

Konu 18

AĞIZDAN MİKROBİYOLOJİK MATERYAL ALINMASI

Aydın M. Ağızdan mikrobiyolojik materyal alınması. Ed. Cengiz, Mısırlıgil, Aydın. Tıp ve diş hekimliğinde genel ve özel Mikrobiyoloji. Konu 18. Sa:153-160. Güneş yayınevi, Ankara, 2004.

Bu işlem, ağızın mikrobiyolojik muayenesinin ilk basamaklarından biridir. İnfekte floranın doğrudan mikroskopisini, patojen mikroorganizmanın kültürünü ve antibiyotik duyarlılık testlerini yapabilmek için için ağızdan materyal alınması gerekir.

Normal ağız florasının önemli bir kısmı anaeroptur. Periodontitisli veya infekte dişi bulunan bireylerde anaerop bakterilerin floraya hakimiyetleri artar. Bu sebeple ağızdan mikrobiyolojik materyal alınırken anaerop mikroorganizmaların üretilmesi hedeflenir.

MİKROBİYOLOJİK MUAYENE ENDİKASYONLARI:

Aşağıdaki durumlarda ağızdan kültür yapılması gereklidir:

1. İkinci haftasını doldurduğu halde tedaviye direnen ve iyileşmeyen bütün mukoza infeksiyonlarından,
2. Periapikal başlayıp giderek derin dokulara yayılan infeksiyonlardan,
3. Ağızın belirli bir bölgesinde sık tekrarlayan veya geniş spektrumlu antibiyotiklere direnen yumuşak doku infeksiyonlarından,
4. Bir bireyin diş çürüğüne meyilinin ölçülmesi istendiğinde ağızdaki kariyojenik bakteri kolonizasyonunun tespit edilmesi gerektiğinde salyasından, veya diş plağından,
5. Tedavisi bitirilen ve klinik şikayetleri kaybolan bir infeksiyonun tamamen iyileştiğinin mikrobiyolojik olarak doğrulanması gerektiğinde eski infeksiyon merkezinden,
6. Cep derinliklerinin takip edildiği vakalarda, periyodik muayene prosedürü içerisine mikrobiyolojik muayene ilave edildiyse, periodontal ceplerden,
7. Nadiren de olsa, tedaviye inatla direnen gingivitis vakalarında mikrobiyolojik inceleme istendiğinde periodontal cepten, (gingivitis diş taşı ve plakların uzaklaştırılmasından sonra çoğunlukla kendiliğinden iyileşir).
8. Tekrarlayan kök kanalı tedavilerinde patojen mikroorganizmanın ne olduğunun bilinmesi gerektiğinde kök kanalından, (Periapikal infeksiyonlar, infekte kök kanalının biyomekanik preparasyonundan sonra genellikle antibiyotik tedavisine gerek kalmadan iyileşirler. Eğer patojen mikroorganizma *Streptococcus faecalis* veya *Actinomyces* türleri ise inatçı ekstradiküler lezyonlar yaparlar ve kök kanalı tedavisine direnirler).
9. Antibiyotik tedavisine karar verildiğinde en isabetli antibiyotiğin seçilmesi gereken derin ve yüzeysel bütün oral infeksiyonlardan,
10. İnfeksiyon ile alakalı olduğu düşünülen biyopsi materyalinden, kültür yapmak gerekir.

Aft, lichen, eritema multiforme, pemfigus gibi immün kaynaklı ağız lezyonları, uçuk gibi herpes lezyonları veya viral kaynaklı olduğu düşünülen diğer lezyonlar (Koplik lekeleri, herpanjin), erozif mukoza lezyonları, termik veya kimyasal mukoza travmaları, papillom, fibro epitelyal polip, hemanjiyom, mukosel gibi tümöral oluşumlardan kültür yapılmasına, dolayısıyla mikrobiyolojik materyal alınmasına gerek yoktur.

ÖN HAZIRLIK:

Ağızdan alınan materyalde üremesi beklenen patojen bakterinin daima bir anaerop olduğu varsayılır. Eğer patojen mikroorganizma fakültatif aerop ise, bu bakteriler anaerop kültür içerisinde rahatça üreyebilecek ve kaybolmayacaktır. Bir diş kliniğinde ağızdan materyal alınıp mikrobiyolojik muayene yapılmak istediğinde klinikte şu hazırlıklar yapılmalıdır:

1. Dişhekimi kendi kliniğine yakın olan bir mikrobiyoloji laboratuvarı ile önceden görüşmelidir. Laboratuvarın anaerobik bakteriyoloji çalışıp çalışmadığını, anerobik kavanoz, glove-box, gas-pack, anaerobik besiyeri gibi hazırlıklarının bulunup bulunmadığını öğrenmelidir. Eğer, laboratuvar anaerobik bakteriyolojik tetkikler yapabilecek düzeneğe sahip değilse kök kanalından kültür yapılması anlamlı değildir. Anaeroplardan dışındaki bakterileri çalışabilen bir laboratuvara ağızdan alınan materyali yollamak fevkalade gereksizdir.

Materyal alınacağı gün, iki adet anaerop sıvı besiyeri (tercihan PYG veya thioglucolate buyyon, Bkz. Besiyerleri) veya anaerop transport besiyeri klinikte hazır bulundurulur. Önceden söylendiğinde, laboratuvar bu besiyerlerini bir gün öncesinden hazırlayarak diş kliniğine ulaştırabilir.

Klinikte alınan materyallerde buyyon kullanılması daha pratiktir, ilave bir teçhizata gerek bırakmaz. Ama eğer buyyon yerine katı besiyeri kullanılacaksa, bu durumda, iki adet anaerop agar (AnaBAP), bir adet anaerop kavanoz ve bir adet gaz paketi klinikte hazır bulundurulur.

2. Bir adet bunzen beki veya ispirto ocağı diş kliniğinde hazır bulundurulur.

3. Eğer kök kanalından, fistülü olan bir apseden veya periodontal cepten materyal alınacaksa, farklı kalınlıkta birkaç tane kağıt koni sterilize edilerek hazır bulundurulur. Bunun için, kağıt koniler, 5x5 cm ebadında kesilen ambalaj kağıtlarına tek tek sarılarak üzerlerine çaplarının kaç milimetre olduğu kurşun kalem ile yazılır. Bunlar kuru sıcak sterilizatöre veya otoklava konarak sterilize edilir. Bu suretle sterilize edilmiş kağıt konilerin ambalajları açılmadan raf ömürleri 10 gün kadardır. Rutubetlenirse, ambalajı açılırsa veya 10 günlük raf ömrü dolmuşsa, yeni bir ambalaj kağıdına sarılarak yeniden sterilize edilebilir.

4. Salyadan materyal alınacaksa steril bir petri kutusu mikrobiyoloji laboratuvarından, 50 gr parafin ticaretten temin edilip klinikte hazır bulundurulur.

5. Dilden materyal alınacaksa steril bir skarpel ve steril lastik silgiçler (mikrobiyoloji laboratuvarından temin edilir) önceden hazırlanmalıdır.

6. Biyopsi materyalinin mikrobiyolojik muayenesi yapılacaksa cerrahi malzemeler yanında lastik silgiçler, bir anaerop kavanoz veya burgu kapaklı tüp veya steril bir şişe bulundurulur.

7. Şart olmamakla birlikte narin anaeroplardan üretilmesi hedefleniyorsa bir adet manometresi bulunan azot gazı tankı ve steril bir kanül hazır bulundurulur. Bir yardımcı, işlem sırasında bu kanülden gelen azot gazını materyalin alındığı dokuya yakın olarak tutar. Böylece anaerop bakteriler havanın oksijeni yerine azot gazı ile temas ederler.

8. Eğer sıvı besiyeri kullanılacak ise bu besiyeri içerisindeki çözünmüş atmosfer oksijeninin uzaklaştırılması gerekir. Bu amaçla, bir kaynatma kabı (steril olması

gerekmez) içerisine çeşme suyu doldurulur, sıvı besiyeri içeren tüp bu suyun içerisine konularak ocağa yerleştirilir ve kaynamaya bırakılır. Toplam 10 dakika kaynaması içerisindeki Eh indikatörünün renksizleşmesi için yeterlidir (Bkz. Anaerobizm). Sonra kendi halinde soğuması beklenir. Bu işlem hastanın randevusundan 15 dakika önce bitmiş olmalıdır. Katı besiyerine ekim yapılacaksa bu işlemler gerekmez.

9. Hasta en az 4 gün öncesinden beri hiçbir antibiyotik kullanmıyor olmalı, ağızına hiçbir lokal antiseptik uygulamıyor olmalıdır. Çünkü, hastanın kullanmakta olduğu antibiyotiğin etkisiyle, incelenen floradaki bakterilerin sayısı, çeşitlilik ve kimliklerinde ve hatta antibiyotik duyarlılık testlerinde önceden kestirilemeyen sapmalar ortaya çıkabilir. Antibiyotik veya antiseptik molekülü ile karşılaşan bir bakteri hücresi ölmeden önce defektif formlarına döner (L-form gibi). Uzayabilir, hareketli ise hareketsizleşebilir, farklı boyanabilir ve mikrobiyoloji laboratuvarını yanıltarak yanlış identifikasyona sebep olabilir.

Bu hazırlıklar yapıldıktan sonra ağızın muhtelif bölgelerinden mikrobiyolojik materyal alınabilir.

İnfekte kök kanalından materyal alınması:

İnfekte kök kanalından kültür yapılması dişhekiminin kök kanalı içerisinde hangi mikroorganizma ile karşı karşıya bulunduğunu bilmesini, doğru tedavi politikasını belirlemesini ve iyileşmeyi monitörize etmesini mümkün kılar. Möller metodu halen kullanılan metottur. Enfekte kök kanalının steril koşullar altında açılması ve içerisine steril bir kağıt koni sokularak kök kanalı içerisindeki mikroorganizmaların bu kağıt koniye bulaşması sağlanır. Daha sonra bu kağıt koni anaerop transport besiyerine veya doğrudan anaerop besiyerine inoküle edilir. İnkübasyonu takiben üreyen bakteriler identifiye edilir ve antibiyotik duyarlılık testleri için saflaştırılır.

Kök kanalları bir süredir (yaklaşık 2 gün) ağız ortamına açık vaziyette bulunuyor ise, bu durumda kültür yapılmamalıdır. Uzun süre açık kalmış kök kanalından izole edilebilecek bakteriler ağız florasının saprofit üyeleri olacaktır ve gerçek kök kanal patojeni olan bakteriler, yoğun kandida, stafilokok ve *Neisseria* kolonileri arasında maskelenerek gözden kaçabilecektir. En az 2 gün boyunca kök kanallarının kapalı kalması durumunda kanalın ekolojisine uyan patojen mikroorganizma tekrar dominant hale geleceği için izolasyon şansı kuvvetlenecektir. Böyle ekspozite kanallar, antiseptik uygulamadan serum fizyolojik ile yıkanıp kapatılmalı, beklenmelidir.

Tekrarlayan kanal tedavisi yapılmış bir dişin kök kanalından kültür yapılacaksa, kanal içerisindeki eski kanal dolgusu sökülmeli, steril serum fizyolojik ile bol irigasyon yapılmalı, 7-10 gün kadar kanallar boş ama kavite sıkıca kapalı olarak beklenmelidir.

Son günlerde hekim müdahalesi görmüş kanallardan kültür yapmak da hatalı sonuçlara sebep olur. Önceki müdahale sırasında kanal içerisine uygulanmış NaOCl, H₂O₂ veya diğer antiseptikler, bakteri hücrelerinin morfolojileri ve metabolizmaları üzerinde atipik değişimlere sebep olur. Yanlış identifikasyon ve yanlış antibiyotik duyarlılık sonuçlarına sebep olur. Uygun koşullar oluşturulduktan sonra aşağıdaki işlemler sıra ile yapılır:

1inci adım: Materyalin alınacağından bir kaç saat önce, mikrobiyoloji laboratuvarını anaerop materyalin yollanacağı konusunda telefon ile bilgilendirmek doğru olur.

2inci adım: Sorunlu diş açılmadan önce:

a) Hasta ağızını 2 dakika boyunca su ile çalkalar,

b) Steril bir pamuk pelet %10 povidon-iodine (Batticon, Betadine, Iodeks, Isosol, Batiodin, Polyod) solusyonuna batırılarak steril bir pens ile diş üzerine bırakılır, 2 dakika bu şekilde beklenir,

c) Hasta ağızını tekrar 2 dakika boyunca su ile çalkalar, rubber dam bu aşamada takılır, salya emici yerleştirilir.

d) Steril bir pamuk pelet %70 lik etil alkole batırılır, şişenin kenarına bastırılarak fazla alkol pamuk üzerinden alınır ve pamuk pelet dişin yüzeyine sarılır, (bu müdahale bakterileri öldürmez, bakterileri diş yüzeyine yapıştırır ve oradan kalkmasına engel olur), böylece biraz sonra kullanılacak olan kağıt koni diş kuronuna yanlışlıkla temas etse bile kontaminasyon riski azalır. En az iki antiseptik kullanılan yüzey dezenfeksiyon işleminde bile kontaminasyon riski %3 seviyesindedir ve sıklıkla oral flora bakterilerinden ibarettir. En sık rastlanan kontaminant kandida cinsi mantarlardır. Daha az sıklıkla stafilokok, difteroid, Gram negatif barsak bakterileridir.

e) Diş ünitesinin hava ve su tanklarında filtre kullanılıyor ise, diş hava-su spreyi ile yıkanır, aksi halde hava-su spreyi kullanılmamalıdır, çünkü aeratörün su ve hava tankında bulunabilecek bakteriler hiç de azımsanacak miktarda değildirler.

f) Steril bir frez ile kavite açılır, açıksa genişletilir ve kanal ağız(lar)ı bulunur. Azot gazı kanülü kullanılacaksa, bu aşamada bir yardımcı personel azot gazı kanülünü kavite içerisine/kenarına yakınlaştırır ve burada tutar.

g) Steril bir 15 numara kanal eğesi ile apekse kadar ilerlenir ve hafifçe kazınarak dışarı çekilir. Kanalından kültür yapılması düşünülen dişler zaten devital olduğundan bu işlem için anestezi gerekmez.

3üncü adım: Eğer kanaldan eksüda geliyor ise, steril bir enjektör kanala sokulur, aspirasyon yapılır. Bu yöntem, en ideal anaerobik materyal alma yöntemidir ve Möller'in kağıt koni yönteminden daha üstündür. Fakat her zaman mümkün olamamaktadır. Bu şekilde materyal almak mümkün olmuşsa, enjektöre fiske vurularak eksüdanın köpüklenmesi giderilir, enjektörün havası alınır, sonra iğnenin dış yüzeyine bulaşmış olabilecek bakterileri öldürmek için enjektörün iğnesi alevden geçirilir. İğne, sıvı besiyeri içerisine en derine daldırılır ve piston hafifçe bastırılarak, eksüda buraya yavaş-yavaş boşalması sağlanır. Bu aşamada tüpü sallamaktan kaçınılmalıdır. İstenirse bu enjektörün havası alınıp laboratuvara bu şekilde yollanabilir. İnjektördeki materyal yeterliyse bir kısmı sıvı besiyerine ekilir geri kalan kısmı laboratuvara yollanır. Yollanmadan önce iğne ucu ikiye katlanmalı veya iğne ucu bir kurşun kalem silgisine saplanmalıdır. Böylece enjektörün içerisine hava girmesi engellenir.

Kanaldan eksüda gelmiyorsa (genellikle gelmeyebilir), bunzen beki veya ispirto ocağı yakılır, önceden sterilize edilmiş ve kanal içerisinde rahat hareket edebileceği düşünülen çaptaki kağıt koni, sterilizasyon için sarıldığı kağıt ambalajından çıkarılır. Bu işlem aleve en yakın yerde yapılmalıdır ve kontaminasyon riskini azaltmak için bu sırada odada kuvvetli hava akımı bulunmamalıdır. Steril bir pens ile kağıt koninin kalın tarafından tutularak, ince ucu kanal içerisine itilir. Mümkün olan en derin şekilde ilerletilir, hasta ağrı duyduğunu işaret veya telkin ediyorsa 1 mm kadar dışarı çekilir. Hafifçe oynatılarak kanal duvarlarına sürtünmesi sağlanır. Bu vaziyette 5-10 saniye beklenir, sonra dışarı çekilir. Eğer kağıt koninin çapı apekse girmeye uygun değilse uygun çaplı bir yenisi ile aynı işlem tekrarlanır.

4üncü adım: Kağıt koni kanaldan çıkarıldıktan sonra bir kaç varyasyon tarif edilmiştir:

Kağıt konin ucu kuru ise :

A. Doğrudan ekilir: Serene ve Mcdonald yaptıkları çalışmalarında ilk kullanılan kağıt konilerin daha yüksek oranda pozitif kültür sonuçları gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu sebeple kanala sokulan ilk kağıt koninin ucu ıslak olmasa bile derhal besiyerine ekilmesini önermişlerdir. Doğru olan yöntem kuru bile olsa ilk kağıt koninin ekilmesidir. Yoğun üreme olduğu önceden bilinen dişlerde ilk kağıt koni atılabilir.

B. İlk kağıt koni atılır: Başka çalışmalar, kanaldan çıkan ilk kağıt koninin ucu kuru ise yeterli miktarda bakteri bulunmayabileceği düşüncesiyle atılmasını, 2 ml steril serum fizyolojik ile kanalın yıkanmasını, yeniden kağıt koni yerleştirilmesini ve bu yeni kağıt koninin besiyerine ekilmesini önermektedir. Bu, yöntemde kontaminasyon riski vardır.

Kağıt koninin ucu ıslak ise:

A. Doğrudan ekilir. Kontaminasyon riski daha az olduğu için bu yöntem uygulanmalıdır. Kağıt koninin kanaldan ucunun ıslak çıkması bir isabettir.

B. İlk kağıt koni atılır. Kanala yeni bir kağıt koni itilir, yaygın ıslaklık kayboluncaya kadar yeni bir kağıt koni ile değiştirilir. Kağıt koninin apeks oturan ucunda hafif bir ıslaklık tespit edilebiliyorsa son uygulanan kağıt koni ekilir. Buradaki düşünce şudur: Eğer periapikal eksüda fazla ise içerisinde bulundurabileceği konak antikorlarını besiyerine taşımamak ve böylece besiyerine aktarılan bakterilerin daha bol üremesini temin etmektir. Halbuki sıvı besiyeri kullanıldığında kanaldan besiyerine taşınabilen antikorlar zaten dilüe olmaktadır. Belkide bu varyant, sadece katı besiyerine ekim yapılacağına uygulanmalıdır. Diğer yandan, gereğinden fazla manüplasyon ve zaman kaybına bağlı olarak bazı narin anaeroplardan hava ile temas ederek ölmesi gibi bir riski vardır. Ayrıca inokülüm miktarı ve patojen bakteriyi izole etme şansı, her kağıt konide giderek azalmaktadır. Farber ve Seltzer, bu aşamada kanal içerisine azot gazı üfleyen bir kanül sokulmasının faydasını göstermişlerdir. *Fusobacterium* ve bazı *Bacteroides*'ler oksijene; *Actinomyces*, *Propionibacterium* ve streptokoklardan daha duyarlıdır.

Aynı vakanın periyodik takibinin yapıldığı durumlarda hangi varyasyon ile materyal alındıysa daima aynı varyasyon ile materyal alınması gerekir.

5.inci adım: Yukarıdaki metotlardan herhangi birisi ile alınmış olan materyal hasta yanında besiyerine ekilir:

Katı besiyerine ekim: petri kutusunun kapağı alevin yanında açılır, steril pens ile tutulan kağıt koni agar yüzeyine bastırılır, sert hareketlerle sürtülür, yüzeye iyice yayılır, kağıt koni agar yüzeyine birkaç kere saplanır, son saplandığı yerde saplanmış şekilde bırakılır. Petri kutusunun kapağı kapatılır. Hiç vakit kaybetmeden, anaerobik kavanoz içerisine konur. Bir adet gaz paketinin ambalajı yırtılır, içerisine 10 ml çeşme suyu ilave edilerek kavanoz içerisine bırakılır, kavanozun kapağı süratle kapatılır, iyice sıkılır. Anaeroplardan oksijen temasına tahammülsüz olduğu daima hatırlanmalıdır. Kağıt koni ağızdan çıktıktan sonraki işlemler 5-10 dakikayı geçmemelidir. Bu kavanoz, yana eğilmeden laboratuvara teslim edilir. Aynı çaptaki bir başka kağıt koni yeniden kanala sokularak yeni bir katı besiyerine daha ekim yapılır ve bu, aerop şartlarda inkübe edilir.

Sıvı besiyerine ekim: Kaynamış ve yanak yakmayacak kadar soğumuş (39-42 °C) olan besiyerinin (tüpün) kapağı bir bunzen bekinin yanında açılır, kağıt koni tüpün içerisine (sıvı besiyerinin tüpe temas ettiği cam yüzeye yakın şekilde) daldırılır, gerekirse küçük fiskelerle kağıt koninin sıvı besiyerinin dibine çökmesine yardım edilir ve tüpün kapağı hemen kapatılır. Bu işlemi çabuk yapmak ve alevin en çok 1-2 cm uzağında çalışmak gerekir. En önemli kural oksijen temasını en az seviyede tutmak için tüpü sertçe sallamamaktır. Laboratuvar bunu anaerop inkübe edecektir. Aynı çaptaki bir başka kağıt koni yeniden kanala sokularak yeni bir materyal daha alınır, bu materyal bir başka sıvı besiyerine ekilir. Bu ikinci besiyeri aerop şartlarda inkübe edileceği için hava ile temas etmesinde bir mahzur yoktur. Tüpler sallanmadan laboratuvara teslim edilir.

Materyali laboratuvara teslim ederken hasta adı, soyadı, yaşı, materyalin infekte kök kanalından alındığı, hekimin adı ve telefonu yazılmalıdır.

Bu adımda kullanılacak bazı hazır paketler vardır. Hasta başında anaerop materyal alma ve transport işleminde kullanmak için ticaretten temin edilebilecek bazı kitler şunlardır: BACTEC 460, BACTEC NR 660, BACTEC NR 720, BACTEC NR 860, BACTEC NR 7A, BACTEC NR 17A, BACTEC NR 27, BACTEC Plus 26/27, BACTEC

460. Bu besiyerlerinin kullanım talimatlarına uyulduğunda klinik önemi olan pekçok anaerop mikroorganizmanın izolasyonu mümkündür. Genel olarak içeriklerinde PYG broth, Chopped-Meat broth, Enriched Thiogluconate broth, PY broth bulunur, ambalaj ve standardizasyonları hasta başında çalışmaya müsaittir, birçoğu için ayrıca bir transport besiyeri gereksinimi yoktur. Prospektüsleri ve kullanım kılavuzları ambalajın içerisinde bulunur. Yalnız kök kanalı enfeksiyonları için değil, aynı zamanda, derin perimandibüler localardan ve periodontal enfeksiyonlardan da, materyal almak amacıyla kullanıma müsaittir. Bazı ticari kitlere fakültatif anaerop bakterileri inhibe etmek için SPS (*Sodium Polyanethol Sulfonate*) ilave edilmektedir. Bir dezavantaj olarak bu madde *Peptostreptococcus anaerobius*'u da inhibe etmektedir. Eğer SPS katkısı bulunan bir ticari kit kullanılacaksa besiyeri içerisine %1-2 jelatin katılarak bu inhibisyon en aza indirilmelidir. İçerisine fenil etil alkol ilave edilmiş anaerop ticari kitler *Clostridium*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*'ları seçer fakat hem fakültatif anaeroplara ve hem de *Capnocytophaga*'ları inhibe eder. Bu inhibisyonu engellemenin pratik bir yolu yoktur. Böyle ticari kitlerde radyometrik olarak ve floresan verip vermediğine bakarak identifikasyon yapabilecek sistemler de bulunmaktadır. BacT-Alert (Organon,NC) ticari kiti inokülasyonu takiben ortama derhal anaerobik atmosfer temin eder, Eh indikatörü ile dışarıdan izlemeye müsaittir. Kolorimetrik teşhise götüren başka kitler de vardır (BACTEC 9240 gibi).

6ıncı adım: Seanslar arası kontaminasyonu engellemek amacıyla kanal çok iyi kurutulup, kavite gayet sıkı bir şekilde kapatılır. Kanalın kuru bırakılması önemlidir. Kaviteyi kapatmak için rezin esaslı geçici dolgu değil polikarboksil simanlar tercih edilmelidir. Hastaya laboratuvar test sonuçlarının belli olacağı tarihe göre yeni bir randevu verilir.

Yukarıda anlatılan materyal alma prosedürleri periodontit, perikoronit, parulis, bütün periapikal enfeksiyonlar ve retromandibüler enfeksiyonlarda kullanılabilir.

Laboratuvar, hangi patojen bakterinin ürediğini ve o bakterinin antibiyotik duyarlılık test sonuçlarını bir rapor halinde dişhekimine bildirir. Rapor formatı her laboratuvar için farklıdır ve bunun hiç bir pratik önemi yoktur. Fakat genellikle ilk satırda hasta adı, soyadı, yaşı, materyalin nereden alındığı bilgileri bulunur. Daha sonra hangi bakterinin ürediği yazılıdır. Eğer infekte kök kanalında üreyen bakteri endodontik mikrobiyoloji konusunda anlatılan kök kanalı patojenlerinden birisi değilse veya onlarla akrabalığı olan bir bakteri değilse kültürün doğrulama amacı ile kültürün tekrarlanması gerekebilir. Örneğin laboratuvar, bir *Nesissaria*, *Candida*, difteroid, Gram negatif barsak çomakları veya stafilokoku patojen mikroorganizma olarak bildirmişse materyal alma işleminde bir kontaminasyon olduğu açıkça bellidir. Veya, laboratuvar hatalı anaerobik çalışma yapmış da olabilir.

Patojen mikroorganizmanın tespit edilmesinden sonra antibiyotik duyarlılık testleri Wilkins-Thiel metoduna göre yapılır. Kirby-Bauer yöntemi oral patojenler için uygun değildir.

Periodontal cepten mikrobiyolojik materyal alınması:

Üst (bazen alt) birinci büyük azıların vestibüldeki dişeti cebi bu iş için tercih edilir. Çünkü bu diş stenon kanalının ağızına en yakın konumda yer alır. Eğer ağızda bu diş bulunmuyorsa (çekilmiş ise), bu dişe en yakın diş tercih edilir. İnfekte kök kanalından materyal alınması başlığında anlatıldığı gibi dişe antiseptik uygulanır. Hastanın yumuşak dokuları ekartör ile kenara çekilir, infekte kök kanalından materyal alınırken uygulanan Möller metodu uygulanarak materyal alınır. Cep içerisine sokulan kağıt koniler daha geniş yüzeye temas edebilmesi için yatay düzlem ile açı yapacak şekilde uygulanmalıdır. Fizyolojik dişeti oluşu likiti sebebiyle kağıt konilerin ucu genellikle ıslak çıkacaktır. İnfekte kök kanalı başlığında anlatılan şekilde inoküle edilir.

Alınan materyalden *Actinobacillus actinomycetemcomitans* üretilmesi hedefleniyorsa üre zengin besiyerine inokülasyon yapılabilir ve CO₂'li atmosferde inkübe edilebilir.

Dentoalveoler apseden mikrobiyolojik materyal alınması:

İnfekte kök kanalından materyal alınırken anlatılan yüzey dezenfeksiyonundan sonra :

Fistül bulunuyorsa: uygun çaptaki bir kağıt koni fistül ağzından itilir, kemik içerisine ilerletilir, infeksiyon merkezine girilir ve kağıdın bir miktar sıvı emmesi beklenir. Bu işlem, genellikle anesteziye gerek kalmayacak kadar ağrısızdır. İnfekte kök kanalı başlığında anlatılan şekilde inoküle edilir.

Fistül bulunmuyorsa: Fluktuan apselerde bistüri ile drenaj yapılır, lezyondan ilk akan değil bir süre sonra sızan cerahat ya enjektör ile veya steril kağıt konilerle besi yerine taşınır. Hiç insizyon yapmadan, uygun çaplı bir enjektör ile lezyonun içerisine doğrudan girmek de mümkündür. (Lezyon merkezine anestezi yapılmaz. Gerekirse çevresine ring blokaj uygulanır). İnjektör ile apse merkezinden materyal almak üstün bir uygulamadır. Bu işlemde önce infekte kök kanalından materyal alınırken uygulanan yüzey dezenfeksiyon işlemleri yapılmalıdır.

Salyanın mikrobiyolojik muayenesi:

Uyarılmadan: Yemek yedikten en erken 1 saat sonra, hasta bir koltuğa dik olarak oturtulur, başı steril bir petri kutusunun içerisine eğilerek, burnundan nefes alması ve ağızını açık bırakması istenir. Bu şekilde dakikada 0.25 ml salya toplanabilir.

Uyarılarak: Hastanın ağızına parafin verilir ve yumuşayınca kadar çiğnemesi istenir. Hastanın başı öne eğilerek salya toplanır. Bu suretle dakikada 1 ml nin üzerinde salya toplamak mümkündür. Hastanın tükürmesi salyanın köpüklenmesine yol açar bu istenmeyen bir durumdur.

Bazen salya çok az olabilir ve parafin ile salyayı uyarmak bile yetersiz kalabilir. Böyle durumlarda parasempatik uyarıcı olarak ağıza %2 pilokarpin içeren bir göz damlası damlatılır (Pilocarsol, Pilomin, Pilosed göz damlası). Biraz beklenir ve salya toplanır. Pilocarpin, vagotoniktir, dil altı mukozasından az da olsa kana geçebilir.

Her iki metot ile istenilen miktar salya toplandıktan sonra (gerekliyse volüm ölçüldükten sonra), infekte kök kanalından materyal almak başlığında anlatılan şekilde inoküle edilir. Salya toplamak için Schaeffer kupası adı verilen özel kaplar vardır. Bu amaçla steril petri kutusu kullanmak yanlış değildir.

Eküvyon ile salyanın besiyerine taşınması da mümkündür. Fakat pamuk elyafları arasında kalacak hava sebebiyle anaeroplara üretme şansı azdır. Mutlaka sürüntü materyal alınması gerekiyorsa, lastik silgiçler kullanılmalıdır (Tablo.18.1).

Dil yüzeyinden mikrobiyolojik materyal alınması:

Steril bir gazlı bez ile dilin apeksi (uc kısmı) tutulur ve dışarı çekilir. Bir skrapel ile dil yüzeyinin istenilen bölgesi kazınarak, bunzen bekinin hemen yanında ekim yapılır. Bu işlem azot gazı temin eden kanül eşliğinde yapılacaksa hızlı çalışılmalı ve hastanın azot soluma süresi en az olmalıdır.

Biyopsi materyalinin mikrobiyolojik muayenesi:

Taze alınmış biyopsi materyali steril kum ile dövülerek anaerop besiyerlerine ekilebilir, ancak bu işlem glove box adı verilen anaerop kabinlerde yapılmalıdır. Kilinikte alınan biyopsi materyali alevin yanında steril bir burgu kapaklı tüpe (veya şişeye) konur. Laboratuvara bu şekilde yollanır.

ANAEROP MATERYALİN TAŞINMASI:

Ağız içerisinden alınan materyalin yarım saat içerisinde laboratuvara ulaştırılması mümkünse, yukarda anlatılan metotlarda anaerobik transport besiyerine gerek yoktur. Böylece besiyerinden besiyerine materyal aktarılmadığı için kontaminasyon riski de bir ölçüde azalmış olur. Fakat materyalin laboratuvara yollanması gecikecekse bu durumda transport besiyeri gereksinimi vardır. (Bkz. Besiyerleri)

Enjektör ile aspire edilen materyal; 1 ml den az ise en çok 10 dakika, 1-2 ml ise en çok 30 dakika, 2 ml den çok ise en çok 2-3 saat içerisinde anaerop besiyerine ekilmelidir. Transport besiyerlerine konulan materyalin orada bekletilme süresi sınırlıdır. Ekilmiş bir anaerop transport besiyeri, ençok 2-3 saat bekleyebilir. Buzdolabında (4 °C'de) bu süre biraz daha uzundur. Doku biyopsi materyali en çok 30 dakika havada ve en çok 2-3 saat transport besiyerinde bekleyebilir. Anaerobik lastik silgiçler nemli anaerobik atmosferde en çok 1 saat bekleyebilir, anerobik transport besiyerinde ise en çok 2-3 saat bekleyebilir. En uygun koşullarda bile materyal uzun süre bekletilmemeli ve en kısa zamanda uygun besiyer(ler)ine inoküle edilip, anaerop atmosfer koşullarında inkübasyona başlanmalıdır.

ANAEROP MATERYALİN DOĞRUDAN MUAYENESİ:

Alınan materyalin göz ile muayenesi, mevcut mikroorganizmaların kimliği üzerinde bir ön tahminde bulunmayı kolaylaştırabilir. Örneğin kanaldan kağıt koniye emdirilen veya enjektöre alınan mayii koyu sarı renkte granüler yapıdaysa aktinomikoz apsesi düşünülmelidir. Fena kokulu ise anaerop bakterilerin mevcudiyeti düşünülmelidir. Siyah renkli bir akıntı *Metanobacter* cinsini aramayı gerektirebilir.

Mikroskopik muayene amacıyla biraz fazla materyal alınabilir veya alınan materyalden artakalan kısmı bir lam üzerine alınıp Koopler's modifikasyon Gram boyama veya Giemsa, wright, akridin orange boyaları ile boyanabilir. Daha iyisi preparat etiketlenerek kültür sonucunun okunacağı zamana kadar bekletilmelidir. Materyalin doğrudan muayenesinde görüldüğü halde kültürde ürememiş bakteri(ler) varsa; 1) anaerobik atmosferin oluşup oluşmadığı atmosfer indikatörleri ile gözden geçirilmeli, 2) besiyeri seçiminde ve besiyeri kalitesinde problem olup olmadığı gözden geçirilmeli, 3) gerekirse yeniden materyal alıp uygun besiyer(ler)inde kültür tekrarlanmalıdır. Ancak bazı anaeroplara disgonik olup ilk izolasyonda üremeleri ikinci haftaya kadar uzayabilmektedir. Üreme olmayan besiyerleri ikinci haftanın sonuna kadar bekletilmelidir. En ideal koşullarda bile ağızdaki mikroorganizmaların ancak yarısının kültür plağında üreyebildiği bilinmelidir.

İnfeksiyon sahasında bulunduğundan şüphe duyulan bir bakteri cinsi varsa bu safhada materyale floresan boyalar uygulanabilir. Bilhassa belirli bir bakteri cinsinin mevcudiyetinden şüpheleniliyorsa veya bu bakterinin varlığı aranıyorsa (örneğin materyalde *A. actinomycetemcomitans* veya *P. gingivalis* aranıyorsa), bu bakteriye özel ticari floresan boyalar kullanılarak materyal bir lam üzerinde boyanır. (Not: nontoksijenik *Clostridium*lar için kullanılan floresan boyalar *Peptostreptococcus anaerobius* ile çarpaz reaksiyon verebilmektedir). Aranılan bakteri materyalde bulunuyorsa, floresan mikroskopta ışıltılı görünecektir.

Anaerop materyalin alınacağı organ veya doku	Önerilen anaerop materyal	Önerilmeyen anaerop materyal
Baş-boyun	Enjektör ile apse aspiratı, Biyopsi materyali, Aspirasyon olanaksızsa Lastik silgiç.	Eküvyon
Dişin kök kanalı	Enjektör ile apse aspiratı, Kağıt koni	Pamuk meç, kanal aleti
Dişeti cebi	Kağıt koni	Pamuk meç, eküvyon
Salya	Ağızı açarak damlatma, lastik silgiç	Tükürmek, Eküvyon
Dil	Kazıma materyali Lastik silgiç	Eküvyon
Akciğer	Transtrakeal aspirat, Akciğer ponksiyon materyali, Biyopsi materyali, Bilerek alınan bronkoskopik örnekler, Torakotomi örnekleri, Cerrahi yoldan lastik silgiç*.	Öksürülen balgam, Balgam, Endotrakeal aspirat, Başka amaçla alınan bronkoskopik örnekler.
Santral sinir sistemi	Enjektör ile apse aspiratı, Biyopsi materyali, Cerrahi yoldan lastik silgiç*.	Eküvyon
Abdomen	Enjektörle periton mayi, Enjektörle apse aspiratı, Biyopsi materyali, Safra, Cerrahi yoldan lastik silgiç*.	Eküvyon
Üriner sistem	Enjektörle alınan suprapubik idrar	Doğrudan idrar, Eküvyon
Kadın genital sistemi	Kuldoskopi materyali, Aspiratör ile endometrial aspirat, Enjektör ile apse aspiratı, Biyopsi materyali, Lastik silgiç, İntrauterin cihazın kendisi.	Eküvyon
Ostomiyelit, artrit	Enjektör ile apse aspiratı, Biyopsi materyali, Cerrahi yoldan lastik silgiç*.	Eküvyon
Yumuşak doku	Enjektör ile apse aspiratı, Biyopsi materyali, Cerrahi yoldan lastik silgiç*.	Eküvyon
Maksiller sinüs	Orta meadan enjektör ile alınan aspirat	Eküvyon, Sümük

Tablo 18-1 Çeşitli organ ve dokulardan anaerop materyal alınırken izlenecek prosedür.

* Cerrahi yoldan lastik silgiç ifadesiyle insizyon ile infeksiyon merkezi açılarak sürülen lastik silgiç kastedilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Aydın M. Endodontik mikrobiyoloji. *In: Alacam T. eds. Endodonti. Ankara: Barış Yayınları 2000:313-385.*
2. Aydın M, Gunay I, Koksal F, *et al.* Taksometri ve bakteriyel identifikasyonda bilgisayar kullanımı. *Mikrobiyol Bül* 1996, 30:281-287
3. Elmer WK, Stephen DA, William MJ, *et al.* Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 4.th ed, Lippincott JB Company, Philadelphia, 1992, 94-.
4. Finegold SM, Martin WJ, Scoot EG. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 5th ed, St.Louis, CV Mosby 1978:490-.
5. Kıyan M. Anaerob bakteriler. *In: Ustaçelebi Ş. Ed. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitapevi 1999: 611-668.*
6. Koleman EW, Stephen DA, William MJ. Diagnostic Microbiology, 4.th ed., J.B.Lippincott Comp, Philadelphia, 1992: 520-602.
7. Könönen E. Jousimies SH, Asikainen S. The most frequently isolated Gram-negative anaerobes in saliva and subgingival samples taken from young women. *Oral Microbiol Immunol* 1994; 9: 126-128.
8. Norell SA, Messley KE. Microbiology Lab Manual: Principles and Applications. New Jersey: Prentice-Hall, Inc. 1997: 54-.
9. Pajukanta R, Asikainen S, Forsblom B, Jousimies SH. Evaluation of the E test for antimicrobial susceptibility testing of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 1994; 9: 123-125.
10. Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 7:257-262.