

# Mic 12j-GRAM + SPORLU BAKTERİLER

written by Dr. Aydođan Lermi

## GRAM + SPORLU BAKTERİLER

### BACİLLUS:

GR+ AEROB, SPORLU, sadece B. Antracis B. Cereus patojen diğerleri patojen değil.

### B.ANTRACİS:

- KAT+ NH<sub>3</sub>+,büyük, künt, kapsüllü, gram +, hareketsiz, zincir oluşturur, çabuk sporlanır, central sporlar bakteriyi şişirmez. Kültürde bambu gibi görülür. Genel BY de ürer, buyyonda şeffaf görülür, çalkalanırsa dipte spiral gibi çökelti görülür. Jelozda beyaz mat, R tipi büyük düzensiz kenarlı yüzeyi granüllü koloni yapar. Koloniye mikroskopla bakılınca ondüle saç gibi uzantılar görülür.
  - B. Antracis yumuşak jelozda ters çam ağacı gibi ürer. Jelatini eritir, KH dan gaz yapmaz, H<sub>2</sub>S yapmaz, ama amonyak NH<sub>3</sub>Yapar.

**B. antracis şarbon etkenidir.** Otçul hayvan hastalığıdır. En çok görülen formları:

- deride pistula maligna, malign ödem ( deri şarbonu)
- akciğer şarbonu ağır bronkopnemoni şeklinde seyreder,
- barsak şarbonu ateş gastroenterit ile seyreder,
- septisemi en ağır formudur.

**Tanı:** deri şarbonundan gram boyanır PNL ve eritrosit azdır, yara kabuğu kaldırılıp yüzeyinden, vezikül içinen büllerin içindeki sıvıdan yapılan boyamada çok az tek tük lökosit eritrosit görülmesi tipiktir. Bacillus antracis preparatta 2şerli 3erli kapsüllü basiller şeklinde görülür. Bacillus kapsüllü hareketsizdir.

Şarbon bir meslek hastalığıdır, zoonozdur, kasap, çoban, yün işçileri, mezbaha ve laboratuvar çalışanlarında görülür. Balgam ve dışkıdan bacillus izolasyonu olanaksızdır. Sepsiste giemsa ile nadiren görülür.

Hayvan inokülasyonunda inokülasyon yerinden başlayarak etrafa yayılan jelatinsi ödem , iç organlarda kongesyon ve siyah renkli nekroz dikkati çeker. Gramda tipik basiller görülür.

### BACİLLUS CEREUS

Doğada yaygındır, toprk su, süt, süttozunda bulunabilir.görünümü bacillus antracis ebezner ancak kıvrımlıdır. Hareketlidir kapsülsüzdür zincir yapabilir.

## HAREKET KAPSÜL PENİSİLİN BETA HEMOLİZ LESİTİNAZ

██████████	-	+	S	-	+/-
██████████	+	-	R	+	+

Lesitinaz testi Yumurta sarısı BY de yapılır lesitinaz varsa çizgi ekim etrafında opak zon görülür. Bacillus antracis santral sporludur. Tüylü ince granüllü gri koloni yapar. Buyyonu bulandırır. Bacillus cereus insanda ençok besin zehirlenmesi yapar. Sporları pastörizasyonla ölmez, sütün bozulmasına yol açan başlıca bakterilerdendir. Bacillus cereus 2 tip besin zehirlenmesi yapar:

### 1. Enterotoksinin bağırsakta oluştuğu besin zehirlenmeleri:

1. konserve et, beklemiş et, hazır çorba, süt, dondurma gibi gıdalardan kaynaklanan 8-16 satlık kuluçka dönemini takiben karın ağrısı, bulantı, kusma, ishal ile seyreden cAMP artışına bağlı kolera benzeri enterotoksinlerin salınmasıyla meydana gelen besin zehirlenmesi.

### 2. Oluşmuş enterotoksinlerin yutulmasına bağlı besin zehirlenmesi:

1. Haşlanmış pirinçte oda ısısında üreyen bakterilerin ürettiği enterotoksinin yenmesine bağlı inkübasyon dönemi 1-5 saat gibi kısa, bol bulantı kusma az ishalin olduğu besin zehirlenmesi.

**Tanı:** kusmuk ve gıdalarda gram pozitif sporlu basillerin görülmesi tanı koydurur. Kanlı ağara ekim yapılabilir. Kapsülsüz, hareketli, beta hemoliz yapan, penisiline dirençli gram pozitif sporlu bakteriler bacillus cereus dur. Bacillus cereus immun sistemi düşük kişilerde fırsatçı patojen olabilir.

## BACİLLUS SUBTİLİS

Peritrich kirpikleri ile hareketli, buyyonda yüzeyde kalın buruşuk zar yaparak ürer, jeloz yüzeyinde buruşuk zar gibi kaplar. Kırmızı turuncu kahverengi pigmentlidir. Fırsatçıdırdoğrudak dokuya girerse panoftalmi, iridosklit yapabilir. Kapsülsüz, hareketli, subterminal sporludur.

## CLOSTRİDİUM

Çoğu anaerob bazıları aerotoleran, clostridium sporları, santral, subterminal yada terminal olabilir. Perfiringens dışındakilerin sporları bakteriden büyüktür.

### CLOSTRİDİUM TETANİ:

- Gram pozitif , hareketli, kapsülsüz, çomak. Terminal sporludur. Kültür eskidikçe gram negatifleşir. Anaerob şartlarda tüm besiyerlerinde ürer.
- Glikoz varlığında hem bol ürer hem bol spor yapar. BY de düzensiz pürtüklü R koloni yapar. Kenarında pamuk ipliği şeklinde uzantılar olur. Kanlı ağarda gri hafif hemolizli koloni yapar. İnvazyon yeteneği yoktur, iyi kanlanan yerlerde sporları açılmaz.
- İyi kanlanmayan redox potansiyeli düşük olan yerlerde sporlar açılır. ( Ca+ varlığı, diğer

bakterilerin varlığı, Yabancı cisim varlığı, oksijenizasyonu düşürüp redox potansiyeli arttırdığından sporlar daha kolay açılır, vegetatif hale geçer) vegetatif formun yaptığı exotoksin ile tetanoz yapar.

- **Tanı** klinik bulgular ile konur.
  - Kültürü zordu, nadiren istenir, hayvan deneyleri yapılabilir. Yaradan alınan nekrotik dokular incelenebilir. Gram boyamada terminal sporlu gram pozitif basiller görülebilir. İmmün Floresan antikorlar ile antijen varlığı gösterilebilir. Kültür için 2 kanlı ağara, 2 tioglikolatlı buyyona, 2 kıymalı buyyona ekim yapılır. Anaerob ekilir daha sonra kültürden yapılan gram boyamada tipik bakteriler aranır.+ hareket incelemesi yapılır.
  - **Hayvan deneyi:** yaradan alınan kıymık vs. hayvan derisi içine gömülür, yada kültürden hayvan deneyi yapılır bunun için buyyon kullanılır üreme olan buyyon dan 4 fareye İM ekim yapılır 2 sine 1500 Ü antitoksin verilir ikisine verilmez. Antitoksin verilmeyenlerde enfeksiyon bölgesinde sertlik, kasılma, omurganın o bölgeye doğru eğilmesi, tonik, klonik konvülsyonlar görülmesi (toksin yukarı doğru yayılır) verilmeyende görülmemesi toksin varlığını gösterir. Hayvanlarda tetanoz insanlardakinin aksine yükselen tiptedir.
  - HEMOLİZ+ H<sub>2</sub>S+ GAZ+ LİPAZ+
  - Terminal subterminal oval sporlu gram + kok tur.
  - Anaerob koşullarda basit Besi Yerinde de ürer. Büyük kaygan ortası mat, kenarı saydam koloniler yapar. Kanlı agarda beta hemoliz yapar. Jeloz içinde merccek-kalp şeklidne koloniler yapar, şekerlerden gaz ve asit yapar H<sub>2</sub>S yapar.
  - Clostridium botulinum : Sütü pıhtılaştırır sonra yavaşça eritir. İnsanda botulizm yapar, yaradan da botulizm olabilir. Hayvan barsağı ve toprakta sporları bolca bulunur. Polipeptit yapıda ısıya ve proteolitik etkiye dayanıklı toksin yapar.
  - Botulizm toksini A - G ye 7 tipe ayrılır. Clostridium Botulinum da A-B-CALFA-CBETA-D-E-F-G olarak 8 tipe ayrılır.

## CLOSTRIDIUM BOTULINUM

C. Botulinum insanda 3 hastalık yapar.

1. **Besin zehirlenmesi ( Botulizm ) :** toksin üremiş besinin yenmesi ile ortaya çıkar. 18 - 96 saat kuluçka dönemi vardır. ( 1-4 gün).
  1. Zayıflık, halsizlik, Başdönmesi, akomodasyon felci, Midriazis, Pitozis, Diplopi, Yutkunma zorluğu, ağız kuruluğu, Ses kısıklığı, Kabızlık,
  1. Daha sonra solunum felci oluşur. BOTULİZM DE ATEŞ YOKUR.
2. **Yara botulizmi:**
  1. Clostridium botulinum un yaraya bulaşması ile olur. Uzun süren botulizm gibi şikayetler ortaya çıkar.
3. **Bebek botulizmi:**

1. Yenidoğan bebeklerde (3 - 20 hafta) görülür. Dışkıda bol C. Botulinum basil ve toksini bulunur. Hastalık barsaklarda kolonize olmuş ve invivo toksin üreten bakterilere bağlıdır. Bebekte Yutma güçlüğü, Emme refleksinde azalma, Kabızlık, Göz bulguları, şaşılık gelişir.

1. Diplopi, Pitozis, Midriazis, Akomodasyon felci,

1. Boyun ve tüm kaslarda gevşeklik vardır.

4. **Botulizm tanısı** : klinik bulgular ile konur. Nadiren laboratuvar istenir. Laboratuvar tanısı için istenen örnekler :

- Hasta serumu ( hastaya anti toksin verilmeden önce alınmalıdır) ,
- Besin artıkları : hem toksin hem C botulinum basili aranır.
- Kusmuk ve dışkı: hem basil hem toksin aranır.
- Yara salgısında bakteri aranır.

• **Botulizm tanısı için Fare Koruma Testi :**

- Botulinum A-B-E-F insanda botulizm yapar, G tipi insanda görülmez, C-D tipi kuşlarda enfeksiyon yapar. A- F monovalan serumları ve birde polivalan A-F antiserumları kullanılarak hayvan deneyi yapılır.

Tüpler	1	2	3	4	5	6	
Hasta serumu	1	1	1	1	1	1	ml
Antitoksin	0,0	A0,25	B0,25	E	F	AF	
FAREYE ENJEKSİYON	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	HERBİRİNDEN İKİ FAREYE ENJEKSİYON TOPLAM 12 FARE

37 DERECEDE 30 DAKİKA BEKLETİLİR

SONUÇ:

TOKSİN A	+	-	+	+	+	-
TOKSİN B	+	+	-	+	+	-
TOKSİN C	+	+	+	-	+	-
TOKSİN F	+	+	+	+	-	-
TOKSİN YOK	-	-	-	-	-	-

Fareler 4-8-12-24. Saatlerde gözlenir. Farede botulizm bulguları not edilir : tüylerde kabarma, abdominal sık solunum, bacaklarda zayıflık, felç, solunum durması, ex.

- **Dışkıda botulizm toksin tayini:**

- Dışkıdan süspansiyon hazırlanır. Hasta serumu yerine bu süspansiyon kullanılarak toksin varlığına bakılır. Kusmuk ve besinlerde havanda kumla ezilerek oluşturulan süspansiyondan yukarıdaki yöntemle toksin tayini yapılabilir. Yapılan süspansiyon gramla boyanarak basil de aranır. Ayrıca bu süspansiyonlar dan ekim yapılabilir, 80C de 10 dakika bekletilerek vegetatif formlar öldürülür, sporlar ölmez, 2 gün sonra hem toksin oluşturma incelemesi hemde bakteri identifikasyonu için ekilir. Ekim yumurta sarısı ağara yapılır, lipaz + ( üzeri veya çevresi parlak) koloniler incelenir. Kültürde toksin tayini yapabilmek için kültür 4 günlük olmalıdır. Bu kültürden santrifüj yapılır isteki süpernatant hayvan deneyleri yapılarak toksin bakılır. Ayrıca ELİZA testi ile botulizm toksin A ve B bakılabilir.

## **GAZLI GANGREN ETKENLERİ:**

Anaerob sporlu gram + basiller doku nekrozu ve gaz yaparlar. Gazlı gangren genellikle birden çok bakteri nedeniyle ortaya çıkar, Clostridium lar dışında Proteus, pseudomonas, E.Coli, Stafilokoklar da patolojide yer alırlar.

### **CLOSTRİDİUM PERFRİNGENS**

- KAPSÜLLÜ, HAREKETSİZ, H<sub>2</sub>S + NH<sub>3</sub>+ KİRPİKSİZ, GRAM + BASİL
- 2 şerli 3 erli çomaklar şeklinde görülür, geniş kapsüllü, hareketsizdir, santral, subterminal sporludur. Kanlı BY de esmer hemoliz yapar. H<sub>2</sub>S, NH<sub>3</sub> ve şekerlerde gaz yapar. Proteoliz yapmaz.
  - Fibrinolizin,
  - Hyaluronidaz,
  - Kollgenaz,
  - Jelatinaz,
  - DNAz,
  - Hemolizin,
  - Hemaglutinin oluştururlar,
  - Sporları 100 C de 5 dk da ölür.

- Clostridium Perfringens A dan E ye 5 tiptir. En sıkı gazlı gangren etkeni Tip A dır.
- Gazlı gangren C. Perfringenz exotoksinleri ile meydana gelir. C. Perfringens doğada yaygındır, toprak, su ve barsak florasında vardır. Ayrıca kolera toksinine benzer bir toksinle de gıda zehirlenmesi yapar.
- Gıda ile alınan bakteri barsakta hızla sporlanır, sporların barsakta eriyen sporangium ları enterotoksi dir ve ishal yapar.

## CLOSTRIDIUM SEPTICUM

- H<sub>2</sub>S +, HAREKETLİ, KAPSÜLSÜZ, PLEOMORFİK BOYANAN, KIRPIKLİ, GRAM + ÇOMAK
- Subterminal sporludur. C. Septicum O-H 6 tiptir. Fibrinolizin salgılayarak fibrini parçalar. Eksotoksinleri ile gazlı gangren yapar.

## CLOSTRIDIUM NOVI

- Bol kirpikli, hareketli, zincir yapar, kapsülsüz, gram+ basil, subterminal sporlu, KH dan gaz ve H<sub>2</sub>S yapar. 6 exotoksini vardır: lesitinaz, nekrolitik toksin, hemolitik toksin, lethal toksin.

## CLOSTRIDIUM HISTOLITICUM

- Subterminal sporlu, hareketli, kirpikli, mikroaerofil hatta fakültatif anaerob koşullarda üreyebilir.
- Proteolitikdir. ( diğeri proteolitik değil). 3 exotoksini vardır: nekroliti, kollagenaz, lethal.

**Gaz gangreni tanısı:** yara salgıları ve nekrotik doku parçaları incelenir. Gram boyanır, c. Perfringens dokuda spor oluşturmaz etrafında kapsül görülebilir. Karanlık saha yada lam lamel arası hareket incelenir. Bir yarada CLOSTRIDIUM varlığı her zaman gaz kangren anlamına gelmez çoğu zaman cellülitis tipinde lokalize enfeksiyon vardır. Örnek kanlı ağara plak içi, yumurta sarısı ağara, neomisin-kanamisi li ağara ekilir, bir anaerob birde aerob olarak ekim yapılır. gram- spor, hareket, lesitinaz, lipaz bakılır.

### • CLOSTRIDIUM PERFRINGENS BESİN ZEHİRLENMESİ

- C perfringens sporları ile meydana gelir. Gıda alımını takiben 8-24 saat sonra ortaya çıkar. Şiddetli karın ağrısı ve ishal vardır, kusma ve ateş olmaz. 2 günde kendikendine kaybolur. Gıda ve dışkıda c perfringens tespit edilebilir. Perfringens LAKTOZ dan asit ve gaz yapar.

### • CLOSTRIDIUM DIFFICILE

- Kirpikli, hareketli, subterminal sporlu, gram + basil. %3 insanda bağırsaklarda bulunur, 2 yaş altı çocuklarda %25-60 oranında bulunur.
- Toksin A enterotoksin toksin B sitotoksindir barsaklarda psedomembranöz kolit yapar.
- Dışkıda izolasyon: normaldede bulunduğundan ya C. Difficile toksinleri bakılmalıdır yada 1 grm dışkıdaki c. Difficile sayısına bakılmalıdır. Normalde gram başına canlı bakteri

sayısı < 100 / cfu olmalıdır. Pseudomembranöz kolit demek için canlı bakteri sayısının > 10 000- 100 000 olması gerekir. C. Difficile izolasyonu zordur. İzolasyonda Cycloserin + Cefoksitin Yumurta sarısı+ früktoz lu agar gerekir ( CCFA BESİYERİ).

- C. Difficile CCFA BY de altın sarısı ve floresan veren koloniler oluşturur. ( UV altında incelenir). Buradan gramdaki koloni sayısı bulunur. Bakteri CCFA da spor oluşturmaz lipaz - ve lesitinaz - dir.

### **Dışkıda toksin:**

1. Doku kültürü yöntemi: Over hücre kültürüne dışkı süspansiyonu nun sitopatik etkisi ve bu sitopatik etkinin antitoksin ile nötralizasyonuna bakılır. Antitoksin olarak çapraz etkili C. Sortellini antitoksini kullanılır.
2. ELİZA ile toksin A varlığına bakılır.

## **CLOSTRİDİUMLARIN İDENTİFİKASYONU:**

1. **Gram ve morfoloji:** çoğu düz ( C. Botulinum eğri) çomak, ikişerli yada zincir ( C.difficile, C.histoliticum) halinde, kısa sürede gram + boyanırken pasajla gram - döner.
  - Perfringens kapsüllü ve hareketsizdir. Perfringens ve histoliticum sporları santral yerleşimli ve bakteriyi şişirmez. Diğerleri şişirir. C. Tetani terminal sporludur.
2. **Koloni morfolojisi:** kanlı agarda
  - C. Difficile- - mat basık CCFA da floresanlı,C. Histoliticum- - küçük düzensiz, granüllü, gri, hemolizli,
  - C. Novyi—opak, granüllü, gri, hemolizli,C. Perfringens - - gri sarı, cüce koloni, hemolizli,
  - C. Septicum - - yayılma eğilimli, gri ,hemolizli koloni yapar.
    - Yumurta sarılı agarda: çizgi ekim yapılır.
      - Lesitinaz - - opak sarı,
      - Lipaz - - üreme çevresi içinde veya çevresinde parlak zon.
      - Jelatin hidrolizi: tüm clostridia lar + dir.

3. **Süt sindirimi:** pıhtılaştırıyormu, gaz oluşturuyormu, kazein sindirimi varmı : C. Botulinum +/-

C. Difficile - C. Novyi +/- dir.

4. **Toksijenlik deneyimi:** gazlı gangren toksini varmı?

- **Nagler reaksiyonu:** yumurta sarılı BY de yapılır. Besiyeri ikiye bölünür. Yarısına önce polivalan gazlı gangren antitoksini sürülür sonra her iki bölgeye de karşılıklı çizgi ekimler yapılır. Antitoksinsiz bölgede opak zon yada inci parlaklığı görülürken antitoksinli bölgede bu parlaklığın oluşmaması **POZİTİF NAGGLER REAKSİYONU** dur. Gazlı gangren toksini vardır denir.

ANTİTOKSİNSİZ BÖLGEDE

OPAK ZON İNCİ PARLAKLIĞI

ANTİTOKSİNSİZ BÖLGEDE		ANTİTOKSİNLİ BÖLGEDE İNHİBİSYON	
OPAK ZON	İNCİ PARLAKLIĞI	OPAK ZON	İNCİ PARLAKLIĞI
+	-	+	
+	+	-	

C PERFRİNGENS

C NOVYİ / C BOTULİNUM

- **Hayvan deneyleri:** buyyonda üretilmiş kültürden süspansiyon hazırlanır, süpernatant fareye inoküle edilir fare 3 günde ölür, yada süpernatant + antitoksin karışımı enjekte edilir. Perf A-E, Novy A-B, Sep- Tet-Botu AF antitoksinleri verilir. Ölmeyen fareye verilen antitoksin koruyor yani clostridium o toksini yapıyor denir.
- **Clostridiumlar vankomisine duyarlı - kolistine dirençlidirler.**