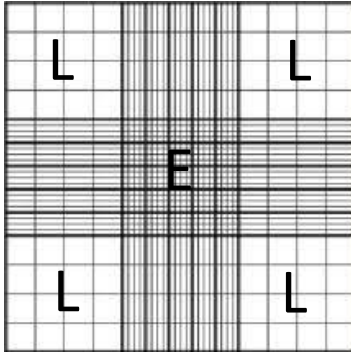
Thoma/Neubauer lamını kullanır.  
Eritrosit sayımını yapar.

**TUTUM**

Laboratuvara gelirken kurallara uygun olarak giyinir.  
Laboratuvardaki malzemeleri kullandıktan sonra temizleyerek bırakır.  
Laboratuvardan çıkmadan önce ellerini yıkar.

**GENEL BİLGİLER****Sayma Lamları ile Kan Sayımı**

Thoma veya Neubauer lamları kullanılarak eritrosit ve lökosit sayımları yapılmaktadır. Neubauer lamı üzerinde özel karelerden oluşan ve mm<sup>3</sup>'teki hücre sayısının hesaplanmasında kullanılan özel bir lamdır (Şekil 2). Bu lamda bulunan "L" harfi ile gösterilen alandaki 16 kare lökosit sayım alanıdır. "E" harfi ile gösterilen alandaki 25 kare ise eritrosit sayım alanıdır. Bir büyük lökosit alanı 1 mm<sup>2</sup>'dir. Bir küçük kare eritrosit alanı da 0,04 mm<sup>2</sup>'dir. Toplam 25 kare ise 1 mm<sup>2</sup>'dir. Lamın derinliği ise 0,1 mm'dir.



Şekil 1. Neubauer Lamı

**Lökosit Sayımı:**

Lökosit sayısı hesaplanırken aşağıdaki formüle göre hesaplama yapılır.

- İncelenecek örnek lökosit açısından yoğun bir örnek ise uygun sulandırma çözeltisi ile sulandırılmalıdır. Sulandırma kat sayısı belirlenmelidir.
- Sulandırma yapıldıktan sonra homojen hale getirilen numune Neubauer lamındaki alana bir damla koyulur ve lamel kapatılır.
- Mikroskofta 400 büyütme gücü ile incelenir.
- Dört büyük lökosit sayım alanında sadece birinin sayılması yeterlidir. Sayımın daha sağlıklı olması için 4 büyük alan sayılıp çıkan sayı dörde bölünmesi gerekir.

Aşağıdaki formülle hesaplama yapılır.

$$\text{Lökosit sayısı/mm}^3 = \frac{\text{sayılan lökosit} \times \text{dilüsyon faktörü}}{\text{sayım alanı (mm}^2) \times \text{derinlik (mm)}}$$

Örneğin; 200 kat dilüsyon yapılmış bir kan örneğinde bir lökosit sayma alanında 10 lökosit sayımı yapılmış olsun, buna göre mm<sup>3</sup>'teki lökosit sayısı kaçtır.

Cevap: Bir lökosit sayım alanı 1 mm<sup>2</sup>'dir. Derinlik ise 0,1 mm'dir. Buna göre;

$$\text{Lökosit sayısı} = \frac{10 \text{ lökosit} \times 200}{1 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm}} = \frac{2000 \text{ lökosit}}{0,1 \text{ mm}^3} = 20000 \text{ lökosit/mm}^3$$

#### Eritrosit Sayımı:

Genel olarak lökosit sayımına benzer şekilde sayım yapılır. Tek fark Orta kısımdaki 25 kare sayılarak eritrosit sayımı yapılır. Daha pratik bir yöntem olarak eritrosit sayım alanında beş küçük kare sayılıp 5 ile çarpılabilir. Aşağıdaki formüle göre hesaplama yapılmaktadır.

$$\text{Eritrosit} \frac{\text{sayısı}}{\text{mm}^3} = \frac{\text{sayılan eritrosit} \times \text{dilüsyon faktörü}}{\text{sayım alanı (mm}^2) \times \text{derinlik (mm)}}$$

Örneğin; 100 kat dilüsyon yapılmış bir kan örneğinde beş küçük karede 10 eritrosit sayımı yapılmış olsun, buna göre mm<sup>3</sup>'teki eritrosit sayısı kaçtır.

Cevap: Bir küçük eritrosit karesi 0,04 mm<sup>2</sup>'dir. Beş kare sayıldığı için alan 5 x 0,04 = 0,2 m<sup>2</sup>'dir. 25 karenin sayılması gerektiğinden sayım alanını 5 ile çarpmak gerekmektedir. Derinlik ise 0,1 mm'dir. Buna göre;

$$\text{Eritrosit sayısı} = \frac{50 \text{ eritrosit} \times 100}{1 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm}} = \frac{5000 \text{ eritrosit}}{0,1 \text{ mm}^3} = 50000 \text{ eritrosit/mm}^3$$



Şekil 2. Üstteki pipet eritrosit sayma pipeti, aşağıdaki resimde lökosit sayma pipeti gösterilmektedir.

### UYGULAMA I Eritrosit Sayımı

#### Kullanılacak Malzemeler

Thoma lamı, lamel, kırmızı bocuklu ve üzerinde 0.5,1 ve 101 işaretleri olan eritrosit sayma pipeti ve kırmızı hortumu, Hayem solüsyonu, saat camı, lanset, alkol, pamuk, eldiven ve mikroskop

#### İşlem Basamakları

1. Eritrosit sayımı için kullanılacak malzemeler hazırlanır.
2. Alkol ile cilt temizliği yapıldıktan sonra lanset ile delik açılır.
3. Birinci damla kuru bir pamuk ile alınır.
4. Eritrosit sayım pipetinin ucunu yeni oluşan kan damlasının içine yatay olarak daldırılır.
5. Hava çekmemeye dikkat ederek, bir elinizle pipeti diğeri ile parmağı tutarak 0.5 çizgisine kadar kan çekilir
6. Pipetin ucu kandan uzaklaştırılırken emici kısım da ağzınızdan çıkarılır ve pipet yatay olarak tutulur.
7. Pipetin dış kısmına bulaşan kan silinir.
8. Pipetin 101 çizgisine kadar Hayem solüsyonu (0,5 gr HgCl<sub>2</sub>, 5 gr Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 gr NaCl, 200 ml distile su) çekilir. (Seyreltme katsayısı 200'dür)
  - Kan ve sayım solüsyonunu çekerken hava kabarcığı olmamasına dikkat edilir
9. Pipetin her iki ucunu sıkıca kapatılarak aşağı yukarı çevirmek suretiyle 1-2 dk çalkalayarak eritrositlerin homojen dağılması sağlanır.
10. Thoma lamı üzeri lamelle kapatılır.
11. Pipetteki solüsyonun bir kısmı dışarı akıtılır.
12. Ayım alanındaki lamelin kenarından ufak bir damla eritrosit solüsyonu Thoma lamına aktarılır.
13. Mikroskopta x10'luk büyütmeyle alanı bulduktan sonra x40'lık büyütmeyle sayım işlemi yapılır.

### UYGULAMA II Lökosit Sayımı

#### Kullanılacak Malzemeler

Thoma lamı, lamel, beyaz boncuklu ve üzerinde 0.5, 1 ve 11 işaretleri olan lökosit sayma pipeti ve beyaz hortumu, Türk solüsyonu, saat camı, lanset, alkol, pamuk, eldiven ve mikroskop

#### İşlem Basamakları

1. Kapiler şekilde kan alım aşamaları yukarıdaki uygulamada anlatıldığı şekilde yapılır.
2. Lökosit sayım pipetinin ucunu yeni oluşan kan damlasının içine yatay olarak daldırılır.
3. Hava çekmemeye dikkat ederek, bir elinizle pipeti diğeri ile parmağı tutarak 0.5 çizgisine kadar kan çekilir
4. Pipetin ucu kandan uzaklaştırılırken emici kısım da ağzınızdan çıkarılır ve pipet yatay olarak tutulur.
5. Pipetin dış kısmına bulaşan kan silinir.
6. Pipetin 11 çizgisine kadar Türk solüsyonu (3cc glacial asedik asit, 8cc gentian moru, 300 ml distile su) çekilir. (Seyreltme katsayısı 20'dir)
  - Kan ve sayım solüsyonunu çekerken hava kabarcığı olmamasına dikkat edilir.
7. Pipetin her iki ucunu sıkıca kapatılarak aşağı yukarı çevirmek suretiyle 1-2 dk çalkalayarak eritrositlerin homojen dağılması sağlanır.
8. Thoma lamı üzeri lamelle kapatılır.
9. Pipetteki solüsyonun bir kısmı dışarı akıtılır.
10. Ayım alanındaki lamelin kenarından ufak bir damla eritrosit solüsyonu Thoma lamına aktarılır.
11. Mikroskopta x10'luk büyütmeyle alanı bulduktan sonra x40'lık büyütmeyle sayım işlemi yapılır.

## ÖLÇME ve DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki form, uygulama faaliyetinizin değerlendirilmesi amacıyla hazırlanmıştır. Performansınız aşağıdaki kriterlere göre değerlendirilecektir.

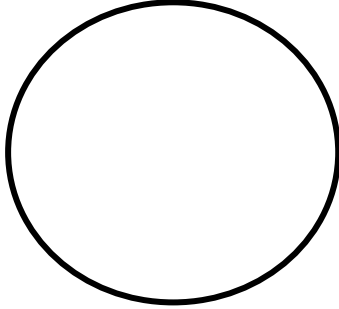
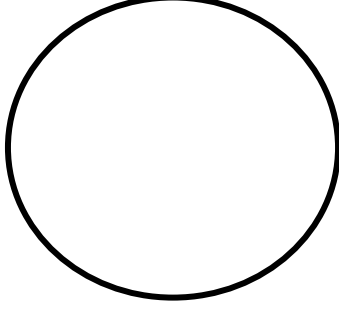
Değerlendirme Kriterleri		Çok iyi	İyi	Orta	Geliştirilebilir
1	Parmaktan kan alımı için cilt antisepsisi yaptı				
2	Lanset ile uygun şekilde parmakta delik açtı.				
3	Eritrosit pipetiyle kurala uygun şekilde kanı aldı.				
4	Eritrosit pipetine Hayem solüsyonunu uygun şekilde aldı.				
5	Lökosit pipetiyle kurala uygun şekilde kanı aldı.				
6	Lökosit pipetine Turk solüsyonunu uygun şekilde aldı.				
7	Mikroskopta eritrosit sayımı yaptı				
8	Mikroskopta lökosit sayımı yaptı				
<b>TOPLAM PUAN</b>					

Aşağıdaki soruların doğru cevaplarını işaretleyiniz.

- 200 kat dilüe edilmiş kan örneğinde 5 küçük karede 100 eritrosit sayıldığına göre  $\text{mm}^3$ 'teki eritrosit sayısı kaçtır?  
A) 10 000      B) 100 000      C) 1 000 000      D) 2 000 000      E) 5 000 000
- Eritrosit pipetiyle alınan kan örneğinden yapılan sayımda 25 küçük karede 200 eritrosit sayıldığına göre  $\text{mm}^3$ 'teki eritrosit sayısı kaçtır?  
A) 40 000      B) 400 000      C) 4 000 000      D) 40 000 000      E) 4 000
- 20 kat seyreltilmiş kan örneğinden bir lökosit sayım alanında toplam 20 lökosit sayıldığına göre  $\text{mm}^3$ 'teki eritrosit sayısı kaçtır?  
A) 2 000      B) 20 000      C) 4 000      D) 400 000      E) 4 000 000
- Lökosit ve eritrosit sayımının yapılabilmesi için mikroskobun büyütme gücü ne kadar olmalıdır?  
A) 10      B) 40      C) 100      D) 400      E) 1000

## LABORATUVARDA YAPILACAK İŞLEMLER

Eritrosit ve Lökosit sayımında mikroskopta gördüğünüz şekilleri çiziniz.

	Eritrosit Sayımı	Lökosit Sayımı
1.		

Eritrosit sayım sonucunun hesaplanması:

Toplam eritrosit sayısı:.....

Lökosit sayım sonucunun hesaplanması:

Toplam lökosit sayısı: .....

Öğrenci Adı Soyadı:

Öğrenci Numarası:

## KAYNAKLAR

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dolaşım Sistemi Ders Kurulu, Kan Pratikleri Laboratuvar Föyü

([https://tipfakultesi.ksu.edu.tr/depo/belgeler/D%C3%B6nem%202.2.komite%20Kan%20Fizyolojisi%20Pratikleri\\_1810301558163494.pdf](https://tipfakultesi.ksu.edu.tr/depo/belgeler/D%C3%B6nem%202.2.komite%20Kan%20Fizyolojisi%20Pratikleri_1810301558163494.pdf))

Demirtaş S, Can M ve Güven B (2014) Tıbbi Laboratuvar El Kitabı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul





**TIBBİ LABORATUVAR TEKNİKLERİ  
UYGULAMA LABORATUVARI  
FÖYLERİ**

**12**

**KAN ALMA**

**Öğr. Gör. Abdulhamit ÇALI**

**DERSİN AMACI**

Maketler üzerinden kan alma işleminin öğrenilmesi

**DERSİN HEDEFLERİ****BİLGİ**

Bu dersi alacak olan öğrenciler;  
Venöz kan alma aşamalarını sıralar.  
Kan alma kurallarını açıklar.

**BECERİ**

Maket üzerinden kan alma işlemini yapar.

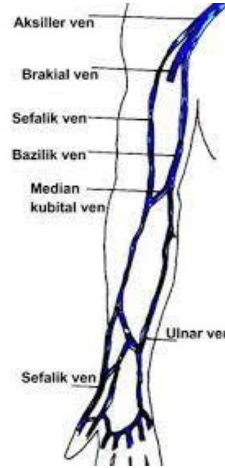
**TUTUM**

Laboratuvara gelirken kurallara uygun olarak giyinir.  
Laboratuvardaki malzemeleri kullandıktan sonra temizleyerek bırakır.  
Laboratuvardan çıkmadan önce ellerini yıkar.

**GENEL BİLGİLER****Venöz Kan Alımı**

Günümüzde kan alma işlemleri rutin ve hızlı bir şekilde gerçekleştirilmesi için vakumlu tüpler ile yapılmaktadır. Venöz kan alım işleminde kan alınacak olan toplar damarların tercih edilme sıralaması vardır. Bu sıralama aşağıdaki gibidir (Şekil 1):

1. Dirseğin büküldüğü yer
  - a. Medyan toplardamar (orta)
  - b. Bazilik toplardamar (iç yan)
  - c. Sefalik toplardamar
2. Önkol
  - a. Sefalik toplardamar
3. Elin üzerinde:
  - a. Dorsal toplardamar











Şekil 1. Toplardamarlar

Bu bölgelerden kan alınmadığı durumlarda hastanın damarlarının en belirgin olduğu yer seçilebilir. İntravenöz tedavi gören hastadan kan alımı olacaksa damar yolunun olmadığı ekstremitte tercih edilmelidir. Bu mümkün olmazsa damar yolu en az iki dakika önce kapatılmalı ve damar yolunun aşağısından başka bir bölgeden kan alınmalıdır. Kan kataterden alınacak ise katater önce izotonik ile temizlenmeli ve ilk beş mililitresi kullanılmamalıdır.

Turnike uygulaması kan alınacak bölgenin 7,5-10 cm üzerinden yapılmalıdır. Eğer damar normal büyüklükte ise kan alma işlemi başladığında çıkarılmalıdır. Turnike uygulaması 3 dakikayı geçmemesine dikkat edilmelidir. Çünkü hemokonsantrasyon nedeniyle bazı test sonuçları etkilenebilmektedir.

Kan alınacak bölge %70'lik alkol ile temizlenmelidir. Antisepsi işleminden sonra deri yüzeyinin kuruması beklenmelidir.

Yine tüplerdeki katkı maddelerinden dolayı bazı testlerin sonuçları etkilenebileceği için kan alma işlemi sırasında tüp sıralaması vardır. Bu tüp sıralaması Şekil 2'de gösterilmiştir.

Kan Alım Hacmi	Renk Kodu	Tüp Çeşidi	Kullanım Alanları	Ters Çevirme	Santrifüj Koşulları
		Kan Kültürü	Anaerobiyin takip ettiği aerobik - eğer her iki kültür şişesi için de yeterli kan yoksa, sadece aerobik olanı kullanın		
1.8 ml 2.7 ml 4.5 ml	 Açık Mavi	Sodyum Sitrata	Koagülasyon çalışmaları için	3 - 4 kez	Devir: 2000 - 2500g Süre 10-15 dakika Sıcaklık: 25°C - Oda Sıcaklığı
1.6 ml 1.8 ml 2.4 ml 5 ml	 Siyah	Sodyum Sitrata ESR	Sedimentasyon çalışmaları için	8 - 10 kez	
2 ml 4 ml 6 ml 10 ml	 Kırmızı	Serum / Plastik	Serum çalışmaları için	5 - 6 kez	Devir: ≤ 1300g Süre 10 dakika Sıcaklık: 25°C - Oda Sıcaklığı
2.5 ml 3.5 ml 5 ml 8.5 ml	 Sarı	SST™ II Advance	Serum çalışmaları için (Jelli)	5 - 6 kez	Devir: 1300 - 2000g Süre 10 dakika Sıcaklık: 25°C - Oda Sıcaklığı
3 ml 4 ml 6 ml 8 ml	 Yeşil	Heparin	Plazma çalışmaları için	8 - 10 kez	Devir: ≤ 1300g Süre 10 dakika Sıcaklık: 25°C - Oda Sıcaklığı
2 ml 3 ml 4 ml 6 ml	 Mor	EDTA	Hematolojik çalışmalar için	8 - 10 kez	
4 ml 6 ml	 Pembe	Cross Match	Cross Match çalışmaları için	8 - 10 kez	Devir: ≤ 1300g Süre 10 dakika Sıcaklık: 25°C - Oda Sıcaklığı
2 ml 4 ml	 Gri	Florür Oksalat, Florür EDTA	Glukoz çalışmaları için Glukoz, Laktat, HbA1c çalışmaları için	8 - 10 kez	Devir: ≤ 1300g Süre 10 dakika Sıcaklık: 25°C - Oda Sıcaklığı
7 ml	 Lacivert	Eser Element	Eser Element çalışmaları için	8 - 10 kez	Devir: ≤ 1300g Süre 10 dakika Sıcaklık: 25°C - Oda Sıcaklığı

Şekil 2. Kan alma sıralaması.

### UYGULAMA I

#### Maketten Kan Alma

#### Kullanılacak Malzemeler

Kan alma maketi, vacutainer (tüp tutamağı), kan tüpü, enjektör, %70'lik alkol

Öncelikle kan alma işlemine başlanmadan önce hastanın en az on beş dakika oturarak dinlenmesi sağlanmalıdır. Hastanın barkodu alınarak istenen testlere göre uygun tüplere etiketlenme yapılmalıdır. Ayrıca hastanın ismi sorularak doğru kişiden kan alındığından emin olunur. Ardından hastanın doğru pozisyonda oturması sağlanır.

#### İşlem Basamakları

1. Kan alımı için uygun bölgenin seçimi yapıldıktan sonra alınacak bölgenin 10-15 cm üzerine turnike bağlanır.
2. Kan alınacak bölgede %70'lik alkol ile antisepsi işlemi gerçekleştirilir.
3. Maket kolu ve bileği düz tutması sağlanır.
4. Vacutainer (Tüp tutamağı)'a uygun iğne takılır.
5. Kol ve seçilen damar kan alacak kişi tarafından sabitlendikten sonra tutamağın sabitlenmesi içinde baş ve orta parmaklar kullanılır.
6. İğnenin kesik ucu üste gelecek şekilde 15-20°C'lik açı ile 1 cm kadar deriye batırılarak damara girilir.
7. Uygun tüp seçilerek diğer elin işaret ve orta parmakları tutamağın kanatları üzerine, başparmağı ise iğne yaparmış gibi tüpün ucuna dayanır.
8. Tüpün kauçuk tıkaçını delecek şekilde iğneye doğru itilir.
9. Tüpe kan alındıktan sonra tüp çıkarılır.
10. Turnike çıkarılır.
11. İğne damardan çekilir ve hemen deliğin üzeri pamuk ya da bası bandı ile kapatılır.
12. Hastaya bu bölgeye birkaç dakika daha bastırması gerektiği söylenir.
13. Tutamağa takı olan iğne kapağı kapatılmadan kesici delici atık kutusuna atılır.

## ÖLÇME ve DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki form, uygulama faaliyetinizin değerlendirilmesi amacıyla hazırlanmıştır. Performansınız aşağıdaki kriterlere göre değerlendirilecektir.

Değerlendirme Kriterleri		Çok iyi	İyi	Orta	Geliştirilebilir
1	Kan alımı için uygun damarı seçti				
2	Kolun uygun yerine turnike yaptı				
3	Kan alınacak bölgenin antisepsi işlemini yaptı.				
4	Tüp tutamağına iğne taktı				
5	Tüp tutamağının iğnesi ile uygun şekilde damara girdi				
6	Tüpü tutamağın içine iterek kan alımına başladı				
7	İşlem bittikten sonra turnikeyi açtı				
8	Pamuk ya da bası bandı ile delinen bölgeye bası uyguladı				
9	Tüp tutamağının iğnesini kapatmadan kesici delici atı kutusuna attı				
<b>TOPLAM PUAN</b>					

Aşağıdaki soruların doğru cevaplarını işaretleyiniz.

- Venöz kan alımı sırasında iğne damara kaç derecelik açı ile girmelidir?**  
A) 1-2                      B) 15-20                      C) 30-45                      D) 50-60                      E) 85-90
- Aşağıdakilerden hangisi venöz kan alımında kullanılan venlerden değildir?**  
A) Medyan toplardamar                      B) Sefalik toplardamar                      C) Bazilik toplardamar  
D) Dorsal toplardamar                      E) Fasiyal toplardamar
- Aşağıdakilerden hangisi vacutainer ile kan alımının avantajıdır?**  
A) Kanla temas edilmez                      B) Küçük damarlara girilebilir                      C) Çok sayıda tüpe kan alınır  
D) İğne batma riski yoktur                      E) Hastalar için rahattır
- I. Mor kapaklı EDTA'lı Tüp  
II. Sarı kapaklı jelli tüp  
III. Siyah kapaklı sitratlı tüp  
Yukarıdaki tüplerin doğru kan alma sıralaması aşağıdakilerden hangisidir?**  
A) III-II-I                      B) III-I-II                      C) II-I-III                      D) II-III-I                      E) I-II-III

## KAYNAKLAR

Demirtaş S, Can M ve Güven B (2014) Tıbbi Laboratuvar El Kitabı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul  
Dokuz Eylül Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Merkez Laboratuvarı, Kan Alma El Kitabı  
<https://hastane.deu.edu.tr/images/tibbi-birimler/merkez-lab/merkez-lab-ek4-v3.pdf>