

GRAM PREPARATININ İNFEKSİYON HASTALIKLARININ TANI VE İZLEMİNE KATKISI**Arif KAYGUSUZ**

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL
kaygusuz@istanbul.edu.tr

ÖZET

Gram boyama mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılan en temel testlerden biridir. Bakterilerin Gram reaksiyonlarına, şekillerine ve büyüklüklerine göre tanımlanmaları için kullanılmaktadır. Birçok infeksiyonda olası etkeni belirlemede çok yardımcıdır. Bundan başka klinik örneklerin kalitesini değerlendirme ve iltihap varlığını saptama konusunda da mikrobiyoloji laboratuvarına yardımcı olur.

Anahtar sözcükler: Gram boyama, infeksiyon hastalıkları, izleme, tanı

SUMMARY**The Assistance of the Gram Stain in the Diagnosis and Follow-up of Infectious Diseases**

Gram stains is one of the most basic tests in microbiology laboratory. It is used to identify bacteria on the basis of Gram reactions together with their sizes and cellular morphologies. It is a very usefull test for the presumptive diagnosis of the etiologic agents in many infections. It also serves to the microbiology laboratory to assess the quality of clinical specimens.

Keywords: diagnosis, evaluation, Gram stain, infectious diseases

Biyolojik materyellerin boyanmasının tarihçesi

Bilim tarihine baktığımızda mikroskopik incelemede katkısı bulunan beş önemli kişi öne çıkmaktadır. Mikroskopun bulunması ile mikroorganizmaların gösterilmesi (1677, Antony Leeuwenhoek), sentetik boyaların bulunması (1856, William Henry Perkin) ve mikroorganizmaların sentetik boyalarla boyanarak gösterilmesi (1881-1882, Paul Ehrlich, Robert Koch; 1884 Christian Gra)^(16,17,18,19,22-24,28,33).

1856 yılında William Henry Perkin sıtma tedavisinde kullanılmak üzere kinin sentezi üzerinde çalışırken tesadüfen sentetik boyaları bulmuş ve bu buluşu hem tekstil sanayinde hem de biyolojide çığır açmıştır^(17,23,33). Bu boyalar Ehrlich'in büyük ilgisini çekmiştir ve kuzeni patoloğ Carl Weigert yanında çalışırken sentetik boyaların organ, doku ve hücrelere karşı spesifikliğı ile ilgilenmiştir. Bu boyaların kan hücrelerinin ve doku hücrelerinin değişik komponentleri ile spesifik reaksiyon gösterdiğini gözlemlemiş ve 1878'de hayvan dokularının boyanmasının teori ve pratiğı konusundaki doktora tezini tamamlamıştır. Ehrlich boyaları asidik, bazik ve nötral

olarak sınıflayan ilk kişidir. Ehrlich 1879'da nötral boyaların kullanımını tanımlamış ve bunları periferik yaymadaki hücrelerin ayırımında kullanmıştır. Onun bulunduğu boyama teknikleri ile kan hücrelerinin granüllerinin boyanması hematoloji ve doku boyamalarında temel olmuştur. Örneğın Ehrlich'in çalışmalarından yararlanan Romanowsky ve Malakowsky birbirinden bağımsız olarak 1891 yılında eosin ve metilen mavisi karışımı ile sadece kan hücrelerinin ayırımını değil, *Plasmodium* nükleusunu da gösterebilmişlerdir. Bu boylara çözücü ve fiksatif olarak metanolün kalıtılması ile de yöntemleri geliştirilmiştir (Jenner 1899, Leishman 1901, May ve Grünwald 1902, Wright 1902, Giemsa 1902)^(15,17,33). Ehrlich sentetik anilin boyalarını biyolojik boyamada kullanan ve metilen mavisi ile bakterileri boyama yöntemini ilk uygulayan kişi olmuştur. Bakterilerin metilen mavisi ile boyanması konusundaki çalışmasını 1881 yılında yayımlanmıştır⁽⁹⁾. İlk kez Robert Koch tarafından *Mycobacterium tuberculosis*'i boyamak için kullanılan metilen mavisi ve Bismark kahverengisi ile gerçekleştirilen

yöntemi⁽³²⁾ de modifiye ederek halen kullanmakta olduğumuz aside dirençli boyama yöntemini de geliştirmiş ve bu çalışmasını da 1882 yılında yayınlamıştır⁽⁸⁾. Gram tarafından bulunan yöntem de bu çalışmadan esinlenerek yapılmıştır^(12,19).

Hans Christian Joachim GRAM

Hans Christian Joachim GRAM 1853 yılında Danimarka'da doğmuştur. Copenhagen Metropolitan School'dan 1871'de mezun olmuştur. Bitkilere çok ilgi duymuş ve 1873-74 yıllarında zoolog Japetus Steenstrup yanında botanik asistanı olarak çalışmıştır. Daha sonra tıba ilgi duymaya başlamış ve 1878'de Kopenhag Üniversitesinden Tıp Doktoru ünvanı almış ve 1883 yılına dek de burada asistan olarak çalışmıştır. 1883-85 yıllarında Avrupa'da Strassburg, Marburg ve Berlin'de bakteriyoloji ve farmakoloji çalışmıştır. Gram'ın ilk çalışmaları eritrositlerin boyutları ve canlılığı üzerine olmuştur. 1882 yılında eritrositlerin sayısı ve morfolojileri üzerinde yaptığı bir çalışma ile altın madalya almıştır. Makrositlerin pernisiyöz aneminin karakteristik bulgusu olduğunu ilk gösteren kişidir. Daha sonra insan eritrositlerinin boyutları ile ilgili çalışması konusundaki doktora tezini tamamlamıştır. Uluslararası üne kavuşmasına neden olan çalışması, bakterilerin daha sonra kendi adı ile anılacak olan boyanması yöntemini bulmasıdır. Buluşunun kısa hikayesi şöyledir. 1884'de Berlin'de Karl Friedländer (1847-1887) ile doku ve hücrelerin farklı yapılarını gösterme amacıyla çeşitli boyama yöntemleri üzerinde çalışmaya başlamıştır. Jansiyon moru ile böbrek tubuluslarını böbrek dokusundan ayırma konusundaki uzun ve yorucu çalışmaları dokudaki jansiyon morunun alkolle tamamen giderilmesi nedeniyle sonuçsuz kalmıştır^(30,33). Daha sonra pnömoniden ölen hastaların akciğer dokuları ile çalışırken bazı boyaların bakteriler tarafından daha iyi alındığını ve tutulduğunu gözlemiştir. Yaptığı boyama bugün yaptığımızın nerdeyse aynısıdır. Kısaca akciğer dokusu sıvısından hazırladığı preparatı bunzen beki alevinde kurutmuş ve daha sonra lamı jansiyon (kristal) moru ile kaplamıştır. Yıkadıktan sonra mordan olarak lugol solusyonu ilave etmiştir. Daha sonra boyayı preparattan etanol ile yıkayarak uzaklaştırmıştır. Bu işlem sonucunda şunu görmüştür. Pnömonokok gibi bazı bakteriler boyayı bırakmamıştır ve koyu mavi olarak kalmış, bazı bakteriler de boyayı bırakarak açık renkte görünmüşlerdir. Böylece dokudaki bazı bakterilerin alkolle boyayı bırakmadığını ve doku örneklerinde bakterilerin boyanarak gösterilmesini sağlayan yöntemi bulan ilk kişi olmuştur^(12,30,33). Bu yöntem ile pnömoniden ölen hastaların doku örneklerinde farklı bakterilerin bulunduğu da gösterilmiş ve pnömoninin birden fazla etkenle oluşabileceği de anlaşılmıştır. Önceleri pnömoninin sadece *Streptococcus*

pneumoniae gibi tek bir etkenle olduğu sanılırken, akciğer dokusu örneklerinde Gram negatif bakterilerin de görülmesi şaşırtıcı olmuş ve daha sonra da eskiden Friandler basili bugün *Klebsiella pneumoniae* dediğimiz bakterinin de pnömoni etkeni olabileceği anlaşılmıştır⁽³³⁾. Gram 1886-89 yıllarında Kopenhag Üniversitesinde farmakolojik çalışmalarına devam etmiştir. 1891'de farmakoloji dersleri vermeye başlamıştır ve bir sene sonra profesör olmuştur ve burada çalışmalarını 1900 yılına kadar sürdürmüştür. Daha sonra bu görevinden ayrılarak tıp üzerinde yoğunlaşmak amacıyla, patoloji ve tedavi profesörü olarak çalışmaya başlamıştır. 1892'de Kongelige Frederiks Hospital and Rigshospitalet Hastanesinde İç Hastalıkları bölüm başkanı olmuştur ve 1923'e kadar bu görevinde kalmıştır. 1938 yılında 85 yaşında ölümüne dek birçok değerli eserler yazmış, önemli kurum ve kuruluşlarda görevler almıştır⁽³⁰⁾.

Gram çok alçak gönüllü birisiydi⁽³⁰⁾. Metodunu yayınladığı makalesini **“Birçok eksikliği ve kusuru olmasına rağmen bu yöntemi yayınlamak istedim, çünkü başka araştırmacıların da katkısıyla yararlı bir yöntem olabileceğini umuyorum”** cümlesiyle bitirmiştir^(12,30,33). Bu umudu gerçekleştirmiş ve birkaç yıl sonra Alman patalog Carl Weigert (1845-1904), alkol aşamasından sonra ikinci boya ilavesini (safranin) yönteme eklemiştir. Böylece Gram negatif bakteriler kırmızıya boyanarak tanınır olmuştur⁽³⁰⁾. Gram kendi orijinal yönteminde aslında kendisi zemin için zıt boyama da yapmıştır. Zeminin boyanması için zayıf Bismark kahverengisi kullanılırsa zemindeki doku hücre nükleuslarının hafif kahverengi (Bismark kahverengisi kullanılmazsa fiksatif olarak kullanılan iyot nedeniyle açık sarı) olacağını da söylemiştir⁽¹²⁾.

Gram boyama

İnfeksiyon bölgesinden alınan örneklerden yapılan yayma preparatların Gram yöntemi ile boyanarak mikroskopta incelenmesi mikrobiyoloji laboratuvarında en çok kullanılan çok basit, güvenilir ve vazgeçilmeyecek bir yöntemdir. Steril vücut sıvılarındaki (BOS, plevra, eklem ve periton sıvıları gibi) bakterileri saptamak için çok yararlıdır. Örneğin menenjit gibi yaşamı tehdit eden bir infeksiyonda etken konusunda 5-15 dakika gibi çok kısa sürede bilgi verebilir. Buna karşın etiyolojik etkenin moleküler tekniklerle gösterilmesi saatler, kültürle gösterilmesi ise günler hatta haftalar alabilir. Gram ile bakterilerin boyanma özellikleri yanında morfolojileri de belirlenir. İnfeksiyon etkeni olan maya ve mantarlar gibi mikroorganizmalar yanında, infeksiyon veya kontaminasyonun kanıtı sayılabilen çeşitli hücreler de Gram preparatında görülebilir (Tablo 1)^(3,11,13, 33,38,39,41,43).

Tablo 1: Gram preparatında görülenler^(33,41,43).

Mikroorganizma	Görülenler		Zor görülen bakteriler ²	Görülmeyen bakteriler
	Hücre	Kristal ¹		
Bakteriler	Nötrofil ³	Boya kristalleri	Campylobacter	Mikoplazma, Ureaplazma
Mayalar	Makrofaj ³		Brucella	Legionella (örnekten)
Mantarlar	Lenfosit ³		Bacteroides	Klamidya
Bazı parazitler	Epitel		Legionella (kültürden), Riketsiya	Coxiella
P.carinii	Skuamoz ⁴		Fusobacterium	Ehrlichia
Microsporidia	Kolumner sliyer ⁵			Bazı spiroketler
T.vaginalis	Sperm			Treponema
				Borrelia
				Leptospira
				Spirillum

1. Gram pozitif bakterilere ve mantarlara benzeyebilir.

2. Özellikle safranin ile zıt boyama yapıldığında görülmeleri çok zordur. Bu bakterilerin bazik fuksin veya karbol fuksin ile zıt boyanmaları daha iyi sonuç vermektedir.

3. İnfeksiyon varlığının göstergesidirler.

4. Genellikle örneğin iyi alınmadığını ve flora ile kontaminasyon olduğunu gösterir.

5. Örneğin alt solunum yolu materyeli olduğunu gösterir.

Tablo 2: Çeşitli Gram boyama yöntemleri ve kullanım alanları⁽⁴³⁾.

	Hucker		Karbon-fuksin		Kopelof	
	Çözelti	Süre	Çözelti	Süre	Çözelti	Süre
İlk boyama	Kristal viyole	30 s	Kristal viyole	30 s	Önce alkali kristal viyole (A solusyonu) konulur ve üzerine 5 damla B solusyonu damlatılır	2-3 dk
Fiksasyon	Gram iyot	30 s	Gram iyot	30 s	Kopelof iyot	= 2 dk
Dekolorizasyon	Aseton-alkol	~1-5 s	% 95 etanol	~30 s	3:7 Aseton/alkol	Hemen
Zıt boyama	Safranin	30 s	Karbon-fuksin veya % 0.8 bazik fuksin	= 1 dk	Kopelof safranin	10-30 s
Kullanım	Genel bakteriyoloji		Bacteroides. Fusobacterium Legionella Campylobacter Brucella		Anaerob bakteriler Bakteriyel vajinoz tanısı	
			ve diğer zayıf boyanan Gram negatif bakteriler.			

Gram boyama yöntemleri

Günümüzde Gram tarafından belirtilen orijinal yöntemin modifiye edilmiş şekilleri kullanılmaktadır. Kullanılan bu yöntemler ve başlıca kullanım alanları tablo 2'de gösterilmiştir.

Gram boyamanın mekanizması

Gram boyamanın ayırım özelliğinin, mikroorganizmaların hücre duvarlarının peptidoglikan ve lipid içeriği ile bu duvarın organik çözücülere karşı geçirgenliği ile ilişkili olduğu sanılmaktadır. Buna göre Gram pozitif bakterilerin hücre

duvarında bulunan kalın peptidoglikan tabakasının suda çözünmeyen kristal viyole-iyot kompleksini lipid çözücülerle bırakmaması nedeniyle mor boyandıkları, buna karşın ince bir peptidoglikan tabaka ve kalın bir lipid tabaka içeren Gram negatif bakterilerin ise lipid çözücülerle suda çözünmeyen kristal viyole-iyot kompleksinin hücre duvarından uzaklaştırılması sonucu kullanılan zıt boya rengiyle kırmızı boyandığı ileri sürülmektedir^(3,13,19-21, 29,33, 38,43). Bununla birlikte kesin mekanizma bilinmemektedir⁽³³⁾.

Başlıca kullanım alanları

Birçok klinik örneğin incelenmesi Gram boyama ile başlar (Tablo 3). Gram boyama infeksiyondan sorumlu etiyolojik etken konusunda, kültür veya bir başka yöntem sonucunu beklemezsizin erken klinik tanıya yardımcı olabilir, böylece kültür sonuçları gelene kadar uygun antibiyotiğin seçilmesine de yardımcı olabilir. Normalde steril olan sıvılardaki (BOS, plevra sıvısı, eklem sıvısı, periton sıvısı ve idrar) bakterileri saptamak için çok yararlıdır^(13,33). Duyarlılığı örnekte bulunan bakteri sayısı ile değişmekle birlikte, bakteri sayısının fazlaca bulunduğu infeksiyonun erken döneminde özellikle de antibiyotik kullanmamış hastalarda birçok durumda tanı koydurucu olabilir^(13,43). Gram boyamanın tanıda değerli olduğu her durumda, izleme amacı ile de kullanılır. Örneğin tedaviye yanıt vermeyen durumlarda başlangıçta saptanan etkenin devam edip etmediği veya yeni bir etkenin varlığı Gram boyama ile gösterilerek erken müdahale yapılabilir. Gram boyamanın başlıca kullanım amaçları:

1. Tanısal amaçla: Etiyolojik etkenin çabuk ve doğru olarak saptanmasında kullanılan en hızlı ve değerli yöntemlerden biridir⁽²⁶⁾. Kültür sonucu alınana dek olası etiyolojik tanı konulması ve erken klinik değerlendirme yapmaya olanak sağlar. Kültür sonucu 1-2 gün alırken, Gram boyama sonucu 5-15 dakika zaman alır. Menenjit ve pnömoni etkenleri Gram boyamada görülebilir ve spesifik tedaviye başlanabilir. Böylece gereksiz yere toksik ve/veya pahalı antibiyotikler kullanılmaması olur. Fuzobakteriler ve spiroketlerle oluşan Vincent anjiniinde etkenleri üretip tanımlamak kolay değildir ama Gram boyaması tanı koydurabilir. Nekrotizan fasiitli bir hasta dokusundan yapılan Gram boyamada zincir yapmış kokların görülmesi *Streptococcus pyogenes* infeksiyonunu, balgam örneğinde Gram pozitif diplokların görülmesi *S.pneumoniae*, BOS örneğinde Gram negatif diplokların görülmesi de meningokok menenjitini düşündürmektedir^(13,25,33).

2. Kalite kontrolü amacıyla: İncelenecek örneğin kültür için uygunluğunu saptamak için değerli bir araçtır⁽²⁶⁾. Kültür için alınan örneğin uygunluğu ve yeterliliğini saptamada Gram boyama yardımcıdır. Vajinal ve üretral örnekler gibi istisnalar dışında genel olarak çok sayıda epitel hücresi görülmesi örneğin iyi alınmadığının, polimorf nüveli lökosit (PNL) görülmesi ise örneğin infeksiyon bölgesinden alındığının göstergesidir^(13,33,43). Preparatta skuamöz epitel hücrelerinin (SEH) çokluğu genellikle flora bakterilerinin kültürde üreyeceğinin ve kültürün klinik öneminin olmayacağını göstergesidir. Bu şekilde değerlendirme yapmak gereksiz işlemlerle zaman, emek ve para harcanmasını önler. Buna karşın PNL görülmesi infeksiyonun kanıtı olacaktır^(33,33,43). Örneklerin bu şekilde kalite kontrolü özellikle balgam için çok değerlidir. Balgamda küçük büyütme ile görülen ortalama SEH sayısı 10'dan fazla ise örnek incelenmemeli ve tekrar

istenmelidir. *Legionella*, *M.tuberculosis* kültürü için gönderilen örneklerde ve kistik fibrozlu hastaların balgamlarında bu kriterler kullanılmaz^(39,43). SEH sayısının 10'dan fazla olduğu durumlarda her sahada bulunan PNL sayısı SEH sayısının 10 katından fazla bulunuyor ve preparatta baskın şekilde ve çok sayıda tek tip bakteri görülüyorsa örneğin incelenebileceği de belirtilmektedir⁽⁴³⁾. Erişkinlerdeki trakeal aspirat örneklerinde küçük büyütmede 10'dan fazla SEH görülmesi veya mikroorganizma görülmemesi (20 immersiyon objektifi sahasında en azından bir bakteri görülmeli) de örneğin mikrobiyolojik inceleme için uygun olmadığını gösterir. Çocukların endotrakeal aspirat örneklerinde mikroorganizma görülmemesi de örneğin mikrobiyolojik inceleme için uygun olmadığını gösterir⁽⁴³⁾. Bronkoalveoler lavaj (BAL) örneklerinde SEH sayısı % 1'den fazla ise örnek uygun kabul edilmemektedir⁽³⁹⁾. İdrar sedimentinin Gram boyamasında her sahada >3 SEH ve 3 farklı morfolojide bakteri görülen örneklerin mikrobiyolojik incelemesi gereksizdir⁽³⁹⁾. Yüzeyel yara sürüntülerinde 2'den fazla SEH görülmesi ama PNL görülmemesi de örneğin uygun alınmadığını gösterir⁽³⁹⁾.

3. Rutin yapılmayan kültüre gereksinim olup olmadığını anlamak için: Klinisyen gönderdiği bir örnekten rutin bakteriyolojik kültür istemiş ama Gram preparatında mayalar veya hifler veya dallanan Gram pozitif çomaklar görülmüşse, Gram preparatı örneğin mantar veya nokardiya açısından da incelenmek üzere, rutin ekim için kullanılan besiyerlerinden başka bu etkenleri üretecek ek besiyerlerine ekimi için yol gösterici olacaktır^(13,26).

4. Kültür sonucunun doğru yorumlamak amacıyla: Kültürde üreyen bakteriler ile Gram boyama sonucu uyuyor mu? Gram boyamada baskın şekilde görülen bakteriler kültürde de baskın şekilde üremiş mi? gibi soruların cevabı kültürün yorumlanmasında önemlidir. Bundan başka Gram preparatı örnekteki etkenleri olduğu gibi göstereceğinden, infeksiyon etkenleri konusunda kültürden daha değerli bilgi verebilir. Çünkü etken(ler)in dokuda ve besiyerinde üremeleri farklı olabilir. Örneğin mikst infeksiyonlarda etken olan bakterilerden bazıları besiyerinde üremeyebilir veya anaerob bir bakteri rutin kültürde üremeyebilir^(13,26).

5. Bakteri identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılık testleri için: İdentifikasyon ve duyarlılık deneylerinde izlenecek yol kültürde üreyen bakterinin Gram boyaması yapılarak belirlenir. Bakterinin Gram özelliği ve morfolojisi yanında besiyerindeki üreme özelliği de göz önüne alınarak uygun identifikasyon ve duyarlılık yöntemleri seçilir. Gram boyama özelliği bilinmeyen bir bakteriyi tanımlama için kullanılmaması gibidir. Çünkü bakteri identifikasyonu için kullanılacak yöntemler ve izlenecek yollar tamamiyle bakterinin Gram boyama ve morfolojik özelliğine göre seçilmektedir. Bakterinin Gram boyama özelliği doğru belirlenmemişse identifikasyon çoğu kez içinden çıkılmaz bir problem haline dönüşür.

Benzer şekilde antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılacak antibiyotikler de bakterinin Gram boyanma ve morfolojik özelliklerine göre belirlenir.

6. Bakterilerin kantitasyonu için: Santrifüje edilmeden lama damlatılan idrar gibi vücut sıvılarından yapılan Gram boyamaya, immersiyon objektifi ile bakıldığında her sahada bir veya daha fazla mikroorganizma görülmesi halinde, kültürde genellikle üriner sistem infeksiyonunun göstergesi olan mililitrede 10^5 'den fazla mikroorganizma ürer. Mililitrede 10^4 kadar bakteri bulunan örneklerde etkenin görülmesi için birçok sahaya bakmak veya örneği santrifüje etmek gerekir. Mililitrede 10^4 'den az bakteriyi santrifüje etmeden görmek olanaksızdır (13,43).

Tablo 3: Rutin olarak Gram boyama yapılması gereken ve gerekmeyen klinik örnekler^(39,43).

Boyama yapılması gereken örnekler	Gereksiz olanlar
Steril vücut sıvıları (santrifüj/sitosantrifüj) ile BOS (sitosantrifüj ile daha iyi) Perikard, plevra, periton, eklem, parasentez sıvıları	Üst solunum yolu örnekleri Dışkı Rektal sürüntü İdrar
Göz (konjunktiva sürüntüsü, kornea kazıntısı) Dış kulak yolu akıntısı/sürüntüsü	Kistik fibroz hastalarının balgamı
Genital örnekler Üretra sürüntüsü (erkek) Vagina/serviks sürüntüsü/akıntısı	
Alt solunum yolu örnekleri Balgam Trakeal aspirat BAL sıvısı Bronkoskopi sıvısı Doku	
Yara veya abse Sürüntü Aspirasyon sıvısı Doku	
Mide biyopsisi Helicobacter pylori için	

Gram preparatının tanıda değerli olduğu başlıca infeksiyonlar

Bakteriyel menenjit: BOS'dan Gram boyama örnek 1500g'de 15 dk santrifüje edildikten sonra sonra yapılmalıdır (39). Normal BOS sterilidir ve çok az sayıda lenfosit bulunabilir (41). BOS'un sitosantrifüj ile yapılan yaymasından yapılan Gram boyaması ile daha yüksek oranda pozitif sonuç alınabilmektedir^(27,39,41,43). Sitosantrifüj sonrasında yapılan Gram boyama ile antibiyotik alanlarda % 88, antibiyotik almayan hastalarda % 92 oranında bakteriyel ve fungal etkenlerin tanısının konulabileceği belirtilmiştir⁽⁷⁾. BOS'dan Gram boyama uygun şekilde yapılırsa tedavi başlanmamış hastalarda % 60-80 oranında pozitif sonuç verir. *Haemophilus influenzae* için daha duyarlı ama *Neisseria meningitidis* ve *S.pneumoniae* için daha az duyarlıdır⁽¹¹⁾. Bakteriyel menenjitte BOS'da PNL sayısı değişken olabilir hatta PNL'nin çok az olması veya bulunmaması kötü prognoz işaretidir. Bu nedenle

menenjit şüpheli tüm olgularda PNL varlığı dikkate alınmadan Gram boyaması muhakkak yapılmalıdır⁽⁴⁰⁾. BOS Gram boyaması olası etiyolojik etkeni belirlemenin en çabuk ve ucuz yollarında biridir. Duyarlılığı % 60-90, özgüllüğü ise neredeyse % 100'dür! Pozitif sonuç BOS'da bulunan bakteri sayısı ile ilişkilidir. Mililitrede 10^3 bakteri varsa pozitiflik oranı % 25 kadardır. Mililitrede 10^5 bakteri bulunduğunda pozitiflik % 97'ye ulaşır. Alınan sonuçlar bakterilere göre de değişmektedir. *S.pneumoniae*'de % 90, *H.influenzae*'de % 86, *N.meningitidis*'de % 75, Gram negatif çomaklarda % 50, *Listeria*'da % 50'den azdır. Hastanın antibiyotik almış olması da bu oranları düşürür (Gram için % 40-60, kültür için % 50'den az). Çocuklarda antibiyotik tedavisi başladıktan 24-36 saat sonra bile kültürleri % 90-100 oranında negatif kalmaktadır ! Bazı çalışmalarda protein konsantrasyonu ve Gram pozitifliğinde de anlamlı düşüşler olacağı da belirtilmiştir⁽¹¹⁾.

Üriner sistem infeksiyonları: Normalde idrar sterildir ama orta akım idrarında az sayıda epitel hücreleri ve flora bakterileri de bulunur. İdrar örneklerinden Gram boyama genellikle yapılmaz ama santrifüje edilmeden yapılan Gram boyamada her immersiyon sahasında bir veya daha fazla bakteri görülmesi ml'de en azından 10^5 bakteri bulunduğunun göstergesidir⁽¹¹⁾. Birkaç sahada hiç bakteri görülmemesi bakteri sayısının mililitrede 10^5 'den az olduğunu gösterir⁽³⁷⁾. Semptomatik hastalarda lökosit esteraz testi pozitif, mm^3 'de >10 PNL bulunuyor ve idrar sedimentinden yapılan Gram boyamada her sahada ortalama SEH <3 ise örnek kültür için uygundur. Asaemptomatik hastalarda PNL ile ilgili değerler dikkate alınmamalıdır. Sediment Gram boyamasında her sahada > 3 SEH ve 3 farklı morfolojide bakteri görülen örneklerin mikrobiyolojik incelemesi gereksizdir⁽³⁹⁾.

Gastrit: Mide biyopsi örneklerinde Gram boyama ile *H.pylori* görülebilir⁽¹¹⁾.

Cinsel temasla bulaşan hastalıklar: Vajinal salgı örneklerinde normal flora bakterisi olan laktobasillerin kaybolması veya sayıca çok azalması ve skuamöz vajina epiteli hücrelerinin Gram negatif veya Gram labil boyanan kokobasiller ile kaplı "kanıt hücreler" halinde görülmesi *Gardnerella vaginalis*'e bağlı bakteriyel vajinoz için patognomoniktir. Laktobasillerin kaybolması veya sayıca çok azalması ve Gram labil boyanan küçük kıvrımlı çomakların preparata hakim olması da *Mobilincus* bakteriyel vajinozunu düşündürür^(11,39,41,43). Vulvovajinit ve servisit olgularında hücre içi Gram negatif diplokokların görülmesi gonore için tanı koydurucudur. Hücre dışı diplokoklar tanı koydurucu değildir çünkü saprofit *Neisseria*'lar kadın genital sistem normal florasında bulunur. Servikal gonoreli kadınların ancak

% 60'ında Gram boyama sonucu pozitif ve negatif sonuç gonoreyi dışlayamaz⁽³⁴⁾. *Trichomonas vaginalis* vajinitlerinde Gram boyamada etken görülebilir⁽⁴¹⁾.

Semptomatik erkeklerde direk Gram boyaması ile gonokoksik üretrit tanısı çok çabuk ve ucuz şekilde yapılabilir. Duyarlılık ve özgüllük > % 95'dir. Asemptomatik kişilerde duyarlılık daha düşüktür ama yine de spesifiktir. Servikal akıntı örneklerinde ise güvenilirliği azdır⁽¹¹⁾. Gonorede asıl tanısal değer taşıyan bulgu hücre içi Gram negatif diplokokların varlığının gösterilmesidir. Bu durum semptomatik olguların % 95'inde, asemptomatik ve kültür negatif olan olguların ise % 2'den azında görülmektedir. Hücre dışı Gram negatif diplokokların görülmesinin gonore için yol gösterici değeri % 10-29 arasındadır. Gonore prevalansı düştükçe bu bulgunun prediktrif değeri de düşecektir. Çok sayıda PNL varlığında Gram negatif diplokokların bulunmaması nongonokoksik üretriti (NGU) düşündürmelidir⁽³⁵⁾. Uretral akıntının Gram boyamasında gonokoksik üretritte hücre içi Gram negatif diplokoklar % 95 oranında pozitif, NGU olgularında ise % 97 oranında negatiftir. Bu nedenle üretrit olgularının yarısının gonokoksik olduğu bir populasyonda pozitif sonuç gonoreyi, negatif sonuç ise NGU'yu % 98 doğrulukta gösterecektir. Hücre dışı Gram negatif diplokokların görülmesi ile gonore tanısı ancak % 10-30 oranında doğrulukla konabilmektedir. Bazı gonokokların besiyerinde bulunan vankomisin ile inhibe olması nedeniyle kültür duyarlılığı % 100 değildir. Kültürden önce hastanın antibiyotik alması da kültür sonucunu negatifleştirmektedir. Bu nedenle Gram ile tanı konan ancak kültürü negatif kalan hastaların çoğunun gerçekte gonore olduğu bilinmelidir. Erkeklerdeki semptomatik infeksiyonlarda Gram boyama sonucunu doğrulama amacı ile kültür yapılması gereksizdir ! Bu hastaların % 5 kadarında kültür sonucu negatif olabilmektedir. Kültür NGU düşünülen olgularda *N.gonorrhoeae*'yi atlamamak için yapılmalıdır⁽³⁵⁾.

Deri, kas ve yumuşak doku infeksiyonları: Özellikle antibiyotik tedavisi altındaki hastalarda Gram boyama etiyojyiyi aydınlatmak için tek yoldur. Yüzeysel yaralar çevre ve flora bakterileri ile kolonize olurlar ve değerlendirilmeleri çok tartışmalı ve sorunludur. Açık yaraların yüzeylelerinden alınan sürüntü örneklerinin mikrobiyolojik incelemesi genellikle uygun değildir. Yaranın cerrahi yöntemlerle temizlenmesi ve yara zemininden örnek alınması önerilmektedir⁽³⁹⁾. Yüzeysel yara sürüntülerinde Gram preparatında her sahada ortalama 2'den az SEH ile birlikte PNL görülmesi örneğin inceleme için uygun olduğunu gösterir⁽³⁹⁾. Gram preparatında her sahada ortalama >2 SEH görülen ve PNL görülmeyen yara materyallerinin mikrobiyolojik incelemeleri gereksizdir⁽³⁹⁾.

Taze kesilmiş doku örneklerinden doku yüzeyi lama bastırılarak preparat hazırlanabilir. Baskı preparatı öğütülmüş

doku örneğinden daha değerlidir. Çünkü inceleme ve yorum yapmak daha kolaydır^(13,43). Gram boyaması sonucu ile kültür uyusmalıdır. Direkt örnekte tek başına veya başka bakterilerle birlikte görülen zayıf Gram negatif boyanan bakterilerin kültürde ürememesi *Bacteroides* gibi anaeroplara oluşan bir infeksiyonu düşündürmelidir^(11,13,41). Birçok yara ve abse örneklerinde birden çok etken bulunabilmektedir. Hayvan ısırıklarından sonra oluşan infeksiyonlarda etken olabilen *Pasteurella multocida* PNL içinde ve dışında Gram negatif kokobasil olarak görülebilir⁽⁴¹⁾. Gazlı gangren olgularında dokudan hazırlanan preparatlarda *Clostridium perfringens*'i düşündüren kalın Gram pozitif çomaklar görülebilir⁽⁴¹⁾. Birçok anatomik bölgenin abse örneğinde *Staphylococcus aureus* en sık bulunan bakteridir⁽⁴¹⁾.

Periton sıvısı, plevra sıvısı, eklem sıvısı, perikard sıvısı: Santrifüje edildikten sonra yapılacak inceleme ile olası etiyojik etken saptanabilir ve uygun antibiyotik tedavisi başlanabilir⁽¹¹⁾. Bir mililitreden fazla olan örnekler 1500g'de 15 dk santrifüje edildikten sonra incelenmelidir⁽³⁹⁾.

Pnömoni: Gram boyamanın ve kültürün pnömoni tanısındaki yeri çok tartışmalıdır. Genel olarak toplumdan edinilmiş pnömonilerde Gram boyamasının olası etiyojik etken ve başlangıç antibiyotik tedavisi konusunda yol gösterici, basit ve ucuz bir yöntem olduğu kabul edilmektedir. Boyama balgamın pürülan kısmından yapıldığında ve küçük büyütmede her sahada ortalama ≤ 10 SEH ve ≥ 25 PNL görülmesi halinde Gram boyamanın değeri artar. Bu kriterlere uymayan balgam değerlendirilmemelidir⁽⁶⁾. Nötropenik hastalarda PNL ile ilgili değerler dikkate alınmamalıdır⁽³³⁾. Uygun balgam örneğinde PNL içinde bakterilerin görülmesi çok değerli bir bulgudur⁽³⁹⁾. Toplumdan kazanılmış pnömonilerde bu kriterlere uyan balgam preparatında baskın olarak görülen bir bakteri ile kan kültüründen izole edilen bakteri % 85 oranında uyusmaktadır. Buna karşın balgam kültürü ile kan kültürü arasındaki uyum bundan daha az ve % 50-60 kadardır! Özellikle ortalama olarak her immersiye sahasında en azından 10 adet karakteristik Gram pozitif diplokok bulunduğunda veya bu bakteriler preparatta baskın şekilde görüldüğünde Gram boyama pnömokoksik pnömoniyi % 85 özgüllük ve % 62 duyarlılıkla saptayabilmektedir. Tanısal değer, kapsül şişmesi deneyi ile artırılabilir. Bu durumda Gram boyamanın kültürle korelasyonu % 89 gibi yüksek değerlere çıkmaktadır. Pnömonokların sağlıklı yetişkinlerin yarısının nozofarenks florasında bulunduğu unutulmalıdır. Bu nedenle kronik bronşitli hastalarda alt solunum yolları da bu bakteri ile kolonize olacaktır. Bu durumda örneklerde pnömokok saptanmasının hastalık anlamına gelmeyebileceği bilinmelidir. Taşiyicilerde Gram boyamasında görülecek veya kapsül şişme deneyi ile pozitif sonuç alınacak kadar pnömokok bulunmaması

bronşitin etiyolojik tanısında karar vermede yardımcı olabilir. Balgam Gram boyamasında küçük Gram negatif kokobasiller *H.influenzae* için karakteristiktir. Sensitivitesi *S.pneumoniae* için olandan düşük ve % 40-80 arasındadır. Küme yapmış koklar stafilkok infeksiyonunu, Gram negatif diplokoklar *Moraxella catarrhalis*'i, değişik morfolojide bakterilerin birlikte bulunması anaerobik infeksiyonu düşündürür. Kistik fibrozlu hastalarda ince Gram negatif çomaklar *Pseudomonas* pnömonisini, özellikle immüsuprese hastalarda dallanan Gram pozitif çomakların görülmesi *Nocardia* pnömonisini düşündürür. İmmüsupresyonlu hastalarda gelişen *Candida* pnömonisinde balgamda maya hücreleri görülür⁽⁴¹⁾. Bakteriyemik pnömokok pnömonilerinde balgam kültürlerinin % 45-50'si, bakteriyemik *H.influenzae* pnömonilerinin kültürlerinin ise % 34-47'si negatif sonuç vermektedir. Bronkoskopi ile alınan örneklerde Gram boyama kültür sonucu gelene kadar antibiyotik başlanması için yol göstericidir. Pozitif Gram boyama sonucu >% 78 duyarlılıkla ml'de 10^3 'den fazla bakteri bulunduğunu gösterir. Bronkoalveoler lavaj (BAL) örneklerinde hücrelerin % 5'den fazlası bakteri içeriyorsa pnömoni tanısı % 90'dan fazla duyarlılık ve % 89-100 özgülükle konulabilir. Hücre içi (PNL, makrofaq) bakterilerin % 2 veya % 7'den fazla oranda bulunduğu durumlar için de benzer oranlar bulunmuştur⁽⁶⁾. Antibiyotik almamış hastalarda Gram boyama ile pnömokoksik pnömonilerin > % 80 oranında saptandığı bildirilmiştir⁽³⁶⁾. Sitosantrifüj ile hazırlanan BAL örneğinde her immersiyon objektifi sahasında bir bakteri görülmesi ve kantitatif kültürde ml'de $> 10^5$ bakteri üremesi bu etkenle oluşan pnömoniyi düşündürür^(39,43). Balgam örneklerinde küçük büyütmede her sahada ortalama >10 SEH görülen örnekler mikrobiyolojik inceleme için uygun değildir⁽³⁹⁾. Yetişkinlerin trakeal aspirat örneklerinin Gram preparatında küçük büyütmede her sahada ortalama >10 SEH bulunması ve 20 immersiyon sahasında bakteri görülmemesi halinde örneğin mikrobiyoloji için uygun olmadığı kabul edilir^(39,43). BAL örneklerinde görülen hücrelerin < 1 'i SEH ise örnekler inceleme için uygundur⁽³⁹⁾.

Gram boyama sonuçlarını etkileyen faktörler

Bozulmuş veya yanlış hazırlanmış çözeltiler: Boyamada kullanılan çözeltilerin her hazırlandığında boyama için uygun olup olmadıkları *E.coli* ve *S.aureus* kültürlerinden boyama yapılarak kontrol edilmelidir. Bu kontroller şüpheli durumlarda da yapılmalıdır. Kalite kontrolü için bir başka yöntem de epitel hücreleri, değişik morfolojide Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin bulunacağı ağız sürüntüsünden preparat yapılmasıdır^(33,43). Epitel hücrelerinin Gram değişken görülmesi boyamanın iyi olduğunun bir başka göstergesidir. Bir preparattaki epitel hücrelerinin tamamen Gram negatif boyanması aşırı dekolorizasyonun, epitel hücreleri ve PNL'lerin

Gram pozitif boyanması da yetersiz dekolorizasyonun işareti sayılır⁽³³⁾.

Yetersiz dekolorizasyon: Yanlış Gram pozitif boyama ile sonuçlanır ve Gram negatif mikroorganizmalar da Gram pozitif olarak görülürler. En sık neden örneğin lama homojen ve ince şekilde yayılmamasıdır. Böyle preparatlar makroskopik olarak gözle bile anlaşılır ve preparat koyu mavi, kalın ve heterojen boyalı görülür. Böyle bir preparat ile mikroskopik inceleme ile doğru sonuca varmak olanaksızdır. Bu durumda yeni bir preparat hazırlanmalıdır. Yeni bir preparat için yeterli örnek yoksa, lam üzerindeki immersiyon yağı ksilenle ıslatılan bir pamuk ile silinerek temizlenir ve dekolorizasyon ve zit boyama işlemleri tekrarlanır^(13,43). İyi hazırlanmış preparat ince, homojen, hafif şeffaf ve pembe renkte görülmelidir.

Aşırı dekolorizasyon: Gram pozitif mikroorganizmaların Gram negatif olarak görünmelerine neden olur. Preparatta sadece Gram negatif boyanmış epitel hücreleri ve Gram negatif bakteriler görülür. Gram boyama tekniğinin uygun yapıp yapılmadığı boyama sırasında Gram pozitif mikroorganizma içeren (örneğin oral sekresyon gibi) başka bir örnekle paralel boyama yapılarak anlaşılabilir. Uygun bir boyama yapılmadığı anlaşılırsa yeni bir preparat hazırlanır veya preparat için klinik örnek yoksa, lamdaki immersiyon yağı ksilen ile silinerek tüm boyama aşamaları yeniden tekrarlanır⁽¹³⁾.

Kristal viyole çökeltileri: Yanlışlıkla Gram pozitif kok, çomak veya mantar olarak yorumlanabilirler. Bu çökeltiler genellikle preparatın kalın hazırlanan kısmında oluşurlar^(13,41).

Bakterilerle ilgili sorunlar: *Acinetobacter* (Gram negatif çomak) ve *Bacillus* (Gram pozitif çomak) cinsi bakteriler ile Gram preparatında her zaman beklenen sonuç alınmaz ve bu bakteriler sıklıkla Gram değişken boyanırlar^(13,43). Bazı bakteriler zayıf boyanırlar ve zeminle yeterli kontrast oluşturamadıklarından görülmeleri zor olabilir. Zayıf boyanan Gram negatif bakterileri ve hemofil türleri gibi kolaylıkla gözden kaçabilen, küçük, pleomorfik Gram negatif bakterileri zeminden ayırabilmek için preparatı dikkatlice incelemek gerekebilir⁽¹³⁾. Gram pozitif bakterilerin eski kültürleri Gram negatif boyanabilmektedir. 48 saatlikten eski kültürler yanlış Gram negatif boyanırlar. Çok genç kültürlerde de yanlış Gram negatiflik oluşabilir^(13,33). Gram boyama için en uygunu 18-24 saatlik kültürlerden boyama yapılmasıdır^(33,43). Kronik bir infeksiyon bölgesinden alınan örneklerde de bakterilerin eski kültüründekine benzer sorunlar oluşabilir ve bakteriler yanlış Gram negatif boyanabilir^(10,33). Morfolojiyi en iyi sıvı kültürden yapılan boyama gösterir^(33,43). Antibiyotik içeren ortamdan yapılan boyamalar da uygun değildir. Gram pozitif bakteriler Gram negatif boyanabilirler^(13,33,43). Gram pozitif bakterilerde irileşme ve Gram negatif bakterilerde de filamanlaşma görülür. Antibiyotik tedavisi altındaki hastaların Gram preparatı incelenirken bu önemli olabilir⁽³³⁾. İnkübasyon ısısı ve atmosfer

koşulları da bakterilerin boyanma özelliğini değiştirebilir. Örneğin *Peptostreptococcus asaccharolyticus*, *Eubacterium plautii*, *Clostridium ramosum*, *Clostridium symbiosum* ve *Clostridium clostridiiforme* aerobik koşullarda Gram negatif boyanabilmektedir. Bu bakterilerin boyama işlemleri anaerob kabinde yapılırsa doğru sonuç alınmaktadır⁽³¹⁾. Fagosite olan mikroorganizmaların morfolojileri ve Gram boyanmaları değişebilmektedir⁽³³⁾. Ciddi inflamasyon yanıtında bakterilerin Gram boyanma özellikleri değişebilmektedir^(10,33). Birçok dokuda bulunabilen lizozim gibi enzimler Gram preparatında bakterinin görülmesini veya morfolojisini değiştirebilmektedir. Otoliz olan bakterilerin (*S.pneumoniae*) morfoloji ve boyanma özellikleri değişebilmektedir⁽³³⁾. Isı ile fiksasyon sırasında aşırı ısıtma hem bakterinin morfolojisini bozar hem yanlış Gram negatif boyanmaya neden olur⁽³³⁾. Metanol fiksasyonu (1 dk) aşırı dekolorizasyonu önler ama preparatı dekolore ederken de dikkatli olmalıdır⁽³³⁾. Metanol sıvı örneklerin (idrara ve BOS) fiksasyonu için idealdir. Yıkama sırasında örneğin lamdan ayrılmasını önler, eritrositler sağlam kalır ve preparatın incelenmesi zeminin temiz olması nedeniyle daha kolaylaşır^(33,43). UV ışınlarına tutulmuş hücreler ile otoliz olan hücreler de Gram negatif boyanabilmektedir⁽³⁸⁾.

Fazla müküs içeren örneklerde müküsün zıt boya ile iyi boyanması bakterileri gizleyebilir veya homojen boyanmama nedeniyle Gram negatif bakterileri andıran görüntüler oluşturabilir⁽³³⁾. Boyamada kullanılan çözeltilerin bozulmuş olması veya yanlış hazırlanması, boyama aşamalarındaki sürelerle uyulmaması da Gram reaksiyonunu değiştirir^(33,43).

Gram boyama ile sonuç alınmayan durumlarda neler yapılabilir ?

Boyama yanlış yapılmışsa preparat ksilen ile silindikten sonra aşamalar tekrar edilir⁽⁴³⁾. Az dekolore edilmişse yeniden dekolore edilerek işlemler sonlandırılır. Çok dekolore edilmişse preparat yeniden boyanır. Boyama işlemi doğru yapılsa bile *Acinetobacter* ve *Bacillus* cisi bakterilerin boyamalarında sıklıkla sorun oluşmaktadır⁽⁴³⁾. Bir bakterinin Gram özelliği belirlenemiyorsa aşağıdaki yardımcı işlemler uygulanabilir:

1. Taze hazırlanmış % 3 KOH lama damlatılır ve bakterinin saf kültürü burada süspanse edilirse, 5-60 saniye sonra süspanسیون visköz ve jelatinöz kıvamına gelir ve jelatinöz süspanسیون öze ile lamdan yukarı doğru kaldırılırsa iplik şeklinde uzama görülür. Bu test Gram pozitif bakterilerle negatif sonuç vermektedir^(1,4,5,14,42).
2. Gram pozitif bakteriler için inhibitör içeren MacConkey gibi selektif besiyerinde Gram pozitif bakteriler üremez. Buna karşın *Enterobacteriaceae* ve nonfermentatif Gram negatif bakteriler özellikle Gram boyaması değişken olabilen *Acinetobacter* suşları bu besiyerinde kolayca ürerler. Zor üreyen *H.influenzae* gibi birçok Gram negatif bakterinin de MacConkey besiyerinde üremediği akıldan çıkarılmamalıdır.

3. Duyarlılık deneylerinde vankomisin^(1,42) ve aztroenam diskleri çevrelere bakılır. Gram negatif bakteriler vankomisine dirençlidir (Gram negatif bir bakteri olan *Flavobacterium* vankomisine duyarlıdır ve bu identifikasyona da yardımcı olur !). Gram pozitif bakteriler de aztreonama dirençlidirler.

KAYNAKLAR

1. Arthi K, Appalaraju B, Parvathi S: Vancomycin sensitivity and KOH string test as an alternative to Gram staining of bacteria, Indian J Med Microbiol 2003;21(2):121-3.
2. Beveridge TJ: Mechanism of gram variability in selected bacteria, J Bacteriol 1990;172(3):1609-20.
3. Beveridge TJ: Use of the Gram stain in microbiology, Biotechnic & Histochemistry 2001;76(3):111-8.
4. Buck JD: Nonstaining (KOH) method for determination of gram reactions of marine bacteria, Appl Environ Microbiol 1982;44(4):992-3.
5. Carlone GM, Valadez MJ, Pickett MJ: Methods for distinguishing gram-positive from gram-negative bacteria, J Clin Microbiol 1982;16(6):1157-9.
6. Donowitz GR, Mandell GL: Acute pneumoniae, "Mandell GL, Bennet JE, Dolin RD (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases, 6. baskı" kitabında s.819-45, Elsevier-Churchill Livingstone, Philadelphia (2005).
7. Dunbar SA, Eason RA, Musher DM, Clarridge JE 3rd: Microscopic examination and broth culture of cerebrospinal fluid in diagnosis of meningitis, J Clin Microbiol 1998;36(6):1617-20.
8. Ehrlich P: Eine methode für das befecken des tuberkelbazillus, Deutsche Medizinische Wochenschrift 1882;8:269-70. (İngilizcesine şu bağlantıdan ulaşılabilir: <http://www.asm.org/ASM/files/CCLIBRARYFILES/FILENAME/0000000379/1882p118.pdf>).
9. Ehrlich P: Ueber das Methylenblau und seine klinisch-bakterioskopische, Verwerthung Ztschr F Klin Med 1881;2:710-3. (<http://www.asm.org/MemberShip/index.asp?bid=16731>' de site edilmiştir).
10. Esteban J, Garcia-Calvo G, Jimenez-Castillo P, Soriano F: Failure of Gram stain to detect Propionibacterium acnes in specimens from clinically significant infections, J Clin Microbiol 1996;34(8):2051.
11. Gill VJ, Federko DP, Witebsky FG: The clinician and the microbiology laboratory, "Mandell GL, Bennet JE, Dolin RD (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases, 6. baskı" kitabında s. 203-41, Elsevier-Churchill Livingstone, Philadelphia (2005).
12. Gram C: Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt-und Trockenpreparaten, Fortschritte der Medicin 1884;2:185-9. (Makalenin orijinalinin İngilizcesine şu bağlantıdan ulaşılabilir: <http://www.asm.org/ASM/files/CCLIBRARYFILES/FILENAME/0000000235/1884p215.pdf>).
13. Graman PS, Menegus MA: Microbiology laboratory tests, "Betts RF, Chapman SW, Penn RL (eds): A Practical Approach to Infectious Diseases, 5. baskı" kitabında s.935-66, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2002).
14. Halebian S, Harris B, Finegold SM, Rolfe RD: Rapid method that aids in distinguishing Gram-positive from Gram-negative anaerobic bacteria,

- J Clin Microbiol 1981;13(3):444-8.
15. <http://home.primus.com.au/royellis/ST%5CROMTECH.htm>
 16. <http://nobelprize.org/medicine/laureates/1905/koch-bio.html>
 17. <http://nobelprize.org/medicine/laureates/1908/ehrllich-bio.html>
 18. <http://users.stlcc.edu/kkiser/History.page.html>
 19. <http://www.arches.uga.edu/~kristenc/history.html>
 20. <http://www.cat.cc.md.us/courses/bio141/lecguid/unit1/prostruct/u1fig9b.html>
 21. <http://www.cat.cc.md.us/courses/bio141/lecguid/unit1/prostruct/u1fig10b.html>
 22. <http://www.chemheritage.org/EducationalServices/chemach/cssb/whp.html>
 23. <http://www.chemheritage.org/EducationalServices/chemach/ppb/pe.html>
 24. <http://www.iqb.es/HistoriaMedicina/personas/gram.htm>
 25. <http://www.meddean.luc.edu/lumen/DeptWebs/microbio/med/gram/slides/slide8.htm>
 26. <http://www.meddean.luc.edu/lumen/DeptWebs/microbio/med/gram/why-gs.htm>
 27. http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Product/product_PDF_24987.pdf
 28. <http://www.ucmp.berkeley.edu/history/leeuwenhoek.html>
 29. http://www.uphs.upenn.edu/bugdrug/antibiotic_manual/Gram1.htm
 30. <http://www.whonamedit.com/doctor.cfm/696.html>
 31. Johnson MJ, Thatcher E, Cox ME: Techniques for controlling variability in gram staining of obligate anaerobes, J Clin Microbiol 1995;33(3):755-8.
 32. Koch R: Die atologie der Tuberkulose. Berliner Klinischen Wochenschrift 1882;15: 221-30. (İlk kez 24 Mart 1882'de Berlin Fizyoloji Cemiyeti toplantısında sunulmuştur ve makale 10 Nisan'da yayınlanmıştır. Makalenin orjinalinin İngilizcesi için: <http://www.asm.org/ASM/files/CCLIBRARYFILES/FILENAME/0000000228/1882p109.pdf>).
 33. McClelland R: Gram's stain: The key to microbiology, <http://www.mlo-online.com/ce/pdfs/apr01.pdf>
 34. McCormack WM: Vulvovaginitis and cervicitis, "Mandell GL, Bennet JE, Dolin RD (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases, 6. baskı" kitabında s.1357-72, Elsevier-Churchill Livingstone, Philadelphia (2005).
 35. McCormack WM, Rein MF: Urethritis, "Mandell GL, Bennet JE, Dolin RD (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases, 6. baskı" kitabında s.1347-57, Elsevier-Churchill Livingstone, Philadelphia (2005).
 36. Musher DM, Montoya R, Wanahita A: Diagnostic value of microscopic examination of Gram-stained sputum and sputum cultures in patients with bacteremic pneumococcal pneumonia, Clin Infect Dis 2004;39(2):165-9.
 37. Sobel JD, Kaye D: Urinary tract infection, "Mandell GL, Bennet JE, Dolin RD (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases, 6. baskı" kitabında s.875-905, Elsevier-Churchill Livingstone, Philadelphia (2005).
 38. Steinbach WJ, Shetty AK: Use of the diagnostic bacteriology laboratory: A practical review for the clinician, Postgrad Med J 2001;77(905):148-56.
 39. Thomson RB Jr, Miller M: Specimen collection, transport and processing: Bacteriology, "Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds): Manual of Clinical Microbiology, 8. baskı" kitabında s.286-330, ASM Press, Washington DC (2003).
 40. Tunkel AR, Scheld WM: Acute meningitis, "Mandell GL, Bennet JE, Dolin RD (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases, 6. baskı" kitabında s.1083-126, Elsevier-Churchill Livingstone, Philadelphia (2005).
 41. University of Washington, Department of Laboratory Medicine: Medical Trainin Solution (MTS): <http://www.medtraining.org/ltac> adresinden ücretsiz olarak veya deneme amacıyla ücretsiz üye olarak ulaşılabilir.
 42. von Graevenitz A, Bucher C: Accuracy of the KOH and vancomycin tests in determining the Gram reaction of non-enterobacterial rods, J Clin Microbiol 1983;18(4):983-5.
 43. York MK: Gram stain, "Isenberg HD (ed): Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2. baskı" kitabında s.3.2.1.1-3.2.1-23, ASM Pres, Washington DC (2004).

