

# UZMANIYLA TARTIŞALIM MİKOLOJİ LABORATUVARINDA YAŞANAN SORUNLAR

Dr. Mine Doluca Dereli  
Dokuz Eylül Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Tıbbi  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı



# OLGU 3A

- Mide ağrısı ile başvuran 56 yaşındaki bir erkek hastaya yapılan BT bulgularına göre apendiküler kitle ön tanısı konulur. On gün önce sağ kolektomi yapılan hastada ateş, maküler döküntüler ve kilo kaybı yakınmaları ortaya çıkar. Post op hastaya sefazolin başlanır.
- Hastanın yatmakta olduğu Genel Cerrahi kliniği tarafından kan kültürü alınır; aynı zamanda da Enfeksiyon Hastalıklarından konsültasyon istenir. Konsültasyon sonrasında ateş etiyolojisini araştırma amacı ile diğer tetkiklerle beraber tekrar kan kültürü alınır. Hastaya ateş nedeniyle tigesiklin başlanır.



## OLGU 3A

- Hastanın ayrıca 3 ay önce hemoptizi, gece terlemesi ve kilo kaybı yakınmaları da olup, BT'de akciğer bazalinde iki adet 3 cm boyutlarında kaviter, bir adet 1.5 cm boyutunda parankimal nodül izlenmiştir. Hastaneye yattığı dönemde tekrarlanan BT'sinde nodüllerin arttığı ve büyüdüğü saptanır, bronkoskopi ile alınan örneklerde ARB ve bakteriyolojik kültür sonuçları negatif olarak belirlenir.
- Gönderilen kan kültür örneklerinde 48. saatte üreme saptanır. Bakteriyoloji laboratuvarında maya üremesi olarak değerlendirilen örnekler Mikoloji laboratuvarına iletilir.

➤ Etkenin koloni görünümü aşağıdaki gibidir

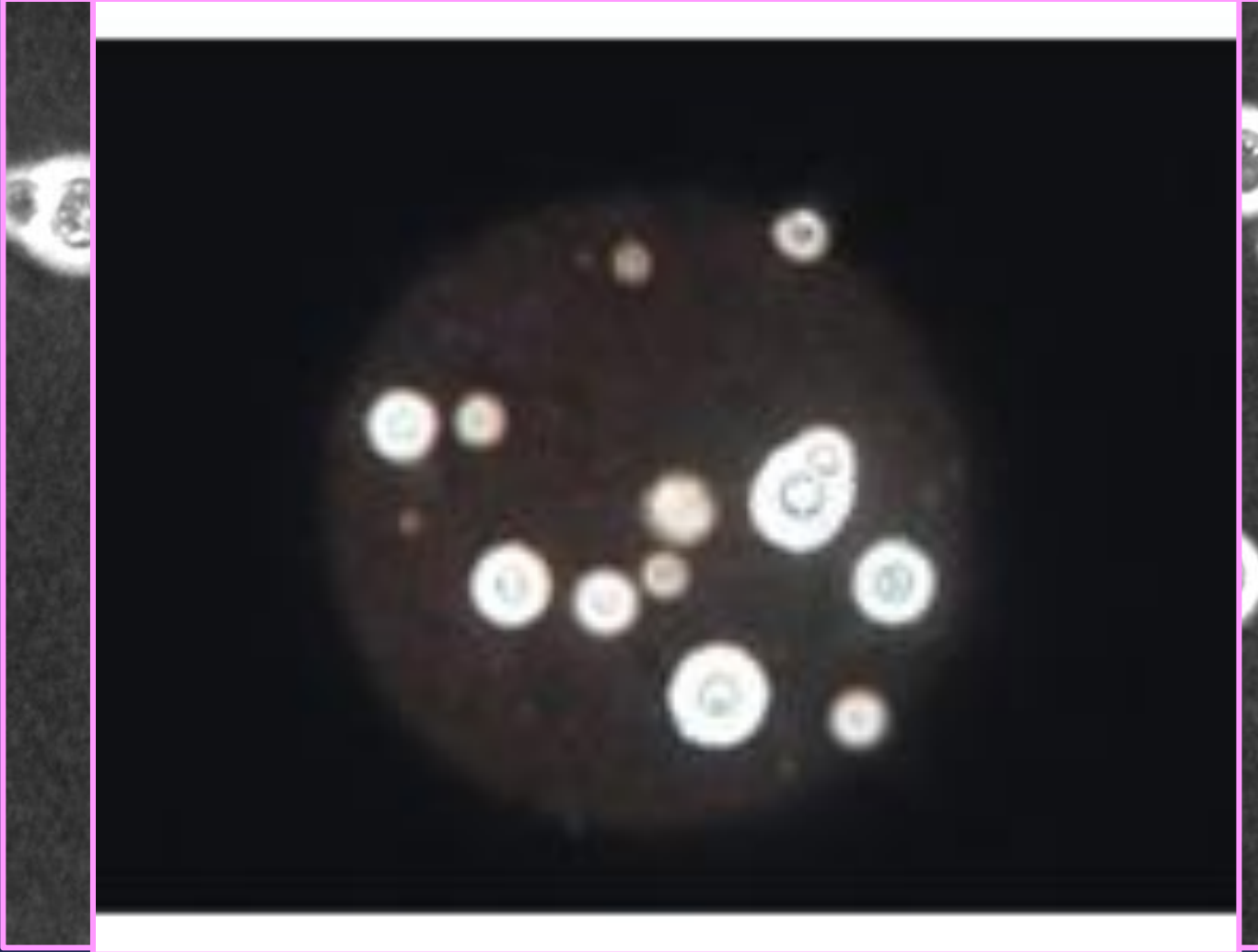


➤ Bu aşamada etken ile ilgili olarak laboratuvarda öncelikle ne yapmayı düşünürsünüz?

- a) Mısır unu tween 80 agara lam kültürü
- b) Çimlenme borusu testi
- c) Yarı otomatize asimilasyon testi
- d) Kromojenik besiyerine ekim
- e) Çini mürekkebi preparatı



- Kolonilerin mukoid görünümünden kuşkulanılarak çini mürekkebi preparatı hazırlanır. Preparatta maya hücreleri etrafında boyanmayan kapsüller izlenir



➤ Bu bilgi sonrasında ne / neler yapmayı düşünürsünüz?

I) Telefon ile kliniğe bilgi verilir

II) Kesin sonuç çıkana dek beklenir

III) Hastadan BOS örneği istenir

a) I,II

b) I,III

c) I,II,III

d) II,III

e) I

➤ Kuşkulanılan etken açısından Enfeksiyon Hastalıkları ile görüşülerek bilgi verilir ve BOS kültürü göndermeleri istenir. Hastada baş ağrısı dışında menenjit düşündürecek bir bulgu olmadığı öğrenilir.

➤ Bu aşamada laboratuvarında etken ile ilgili olarak öncelikle ne yapmayı düşünürsünüz?

a) Mısır unu tween 80 agara lam kültürü

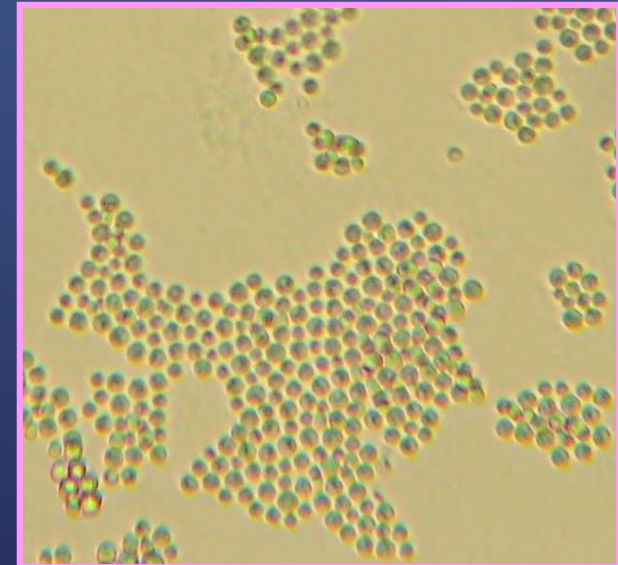
b) Çimlenme borusu testi

c) Yarı otomatize asimilasyon testi

d) Kromojenik besiyerine ekim



- Çimlenme borusu testi negatif olarak belirlenen etken tanımlama amacı ile mısır unu tween 80 agar ve CHROMagar *Candida* besiyerine pasajlanır. Ayrıca API 20C AUX yarı otomatik tanımlama sistemine alınır.



➤ Etkenin tanımlanması açısından ek olarak yapılabilecek testler nelerdir?

- a) Staib agara ekim
- b) Üreaz testi
- c) Fenol oksidaz (kafeik asit) testi
- d) Kanavanin glisin bromtimol agara pasaj
- e) Hepsi yapılabilir

**Dizi analizi, MALDI-TOF MS**

- Etken üreaz aktivitesinin değerlendirilmesi amacıyla Christensen'in üreli agarına pasajlanır. Test beş saat sonra pozitifleşir.



➤ Bu bilgiler ışığında etkenin ne olduğunu düşünürsünüz?

- a) *Candida krusei*
- b) *Geotrichum candidum*
- c) *Cryptococcus neoformans*
- d) *Candida tropicalis*
- e) *Blastoschizomyces capitatus*

- Etken diğer özellikleri, mısırunu tween 80 agardaki görünümü ve 48. saatteki API sonucuna göre *Cryptococcus neoformans* olarak tanımlanır

API® 20 CAUX

CE 07221 C REF.: 1224/1230 (KAN) 20.1.6 / 05 / 26

Origine / Source / Herkunft /  
Origen / Origen / Προέλευση /  
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

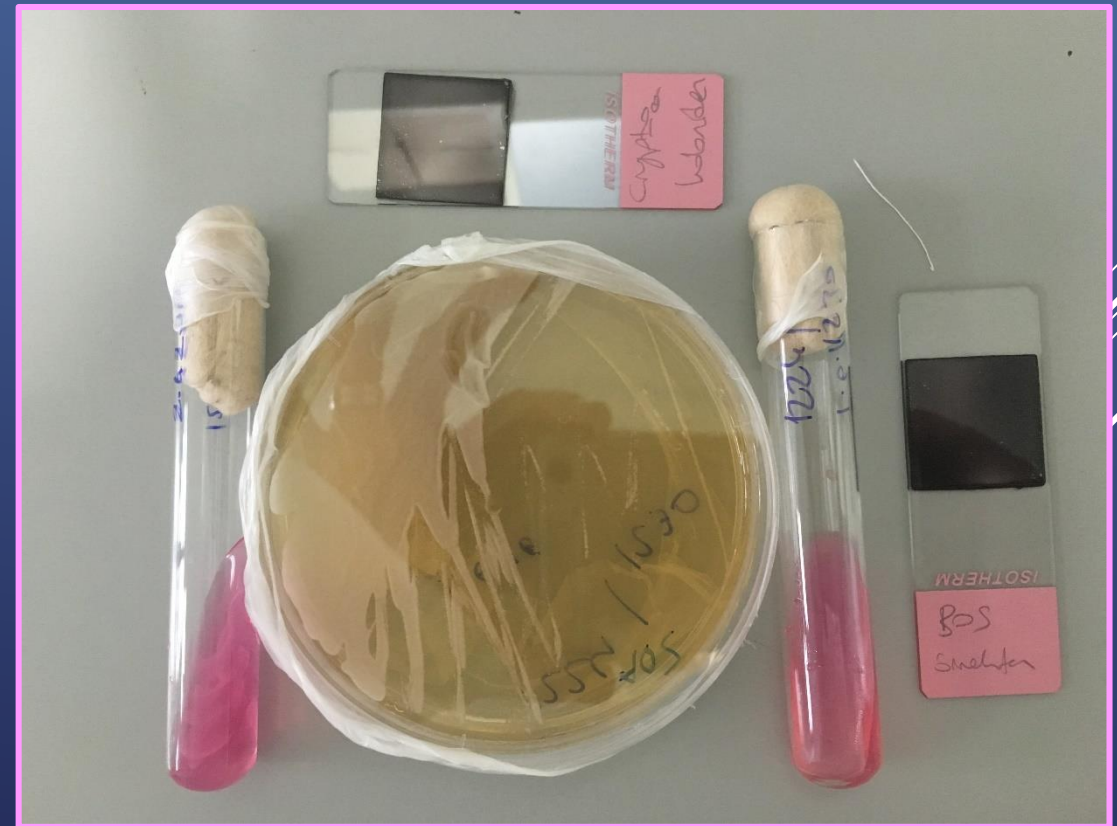
BIOMÉR

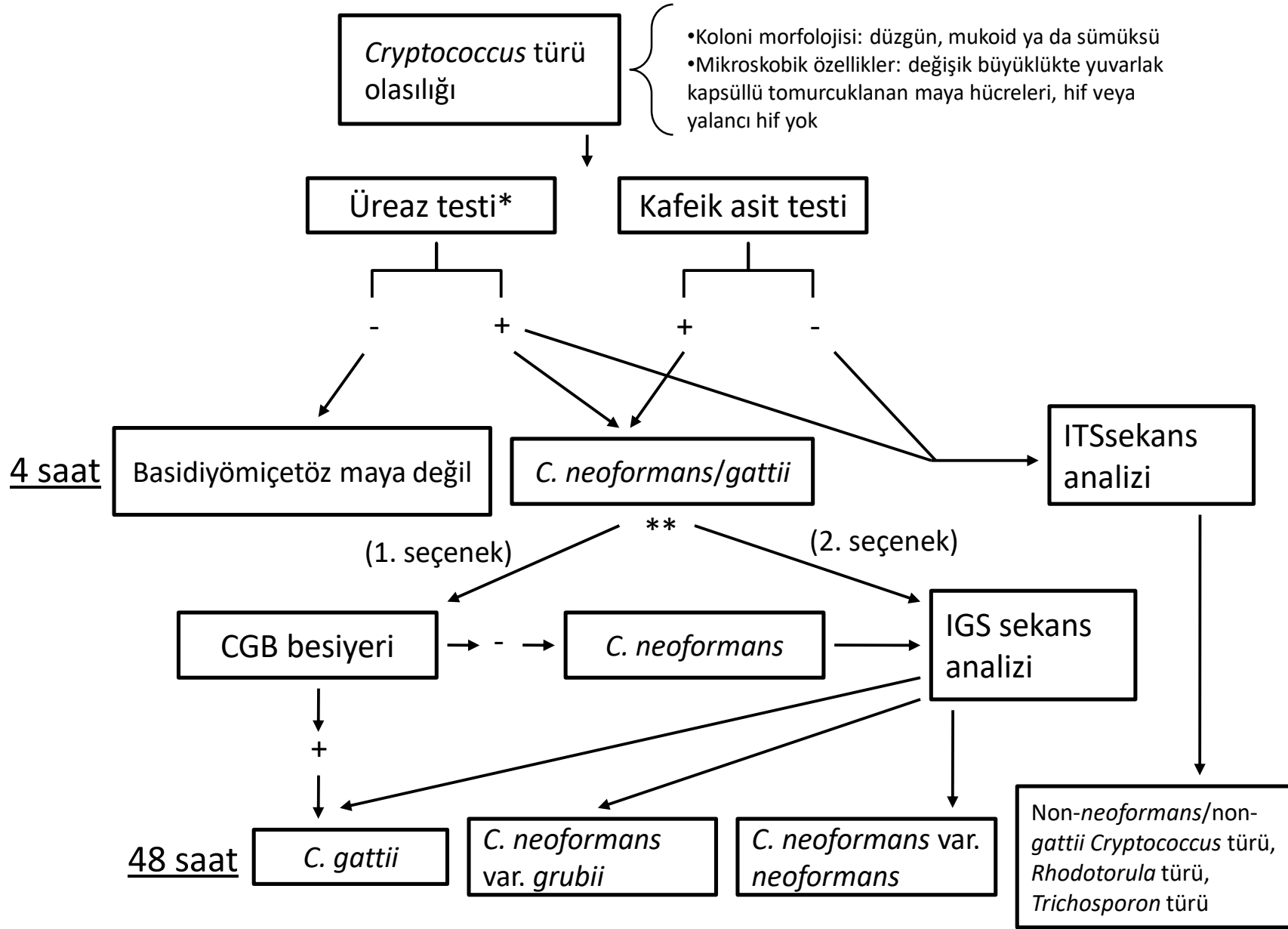
24h	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-			
48 h	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+			
72 h	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+			
	0	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MILZ	RAF	
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4

Autres tests / Other tests / Andere Tests /  
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /  
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /  
Andre tests / Inne testy :

%99,8  
*Cryptococcus neoformans*

Ident. / Ταυτοποίηση :  
27.5.20



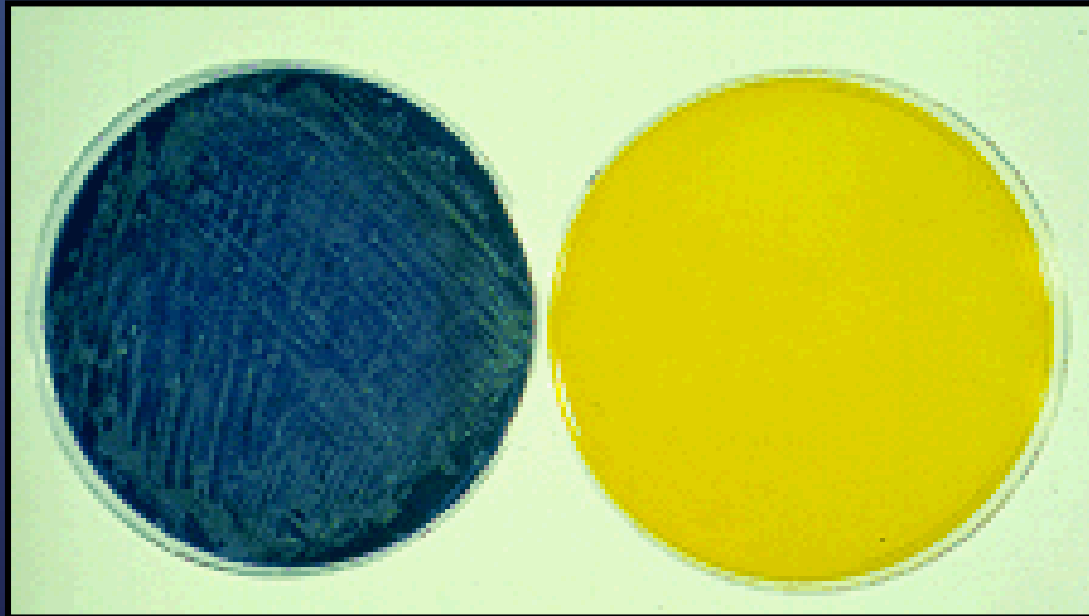


McTaggart ve ark  
2011

Prof. Dr. Şinasi Taner  
Yıldıran'dan alınmıştır

## C. NEOFORMANS - C. GATTII AYRIMI

- ▶ Kanavanin glisin bromtimol agar (Canavanine-glycine-bromthymol blue (CGB)
  - (*C. gattii* = ürer ve besiyerini 24 saat – 5 günde maviye dönüştürür)
  - (*C. neoformans* = üremez, besiyeri sarı)



Prof. Dr. Süheyla Hilmioğlu  
Polat'tan modifiye edilmiştir

*Cryptococcus neoformans* (SAB)



Wet/Mucoid Capsule Forming Colonies

*Cryptococcus neoformans* (SAB)



Creamy Butyrous Colonies



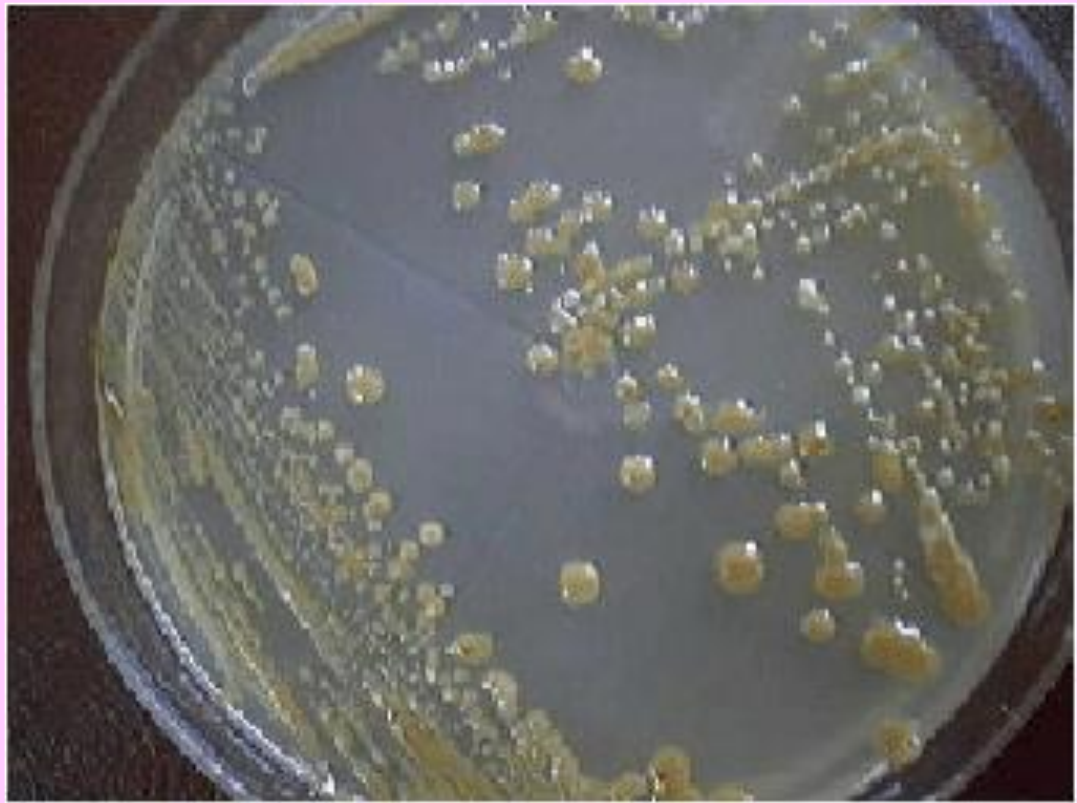
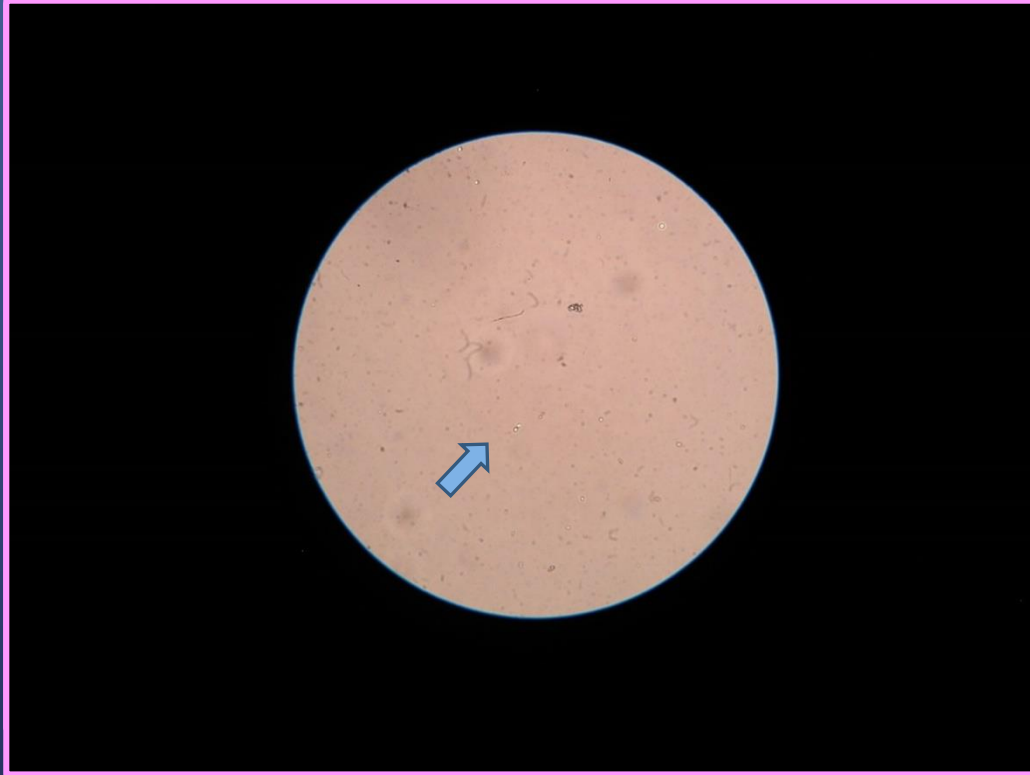


Figura 1. *Cryptococcus neoformans* in standard Staib agar.



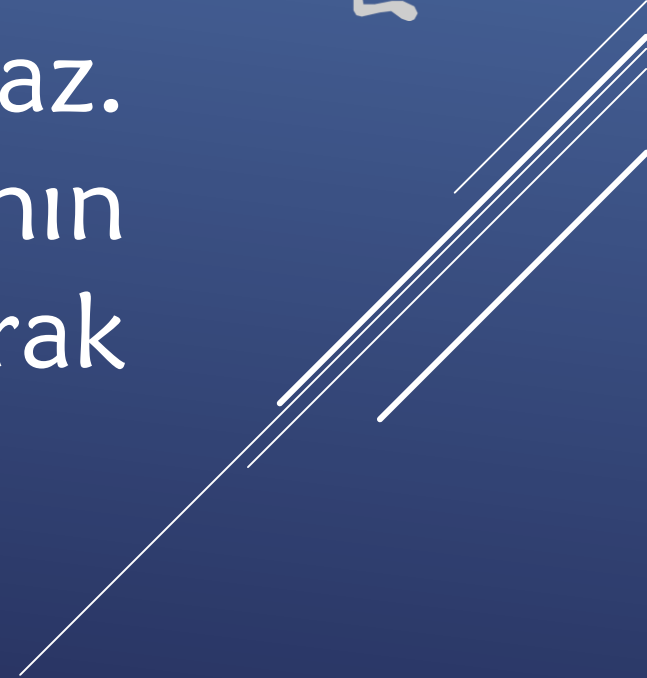
- *C. neoformans* kuşkusunu nedeniyle istenen BOS örneğinin direk bakışı amacıyla çini mürekkebi preparatı yapılır ve kapsüllü maya hücreleri görülür.



- BOS örneğinin kültüründe de *C. neoformans* üremesi olur. Durum kliniğe bildirilir.

- Bu sonuç üzerine Enfeksiyon Hastalıkları hastada HIV enfeksiyonu araştırma gereksinimini duyar ve gönderilen kan örneğinde hasta **HIV pozitif** olarak, kantitatif HIV miktarı da 1.268.642 kopya şeklinde saptanır.
- Hastanın akciğer bulguları mantar enfeksiyonu lehine yorumlanır
- Olguya kültür sonucu doğrultusunda anidilofungin başlanır, daha sonra ise lipozomal amfoterisin B sağaltımına geçilir

➤ Hastanın ateşı düşer. Genel durumu ve yakınmaları düzelir. Lipozomal amfoterisin B sağaltımının 18. gününde alınan kan kültüründe üreme olmaz. Sağaltımın 21. gününde hastanın antiretroviral sağaltımı planlanarak taburcu edilir.



# BU OLGUDAN ÇIKARILACAK DERS

- Kriptokok infeksiyonları durumlarında olguların ilk olarak kan kültürlerinde de *C. neoformans* üremesi saptanabilmekte olup, bu açıdan dikkatli olunması gerekmektedir.
- Laboratuvarın uyarısı üzerine BOS örneğinin gönderilmesi sonucunda etken üremesi saptanabilmektedir.
- *C. neoformans* tanımlamasında dikkatli olunması ve uygun testlerin hızla yapılması büyük önem taşımaktadır.
- *C. neoformans* infeksiyonlarının fırsatçı infeksiyonlar olduğu ve altta yatan başka bir hastalığın (örn HIV inf) olabileceği hem klinisyen hem de laboratuvar hekimleri tarafından unutulmamalıdır.



# OLGU 3B

- 2009 yılında KLL tanısı almış ve en son 2014 yılında bu açıdan sağaltım alan 68 yaşındaki erkek hasta ateş yüksekliği, öksürük, kilo kaybı ve yaygın döküntüler nedenleriyle başvurur.
- Yapılan incelemelerde pnömoni tanısı konulan hasta Hematoloji Kliniğine yatırılır. Hastaya tazosilin ve siprofloksasin başlanır. Döküntüler herpes infeksiyonu olarak değerlendirilerek asiklovir de verilir. Ateşin devam etmesi üzerine ilk antibiyotikler durdurulup, meropenem başlanır.
- Hastada ani bilinç bulanıklığı ortaya çıkması nedeni ile beyin tümörü veya bakteriyel / mikobakteriyel menenjit düşünülür ve BOS örneği alınarak bakteriyoloji ve mikobakteriyoloji laboratuvarlarına gönderilir. Sağaltıma asiklovir ve vankomisin ile devam edilir.
- Bu arada BOS'un biyokimyasal bulguları doğrultusunda tüberküloz menenjit düşünülerek dördü antitbc sağaltımı başlanır.

# OLGU 3B

- Bakteriyoloji laboratuvarında BOS örneğinin direk mikroskopik bakısında her sahada 4-5 PNL görülür ancak örneğin kültürlerinde 48 saatte üreme olmaz.
- Direk bakıda lökosit görülmesi nedeniyle kültür plakları bir gün daha inkübe edilir ve kültürde bir gün sonra maya üremesi izlenir. Hastanın kan kültüründe de bir gün sonra benzer bir üreme ortaya çıkar. Kültür plakları identifikasyon amacıyla mikoloji laboratuvarına iletilir.

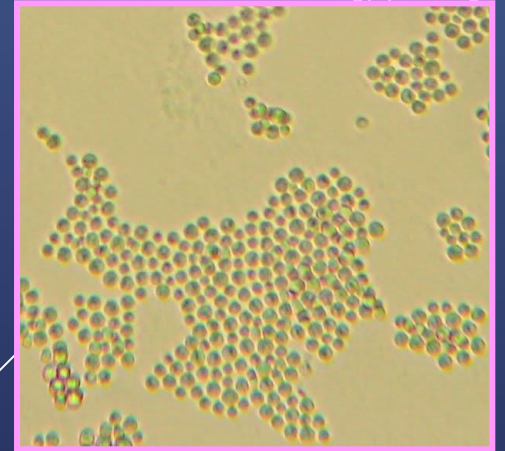


➤ Bu aşamada etkenin identifikasyonu açısından hangi işlemleri yapmayı düşünürsünüz?

- a) Üre testi
- b) Çimlenme borusu testi
- c) Mısır unu tween 80 agara lam kültürü
- d) Yarı otomatize asimilasyon testi
- e) Hepsi



- Mikoloji laboratuvarında kolonilerin mukoid görünümünden kuşkulanılarak çini mürekkebi preparatı hazırlanır. Preparatta maya hücreleri etrafında kapsüller görülür.
- Etken tanımlama amacı ile mısır unu tween 80 agar besiyerine pasajlanır. Ayrıca API 20C AUX yarı otomatik tanımlama sistemine alınır.



- Ayrıca *Cryptococcus neoformans* kuşkusunu nedeniyle etkene üre testi yapılır. Bu test beşinci saatte zayıf pozitif, 24 saatte tam pozitif olarak izlenir. 48. Saatte mısırunu tween 80 ve API sonucuna göre etken *C. neoformans* olarak tanımlanır. Kan kültüründe üreyen etken de benzer şekilde *C. neoformans* olarak identifiye edilir.



- Bu dönemde hastaya bronkoskopi yapılır. BAL örneği patolojik olarak malignite açısından negatif olarak değerlendirilir.
- BAL örneğinin ARB direk bakı ve kùltürü ile *Mycobacterium tuberculosis* DNA'sı negatif bulunur
- Hastanın antitbc sağaltımı kesilir. Lipozomal amfoterisin B ve flukonazol başlanır.
- Üç hafta sonra hastanın genel durumu düzelmesi yakınmalarının yok olması ve kontrol kan kùltüründe üreme olmaması nedeniyle taburcu edilir.

# BU OLGUDAN ÇIKARILACAK DERS

- Mantar menenjitlerinde her zaman BOS direk bakısında lenfosit görülmeyebilir, bazı durumlarda ve özellikle ilk dönemlerde PNL izlenebilmektedir
- Direk bakısında lökosit izlenen BOS örneklerinin kültür plakları daha uzun süre inkübe edilmelidir
- BOS ve kan örneklerinin kültürleri paralel olarak izlenmelidir
- *C. neoformans* tanımlamasında dikkatli olunması ve uygun testlerin hızla yapılması büyük önem taşımaktadır



# OLGU 4

- Hastanemiz mikoloji laboratuvarının katıldığı dış kalite programı kapsamında tanımlanması ve antifungal duyarlılık testinin yapılması için liyofilize halde bir adet mantar suşu gelir.
- Suşun, 35 yaşında akut lösemi nedeniyle kemoterapi alırken nötropenik bir dönemde ateşi çıkan bir hastadan alınan kan kültüründen ürediği bildirilir.
- Laboratuvar teknisyeni suşun belirtildiği şekilde ekimini yapar.

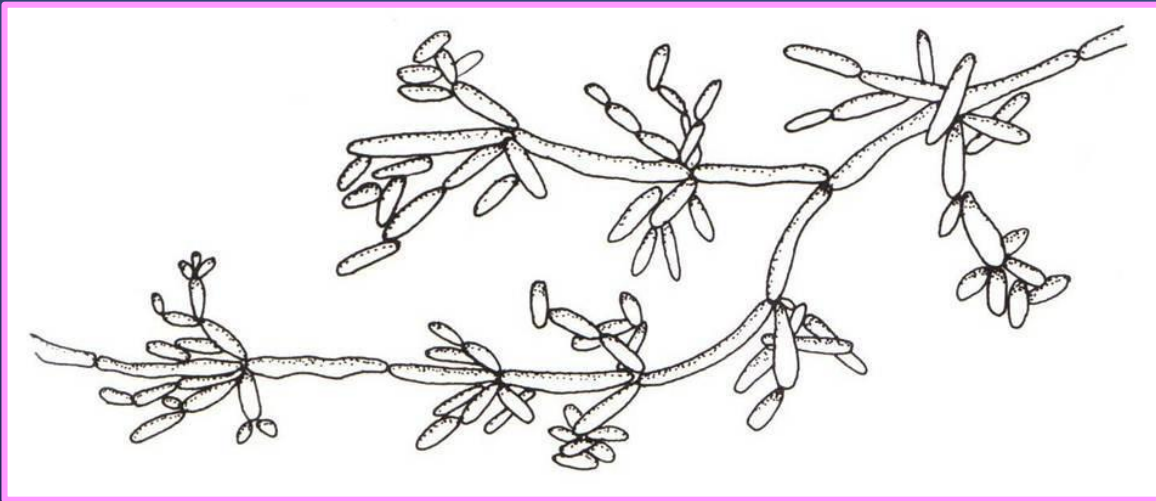


- SDA besiyerinde 48 saat sonra üreyen suştan preparat yapılır ve suşun maya / maya benzeri mantar olduğuna karar verilir.
- Üreyen maya mantarı konvansiyonel yöntemlerle (çimlenme borusu testi, CHROMagar *Candida* ve mısırunu tween 80 agardaki morfoloji) tanımlanır. Ayrıca API 20C AUX ile yarı otomatik karbonhidrat asimilasyon testi yapılır.





- Mikoloji laboratuvarı sorumlusu, konvansiyonel yöntemlere göre suşun *Candida krusei* olabileceğini düşünür ancak karbonhidrat asimilasyon test sonuçlarına göre identifikasyon sonucu *Candida kefyr* olarak gözükmektedir. Durumdan tam emin olamayan Mikoloji laboratuvarı sorumlusu, karbonhidrat asimilasyon testinin daha güvenilir olduğunu düşünerek suşun identifikasyon sonucunu *C. kefyr* olarak bildirir.



➤ Bu görüntüler ve bulgular ışığında sizin yaklaşımınız ne olurdu?

a) *Candida krusei* olarak bildirirdim

b) Mısırunu tween 80 lam kültürünü tekrarlardım

c) Yarı otomatik asimilasyon testini tekrarlardım

d) *Candida kefyr* olarak bildirirdim

e) Hem mısırunu tween 80 lam kültürünü hem de yarı otomatik asimilasyon testini tekrarlardım

- Ayrıca suşa flukonazol ve amfoterisin B için CLSI M27-A3 standartları doğrultusunda mikrodilüsyon yöntemi ile antifungal duyarlılık testi çalışılır. Sonuç olarak suşun flukonazol **MİK değeri 2  $\mu\text{g/ml}$  (duyarlı)** amfoterisin B MİK değeri ise **0.5  $\mu\text{g/ml}$  (duyarlı)** olarak belirlenir ve bildirilir.



- DKK program değerlendirmesi geldiğinde, suşun tanımlama sonucunun *C. krusei* olduğu ve **yanlış** tanımlandığı görülür.
- Öte yandan suşun duyarlılık sonucu olarak verilen **amfoterisin B** sonucunun **doğru** ancak **flukonazol** sonucunun **yanlış** olduğu, suşun duyarlı değil **dirençli** olarak rapor edilmesi gerektiği bildirilir.



➤ **Burada hangi noktada sorun yaşanmıştır?**

a) Sekreterlik hatası

b) Antifungal duyarlılık testinin yanlış uygulanması

c) Mısır urüni ile kültür ortamı karıştırılırken suş karışması

**Hepsi doğru olabilir**

d) API 20C AUX sistemine inokülasyon esnasında kontaminasyon

e) Antifungal duyarlılık testinin yanlış okunması

➤ BU DURUMDA LABORATUVAR  
SORUMLUSU NE YAPMALIDIR?  
NASIL BİR YOL İZLEMELİDİR?



# 1) Algoritma ile Değerlendirme

Birinci basamak: Hata nedeninin belirlenmesi

## A) Sekreterlik hatası

Nasıl kontrol edilir? ⇒ Laboratuvarda yazılan kayıtlar ve sonuçlar ile, DKK programı formuna yazılan ve bildirilen sonuçların aynı olup, olmadığı kontrol edilir

⇒ **BURADA BÖYLE BİR SORUN YOK**

## B) Teknik Sorunlar

## B) Teknik Sorunlar Nasıl kontrol edilir?

⇒ Tanımlama ve antifungal duyarlılık işlemlerindeki İKK, teknik açıdan işlemler ve yöntem gözden geçirilir, değişik aşamalarda kültürler kontrol edilir.

Teknik personel ile görüşme ⇒ Örnek hazırlığı, pipetleme, dilüsyon hatası açısından: Personel doğru yaptığını ifade ediyor

⇒⇒ Konvansiyonel yöntem sonucunun doğru, karbonhidrat asimilasyon testi sonucunun yanlış olması nedeni ile karbonhidrat asimilasyon testi hazırlanırken bir kontaminasyon olabileceğinden şüphe edilir. Bu nedenle, DKK kontrol suşu canlandırılıp karbonhidrat asimilasyon testi tekrar edilir ve sonucunun *C. krusei* olduğu görülür.



## *B) Teknik Sorunlar* Nasıl kontrol edilir?

⇒ DKK suşunun antifungal duyarlılık testi açısından teknik personel ile görüşme ve incelemelerde bir **sorun izlenmez**. Bunun üzerine flukonazol duyarlılığı **tekrar çalışılır** ve bildirildiği şekilde aynı MİK sonucu çıkar. Ancak identifikasyon sonucunun *C. krusei* olması nedeniyle, duyarlılık testinde flukonazol duyarlı çıksa bile, bu türün **intrensek flukonazol direnci** bulunması nedeniyle, dirençli olarak rapor edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle bildirilen sonuç hatalı olarak değerlendirilmiştir.

# NASIL BİR DÜZELTİCİ-ÖNLEYİCİ ETKİNLİK BAŞLATILMALIDIR?

## 2. Basamak: Algoritma oluşturulması

Bu testleri çalışan teknik personel/personeller ile bir toplantı yapılarak sorun paylaşılır, örneğin nasıl sulandırılacağı, nelere dikkat edilmesi gerektiği, işlemin nasıl yapılması gerektiği tekrar gözden geçirilir **(EĞİTİM!)**.

# SORUN NASIL SINIFLANDIRILABİLİR?

## 3. Basamak: Sorunun sınıflandırılması

### 2. Teknik Sorunlar

#### 2.2 Dilüsyon veya pipetleme hatası

*SUŞ SÜPANSİYONUNUN HAZIRLANMA HATASI  
(KONTAMİNASYON)*

## 4. Basamak: Kayıt

Tüm yapılan işlemler Kalite Güvence Sorumlusunun verdiği “Düzeltilici - Önleyici Etkinlik Formu”na kaydedilir.

# BU OLGUDAN ÇIKARILACAK DERS

↳ Laboratuvar birim sorumlusu emin olmadığı veya sonuçlarda uyumsuzluk olduğu durumlarda, prosedürleri ve yapılan işlemleri teknik personel ile gözden geçirip, sorunu onunla tartıştıktan sonra testi tekrarlatmalı ve gerek rutin gerekse Dış Kalite Kontrol sonuçlarını emin olduktan sonra bildirmelidir.



# SON DURUM / SORULAR

- Bir başka dış kalite kontrol suşu *C. albicans* olarak tanımlanır ve suşun yapılan antifungal duyarlılık test sonucunda amfoterisin B MİK değeri **2 µg/ml** olarak belirlenir ve **dirençli** olarak bildirilir.

➤ Bildirilen sonuç doğru mudur? Uygun mudur?

- a) Bildirilen sonuç doğrudur
- b) CLSI'nın amfoterisin B için bildirdiği direnç sınır noktası olmadığı için duyarlılık kategorisi bildirilmemelidir
- c) Antifungal duyarlılık testi sonucu bir başka göz tarafından değerlendirilmelidir
- d) *C. albicans* türünde amfoterisin B direnç oranı düşük olduğu için duyarlılık testi tekrarlanmalıdır

➤ DKK program değerlendirmesi geldiğinde, suşun amfoterisin B duyarlılık sonucunun **yanlış** olduğu, MİK değerinin **1 µg/ml** ve **duyarlı** olarak bildirilmesi gerektiği rapor edilir.

➤ **Bu durumda ne yapılmalıdır?**

➤ Duyarlılık testinde bir kuyu farkla dirençli/duyarlı kararının değişmesi nedeni ile bulduğumuz sonucun yanlış çıkması nedeniyle akreditasyon gereği **Düzeltici Önleyici Etkinlik yazılması ve planlanması** gerekir oysa **+1 dilüsyon** sınırı dahilindedir.







Teşekkür ederim

