



Düzenleyenler : Prof. Dr. Gülşen HAŞCELİK
Prof. Dr. Özay ARIKAN AKAN
Uzm. Dr. Dolunay GÜLMEZ KIVANÇ
Editör : Prof. Dr. Dürdal US

Program

SAAT	KONU	ÖĞRETİM ÜYESİ
09.00 - 09.15	Açılış, Tanışma, Kursun Tanıtımı ve Amacı	Dr. G. Haşcelik
09.15 - 10.00	Gram Boyama: Klinik Kullanım ve Sınıflamalar	Dr. Ö. Arkan Akan
10.00-10.30	ÇAY-KAHVE ARASI	
10.30 - 11.15	Solunum Yolu Örneklerinin İncelenmesi: Balgam, Bronkoalveoler Lavaj ve Trakeal Aspiratlar	Dr. Ö. Arkan Akan
11.15 - 12.00	Steril vücut sıvılarının incelenmesi: BOS, Periton, Plevra ve Eklem Sıvıları	Dr. D. Gülmez Kivanç
12.00 - 13.00	YEMEK ARASI	
13.00 - 14.00	Gram Boyamada Otomasyon: Genel Bilgi ve Demonstrasyon	Bio-Merieux
14.00 - 14.30	Yara Örneklerinin İncelenmesi: Derin ve Yüzeysel Yara Örnekleri	Dr. Ö. Arkan Akan
14.30 - 15.00	Genitoüriner Sistem Örneklerinin İncelenmesi: Vajinal ve Üretral Akıntılar	Dr. D. Gülmez Kivanç
15.00 - 15.30	ÇAY-KAHVE ARASI	
15.30 - 16.00	Günlük Çalışmalardan Seçilmiş Örnekler : Kursiyerlerin katılımıyla çeşitli klinik preparatların tartışılması	Dr. G. Haşcelik Dr. Ö. Arkan Akan Dr. D. Gülmez Kivanç
16.00 - 16.30	Görüş ve Temenniler, Kurs Sertifikalarının Dağıtılması, Kapama	Dr. G. Haşcelik

Konuşmacı Slaytları

Gram Boyama Klinik Kullanım ve Sınırlamalar

Prof. Dr. Özay ARIKAN AKAN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
İbni Sina Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Lab.



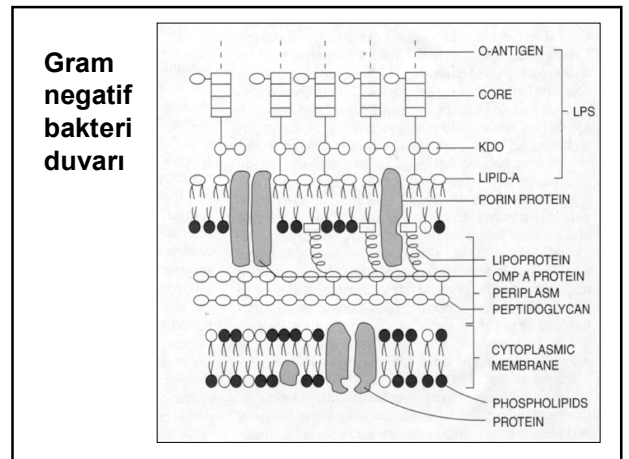
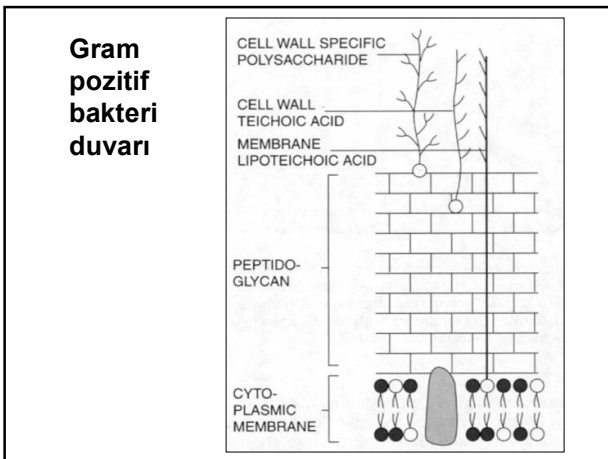
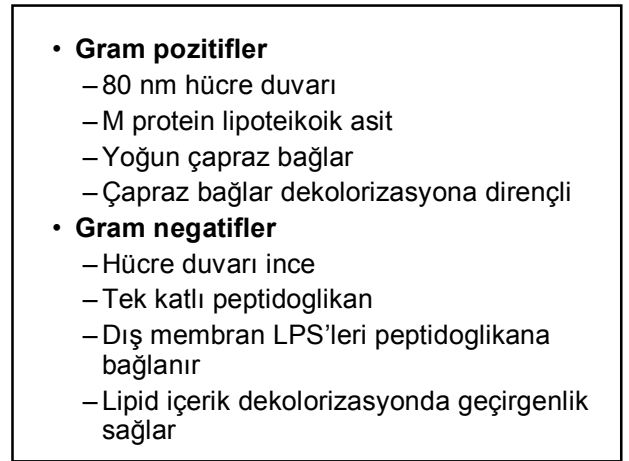
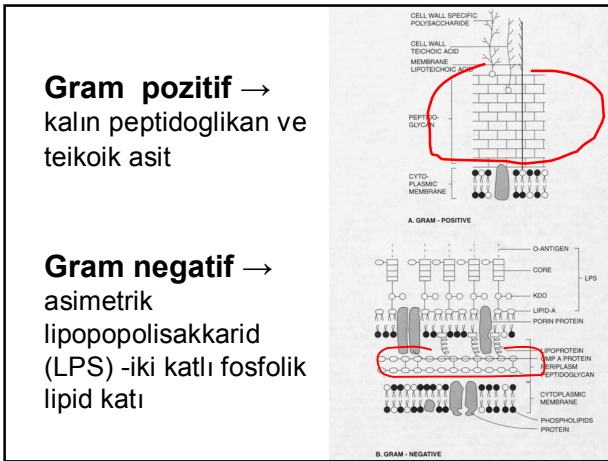
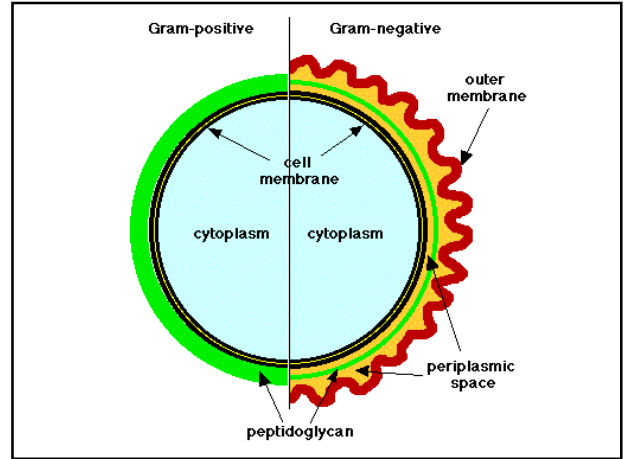
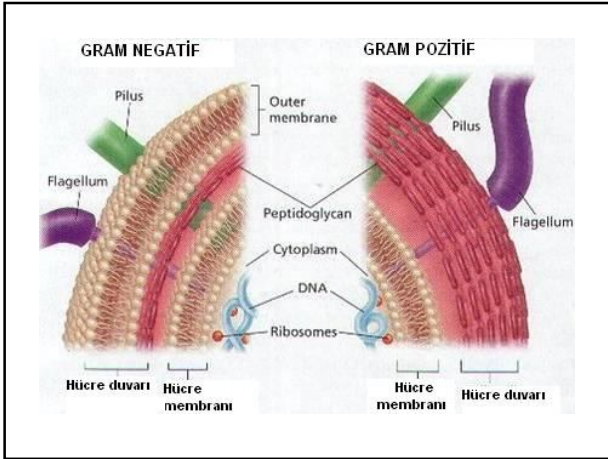
Hans Christian Gram
1884

Huckers modifikasyonu
1921

Neden Gram boyama?

- Hızlı, ucuz tanı
- Etken hakkında fikir verir- ön tanı (Gram reaksiyonu, biçim, büyüklük, morfoloji)
- Uygun antibiyotik seçimi
- Uygun besiyeri seçimi?
- Örnek kalitesini belirler.

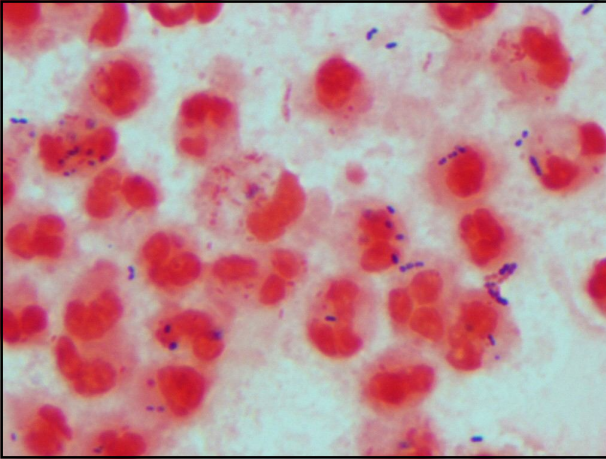
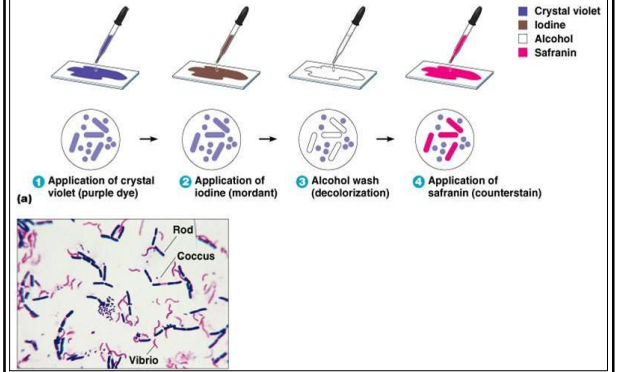




Gram boyama: Uygulama



Gram boyama yöntemi



Gram boyama- değişkenler

- Yayma hazırlanması
- Tespit
- Boya çözeltileri
- Kurulama
- Boyama yöntemi (zaman)
- Örneğin durumu...

Örneğin boyaya hazırlanması- yayma

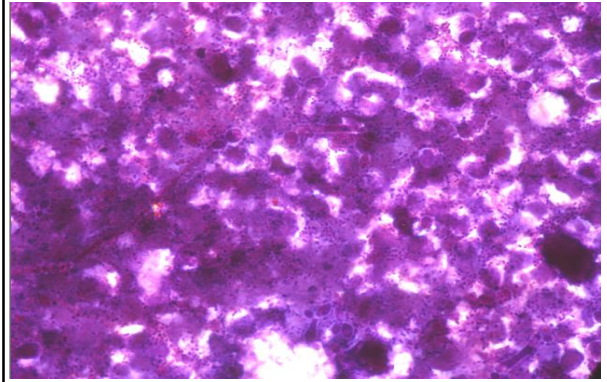
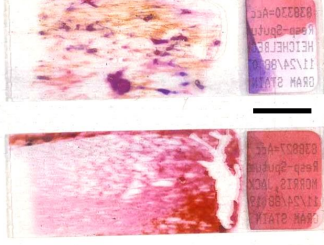
- Materyalin uygun kısmının yayması
- Pürülan kısım, en katı ve sert kısım → en uygun kısım
- Pamuklu çubuk → artefakt
- Taze üreme ve örnek ideal



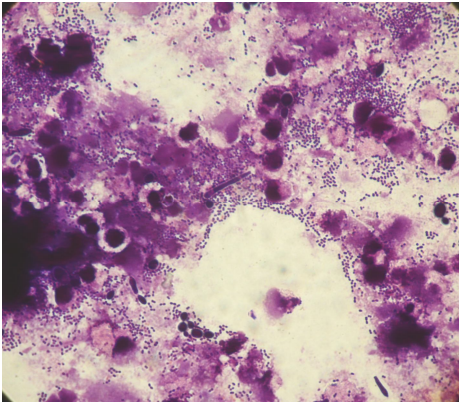
Yayma hazırlanması

- İnce/kalın yayma
- Eküvyonu döndürme
- Damlatma
- Sitosantrifüj
- Dokundurma (değdirme)
- İki lam arası ezme
- Biyopsi – kıyma

Amaç: Tek sıra hücre eldesi



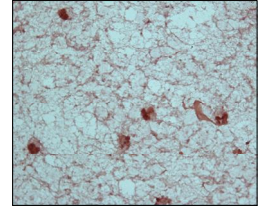
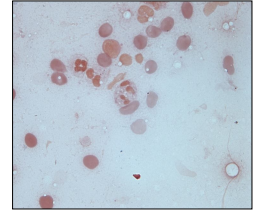
Kalın yayma örneği



İncelemeye uygun alan aranması

Tespit

- Metanol
 - Konak hücreleri daha iyi
 - Zemin daha temiz
- Isı → Alev-ısıtıcı tabla
 - Fazla olursa hücre yapısı bozulur, bu da çok dekolorizasyona yol açar



Ayıraçlar

- Dekolorizasyon
 - Alkol (%95 etanol)
 - Aseton-alkol
 - Aseton
- Kristal viyole ve iyot çözeltileri
- Karşıt boyama-
 - safranin, bazik fuksin, karbol fuksin

Gram değişken

- | | | |
|--|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">• <i>Actinomyces</i>• <i>Aerobacter</i>• <i>Corynebacterium</i>• <i>Propionibacterium</i> | } | <ul style="list-style-type: none">• Hücre duvarları bölünme esnasında kırılabilir olup gram pozitif bakteriler gram negatif boyanabilir |
| <ul style="list-style-type: none">• <i>Bacillus</i>• <i>Clostridium</i> | } | <ul style="list-style-type: none">• Kültürlerinde veya üreme sırasında PG kalınlığı değişir, gram negatif görülebilir. |

Zayıf boyanan gram negatif bakteriler

- Anaeroblar
- *Legionella*
- *Bacteroides*
- *Fusobacterium*
- *Brucella*
- Çözüm→ karşıt boyama için bazik fuksin veya karbol fuksin

Gram boyada nelere bakmalı?

- Teknik uygun mu?
- Nereden alınmış?
- En iyi değerlendirme alanı nedir?
- Örnek kalitesi nasıl?
- Patolojik hücre/yapılar var mı?
- Mikroorganizma var mı, ne ile uyumlu?

Kalite kontrol

- Kalite kontrol izolatu
- Sonuçların kültür uyumu ile izlenmesi
- Slaytların tekrar bakılmak üzere saklanması
- Klinik tablo ile uyum

Gram (+) Kültür (-) ise

- Malzemelerin kontaminasyonu
- Antibiyotik kullanımı
- Özel koşullarda üreyen mikroorganizmalar

Kültür (+) Gram (-) ise

- Uygunsuz örnek alımı
- Yetersiz Gram boyama (yöntem hatası)
- Uygun olmayan değerlendirme
- Numara karışıklığı (laboratuvar hatası)
- Az sayıda mikroorganizma olması

Gram Boyamada Sayım

- **NADİR (1+)**
 - Tüm alanlarda < 10
 - **AZ SAYIDA**
 - Tüm alanlarda > 10 , ancak tek bir inceleme alanında < 1
 - **ORTA (2+)**
 - 1-25/alan
 - **YOĞUN (3+)**
 - > 25/alan
- Klinik olarak fark?

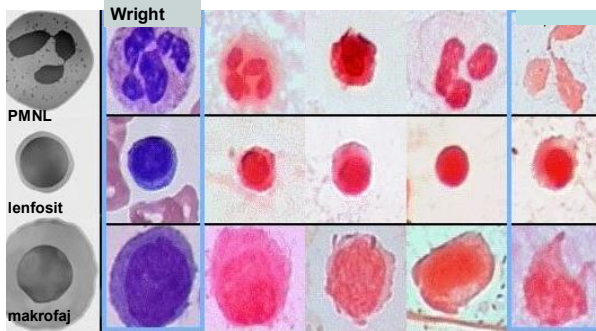
Gram nereye kadar (yorumda) önemli

- Mikroorganizma harici hücreler
- Morfolojik inceleme – sınırları

Gram boyamadaki ekstra morfolojiler

- Beyaz küre (polimorfonükleer lökositler)
- Alveolar makrofajlar
- Epitel hücreleri (yassı/kolumnar)
- Elastin/kollajen lifler
- Curschmann spiralleri
- Corpora amylacea
- Hücre nekrozu
- Hücre içi mikroorganizmalar
- “Antibiyotik” etkisindeki bakteriler
- Kristaller
- Charcot-Leyden Kristalleri
- Solunum tedavileri

Gram boyamada çeşitli hücre görünümleri



Örnek tipine göre Gram değerlendirme

- Örnek steril ise (varsayım)
 - PMNL
 - Mikroorganizma
 - > 3 adet tipik morfoloji görmeden bildirim yapılmamalı
- Örnek steril değil ise
 - PMNL
 - Sadece potansiyel patojen ise mikroorganizmalar tanımlanır
 - Normal flora/ patojen oranı önemli

Otomatize/ yarı otomatize sistemler

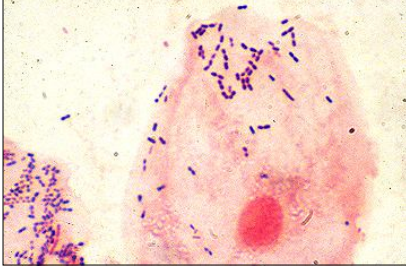


Solunum Yolu Örneklerinin Gram Boyası ile İncelenmesi

Prof. Dr. Özay ARIKAN AKAN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
İbni Sina Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Lab.

52 yaşında erkek hasta, ateş, öksürük ve balgam şikayetleri ile başvuruyor.

Tanınız nedir?



Alt solunum yolu infeksiyonları mikrobiyolojisi

- **Tanı** (taklitçi klinik durumlar)
- **Etkenin Tespiti** (klinik/radyolojik bulgular etkene özgül değil)
- **Tedavi Başarısı** (atipik m.o, alışılmış bakterilerde antibiyotik direnci)
- **Epidemiyolojik verilerin toplanması**

Solunum yolu örnekleri

- **Nazofaringeal sürüntü ve aspiratlar**
– Viral infeksiyon, *M.pneumoniae* ve *Chlamydia* tanılarında
- **Balgam**

Balgamın uygun toplanması

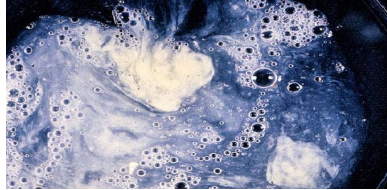
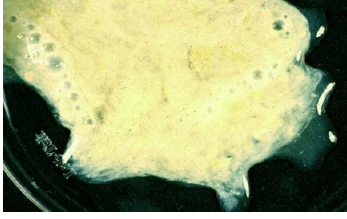
- Tükrük değil balgam istiyoruz!
- Diş protezleri çıkarılacak
- Ağız su ile çalkalanacak
- Steril bir kaba derin bir öksürük ile örnek verilecek (bir defada)
- 2 saat içerisinde laboratuvara gönderilecek
- Laboratuvarda pürülan kısımdan yayma yapılır

Normal flora

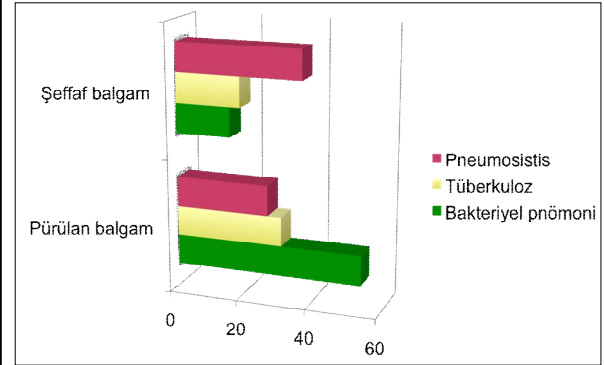
- Oral kavitede 500-700 çeşit bakteri ve maya vardır.
- Üst solunum yolu büyük miktarlarda aerobik, anaerobik bakteri, maya ve virüs barındırır.
- Sağlıklı erişkinlerde sublingual bakteriyel kolonizasyon minimaldir.
- Entübasyon ve kronik akciğer hastalığı alt solunum yollarının bakteriyel kolonizasyonuna yol açar.

Orofaringeal Flora

- **Sağlıklı erişkin:**
 - Viridans streptokoklar
 - Beta-hemolitik streptokoklar
 - *S. aureus*
 - *Haemophilus* spp.
 - *S. pneumoniae*
 - *Moraxella catarrhalis*
 - Anaerobik bakteriler (*Fusobacterium* spp., *Actinomyces israelii*)
 - Mayalar
 - Virüsler
- **Hastanede yatan hastalar:**
 - *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter* spp.
 - *Pseudomonas* spp.
 - *Candida* spp.



<http://www.fletcherallen.org>

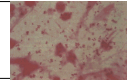


Yayma materyali lamalar arasında ezerek hazırlanır.



<http://www.fletcherallen.org>

Standart balgam incelemesi Gram boyama ve kültür



- **Avantajları**
 - KOLAY
 - HIZLI
 - UCUZ
- **Dezavantajları**
 - Balgam çıkaramama
 - ÜSYF BULAŞI (%20-25)
 - Bazı m.o.lara yetersiz
 - İncelemesi uzmanlarca

- Duyarlılık (%65-80) ve özgüllüğü (%90) iyidir
- AB kullanımı ile duyarlılık azalır (%25-60)
- Uygun örnek- uygun transport
- Red kriterleri
- *P.jirovecii*, *M.tuberculosis* ve bazı bakteriler için indüklenmiş balgam örneği
- İmmün süprese hastalar entübe ise endotrakeal aspirat spontan balgam yerine geçer.

Pnömoni tanısında invazif yöntemler

Bronkoskopik

- Standart bronş lavajı
- BAL
- PSB (korunmuş fırça ile örnekleme)

Non-bronkoskopik

- Trakeal / transtrakeal aspirasyon
- Kör korunmuş fırçalama
- Kör korunmuş bronş lavajı
- Teleskopik kateterle distal hava yolu aspirasyonu
- Biyopsi (kapalı plevra, transtorasik, torakoskopik ve torakotomik)

İnvazif yöntemler

Avantajları

- Distal hava yollarına ulaşır
- Duyarlılık ve özgüllük yüksek?
- Kantitatif kültürler ile tanısal standardizasyon sağlar

Dezavantajları

- Uygulama zorluğu
- Pahalı
- Lokal anesteziğin antibakteriyel etkisi var
- Endikasyonları kesin değil
- Tekrarlanabilirliği ? (sınır değerlere dikkat)
- İyatrojenik enfeksiyonlar

Bronkoskopik Örnekler

- Trakeal veya endotrakeal aspiratlar → balgam gibi değerlendirilir (red>10 EP/LPF)
- Bronşiyal yıkama (aynı)
- Bronşiyal fırçalama (Korunmuş fırça ile örnekleme)
- Bronkoalveolar lavaj (BAL)
- Transbronşiyal biopsi/Transbronşiyal iğne aspirasyonu

Hangi durumlarda?

- Hastanede yatan ciddi pnömoni hastalar
- İmmün yetmezlikli hastalar
- Ventilatöre bağlı pnömoni gelişen hastalar

Örnek tipleri - mikroorganizma izolasyonları

Örnek	Maliyet	Bakteri	P.jirovecii	M.tbc	CMV	Aspergillus
Kan	Düşük	+1	0	0	+1	0
Balgam	Düşük	+3	+2	+3	0	+1
Trakeal aspirat	Düşük	+2	+2	+3	0	1
PSB	Yüksek	+4	0	0	0	0
Non - bronkoskopik BAL	Orta	+4	+2	+3	0	+2
BAL	Orta	+4	+4	+4	+3	+2
TBB	Yüksek	0	+	+3	+3	+3
CAB	Çok yüksek	0	+4	+4	+4	+4

Sorunlar:

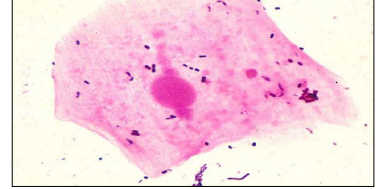
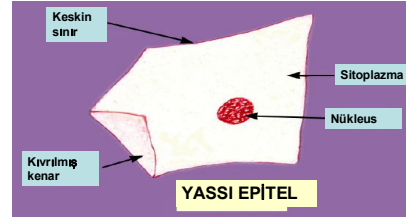
- Üst solunum yollarından geçerken kanalın kontaminasyonu
- Yoğun topikal lidokain kullanımı bakteri üremesini baskılayabilir.
- Alveole verilen ve alınan sıvı miktarı

Gram boyamada patolojik kabul edilen yapılar

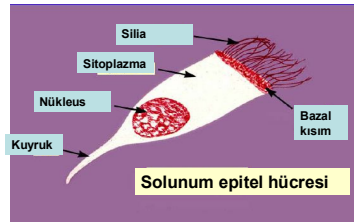
- PMNL
- Alveolar makrofajlar
- Yassı epitel hücreleri
- Elastin/kollajen lifler
- Curschmann spiralleri
- Corpora amylacea
- Hücre nekrozu
- Hücre içi bakteri veya maya
- Charcot-Leyden kristalleri
- Respiratuvar tedavi

Solunum yolu hücresel elemanları

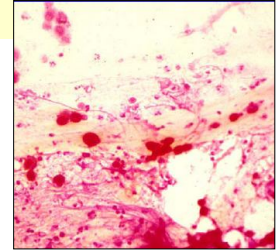
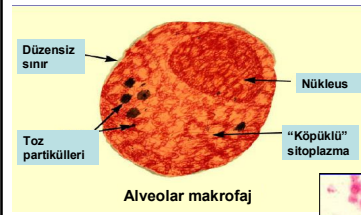
- Yassı epitel hücresi
- Respiratuvar epitel hücresi
- PMNL
- Mononükleer hücreler
- Alveolar makrofajlar



<http://www.fletcherallen.org>



<http://www.fletcherallen.org>

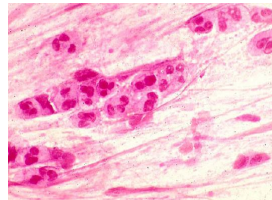


<http://www.fletcherallen.org>

Alveolar makrofajların özellikleri

- Yassı epitelden küçük, PMNL'den büyüktür.
- Sitoplazma yoğun, hücre kenarları düzensiz
- Nükleus bir tarafta yerleşmiş
- Hafif turuncu bir renk değişimi
- İçinde siyah toz partikülleri veya kahverengi hemosiderin olabilir
- Yaymalardaki varlığı, alt solunum yolu infeksiyonunu gösterir

Polimorfonükleer lökositler



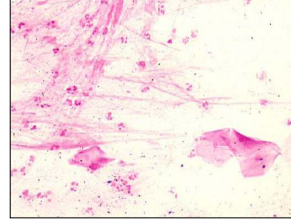
Multilobar nükleus, granüler sitoplazma ve bazen fagosite edilmiş bakterilerle karakterizedir.

- İltihap hücreleri olarak bilinir.
- Diğer hücreler gibi solunum yollarında normal koşullarda bulunmaz.
- İnflamatuvar duruma (bakteriyel inf.) yanıt olarak bölgede toplanırlar.

Mononükleer hücreler

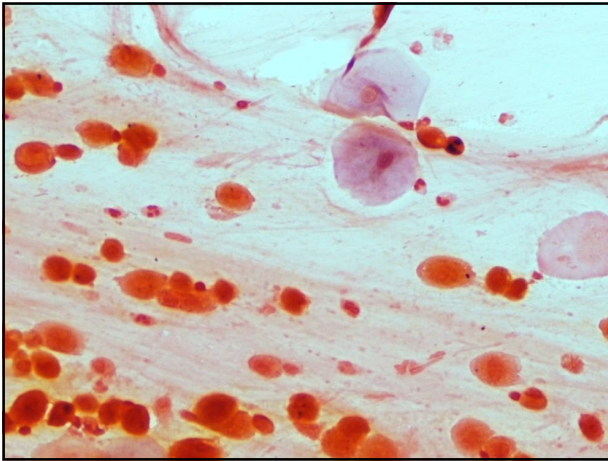
- Tek nükleuslu küçük hücrelerdir
- En sık görülen lenfositlerdir
- Varlıkları bazı kronik inflamatuvar durumları, viral enfeksiyonları ve bazı bakteriyel enfeksiyonları düşündürür.

Hücre dışı yapılar- mukus



- Bronşlardaki goblet hücrelerinden salgınır.
- Doku üzerinde bir kat oluşturur.
- Akciğerin normal savunma mekanizmalarındandır.
- Yabancı cisimleri uzaklaştırır.
- Birçok hastalık durumunda yapımı artar ve hücrelerle birlikte 'balgam'ı oluşturur.

<http://www.fletcherallen.org>



Hücrelerin sayımı

Küçük Büyütme ile (LPF):

1- 9 /alan → Az
10-25 /alan → Orta düzeyde
>25 /alan → Yoğun

Bakterilerin sayımı

Büyük Büyütme ile (immersiyon objektifi):

Her 1-10 alanda 1 → Az
>1- <50 /alan → Orta düzeyde
>50 /alan → Yoğun

LPF: Low Power Field

<http://www.fletcherallen.org>

Örnek alımında kalite

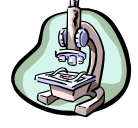
- Segmentli nötrofiller (PMNL) → inflamasyon/enfeksiyon göstergesi
- Yassı hücreli epiteller → yüzeysel kontaminasyon
- Gram boya ile örnek kalitesi belirlenir.

Balgamın değerlendirme kriterleri

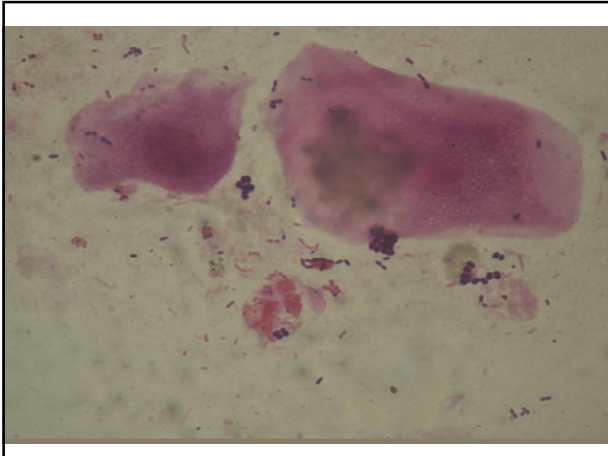
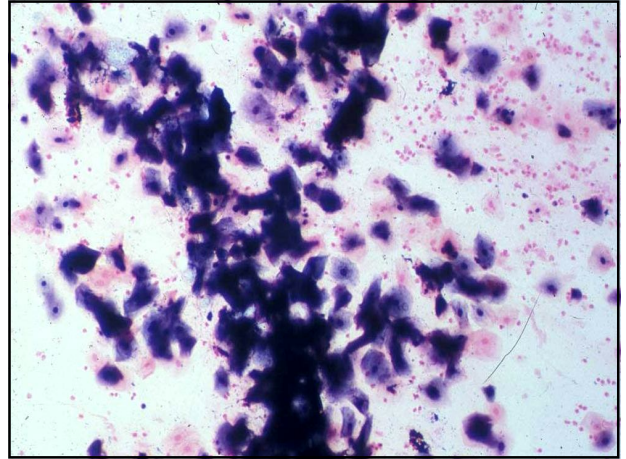
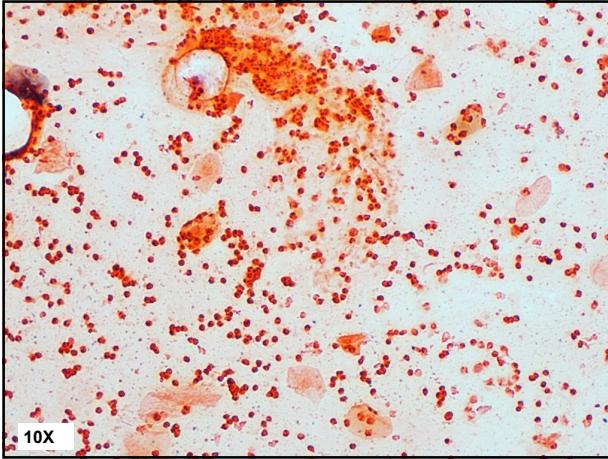
	PMNL (X10)	Epitel (X10)	Gram m.o (X100)
Kalitesi yüksek	>25	<10	>10/alan
Sınırdaki	>25	>10	>10/alan
Kalitesi düşük	<25	>10	(-)

Red Kriterleri

- Legionella, ARB ve kistik fibrozlu hastaların örnekleri kültür için red edilmez.
- Red kriterleri uygulanırken rapora not düşülmelidir. Örn:
“ > 10 EP/ LPF saptanmıştır, örneğin tükürük ile kontaminasyonu düşünüldüğünden kültür yapılmamıştır”
- Kültürün değil sadece yaymanın ücreti hastadan alınmalıdır.
- QA: Aylık gelen ve reddedilen balgam sayısı izlenmelidir.



- BAL
 - Mikroskopi
 - >%1 epitel hücresi → kontaminasyon
 - Bakteri içeren PMNL oranı %5 → pnömoni için spesifik
- Trakeal aspirat
 - Mikroskopik inceleme
 - Epitel hücresi > 10 /LPF (10X)



Kültürde üreme olmama nedenleri-1

- Antibiyotik kullanımı
- Lokal anesteziklerin fazla kullanılması
- Yetersiz materyal alımı
- Bakteriyolojik teknikte hatalar (taşıma, saklama, ekim, kültür değerlendirme)
- Standart kültürlerde üremeyen ajan ile gelişen infeksiyon (*Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Legionella* gibi)

Kültürde üreme olmama nedenleri-2

- Anaerobik infeksiyon
- *Mycobacterium* inf. (%1-2)
- İnfeksiyonun çok erken dönemde olması
- Pnömoniye taklit eden infeksiyon dışı bir patoloji

Kan Kültürü ve Steril Vücut Sıvılarının Gram Boyası ile İncelenmesi

Uzm. Dr. Dolunay GÜLMEZ KIVANÇ
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Steril vücut sıvıları

- Kan kültürü (şişeleri)
- BOS
- Eklem sıvısı
- Plevral sıvı
- Peritoneal sıvı
- Perikardiyal sıvı
- Cul-de-sac sıvısı
- Amnion sıvısı
- Vitreus
- Safra
- Gram boyamada PMNL görülebilir, ancak sıklıkla mikroorganizma görülmez
- Mikroorganizma miktarı çok az
- Örnek hacminin artırılması, santrifüj edilmesi...
- Artefakt?

Kan kültürü şişeleri

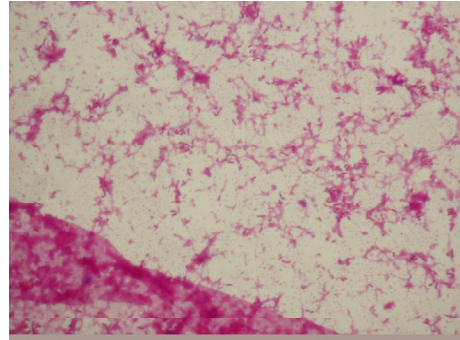
- Kan kültürü şişelerinde Gram boyamanın değeri
 - 5893 tek morfotip içeren kültür
 - Duyarlılık: %91.3 - 99.7
 - Çok görülen türler %91.3 - 100
 - En düşük non-hemolitik streptokoklar %86.2 - 94.9
 - Özgüllük: %98.9 - 100
 - Pozitif prediktif değer: %94.6 - 100
 - Negatif prediktif değer: %99 - 100

Søgaard M , et al. J Clin Microbiol 2007; 45:1113

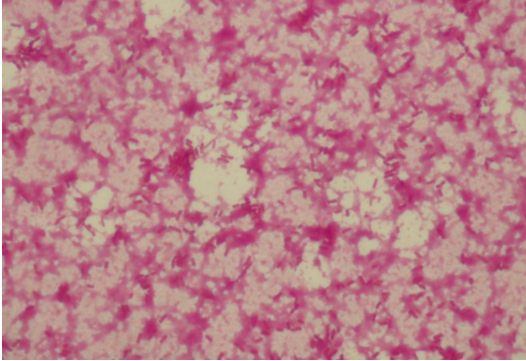
Kan kültürü şişelerinden örnek hazırlanması

- Şişeden bir damla lam üzerine konur ve yaklaşık 1 cm çapında olacak şekilde yayılır.
- Kömür içeren kan kültürü şişelerinde, bir damla lam üzerine konduktan sonra 30 saniye kömür parçacıklarının çökmesi beklenir. Sonrasında lam 45 derece eğilerek üstteki kömür partikülü içermeyen kısım yan tarafa atılır.
- Lam üzerindeki örnek kuruduktan sonra tespit edilerek boyanır.

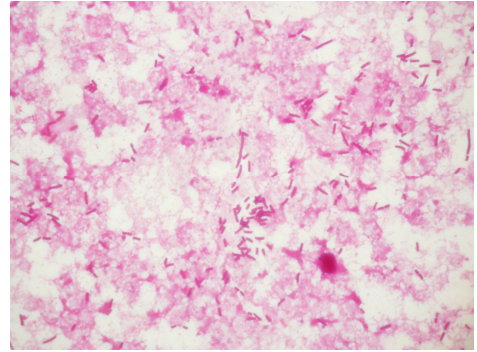
Kan kültürü (Gram boyama)



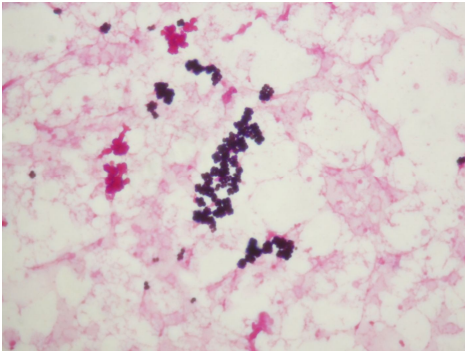
Kan kültürü (Gram boyama)



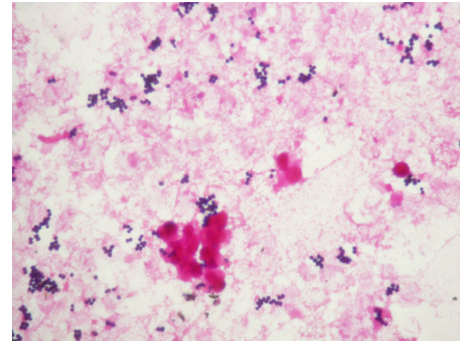
Kan kültürü (Gram boyama)



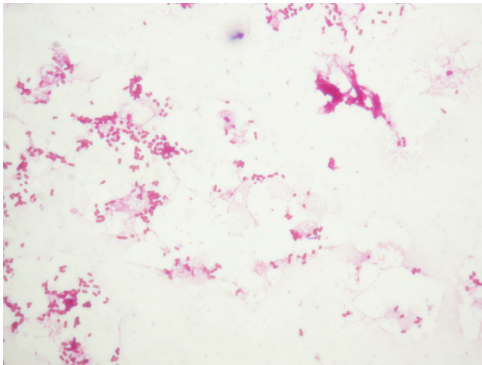
Kan kültürü (Gram boyama)



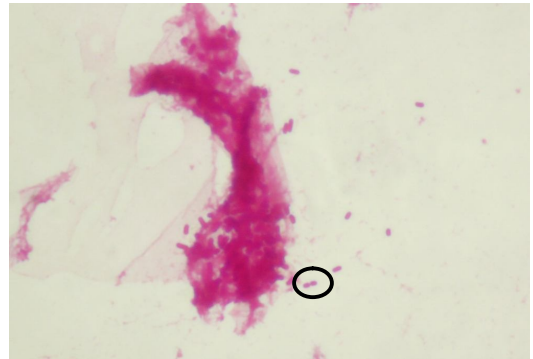
Kan kültürü (Gram boyama)



Kan kültürü (Gram boyama)

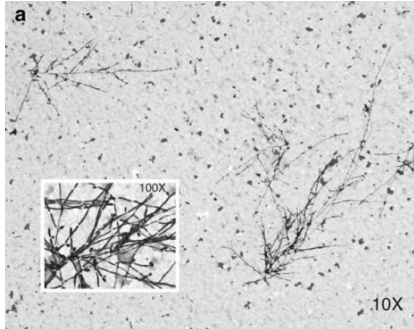


Kan kültürü (Gram boyama)



Kan kültürü (Gram boyama)

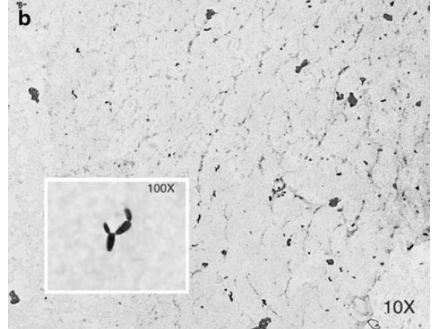
Candida albicans



Harrington, Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002;26:325

Kan kültürü (Gram boyama)

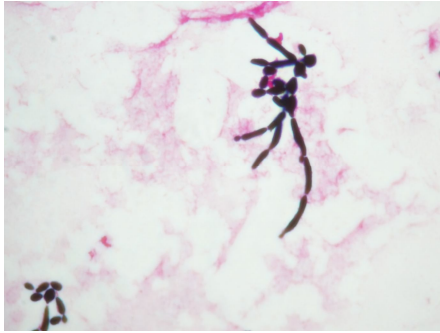
Candida glabrata



Harrington, Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002;26:325

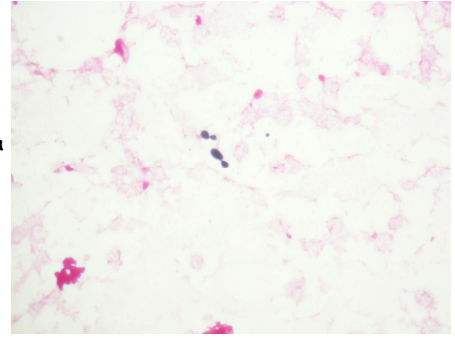
Kan kültürü (Gram boyama)

Candida albicans
olasılığı çok
yüksek



Kan kültürü (Gram boyama)

Candida spp.
albicans veya
non-albicans
olabilir.



Kan kültürü şişeleri

- Hatalar: %0,7
 - Acinetobacter → gram pozitif
 - Bacillus → gram negatif
 - Clostridium → gram negatif
 - Karışık enfeksiyonlarda bir morfolopinin görülmemesi
 - %50 gram negatif basil görülmemiş
 - %50 gram pozitifler görülmemiş

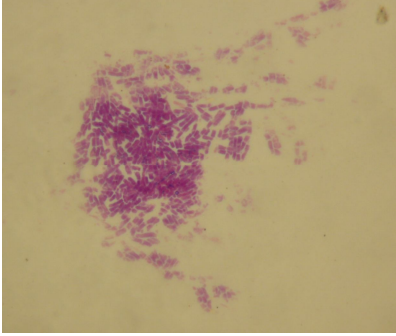
Rand, AJCP 2006; 126: 686

Gram (-) basil gibi görünen *Bacillus*

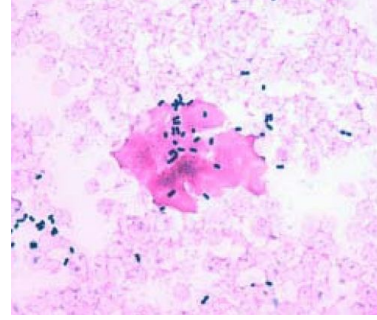


Rand, AJCP 2006; 126: 686

Gram (-) basil gibi görünen *Clostridium*

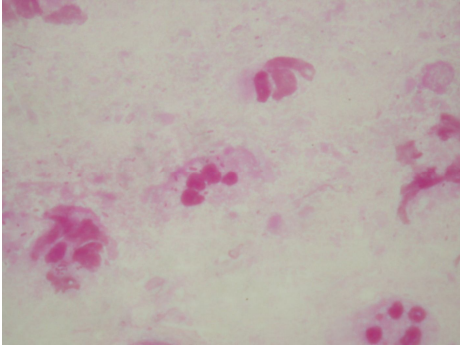


Gram (+) kok gibi görünen *Acinetobacter*



Rand, AJCP 2006; 126: 686

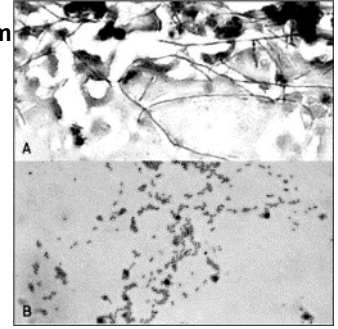
Gram (-) kok gibi görünen pnömokok



Antibiyotik altında bakteri morfolojisi

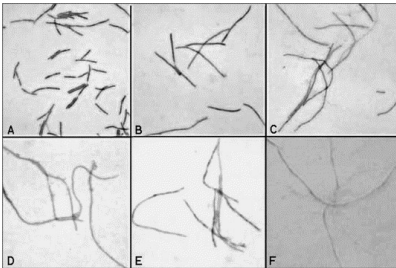
**Piperasilin/tazobaktam
altında *Serratia*
morfolojisi**

**A.Kan kültürü şişesi
B.Şişeden çikolata
agara pasaj**



Healy, Clin Micro Newsletter 2007;29

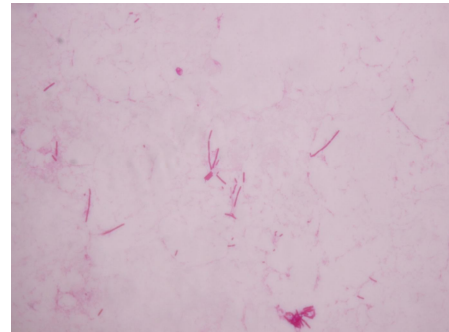
Antibiyotik altında bakteri morfolojisi



**PTZ altında *Serratia* morfolojisi: Başlangıçtan
sonraki 24 saat**

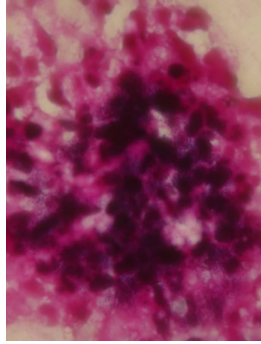
Healy, Clin Micro Newsletter 2007;29

Antibiyotik altında bakteri morfolojisi

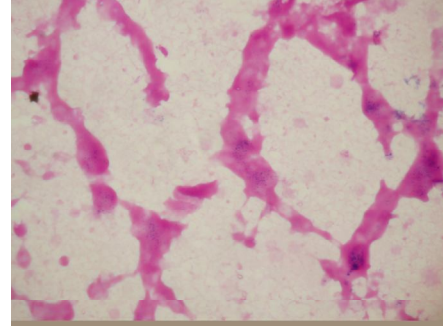


Yanlış pozitif kan kültürü: Niye deneyimli bir göz burada pozitif demez?

- İyi dekolorize olmamış, PMNL hala mor
- “Kok” görünümü yalnızca dekolorize olmamış alanlarda
- Karakteristik morfoloji yok
- PMNL varlığında yanlış pozitiflik sık

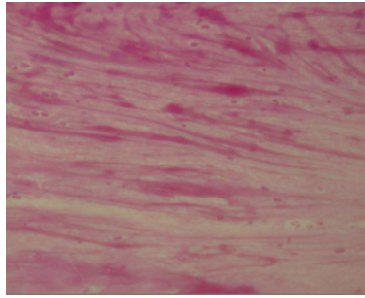


Yanlış pozitif kan kültürü: Niye deneyimli bir göz burada pozitif demez?



Pozitif kan kültüründe Gram boyama duyarlılığı

- Organizmaya bağlı
- Viridans strep. için eşik: 2×10^7
- Enterokok için 7×10^9
- Maya için 5×10^6



Marlowe, J Clin Microbiol 2003; 41:1266

Kan kültüründen Gram boyasının değerlendirilmesi

- Kan kültüründe her pozitif kültür bildirilmeli mi?
 - İlk kez gram negatif basil görüldüğünde
 - 24 saat içinde pozitif veren şişede ilk kez gram negatif basil görüldüğünde
 - 48 saat?
 - Gram pozitif kok?
- Bilgi fazlalığı olabilir mi?
 - Her pozitifin bildirilmesi
 - “...’e benzeyen” bakteriler

Kan kültüründen Gram boyasının değerlendirilmesi

- Preparat iyi incelenmeli:
 - Birden fazla mikroorganizma
 - Tipik olmayan boyanma
- Her pozitif şişeden mutlaka Gram boyama yapılmalı ve sonuç bildirilmeli, klinisyen için önemli (Cumitech 1C Blood Cultures IV 2005)
- Bildirimlerin kaydı tutulmalı
 - Hasta bilgileri
 - Kan kültürünün numarası ve alındığı tarih
 - Bildirilen kişi, gün ve saat
 - Bildirilen kişinin sonucu yazması ve geri okuyarak doğrulaması önerilmekte

Steril vücut sıvıları

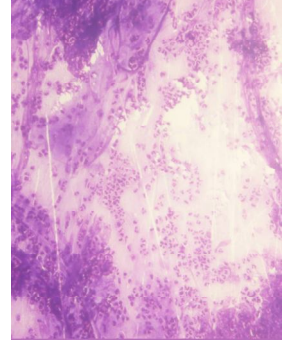
- Steril vücut bölgelerinden alınan örnekler ne kadar sürede incelenmeli?
- Örnek ne kadar taze olursa o kadar iyi

Steril vücut sıvılarından preparat hazırlanması

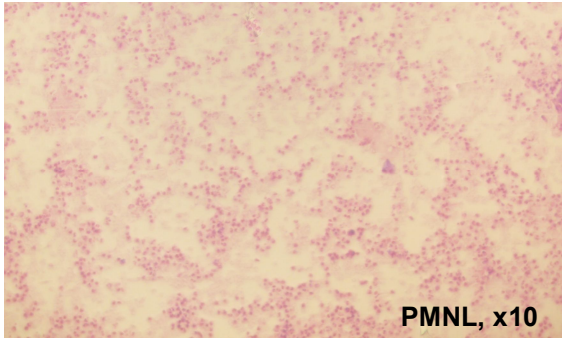
- Mikroorganizma derişimi çok düşük
- Örnek mutlaka santrifüj edilmeli
- 3000 g, 15 dakika
- Santrifüj sonrası dipteki çözültiden çok fazla dağıtmadan preparat hazırlanmalı
- Preparat kuruduktan sonra tespit edilerek boyanmalı

Steril vücut sıvıları

- Neler görülebilir?
 - İnflamasyon hücreleri
 - PMNL
 - MNL
 - Diğer...
 - Epitel hücreleri
 - Mikroorganizmalar

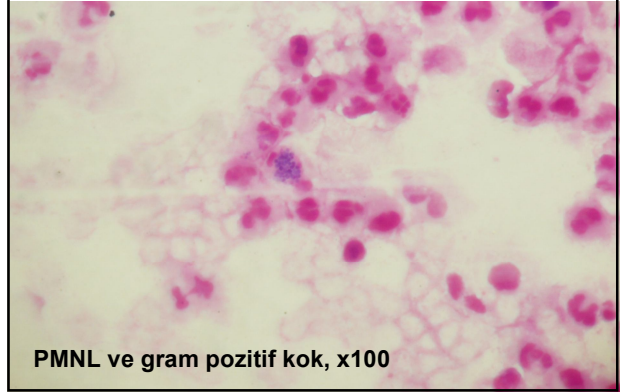


Steril vücut sıvıları



PMNL, x10

Steril vücut sıvıları

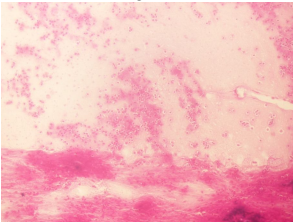


PMNL ve gram pozitif kok, x100

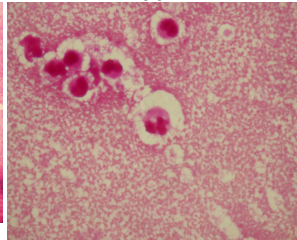
Steril vücut sıvısında bakteri

- Yayma çok kalın ise görünmez

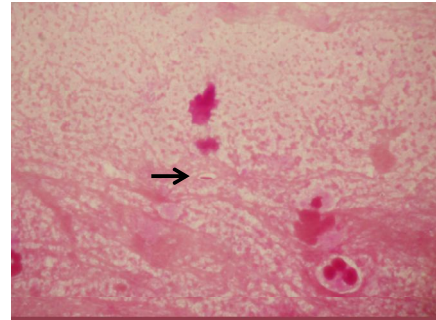
X10



X100

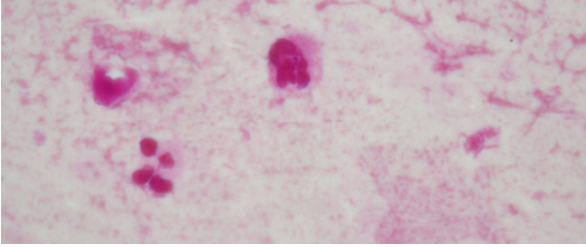


Steril vücut sıvısında bakteri

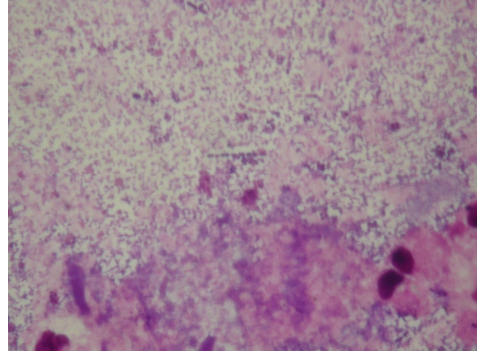


BOS

- Hücre içi gram pozitif kok

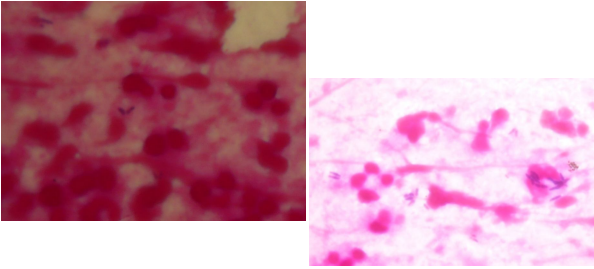


Artefakt ve gram (+) kok



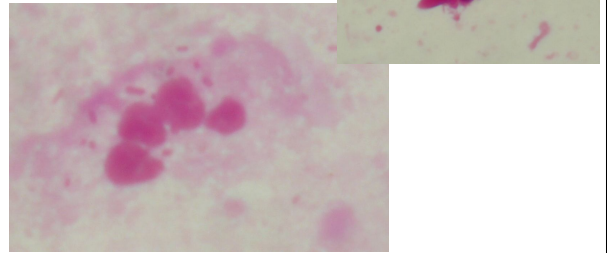
BOS

- Hücre içi gram pozitif basil



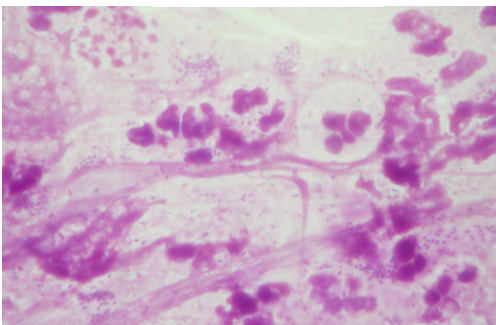
BOS

- Pnömonokok

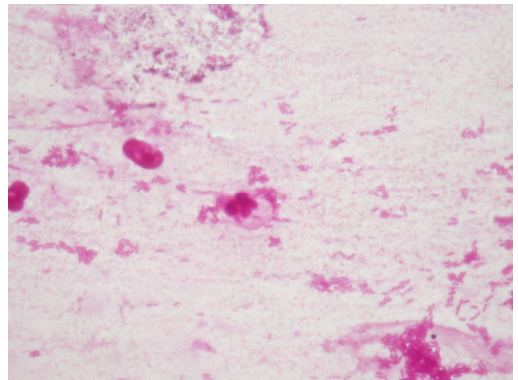


BOS

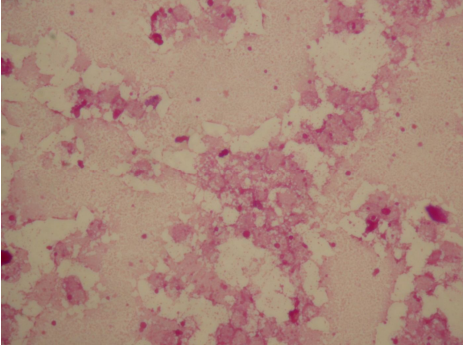
Haemophilus



BOS Hücre içi gram (-) basil

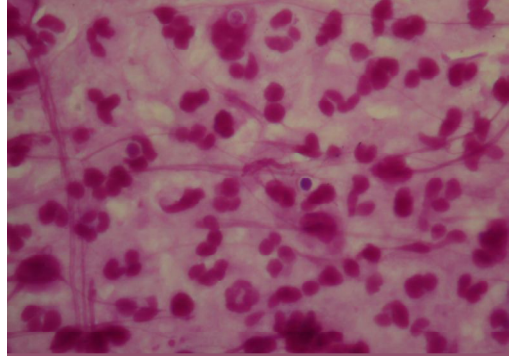


Artefakt

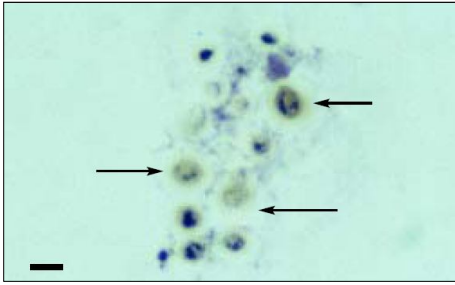


BOS

- Hücre içi maya
- *Cryptococcus*

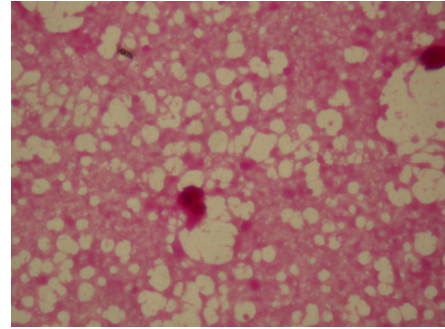


Cryptococcus



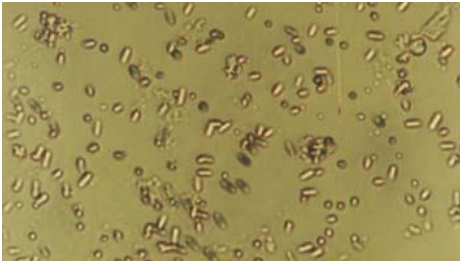
Harrington, Laboratory Medicine 2002;33:609-14

Eklem sıvısı



Safra kesesi sıvısı

- Safra kristalleri, sivri veya yuvarlak uçlu



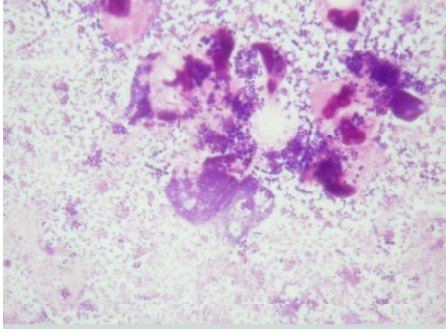
Yang, World J Gastroenterol 2003;9:1791-4

Steril vücut sıvıları: Birden fazla mikroorganizma

- Karışık enfeksiyonlar sorunlu olabilir, bir çeşit bakteri görünce arama bırakılıyor
- Apselede de benzer sorunlar

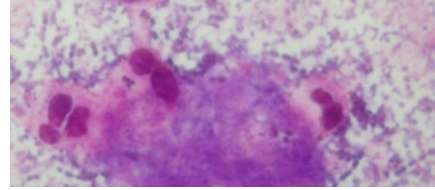


**Steril vücut sıvıları
Birden fazla mikroorganizma**



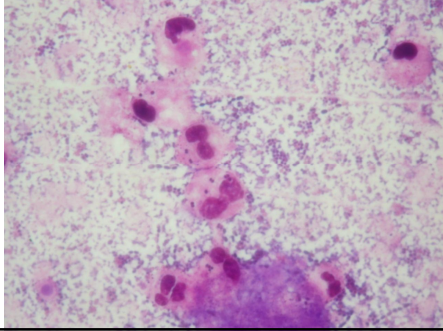
**Plevral sıvıda gram (+) koklar, kültürde
üreme yok**

- Yaymayı yeniden değerlendir: yanlış pozitif mi?
- Kültür yanlış negatif mi? Hasta antibiyotik alıyor mu? Örnek ekilmeden önce fazla beklemiş mi?
- Klinisyenle görüş ve çelişkiyi çözmeye çalış.



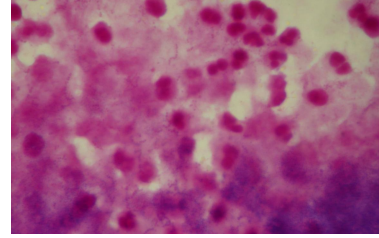
**Plevral sıvıda gram (+) koklar, kültürde
üreme yok**

- Bu hasta antibiyotik alıyor..



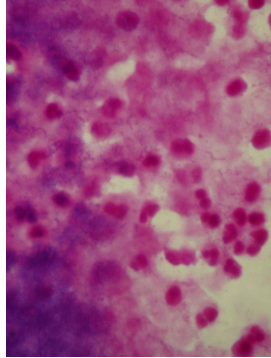
**Yaymada streptokok benzeri görünüm, kültürde
A grubu streptokok**

- Yaymada streptokok benzeri denmiş
- Bir klinisyen bu yoruma güvenmeyeceğini ve ampirik tedaviyi stafilokoku da kapsayacak şekilde düzenleyeceğini bildirmiş.
- Yine de yorum hoşuna gitmiş.

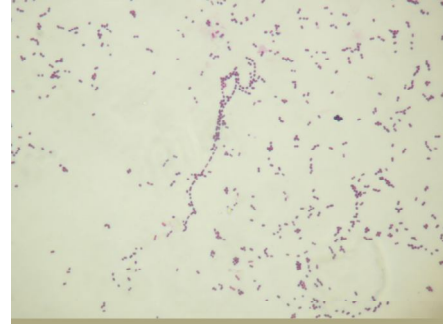


**Yaymada streptokok benzeri görünüm,
kültürde *Aerococcus***

- Yayma sonucu yanlış mı yönlendiriyor?
- "...a benzeyen bakteriler görüldü" ifadesi sakıncalı
- Klinisyen yaymaya ne kadar güveniyor?
- Klinisyen streptokok tedavisine yönelseydi ne olurdu?

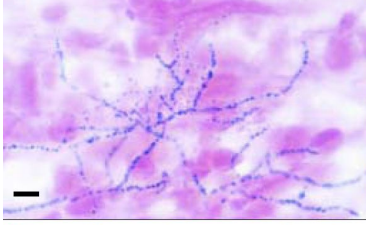


Zincir yapan kok=*Streptococcus*?



**Yaymada streptokok benzeri görünüm,
kültürde *Nocardia***

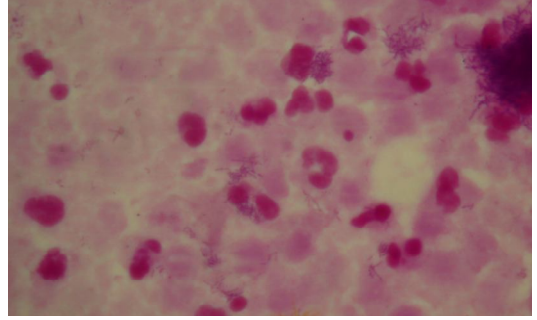
Zincir yapan kok gibi ama irregüler görünüm



[F10] Branching, beaded rods of *Nocardia asteroides* in Gram-stained smear of sputum. (Bar = 5 µm)

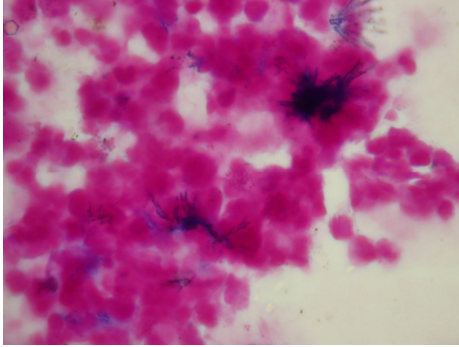
Harrington, Laboratory Medicine 2002;33:609-14

Nocardia

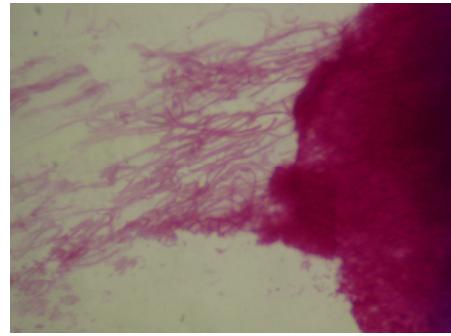


- Gram ile dallanan gram (+) basil, yer yer kötü boyanmış
- Modifiye ARB daha da yönlendirir

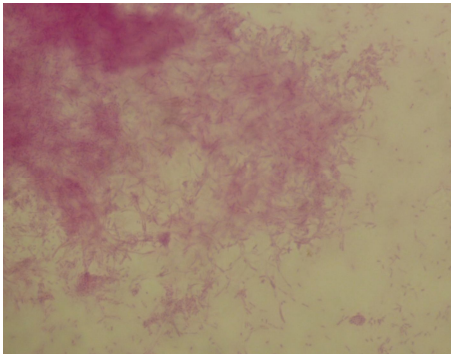
Nocardia



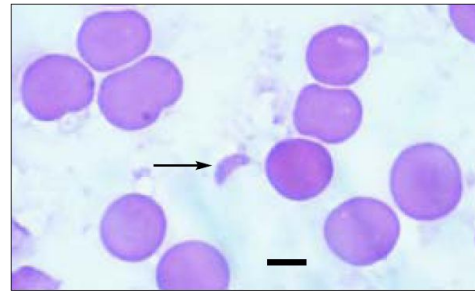
***Nocardia*, sülfür granülü**



***Nocardia*, modifiye ARB +**



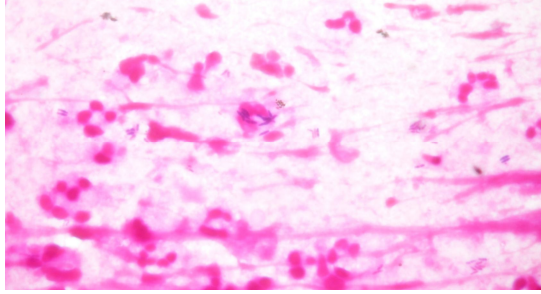
Beklenmeyen patojenler



[F17] Trophozoite of *Toxoplasma gondii* in Gram-stained smear of brain abscess. (Bar = 5 µm)

Harrington, Laboratory Medicine 2002;33:609-14

Gram boyamada gram (+) basil, kültürde üreme yok



Gram boyamada gram (+) basil, kültürde üreme yok

- *Propionibacterium*: Anaerop
- Kan kültüründe kontaminant olabilir:
 - Yalnız bir set kan kültüründe üreme
 - Birkaç gün sonra üreme
- Klinik olarak anlamlı:
 - Steril vücut sıvılarının yaymasında pozitif
 - Saf olarak üreme
 - Kısa sürede üreme

***S.aureus* vs koagülaz negatif stafilocoklar**

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • <i>S.aureus</i> <ul style="list-style-type: none"> – Birbirine benzeyen – Geometrik kümeler halinde küçük koklar – Kümelerde tek tek koklar seçilebiliyor | <ul style="list-style-type: none"> • KNS <ul style="list-style-type: none"> – İrregüler, boyut değişken – Daha pleomorfik – Daha büyük – Kümelerde tek tek koklar kaybolur gibi – Kümelerden çok tetradlar |
|---|---|

-Clin Microbiol Procedures Handbook
-Murdoch, J Clin Pathol 2004; 57:199

***S.aureus* vs KNS**

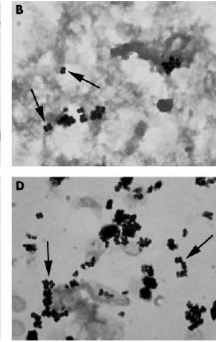
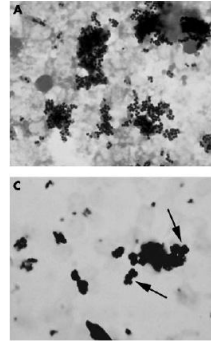
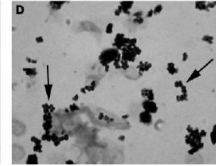
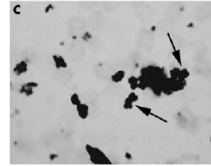
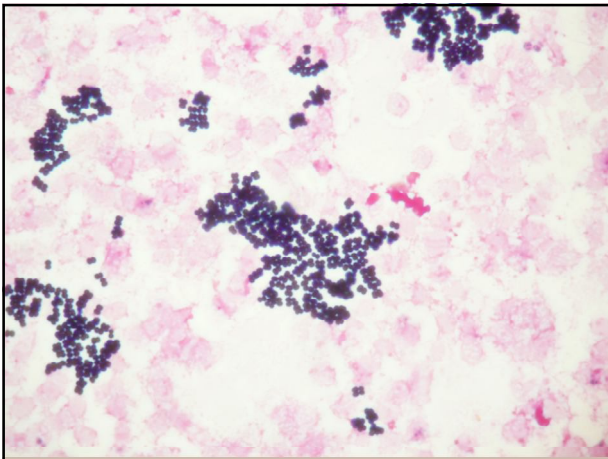


Figure 1 Gram stain smears from positive Bact/ALERT blood culture bottles showing typical appearances of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci, with key characteristics stated below in parentheses. (A) Anaerobic bottle, *S. aureus* (small cells, large clusters); (B) anaerobic bottle, coagulase negative staphylococci (large cells, tetrads (arrows), and small clusters); (C) aerobic bottle, *S. aureus* (large cells, right clusters (arrows)); (D) aerobic bottle, coagulase negative staphylococci (tetrads and small clusters (arrows)).



Murdoch, J Clin Pathol 2004; 57: 199-201



Steril vücut bölgelerinde Gram boyamanın değerlendirilmesi

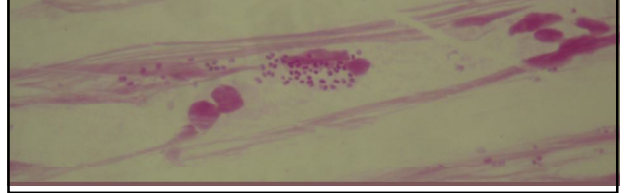
- PMNL varlığı ve yoğunluğu
- Mikroorganizma varlığı, morfolojisi, Gram özelliği ve yoğunluğu
- Bildirmeden önce >3 morfolojik olarak tipik şekil gözlenmeli
- Yaymada BK olmaması enfeksiyonu ekarte etmez
 - İmmün süpresyon
 - *Listeria*

Yayma sonuçları

- Her pozitifin bildirilmesi
- “...’e benzeyen bakteriler”: ne zaman söyleyebiliriz?

Hasta bir bütün olarak değerlendirilmeli

- BOS’ta hücre içi gram (-) koklar, kültür negatif
- Balgam kültüründe *Neisseria meningitidis*
- Balgam yaymasında da hücre içi gram (-) koklar



Olası hatalar

- Maya sanılan stafilokok
- Koka benzer difteroid
- Difteroide benzer streptokok
- Basile benzeyen gram negatif dipkok (*Acinetobacter*)
- Hif ile elastinin karışması: elastin boya alıyor

Hata yapıldığında:

- Hatayı yapan kişiye sessizce ve özel olarak uyarı
- Hatayı yapan kişiye herkesin duyacağı şekilde uyarı
- Herkes için bir eğitim sunumuna ekleme

Yara Örneklerinin Gram Boyası ile İncelenmesi

Prof. Dr. Özay ARIKAN AKAN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
İbni Sina Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Lab.



Yüzeyel yaralarda tanı ve örnek alımı önemlidir

- Klinik olarak infeksiyon tanısı pürülan sekresyona ek olarak en az iki kardinal inflamasyon belirtisi (kızarıklık, ısı artışı, şişme, endürasyon, ağrı) ile konur.
- Sistemik hastalık ya da ciddi infeksiyon düşünülüyorsa kan kültürü alınır.

IDSA Guidelines, Diabetic Foot Ulcers: CID, 2004

Yüzeyel ülserlerden (diyabetik ayak-dekübit) örnek alımı

- Yüzey, iyot (30 sn) veya sulu iyodofor (1 dk) ile konsentrik olarak silinir.
- İyodin de steril SF ile aynı şekilde silinir.
- Ülser yüzeyi steril gazlı bez ile elle debride edilir ve bez atılır.
- Derin ve temiz ülser tabanından doku örneği alınır.

Doku ve aspiratlarda Gram boya değerlendirme sırasında dikkat edilecek noktalar

BULGU	YORUM
Yassı epitel hücresi	Örnek alım tekniği yanlış, kültürde deri flora kontaminantları üreyebilir
PMNL	Bakteriyel etken aranır, intrasellüler bakteri aranır
PMNL ve karışık morfolojide gram (-) ve (+) bakteriler	Karışık, anaerobik ve aerobik infeksiyon
Az sayıda veya nekrotik görünüşlü PMNL'ler, büyük sucuk şekilli gram (+) veya değişken basiller	Muhtemel Clostridial doku nekrozu. <i>C.perfringens</i> 'e bağlı gazlı gangren
Nadir PMNL, başka vücut hücresi yok	İmmün yanıt iyi değil, veya m.o.lar PNL yanıtını ortaya çıkarmıyor
İntrasellüler mikroorganizma	Aktif bakteriyel infeksiyon
Zayıf gram negatif basiller	Özellikle lenf nodu veya dokuda ise (<i>Brucella</i> , <i>Yersinia</i> , <i>Francisella</i>)

Abselerden örnek alımı

- Cilt yüzeyi alkol ile temizlenir (konsentrik olarak)
- İyot (30sn) veya sulu iyodofor (1 dk) ile konsentrik olarak silinir.
- İyodin preparatı alkol ile temizlenir.
- Şırınga ile püy yüzeydeki sağlam deriden girilerek aspire edilir.

Yara örneğinin iyi alınmadığının kanıtları

- Eküvyonda gönderilmiş örnek
- Nötropenik olmayan hastada PMNL görülmemesi ya da yaymada epitel hücresinin PMNL'den daha çok olması (kontaminasyon ya da pürülan akıntı değil)
- Kültürde karışık bakteri florası üremesi

Değerlendirme kriterleri

- Q 234
- Q skoru
- PMNL bağımlı sistem

Q Skor sistemi: Yara örneklerinin Gram boyama yöntemi üzerinden değerlendirilmesi

- Yaymanın Gram ile incelemesi:
 - 0 = Hücre yok
 - 1 = 1-9/ hpf
 - 2 = 10-24/ hpf
 - 3 = >25/ hpf
- Q skor = Çalışılacak potansiyel patojen (PP) sayısı
 - Q0= Kültür yapılmaz
 - Q1= 1 PP çalışılır
 - Q2= 2 PP çalışılır
 - Q3= 3 PP çalışılır

Sharp, Clin Microbiol Newsletter 1999; 21(14):118-20

Q Skoru sistemi

		Yassı epitel -			
		0	-1	-2	-3
Nötrofil +	0	3	0	0	0
	+1	3	0	0	0
	+2	3	1	0	0
	+3	3	2	1	0

- Q1, Q2 → Örnek kalitesi daha düşük (yassı epitel sayısı fazla); çalışılacak m.o. sayısı daha az.
- Q3 → Örnek kalitesi yüksek; 3 m.o.'ya kadar çalışılır [tanımlama (ID), antibiyogram (AB)]
- PP sayısı, Q skor sayısını aşarsa Gram boya sonucuna dönülür ve çalışılacak m.o.'lara karar verilir.
- Kültürde üreyen m.o.'lar gram boyama ile uyumsuz ise, sınırlı ID yap (spot test gibi) AB yapma.

- YARALARDA ESAS OLAN GRAM YAYMA SONUCUDUR
- Q skortlama sistemi kılavuz olarak sunulmuştur, istisnalar ve modifikasyonlar mümkündür.
- Klinisyenlerle birlikte izlenmelidir.

Matkoski C, et al. Evaluation of the Q Score and Q234 Systems for Cost-Effective and Clinically Relevant Interpretation of Wound Cultures. J Clin Microbiol 2006; 44:1869-72

Q/234 sistemi

2 PP= Çalışılır

3PP= Gram boyasına bakılır

4PP= Morfolojik tanımlama

2 PP görülüyorsa ID+AB
3 PP görülüyorsa hepsi morfolojik ID

PMNL'e dayalı sistem

- Gram boyamada mevcut PMNL'lerle ilişkili bakteriler incelenir. Eritellerle ilişkili bakteriler bildirilmez.

Skortlama için örnek-1

- Gram boyamada → Orta PMNL (+2) , az sayıda epitel (-1), yoğun gram pozitif kümeli koklar, yoğun gram pozitif zincirler
- Kültürde → Yoğun *S.aureus*, orta beta-hemolitik streptokok, orta KNS, az difteroidler
- Buna göre:
 - Q skoru Q1 = 1PP
 - Morfolojik ID; *S.aureus*, beta hemolitik streptokok, karışık flora
 - Q234 = 2PP
 - *S.aureus* ve beta hemolitik streptokoku çalış, + karışık flora

Skorlama için örnek-2

- Gram boyamada → Yoğun PMNL (+3), yoğun gram negatif basil (0), yoğun gram negatif kokobasil
- Kültürde → Orta *Klebsiella*, orta *Bacteroides*, az enterokok
- Buna göre;
 - Q skoru Q3 = 3PP
 - *Klebsiella*, *Bacteroides*, enterokoku çalış
 - Q234 = 3PP
 - *Klebsiella*, *Bacteroides*'i çalış, enterokoku identifiye et

Gram boyama ile kliniğe bildirilecek durumlar

- *Clostridium*-benzeri gram (+) basillerin yumuşak doku, aspiratlarda görülmesi.
- PMNL yokluğu ipucu olmalı (anaeroblar lipaz ve fosfolipaz yaparlar bu da PMNL'yi harap eder).
- Gazlı gangren, hastanın 24 saatte kaybına neden olabilir. *S.aureus*, grup A streptokok infeksiyonlarında da görülebilir.
- *Clostridium*-benzeri gram (+) basil (yüzeyel yarada *B. anthracis*'i düşündürür)

PMNL görülüyorsa;

- Hasta nötropenik olabilir
 - İmmün yetmezlik
 - Kemoterapi
- <2 yaş hastalarda immün yanıt ortaya çıkmayabilir

Vajinal ve Üretral Akıntı Örneklerinin Gram Boyası ile İncelenmesi

Uzm. Dr. Dolunay GÜLMEZ KIVANÇ
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Genital sistemden alınan örnekler

- Erkek
 - Üretra: Eksuda ya da sürüntü
 - Testiküler ya da epididimal aspiratlar veya sürüntü
 - Prostat sıvısı veya sürüntü
- Kadın
 - Vulva sürüntüsü
 - Vajinal - Servikal sürüntü
 - Transservikal endometriyum sürüntüsü veya kazıntı (D&C)
 - Üretral sürüntü
 - Anal sürüntü
 - Transabdominal aspirasyon (endometriyum)
 - Amniyon sıvısı
 - Bartolin bezinden aspirat
 - Lezyon sürüntüsü, aspirat veya bx: şankr, şankroid, genital ülser
 - Lenf nodu aspiratı
 - Kuldosentez
 - Laparoskopik örnek

Değerlendirme

- Vajen:
 - Rutin kültür anlamlı değil.
 - Klinik bilinmeli ve olası etkene göre işlem ve yorum yapılmalı.
 - Yayma için skorlama
 - Kültürde
 - Patojen üreme //gonokok, maya...
 - Laktobasil ile diğer üremenin oranı
 - Laktöz (-) enterik bakteri üremesi → *Salmonella/Shigella/Yersinia* açısından araştırılmalı (öz. çocuklarda). Diğer enterikler normal florada bulunabileceği için rapor edilmemeli.

Aranması gereken m.o.lar

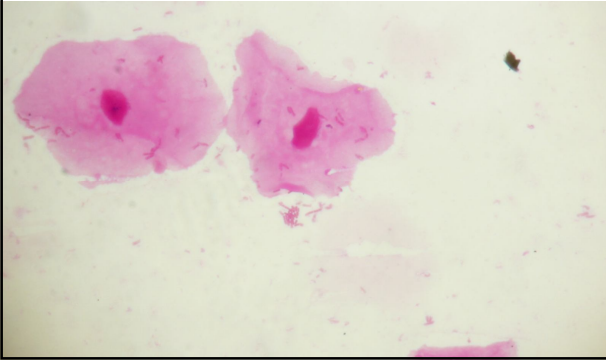
- Maya: *C.albicans*, *C.glabrata*
- *N.gonorrhoeae*
- *Listeria monocytogenes*
- *S.agalactiae* (gebelerde distal vajen ve rektumdan örnek)
- *S.pyogenes*

Vajinal yaymanın Gram boyaması

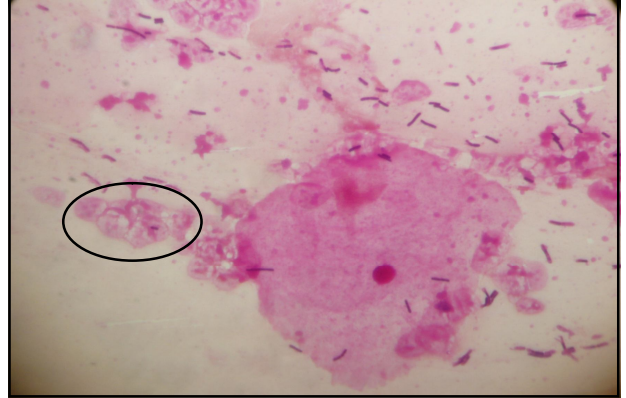
Rapor:

- Normal vajen florası
- Bakteriyel vaginosis ile uyumlu karışık morfotipler...
- BK, KK, "clue cell", maya, genellikle patojen olan m.o. (gonokok...), hücre içi bakteri

Normal vajen yayması



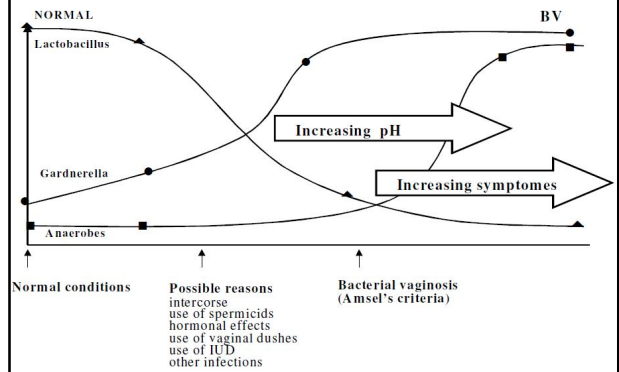
Normal vajen yayması



Vulvovajinit, vajinit

Hastalık	pH	Islak preparat	%10 KOH	Diğer testler
Yok	4 – 4.5	Uzun basiller	-	
Atrofik	>6		-	
Kandidiyazis	4 – 4.5	Psödohip veya tomurcuklanan maya	-	Kültür
Bakteriyel vajinozis	> 4.5	"Clue cell"	+	Gram boyama
Trikomoniazis	5 - 6	Flajelli parazit	-	<i>Trichomonas</i> kültürü

Bakteriyel vajinozis



Bakteriyel vajinozis

- Vajen florasında laktobasillerin azalması ve *G.vaginalis* (x100), *Prevotella*, *Mobiluncus*, sıklıkla diğer anaeroplara (x1000) ve *M.hominis*'in baskın hale geçmesi
- Gebelerde prematüre doğum, düşük, düşük doğum ağırlığı, amniyon enf., endometrit ile ilişkili
- %10 KOH eklendiğinde amid (balık) kokusu
- "Clue cell" → Yaymada bakterilerle kaplanmış yassı epitel hücreleri

Bakteriyel vajinozis etkenleri

Frequently isolated and identified anaerobic (aerobic) bacteria:

Gardnerella vaginalis
Mobiluncus mulieris (long curved rod)
Mobiluncus curtisii (short curved rod)
Bacteroides urealyticus and other spp
Prevotella bivia and other spp
Prophyromonas spp
Fusobacterium nucleatum
Peptostreptococcus spp
Streptococcus morbillorum
Atopobium vaginae
Mycoplasma hominis etc.

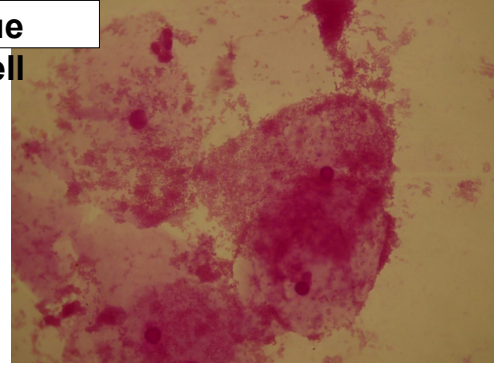
Vajen yaymalarında Nugent skorlaması

	Hiç	1+	2+	3+	4+
Orta/büyük gr (+) basil	4	3	2	1	0
Küçük gr (-)/V basil	0	1	2	3	4
Kıvrık gr (-)/V basil	0	1	1	2	2

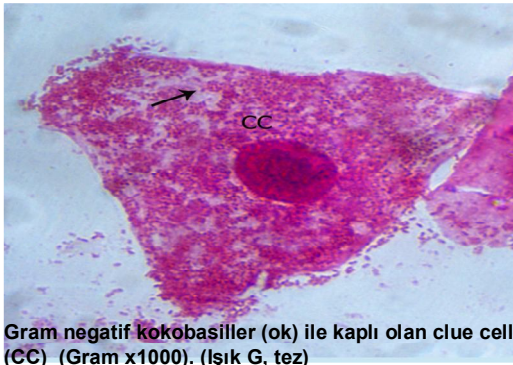
- Doğurganlık çağındaki veya hormon tx alan kadınlar için geçerli
 - 0-3 normal
 - 4-6 orta
 - 7-10 bakteriyel vajinozis
- Laktobasil 3 veya 4 + ise skor 0-3 olmalı (normal flora).
- *Gardnerella* 3 veya 4 + ise skor 7-10 olmalı (bakteriyel vajinozis)

Bakteriyel vajinozis

Clue cell

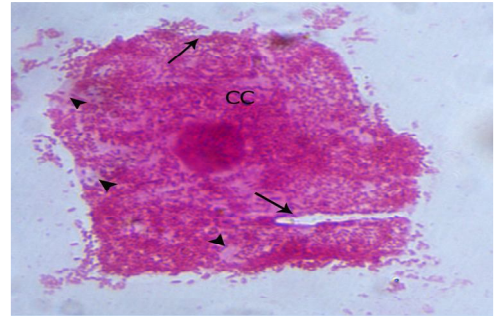


Bakteriyel vajinozis



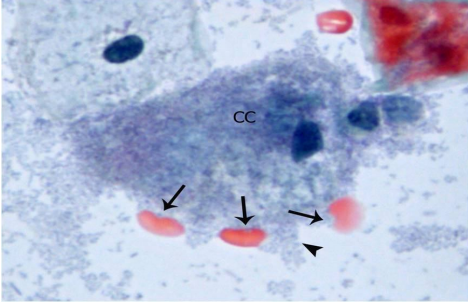
Gram negatif kokobasiller (ok) ile kaplı olan clue cell (CC) (Gram x1000). (Işık G, tez)

Bakteriyel vajinozis



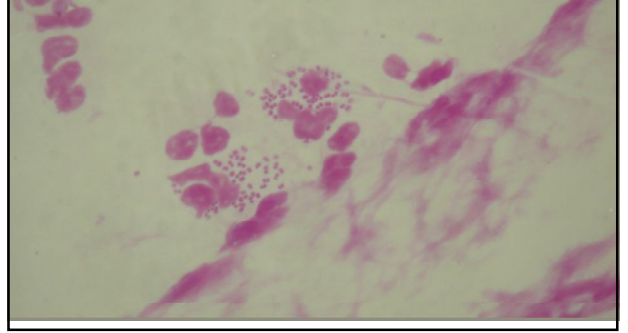
Hücre bütünlüğü kaybolmuş, içeriye doğru girintiler gösteren (ok) ve sitoplazmik boşluklar içeren (ok başı), Gram negatif kokobasiller ile kaplı clue cell (CC) (Gram x 1000). (Işık G, tez)

Bakteriyel vajinozis

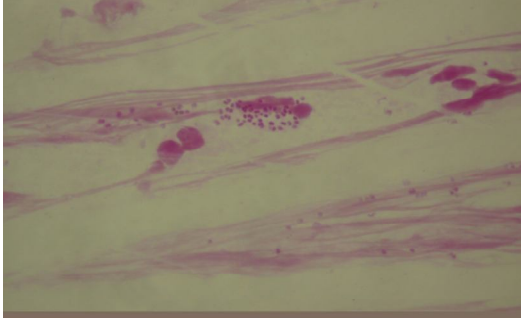


Gram negatif kokobasiller ile kaplı clue cell (CC) ve kenarında eritrositler (Papanicolaou x 1000). (Işık G, tez)

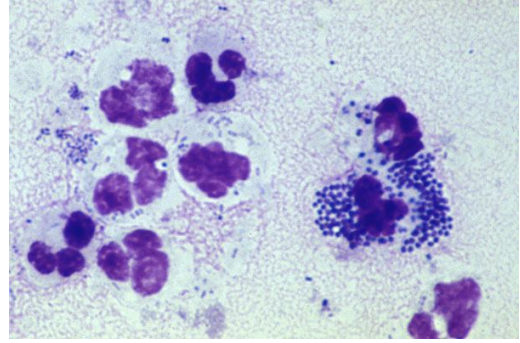
Neisseria gonorrhoeae Vajen veya üretral akıntı



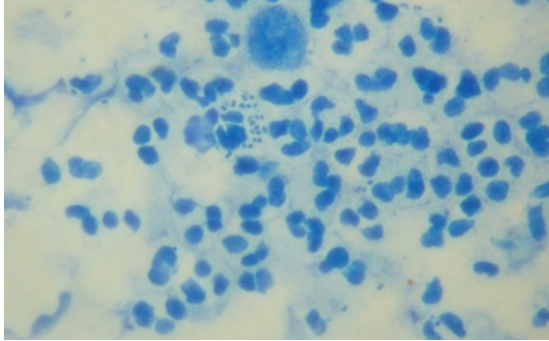
Neisseria gonorrhoeae Vajen veya üretral akıntı



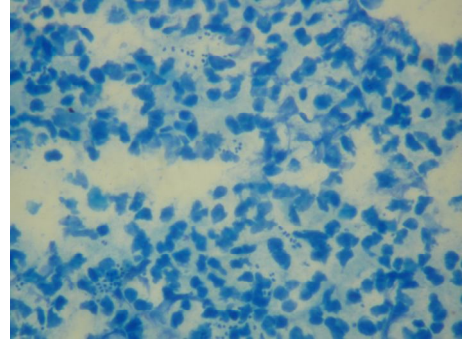
Neisseria gonorrhoeae Vajen veya üretral akıntı



Neisseria gonorrhoeae Vajen veya üretral akıntı, metilen mavisi



Neisseria gonorrhoeae Vajen veya üretral akıntı, metilen mavisi



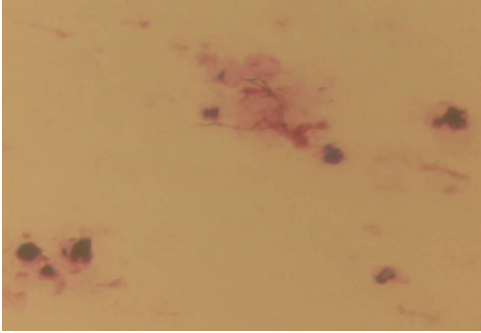
Listeria monocytogenes

- Koyun kanlı agarda dar beta-hemoliz
- 22°C'de hareketli, 37°C'de hareketsiz
- Katalaz +
- CAMP +
- Hippurat +
- Safra-eskülin +

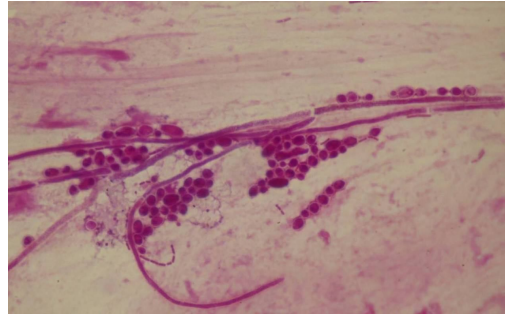
- *Haemophilus ducreyi*
 - Gram (-) basil
 - Şankroid lezyondan alınmış örnekten yayma → PMNL içinde ve dışında "balık akını" şeklinde dizilmiş basiller

- *Capnocytophaga* spp.
 - Gram (-) ince basil
 - MacConkey'de üremez
 - Oksidaz (-)
 - Glukozu fermente eder (TSI'da görülmeyebilir)
 - Genellikle eskülin (+)

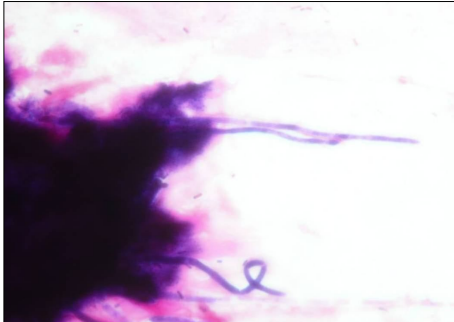
Maya



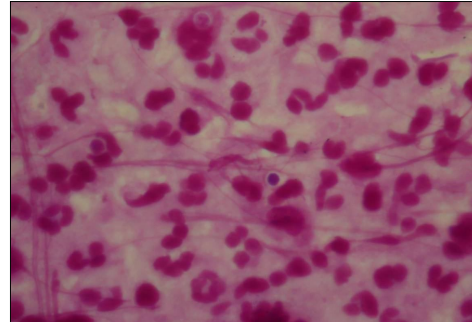
Maya

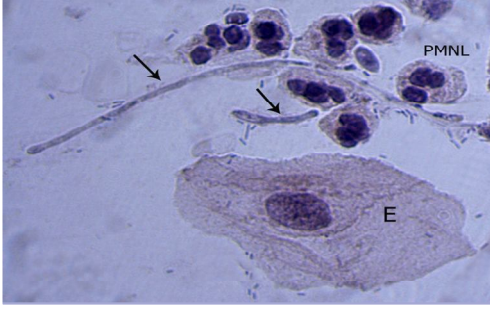


Maya



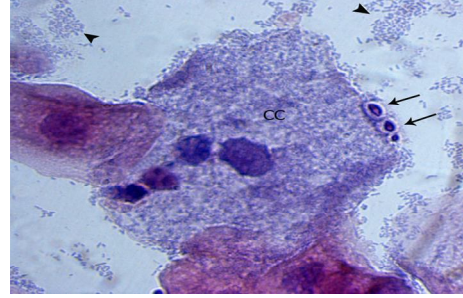
Maya





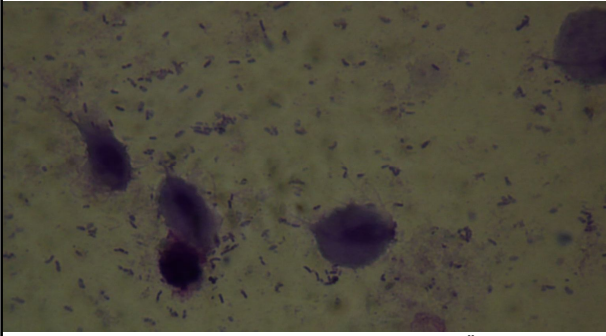
Polimorfonükleer lökositler (PMNL) arasında uzanmış olan mantar pseudohifleri (ok) ve epitel hücresi (E). (Papanicolaou x1000) (Işık G, tez)

Clue cell ve maya



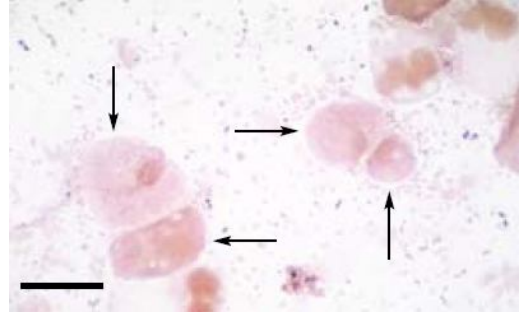
Kokobasillerle kaplı olan clue cell (CC) zarına hücre duvarlarıyla yapışıp, hücre zarının şeklini alan mantar blastosporları (ok) ve serbest kokobasiller (okbaşı). (Papanicolaou x1000) (Işık G, tez)

Trichomonas vaginalis, Giemsa



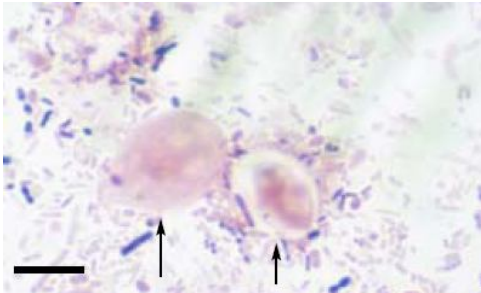
Ö.Arkan Akan

Trichomonas vaginalis, Gram



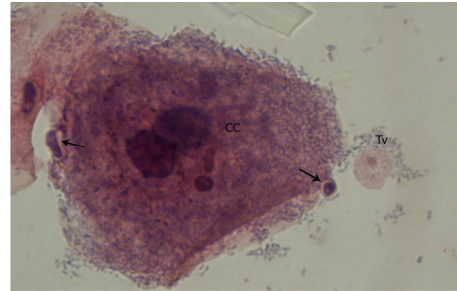
Harrington, Laboratory Medicine

Trichomonas vaginalis, Gram



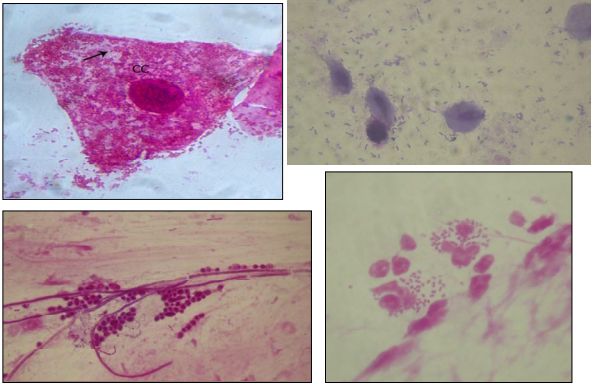
Harrington, Laboratory Medicine 2002;33:609-14

Clue cell, maya ve *Trichomonas vaginalis*

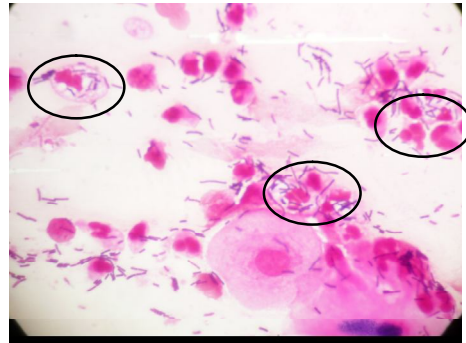


Clue cell (CC), hemen yanında yer alan *Trichomonas vaginalis* (Tv) ve mantar blastosporları (ok). (Papanicolaou x1000) (Işık G, tez)

Vajinal yayma, Gram



Vajinal yayma, Gram



Vajinal yayma, Gram

