

Olgularla Klinik Bakteriyoloji

Doç. Dr. Ebru Us
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

OLGU 1

- ▶ Ekim 2013 tarihinde gastroenteroloji kliniğine
- ▶ Kanlı-mukuslu ishal ve
- ▶ Kramp tarzında karın ağrıları ile yatırılan
- ▶ 25 yaşında kadın hastadan
- ▶ Rutin tetkikleri ile beraber
- ▶ Dışkı incelemesi de isteniyor
- ▶ Hastaya herhangi bir tedavi başlamadan önce dışkı örneği temiz bir kaba alınarak içinde buz aküsü bulunan bir taşıma kutusu içinde merkez mikrobiyoloji laboratuvarına gönderiliyor



OLGU 1

► **SORU 1:** Sizce örnek alımı do ru yapılmış mıdır?

A. Evet

B. Hayır, örnek kabı steril olmalıydı



OLGU 1

A. Evet



- ▶ shali olan hastalardan örnekler özellikle hastalı nıbaşladı ilk 4 gün içinde ve antibiyotik tedavisi başlanmadan alınmalı
- ▶ Örneklerin alınca ı kabın temiz olması, deterjan ve dezenfektanla kontamine olmaması gerekli



OLGU 1

- ▶ Dışkı örne i 30 dakika içinde laboratuvara ulaştırılıyor
- ▶ **SORU 2:** Sizce laboratuvara ulaştırma işlemi do ru yapılmış mıdır?
 - A. Evet
 - B. Hayır, örnek mutlaka taşıma besiyerine alınmalıydı
 - C. Fark etmez



OLGU 1

A. Evet



- ▶ Taşıma esnasında örnekler +4.C'de korunmalı, en kısa sürede laboratuvara ulaştırılmalı
- ▶ Eğer hemen ulaştırılamayacaksa +4.C'de saklanarak 48 saat içinde laboratuvara iletilmeli
- ▶ Örnek eğer rektal sürüntü örneği ise veya hemen ekilemeyecek ise nem kaybını önlemek için hemen bir taşıma besiyerine (Cary-Blair) alınmalı

OLGU 1

Laboratuvar



Makroskopik inceleme



Mikroskopik inceleme

Lökosit + Parazitolojik inceleme -

- ▶ Kanlı Agar ,
- ▶ MacConkey Agar
- ▶ Hektoen Enterik Agar



- ▶ 35-37.C'de 18-24 saat (aerobik) inkübasyon

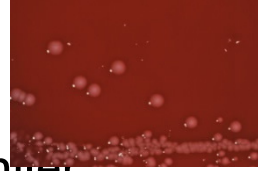


OLGU 1

- ▶ inkübasyon sonunda

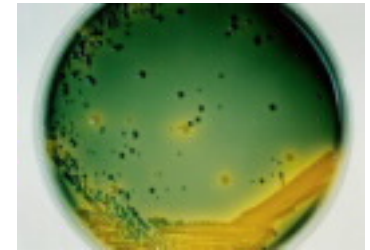


- ▶ Kanlı agarda 2-3 mm çapında nemli koloniler
- ▶ MacConkey Agar'da renksiz koloniler
- ▶ Hektoen Enterik Agar'da ise yeşil-mavi renkli koloniler
- ▶ H₂S üretimi sonucu oluşan siyah presipitatlar gözlenmiyor



- ▶ **SORU 3: En olası etken hangisi olabilir?**

- A. *Salmonella* spp.
- B. *Citrobacter* spp.
- C. *Shigella* spp.
- D. *Proteus* spp.



OLGU 1

C. *Shigella* spp.

- ▶ *Shigella* gibi laktoz ve sukrozu kullanmayan organizmaların oluşturabilece i düşünölen bu şüpheli koloniler ileri çalışmalar için seçiliyor



OLGU 1

- ▶ Primer kültür vasatlarındaki şüpheli kolonilerden



TSI, üre, lizin dekarboksilaz

- ▶ 35°C'de 18-24 saat inkübasyon
- ▶ inkübasyon süresinin sonunda



OLGU 1

- ▶ TSI besiyerinde
 - ▶ Dip sarı, yüzey kırmızı (Asit/Alkali)
 - ▶ Glukozdan gaz oluşumu –
 - ▶ H₂S üretimi –
- ▶ Üreaz aktivitesi –
- ▶ Lizin dekarboksilasyonu –



- ▶ Üretilen bakterinin *Shigella* cinsine ait olduğu düşünülüyor



OLGU 1

► **SORU 4:** Bundan sonra tanıyı do rulamak için ne yaparsınız?

- A. *Shigella* spp. olarak raporlamak
- B. Serolojik test
- C. Otomatize sistem ile identifikasyon
- D. Referans laboratuara göndermek



OLGU 1

B. Serolojik test

- ▶ *Shigella* izolatlarının identifikasyonu için serolojik testler gereklidir



OLGU 1

- ▶ Serolojik identifikasyon



- ▶ Polivalan somatik O antijenlerini içeren antiserumlarla lam aglutinasyonu
- ▶ Aglutinasyon +



- ▶ Serotipi belirlemek için monovalan antiserumlarla identifikasyona devam
- ▶ *S. dysenteriae* (serotip A) antiserumuyla aglutinasyon +

Kontrol olarak kullanılan SF ve şüpheli bakteri karışımında spontan aglutinasyon yok

OLGU 1

- **SORU 5:** Sonucu *S. dysenteriae* (serogrup A) olarak raporlayalım mı?
- I. Evet, *Shigella* izolatlarının identifikasyonu serolojik olarak yapılır
 - II. Hayır, yapılan biyokimyasal testler yetersiz, otomatize sistemle identifikasyonu tekrar edip doğrulayalım
 - III. Referans laboratuvara gönderelim
 - IV. Klinikle irtibata geçip hastada bir *Shigella* enfeksiyonundan şüphelenip şüphelenmediklerini soralım
- E. Yalnız I
- F. Yalnız IV
- G. II ve IV
-



OLGU 1

C.II ve IV

- ▶ *Shigella* enfeksiyonlarının daha çok yaz aylarında görülmesi ve o günlerde bir salgın durumunun olmamasından dolayı



- ▶ Bakteri identifikasyonu otomatize sistemle tekrar ediliyor
- ▶ Bu arada da klinikle irtibata geçilerek hastada bir *shigella* enfeksiyonundan şüphelenip şüphelenilmedi i ö reniliyor



OLGU 1

- ▶ Tek koloni pasajından yapılan saf kültürün otomatize sistemle incelenmesi



%99 *E. coli*

- ▶ Hastanın doktoruyla yapılan görüşme
 - ▶ Hastanın ishali devam ediyor
 - ▶ Fakat ateşinin olmaması ve şikayetlerinin akut başlamaması nedeniyle



- ▶ Kronik inflamatuvar barsak hastalıklarının daha çok düşünüldü ü
- ▶ Enfeksiyon kaynaklı durumları ekarte etmek amacıyla dışkı incelemesi istendi i anlaşılıyor



OLGU 1

- ▶ **SORU 6:** Bu bilgiler ışığında ne yapılmalıdır?
- A. Dışkı kültürü “Normal enterik flora elemanları üredi. *Salmonella*, *Shigella* türlerine rastlanmadı” şeklinde raporlanıp, *Shigella* antiserumlarının kalite kontrolü yapılmalıdır
- B. Hastaya herhangi bir sonuç verilmeyip, izolat referans laboratuvara gönderilmelidir



OLGU 1

A. Dışkı kültürü “Normal enterik flora elemanları üredi. *Salmonella*, *Shigella* türlerine rastlanmadı” şeklinde raporlanıp, *Shigella* antiserumlarının kalite kontrolü yapılmalıdır



OLGU 1

- ▶ *E. coli* ve *Shigella* türleri genetik olarak yakın ilişkilidir ve klinik laboratuvarlarda tanı problemlerine yol açarlar
- ▶ Eskiden *Alkalescens/Dispar* adı verilen ve genellikle patojen olduğu düşünülmemiş inaktif *E.coli*'ler tarama besiyerlerinde tipik olarak



- ▶ Laktoz -
- ▶ Hareketsiz
- ▶ Glukozdan gaz oluşturmayan suşlardır

- ▶ Bu nedenle biyokimyasal tarama testlerinden alınan sonuçlar, ikinci bir yöntemle doğrulandıktan sonra, kalite kontrolü yapılmış *Shigella* antiserumları kullanılarak kesin tanıya varılmalıdır



OLGU 1

- ▶ *Shigella* antiserumları ile bazı bakterilerin çapraz reaksiyon verebileceği de göz önünde bulundurulmalıdır



- ▶ *Stenotrophomonas maltophilia* ile *Shigella dysenteriae*, Bonny, 2010;
 - ▶ *Plesiomonas shigelloides* ile *Shigella flexneri* spp. ve *Shigella dysenteriae*, Albert, 1993;
 - ▶ *Enterobacter*, *Escherichia*, *Stenotrophomonas*, *Aerococcus*'un çevresel izolatları ile *Shigella* spp spesifik antiserumlar arasında (özellikle *Shigella dysenteriae* ve *Shigella boydii*), Rahman, 2007

 - ▶ Sonuç olarak; izole edilen bakterinin biyokimyasal olarak *Shigella* spp oldu undan emin olunmadan serolojik identifikasyona başvurulmamalıdır
-





OLGU 2

- ▶ Romatoid artrit ve *kronik obstrüktif akciğer hastalığı* (İKOA) nedeniyle takip altında olan
- ▶ 72 yaşında kadın hasta
- ▶ 15 Eylül 2012 tarihinde
 - ▶ Öksürük
 - ▶ Ateş
 - ▶ Halsizlik
 - ▶ Kilo kaybı
 - ▶ Nefes darlığı
- ▶ Göğüs hastalıkları polikliniğine başvuruyor

Ön arka akciğer grafisinde *fibrozis ve parenkimal opasite*



OLGU 2

- ▶ Tam kan sayımı
 - ▶ Lökosit (WBC) * **12** x10⁹/L 4,5 – 11
 - ▶ Nötrofil % ***70,9** % 40 – 70
 - ▶ Lenfosit % * **16,4** % 20 - 45
 - ▶ Monosit % * **11,1** % 3 - 9

 - ▶ Eozinofil % **1,3** % 0 – 3

 - ▶ Sedimantasyon * **38** mm/saat 0 - 20
 - ▶ CRP * **50,5** mg/L 0 - 3
-



OLGU 2

- ▶ Toraks bilgisayarlı tomografisinde nfiltrasyonlar var
- ▶ Lenfopenik
- ▶ Ön tanı Pnömoni, tüberküloz ve malignite

▶ **17/09/2012** bronkoskopi yapılıyor

- ▶ Tüm lob ve segmentler açık
- ▶ Endobronşial lezyon yok
- ▶ Bol seroz sekresyon gözleniyor



▶ Bronşiyal lavaj örne i alınarak

- ▶ Mikroskopik inceleme (aside dirençli bakteri (ARB) aranması)
- ▶ Tüberküloz kültürü
- ▶ Bronşiyal lavaj kültürü (bakteri, mantar)
- ▶ Bronşiyal lavaj histopatolojik incelemesi isteniyor

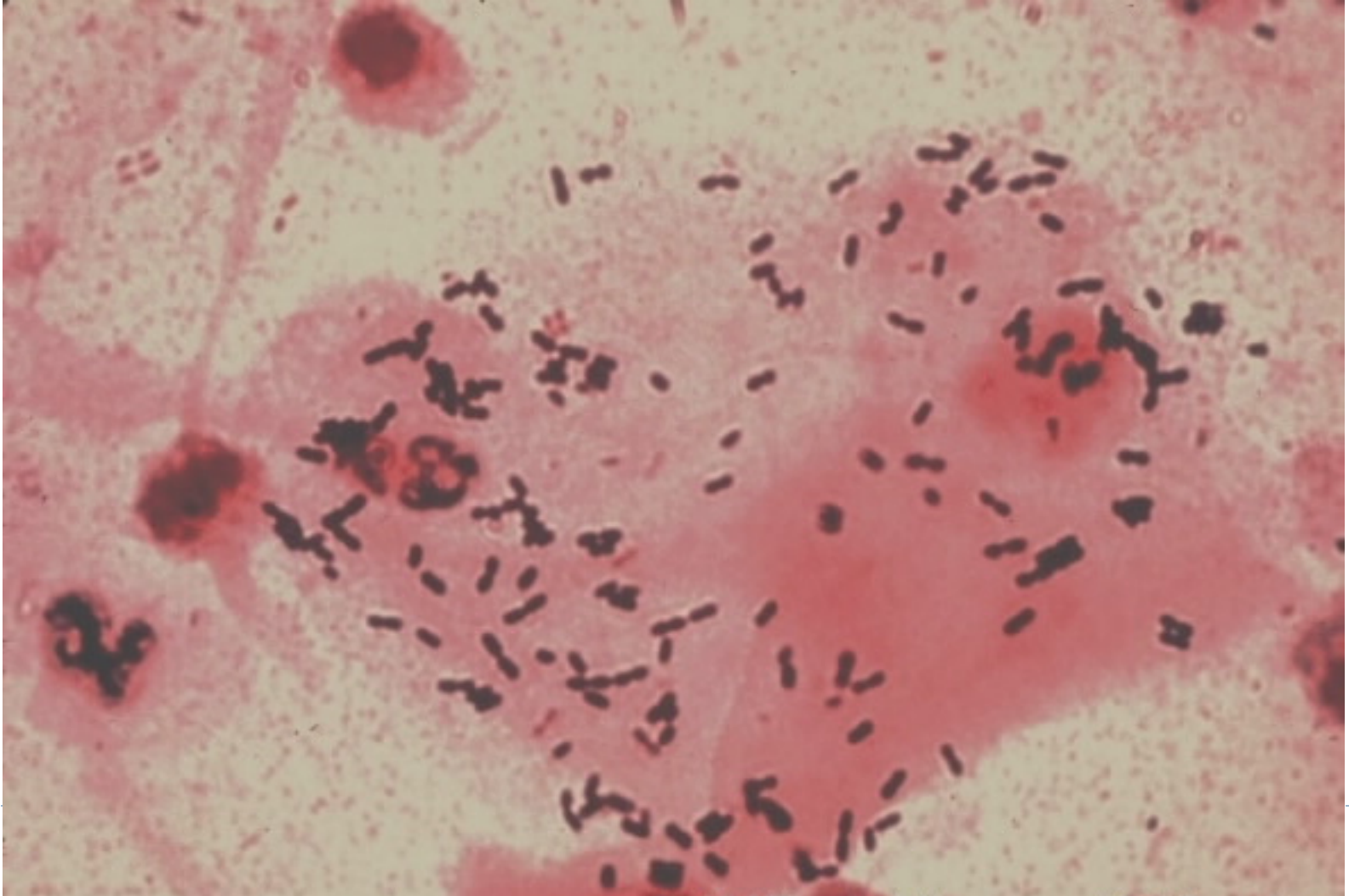


OLGU 2

20/09/2012

IBN-I SINA MERKEZ LABORATUVARI

Direkt mikroskopi: BAL gram yayması



OLGU 2

SORU 1: Şekilde görülen yaymayı nasıl raporlarsınız?

- A. Epitel hücresi : 3-4 adet (x100 büyütme ile her alanda)
PMNL : 8-10 adet (x1000 büyütme)
Mikroorganizma : Hücre içi ve dışı Gram pozitif diplokok

- B. Epitel hücresi : yo un (x100 büyütme ile her alanda)
PMNL : nadir (x1000 büyütme)
Mikroorganizma : Hücre dışı Gram pozitif zincir kok

- C. Epitel hücresi : nadir(x100 büyütme ile her alanda)
PMNL : yo un (x1000 büyütme)
Mikroorganizma : Hücre içi ve dışı Gram pozitif kokobasil



OLGU 2

- A.** Epitel hücresi : 3-4 adet (x100 büyütme ile her alanda)
PMNL : 8-10 adet (x1000 büyütme)
Mikroorganizma : Hücre içi ve dışı Gram pozitif diplokok



OLGU 2

21/09/2012

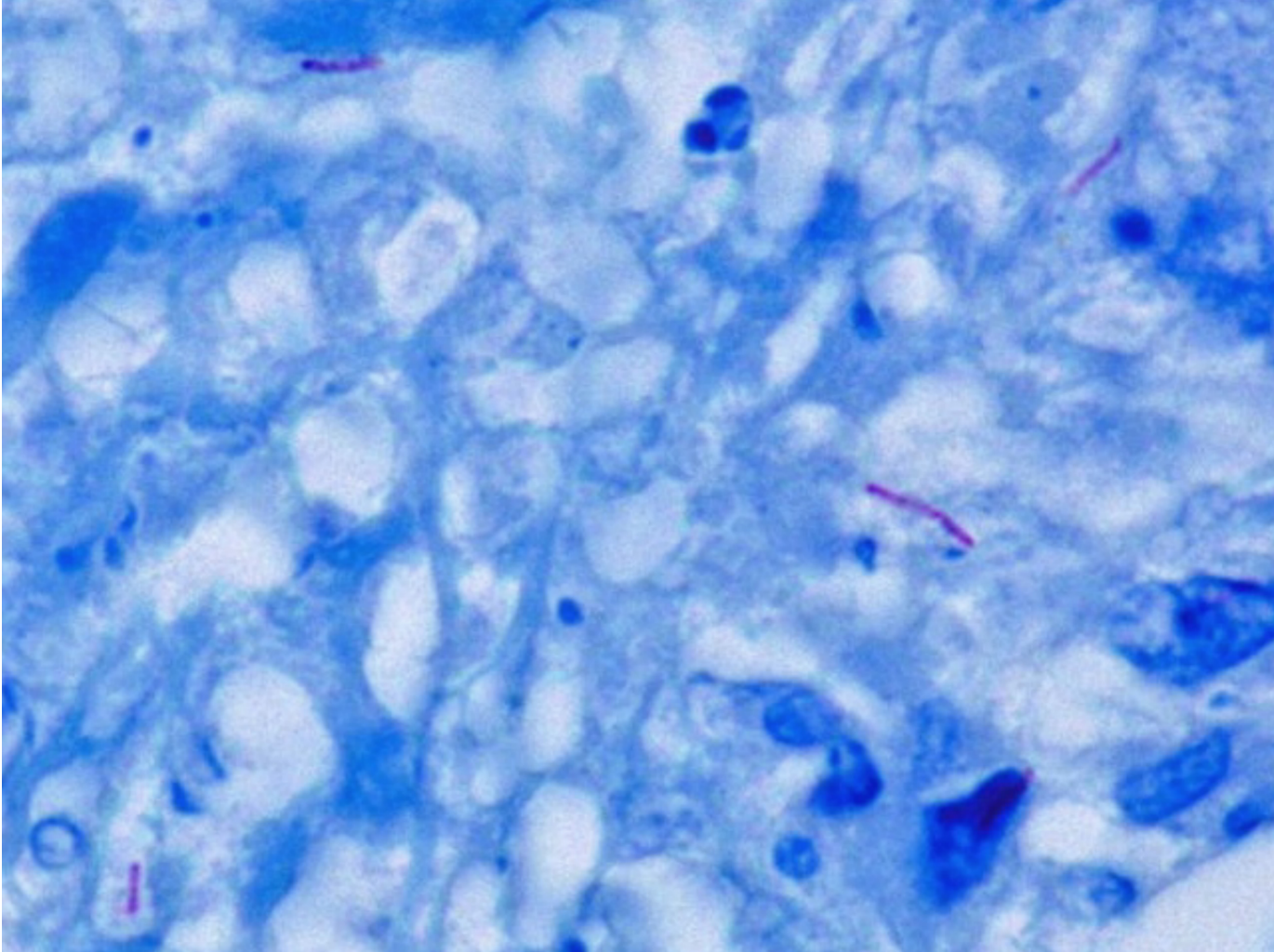
Kültür Antibiyogram - IBN-I SINA MERKEZ LABORATUVARI

- ▶ Bronşiyal Lavaj Kültürü Sonucu:
 - ▶ Üst solunum yolu flora elemanları üredi
 - ▶ Mantar açısından üreme **negatif**



20/09/2012

Mikroskopik Incelemeler- IBN-I SINA MERKEZ LABORATUVARI



BAL – Aside dirençli boyama

OLGU 2

▶ Mikroskopik İncelemeler- IBN-I SINA MERKEZ LABORATUVARI



- ▶ ARB Aranması **Pozitif**
- ▶ ATS kriterlerine göre I (+) Pozitif olarak değerlendirilmiştir
- ▶ **22/09/2012** tarihli bronşiyal lavaj örneği histopatolojik inceleme sonucunda
- ▶ Granülomatöz ve süpuratif reaksiyon
- ▶ Malignite açısından **negatif**



Bu bulgular ışığında malignite ve bakteriyel pnömoni ekarte edildiğinden anti-tüberküloz tedavi başlanıyor



OLGU 2


- ▶ **2 hafta sonra**
- ▶ Hastanın şikayetlerinde gerileme yok
- ▶ Hastanın balgam örneğinden tekrar



Mikroskopik inceleme
(aside dirençli bakteri (ARB) aranması)




Tüberküloz kültürü

- ▶  Real-time PCR ile *M. tuberculosis* kompleks araştırılması isteniyor
- ▶ O tarihe kadar tüberküloz kültüründe üreme olmadı labortauvardan öğreniliyor
- ▶ (Analiz süresi 42 gün)



OLGU 2

- ▶ 7.10.2012
- ▶ Mikroskopik İncelemeler- **IBN-I SINA MERKEZ LABORATUVARI**

- ▶ ARB aranması **Pozitif**
- ▶ ATS kriterlerine göre I (+) Pozitif olarak değerlendirilmiştir



OLGU 2

▶ **11.10.2012**

▶ Sadece *Mycobacterium tuberculosis* kompleks DNA varlığını araştırmaya yönelik olarak uygulanan moleküler incelemenin sonucu **Negatif**

▶ Bu sırada tüberküloz kültüründe hala üreme yok (İlk örnek gönderilişinden 3 hafta sonra)

▶ **SORU 2:** Bu bulgular size hangi etkeni düşündürdü?

A. Bakteriyel pnömoni

B. Viral pnömoni

C. Mikoplazma pnömonisi

D. Tüberküloz dışı mikobakterilerin (TDM) sebep olduğu pulmoner hastalık



OLGU 2

D. Tüberküloz dışı mikobakterilerin sebep olduğu pulmoner hastalık



OLGU 2

- ▶ **SORU 3:** Lenfopenik, altta yatan kronik hastalı olan ARB pozitif hastaların klinik örneklerinden herhangi bir mikobakterinin izole edilemedi i durumlarda ne yapmak gerekir?
 - A. Tekrar örnek isteyip mikobakteri kültürünü tekrarlamak
 - B. Uygun kültür şartları oluşturularak atipik mikobakterileri araştırmak



OLGU 2

B. Lenfopenik, altta yatan kronik hastalı olan ARB pozitif hastaların klinik örneklerinden herhangi bir mikobakterinin izole edilemedi i durumlarda uygun kültür şartları oluşturularak atipik mikobakterilerin araştırılması gerekir



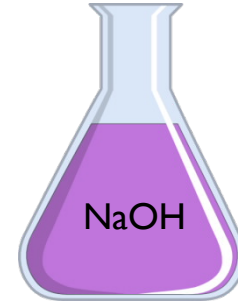
OLGU 2

- ▶ Bu amaçla hastadan tekrar klinik örnek isteniyor
- ▶ Gönderilen balgam örneği NALC-NaOH'in kullanıldığı protokolü uygulanarak dekontamine edildikten sonra



- ▶ Mikroskopik inceleme için preparat hazırlanıyor

dekontaminasyon



OLGU 2

- **SORU 4:** Atipik mikobakterileri kültür ortamında üretebilmek için hangi koşullar oluşturulmalıdır?
- A. Mikobakteri kültürü 30°C'de yapılmalıdır
 - B. Mikobakteri kültürü demir içeren vasatlar kullanılarak 30°C'de yapılmalıdır
 - C. Kültür için özellikle Staib agarkullanılmalıdır
 - D. Mikobakteri kültürü 45°C'de yapılmalıdır



OLGU 2

B. Mikobakteri kültürü demir içeren vasatlar kullanılarak 30°C'de yapılmalıdır



OLGU 2

- ▶ Middlebrook 7H10 agar plaına
- ▶ Dekontamine edilmiş olan materyalden 0.1 ml



- ▶ Agar yüzeyine hemin içeren kağıt strip

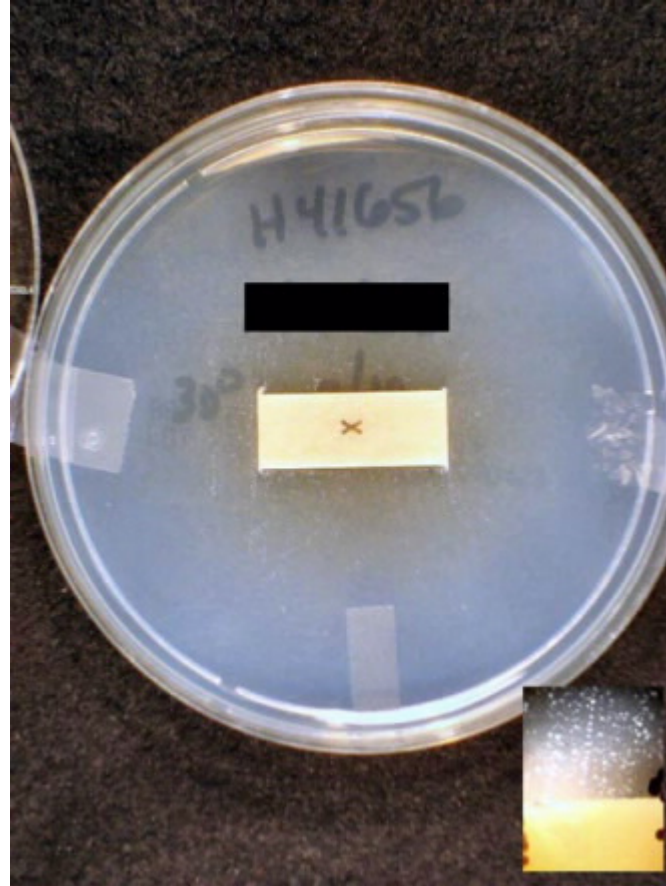


- ▶ 30°C'ye ayarlanmış etüvde inkübasyona bırakılıyor



OLGU 2

- ▶ 2. haftanın sonunda hemin içeren kağıt stripin etrafında uydu koloniler



OLGU 2

► **SORU 5:** Etken aşı idakilerden hangisi olabilir?

- A. *M. avium complex*
- B. *M. abscessus*
- C. *M. marinum*
- D. *M. haemophilum*
- E. *M. kansasii*



OLGU 2

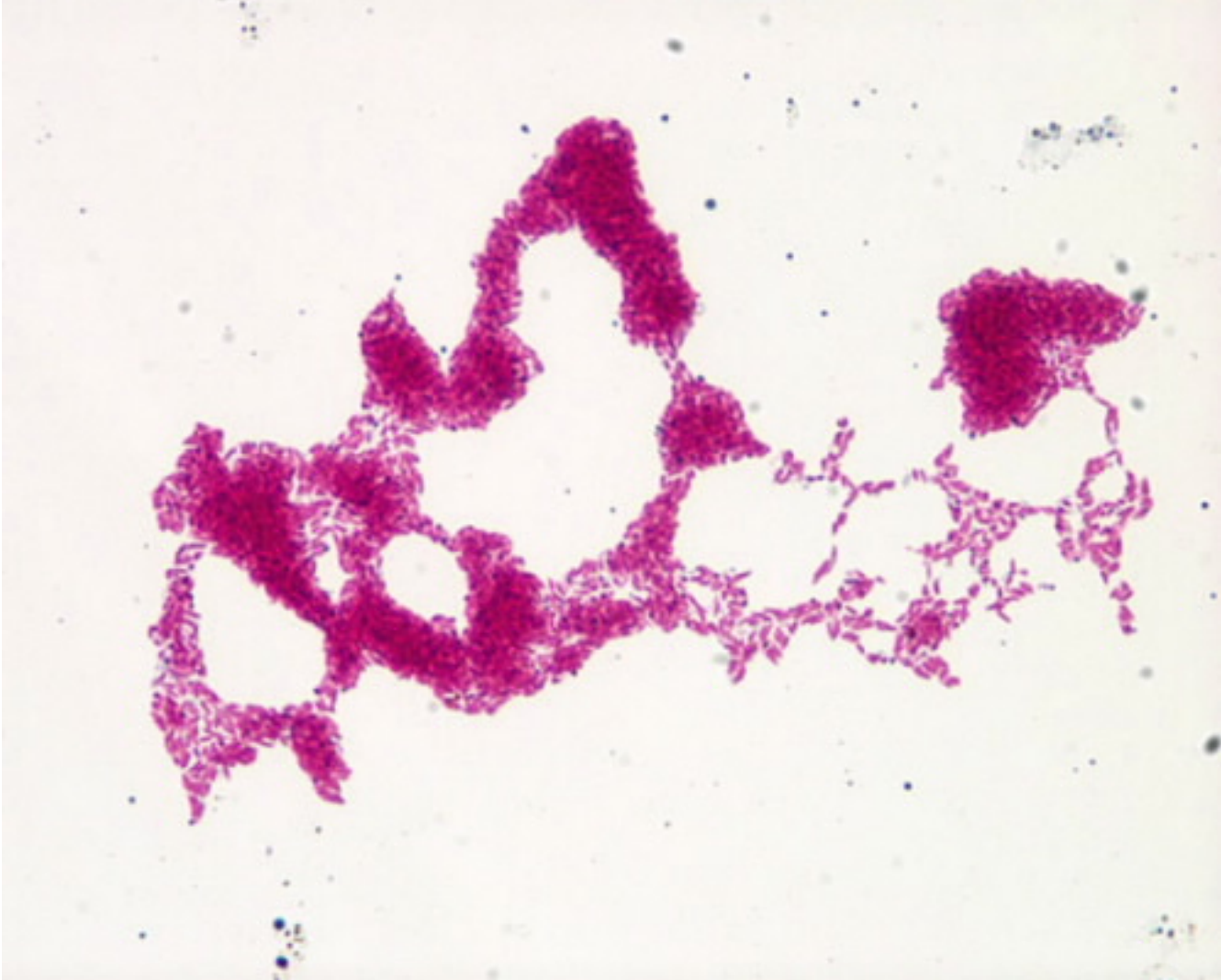
D. *M. haemophilum*

Nonfotokromojen:(Runyon grup III): karanlıkta ve ışıkta pigmentsiz olabildi i gibi; soluk sarı, deve tüyü rengi veya açık bronz renkte pigmentli olabilir. Pigment ışığa maruz kaldı nda artmaz



OLGU 2

- ▶ Bu kolonilerden yapılan EZN boyasında
- ▶ *M. tuberculosis*'e benzer şekilde kord oluşturmuş aside dirençli basiller



OLGU 2

- ▶ Bu durumda üremenin *M. tuberculosis*'e ait bir üreme oldu unu düşünür müsünüz?
- A. Evet
- B. Hayır




OLGU 2

- B.** *M. haemophilum* kolonileri sıklıkla *M. tuberculosis*'e benzer şekilde kord oluşumu gösterir
- ▶ Kord oluşumu son zamanlarda tüberküloz dışı mikobakterilerde de gösterildi inden artık özellikle *M. tuberculosis* izolatlarına özgü olarak kabul edilmemektedir
 - ▶ (Julián E., et al, 2010. Microscopic cords, a virulence-related characteristic of *Mycobacterium tuberculosis*, are also present in nonpathogenic mycobacteria. J. Bacteriol. 192:1751–1760)



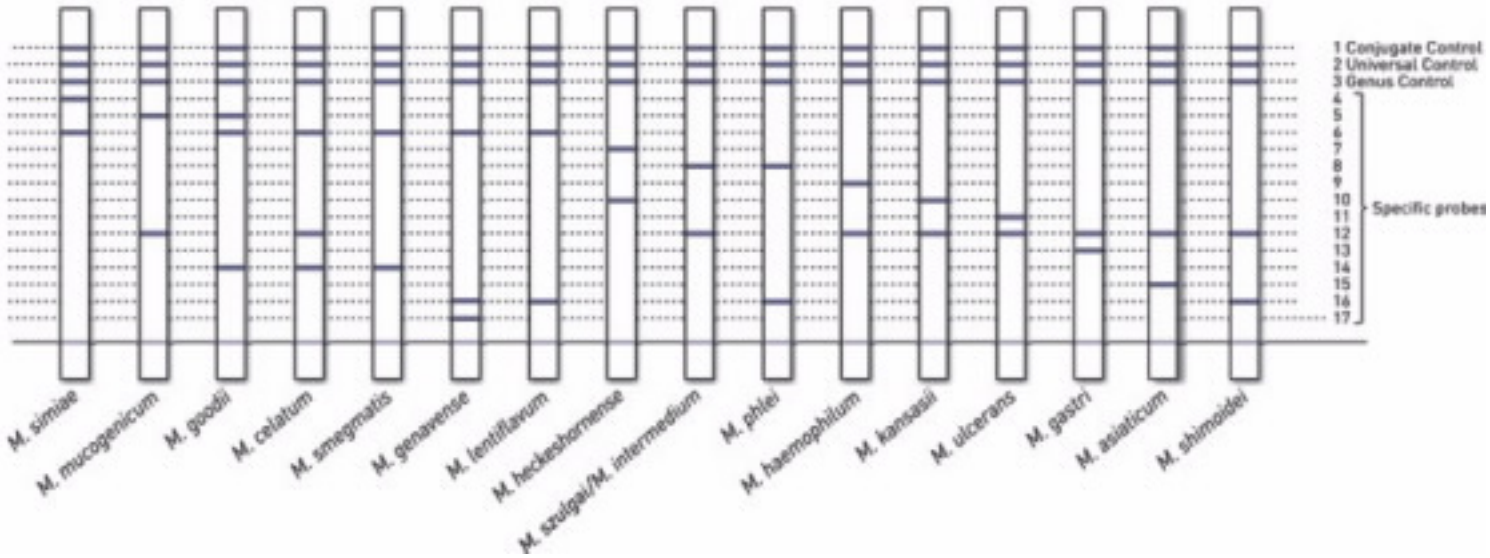
OLGU 2

- ▶ Tanının kesin olarak doğrulanması için kültürde üretilmiş izolata
- 
- ▶ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde line probe assay uygulanıyor (the GenoType Mycobacterium AS, Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany)
-
- ▶ (Moleküler LPA (Line Probe Assay) testleri; PCR tekniği ile amplifikasyon, ardından hibridizasyon uygulanarak çalışılmaktadır)



OLGU 2

► Test sonucunda



M. haemophilum identifiye ediliyor

OLGU 2

- ▶ Hastaya başlanan anti-tüberküloz tedavi kesilerek tüberküloz dışı mikobakterilere yönelik tedavi başlanıyor
- ▶ 42 günün sonunda (28.10.2012 tarihinde) ilk gönderilen tüberküloz kültürü üreme olmadı şeklinde raporlanıyor



OLGU 2

- ▶ **28.10.2012** (42 günün sonunda) (ilk gönderilen örnek)
- ▶ **Tüberküloz - IBN-I SINA MERKEZ LABORATUVARI**
- ▶ TÜBERKÜLOZ KÜLTÜRÜ(OTOMATIZE)
- ▶ Kültür Sonucu: Üreme olmadı



- ▶ Hastaya uygulanan 18 aylık azitromisin ve rifampin tedavisi ile iyileşme





Teşekkürler

