

# 8. Hafta

**TEŞHİS**

# Mantar İnfeksiyonlarının Teşhisinde Kullanılan Yöntem

1-) Anamnez

2-) Klinik Bulgular

3-) Nekropsi Bulguları

4-) İntradermal Deri Testleri

5-) Klinik örneklerin laboratuvarda incelenmesi

a) Direkt mikroskopi

b) İzolasyon

c) İdentifikasyon

- Koloni özellikleri
- Makrokonidiaların incelenmesi
- Belirli dermatofit ve mayalarda biyokimyasal testler

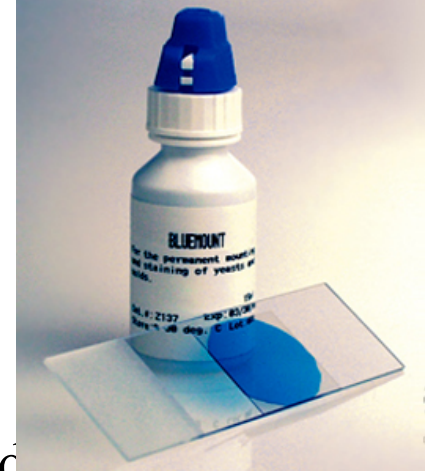
## 5-) İnceleme Örnekleri

- Dermatofitlerde fungal patojenleri içerdđi düşünölen saç (kıl, tüy) örnekleri ve deri kazıntıları
- Eksudatlar, biyopsi ve dokular
- Çoğu fungal patojen çevrede yaygın olarak bulunduğu için histopatolojik muayene ile fungal hifa, maya hücreleri ya da bunların doku reaksiyonlarının görüntölenmesi için dokunun da alınması gerekir
- Eğer izole edilen etken ile histopatolojik bulgular uyuşuyorsa bu teşhisi doğrular!!!
- Histopatolojik kesitler biyopsi örnekleri ya da dokulardan hazırlanabilir. Dondurulmuş kesitler taze dokulardan hazırlanırken, daha kalıcı doku kesitleri %10 formalin ile fikse edilmiş materyalden hazırlanır.

<b>Teknik</b>	<b>Kullanım Amacı</b>	<b>Mantarlar</b>
Hair Perforation Test	Saç ve kıllarda meydana gelecek perforasyona göre değerlendirme yapılır.	Microsporum canis, M. equinum ve Trichophyton mentagrophytes – T. rubrum arasında ayırım yapmak için kullanılır.
Wood's Lamp Uygulaması	Saç ve kılların, dermatofitlerle infekte olduğu durumların tespitinde kullanılarak tespit edilmesinde kullanılır.	Karanlık bir odada, kıllara tutunmuş sporların sarı yeşil renkli floresan yansıması ile tespit edilmesi esasına dayanır.
Hayvan İnokulasyon Tekniği	Yapay besiyeri ortamlarında saf kültürler elde edilir. Beyaz fareler ve guinea pig tercih edilir.	Klinik materyallerden izole edilmiş mantar etkenleri, hayvan etik komitesinin izni ile laboratuvar hayvanlarına inokule edilir
Serolojik Testler	Spesifik mantar antikörleri tespit edebilir.	İmmun sistem baskılanmış hastalarda da hiç antikor olmayabilir ya da çok düşük miktarda üretilir.
Moleküler Biyoteknolojik Yöntemler	Güncel ve alternatif yaklaşım. Daha spesifik, kesin sonuç alınabilir.	Çoğu mantar ve maya, dimorfik formlar, dokulardaki maya benzeri formlar

# Laktofenol Pamuk Mavisi

Fenol kristal	20 g.
Laktik asit	20 cc.
Gliserin	40 cc.
Distile su	20 cc.
Pamuk mavisi	0.0075 g.

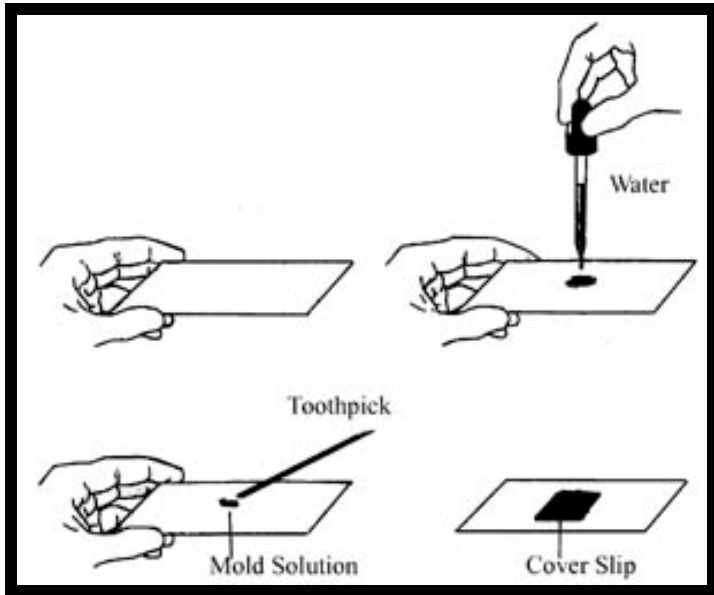


-Fenol kristal, distile su içinde hafifçe ısıtılarak eritildikten sonra diğer bileşenler katılır.

-Solusyonun içindeki laktik asit özellikle mantar elementlerinin muhafazasında, fenol mantarların öldürülmesinde ve pamuk mavisi (anilin mavisi) de boyamada görev alarak iyi bir görünüm sağlar.

-Temiz bir lam üzerine bir damla Laktofenol Pamuk Mavisi solüsyonu konur. Üzerine kıl örnekleri ya da besiyerinde üremiş mantar kolonisi parçası küçük bir üçgen şeklinde örneklendikten sonra konarak üzerine lamel kapatılır ve mikroskopta muayene edilir.

# Laktofenol Pamuk Mavisi ile Preparat Hazırlama



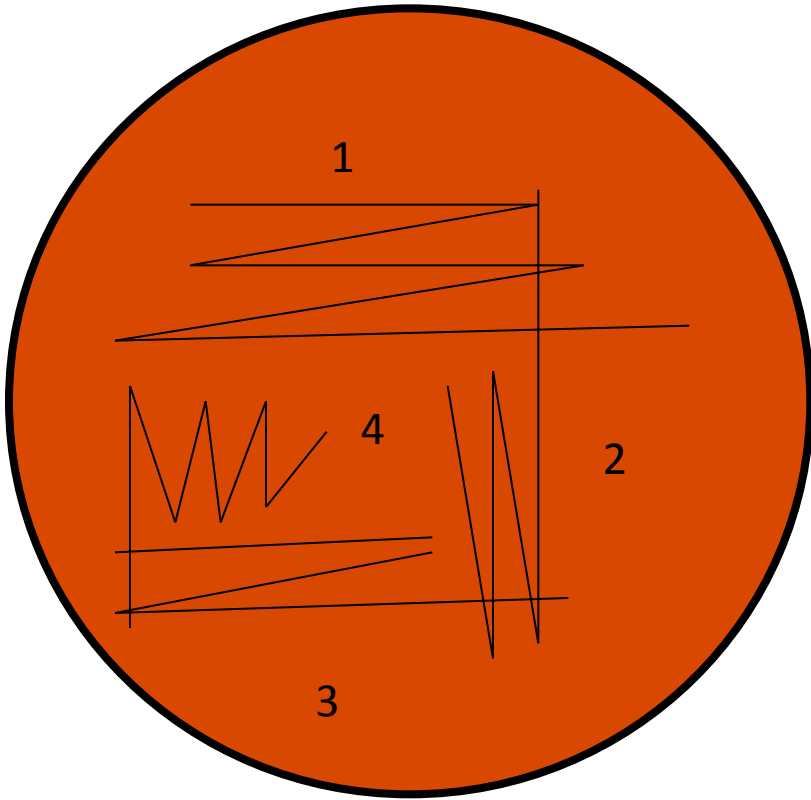
## 5(b)-Mantar İzolasyonu ve Pasajlanması

- Klinik örneklerden patojen mantar izolasyonunda kullanılan besiyerinin daha hızlı üreyen bakteri ve kontaminant mantarlara karşı selektif olması gerekir.
- En çok kullanılan besiyeri: **Sabouraud Dextrose Agar !!!**
- pH' sı 5.6 olup aside tolerans gösteren mantarların üremesini desteklerken bakterileri inhibe eder.
- Bu besiyerine kloramfenikol (antibakteriyal) ve cycloheximide (actidione, antifungal) eklenerek daha da selektif hale getirilebilir.
- Dimorfik mantarlarda %5 koyun kanlı brain-heart infusion agar kullanılır. Bu besiyeri 37°C' de inkube edildiğinde miselyal formdan maya formuna geçiş şekillenir.
- Trichophytonlar için maya ekstraktı (üretme faktörü), kloramfenikol (0.05 g/l) ve sikloheksimid (0.4 g/l) katılır.
- 37°C' de inkubasyon başlı başına bir selektif prosedürdür. Hayvansal dokuları invaze eden patojenler bu sıcaklığı tolere edebilir.

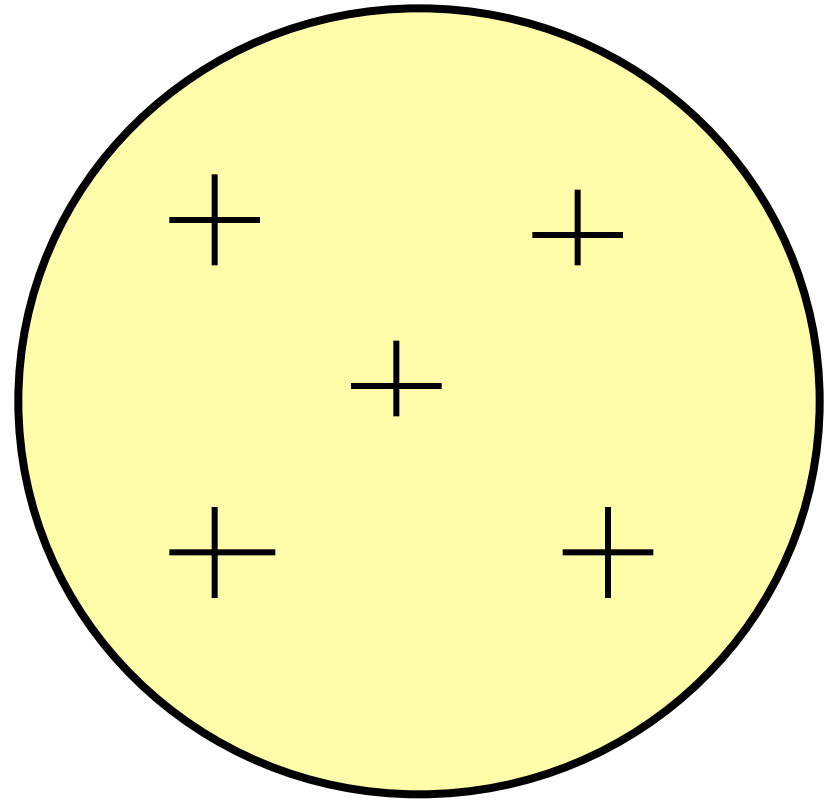


# Besiyerine İnokulasyon

- Mayalar aynı bakterilerde olduğu gibi klinik ya da nekropsi materyalinden hazırlanan inokulum besiyeri yüzeyine öze yardımıyla inokule edilir.
- Mantar izolasyonunda, besiyeri yüzeyinde 5 noktada steril bir bistüri ile artı şeklinde ekim alanları oluşturulur. Daha sonra küçük lezyonlu doku parçaları, deri kazıntı örnekleri veya tüyler bu artı şeklindeki alanlarda agara hafifçe batırılır.
- Eğer örnekler agara direkt batırılırsa uzun süreli inkubasyonlarda agarda yarıma, parçalanma gerçekleşebilir.
- Mayalar aynı bakterilerde olduğu şekilde yeni besiyerine öze ile pasajlanır.



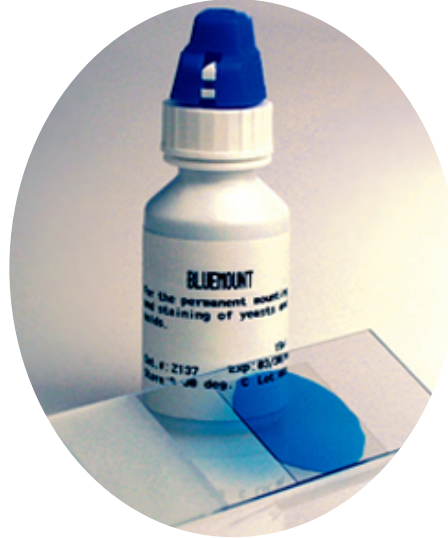
**Maya inokulasyonu**



**Mantar inokulasyonu**

# Mantar Kolonilerinin Mikroskopik Muayenesi

- Dissecting microscope ile inceleme
- LPCB  
(Lactophenol Cotton Blue / Laktofenol Pamuk Mavisi )  
ile lam lamel arası preparat hazırlama  
(wet mount method)  
ile inceleme
- Yapışkan seloteyp yöntemi
- Lam Kültür Tekniği



## Seloteyp Yöntemi



## 5(c)-Mantarların İdentifikasyonu

- Klinik örnekte mantarın direkt mikroskopik görüntüsü
- Koloni morfolojisi ve pigmentasyon tipi
- Mantar kolonilerinde makrokonidia (fruiting heads) ve sporların mikroskopik görüntüsü
- Maya morfolojisi ve tomurcuklanma şekli
- Mayalar ve daha az oran ve sıklıkta mantarlar için için biyokimyasal testler
- *Candida albicans* için germ tube testi gibi etkene spesifik testler
- Spesifik serolojik testler
- Kontaminantların durumu !!!

# Mikolojide Güvenlik Koşulları



- Hayvanlarda hastalığa yol açan mantarların çoğu insanlar için de patojeniktir
- Özellikle patojenik mantar içerdiği düşünülen materyal ve kültürler ele alınırken çok dikkatli olunmalıdır!!!
- Özellikle *Coccidioides immitis* gibi 25 ve 37°C'lerde yüksek oranda infektif arthrosporlar oluşturan ve kolaylıkla aerosolize olabilen patojenlere karşı çok dikkatli olunmalıdır.
- *Cryptococcus neoformans* ve *Blastomyces dermatitidis* gibi dimorfik mantarlar insanlarda çok ciddi hastalığa yol açmaktadır.
- İdeal olan bütün mikolojik muayenelerin biyogüvenlik kabini içerisinde yapılmasıdır.