

TÜBERKÜLOZ TANI: BAKTERİYOLOJİK İNCELEME, LABORATUVAR YÖNTEMLERİ, NAAT, İDT, HİSTOPATOLOJİ

HAZIRLAYAN:DR.ORKUN ERAY TERZİ

MODERATÖR:DOÇ.DR.ASLI GÖREK DİLEKTAŞLI

TANIDA KULLANILAN YÖNTEMLER

☐ Mikroskopi ile Direkt Bakı (Aside alkole rezistan basil (AARB) ile boyama)

- ☐ AARB görülebilmesi için ml'de en az 5000 bakteri gerekmektedir

☐ Nükleik Asit Amplifikasyon ve İlaç Duyarlılık Testleri(İDT)

- ☐ TB tanısı, hızlı ilaç direncinin saptanması, tür tanımlanması
- ☐ Genotiplendirme (moleküler epidemiyoloji)
- ☐ Hızlı sonuç vermesine rağmen moleküler test sonuçları kültür ile doğrulanmalı

TANIDA KULLANILAN YÖNTEMLER

- ❑ **Kültür (Altın Standart)**

- ❑ Kültürün sonuç vermesi 6-8 haftaya kadar uzayabilmektedir

- ❑ **Histopatolojik İnceleme**

TÜBERKÜLOZ TANISI

- ❑ Tüberküloz bir enfeksiyon hastalığıdır ve tanısı bakteriyolojiktir
 - ❑ Klinik örnekten hazırlanan yaymada çeşitli boyama yöntemleri sonrasında mikroskopik inceleme ile basilin görülmesi
 - ❑ Çeşitli sıvı ve katı besiyerlerinde basilin üretilmesi
 - ❑ Ayrıca moleküler yöntemlerle basilin gösterilmesi de tanı açısından yeterli

ÖRNEKLERİN ALINMASI VE TAŞINMASI

☐ Doğru tanı için;

- ☐ Hasta örneği doğru yerden
- ☐ Doğru şekilde örnek alınması
- ☐ Doğru şekilde laboratuvara nakledilmesi

☐ Alınan örneklerin;

- ☐ Anti-TB tedavi başlamadan önce
- ☐ Uygun kalitede
- ☐ Yeterli miktarda ve sayıda
- ☐ Alırken aseptik şartlara uyulmalı
- ☐ Örnek, tek kullanımlık, steril, vida kapaklı sızdırmaz kapaklı kaplara konmalı
- ☐ Kapların içine alkol, formol vb. fiksatif ve koruyucular konmamalı

BALGAM

- ❑ Akciğer tüberkülozu tanısı koymak için en sık kullanılan örnek
- ❑ En uygun balgam örneği sabah aç karnına, derin ve kuvvetli bir öksürükle çıkartılan, kıvamlı en az 3ml(ideali 3-5ml) miktarındaki balgamdır

BALGAM

a. Balgam:

Akciğer tüberkülozu tanısı için en sık kullanılan örnek balgamdır. En uygun balgam örneği sabah aç karnına, derin ve kuvvetli bir öksürükle çıkartılan, kıvamlı, en az 3 ml (ideali 3-5 ml) miktardaki balgamdır. Basıl saptama olasılığını artırmak için ardışık üç gün sabah balgamı alınması (en az iki) en uygundur. Üç gün üst üste sabah ilk balgam örneği şu şekilde alınır:

- İlk balgam örneği; kliniğe başvuru sırasında (anlık),
- İkinci balgam örneği; ikinci gün sabahı uyanınca (evde),
- Üçüncü balgam örneği; üçüncü gün sabahı uyanınca (evde) alınır. Bu mümkün değilse, ikinci balgam örneğini getirdiğinde (anlık) alınır.



BALGAM

- ❑ Hasta 3 sabah üst üste balgam veremiyorsa;
 - ❑ Hastanın ilk gün iki kez birer saatlik arayla balgamı alınır, üçüncü örnek ertesi sabah kalkar kalkmaz ilk çıkan balgamın getirmesi istenir
 - ❑ İlk gün anlık, ikinci sabah balgamı ve ikinci gün balgamı getirildiğinde anlık balgam almak
 - ❑ Hasta her gün gelemiyorsa, iki sabah balgamını buzdolabında bekletip, üçüncü gün sabah balgamı ile birlikte getirilir
- ❑ DSÖ;ardışık günlerde balgam vermek yerine aynı günde alınan iki spot ile sonuçlanan yeni politikasını önermektedir.

Comparison of sputum collection methods for tuberculosis diagnosis: a systematic review and pairwise and network meta-analysis

[Sumona Datta](#), Dr, MD,^{a,b,c,*} [Lena Shah](#), PhD,^d [Robert H Gilman](#), Prof, MD,^e and [Carlton A Evans](#), Prof, MD^{a,b,c}

- ❑ Yayma pozitif vakaların %97'sinde ilk iki örnekte pozitiflik saptanır
- ❑ Aynı gün içinde alınan iki balgamin örneğini yayma pozitifliğini azaltmamaktadır
- ❑ Tükürük ve balgam arasındaki farkın (sözlü veya görsel olarak) açıklanmasının, balgamin nasıl verileceğine dair rehberlik sağlamanın, solunum egzersizleriyle yardımcı olmanın tüberküloz tanısı olasılığını neredeyse iki katına çıkarıldığı gösterilmektedir

Comparison of sputum collection methods for tuberculosis diagnosis: a systematic review and pairwise and network meta-analysis

[Sumona Datta](#), Dr, MD,^{a,b,c,*} [Lena Shah](#), PhD,^d [Robert H Gilman](#), Prof, MD,^e and [Carlton A Evans](#), Prof, MD^{a,b,c}

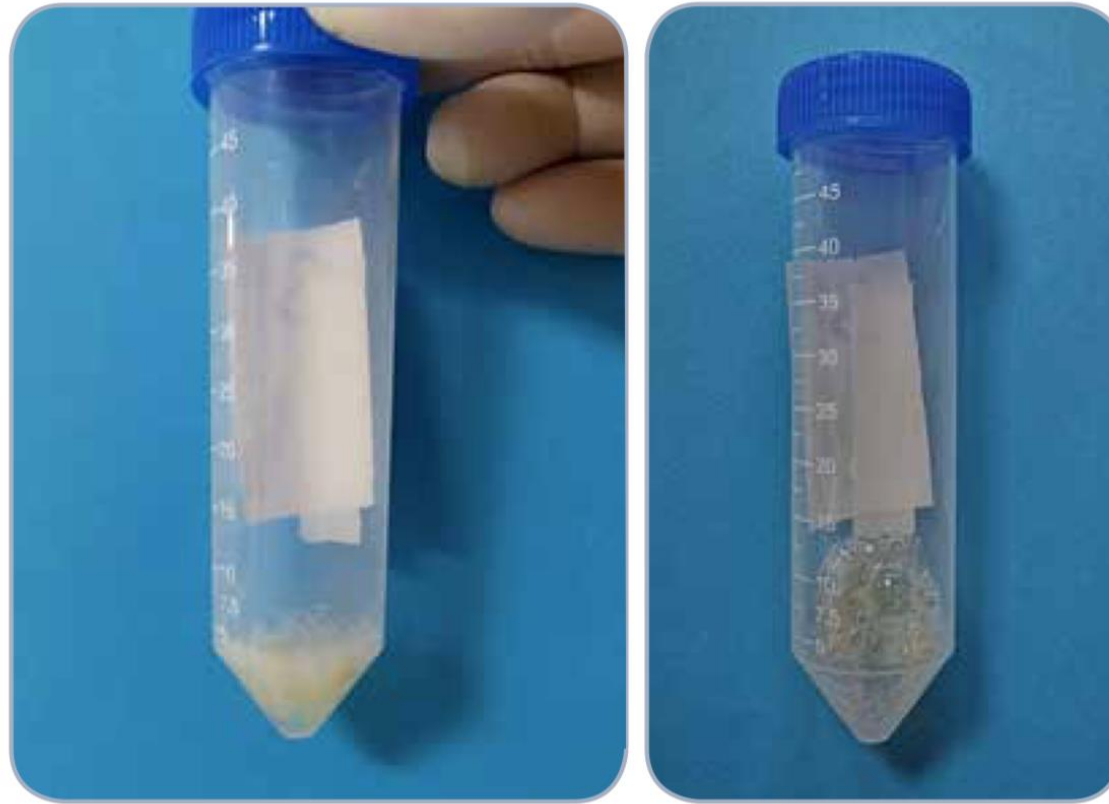
Patients being tested for tuberculosis are often asked to complete early morning sputum collection, consistent with some international recommendations.¹⁰ Early morning sputum collections have been thought to be superior to standard spot sputum collection, perhaps because of the diurnal variation in sputum volume and symptoms in other inflammatory lung diseases, together with the assumption that poor lung clearance while sleeping leads to increased expectoration of sputum upon waking.^{60, 61, 62} However, our analyses show that early morning sputum collection had no significant effect on diagnostic performance, in keeping with previous findings that two spot sputum samples had equivalent diagnostic accuracy to spot plus early morning sputum samples.¹¹ Thus, to improve diagnostic performance, instructed spot or pooled sputum samples can be collected at any time.

BALGAM

- ❑ Uygun materyal olarak kabul edilmeyecekler;
 - ❑ Tükürük örnekleri
 - ❑ Biriktirilen balgam örnekleri
 - ❑ İçinde yiyecek artıkları olan balgam örnekleri
 - ❑ Taşıma süresi 3 günü geçen balgam örnekleri

- ❑ Hasta tekrar tekrar balgam veremiyorsa, uygun olmayan örnekler kabul edilebilir.
 - ❑ Sonuç negatif çıkarsa, durum raporda uygun olmayan örnek şeklinde belirtilmelidir

BALGAM



BALGAM

- ❑ Balgam çıkarma, öksürük yaratan ve çevreye bol basil saçan bir işlemdir
 - ❑ Balgam; balkon veya bahçe gibi açık havada, diğer insanlardan uzak bir yerde, mümkünse bol güneşli bir ortamda verilmeli
 - ❑ Serviste veya labaratuvarda balgam çıkarılmamalıdır
- ❑ Hastaya en uygun balgamı nasıl vereceği açıkça anlatılmalı ve yazılı talimatlar verilmelidir

Balgam nasıl çıkarılır:

- Balgam kabını laboratuvarından alınız.
- Sabah aç karnına önce dişlerinizi fırçalayın veya ağzınızı iyice çalkalayınız.
- Balgam çıkarmakta zorlanıyorsanız bol sıvı alın, kültüf fizik hareketleri yapın (15-20 kez ellerinizi başın üstünde birleştirip derin nefes alın, elleri yanlara indirip derin nefes verin) veya merdiven inip çıkınız.
- Balgamı balkonda ya da açık havada veriniz.
- Balgam kabının kapağını dikkatlice açın, kapağı ya öbür elinizde tutun ya da uygun ve temiz bir yere koyunuz.
- Derin bir nefes alıp bir süre nefesinizi tuttuktan sonra derin ve kuvvetlice öksürük ile balgamınızı doğrudan kabın içine çıkartınız. Tükürmeyiniz. (Tükürük veya burun akıntısı test için uygun değildir)
- Örnek kabının kapağını dikkatli bir şekilde ve sıkıca kapatınız.
- Kabı aynı gün en geç iki saat içerisinde laboratuvara getirin, iki saat içinde getiremeyecekseniz en geç ertesi güne kadar buzdolabında (+4 - +8 °C) saklayınız.

UYARILMIŞ BALGAM

- ❑ Balgam çıkaramayan hastalarda 10 ml %3-10'luk NaCl solüsyonu nebulizatör ile 10-30 dakika verilir
- ❑ Normal balgamdan daha sulu, tükürük görünümünde olabilir
- ❑ Balgam indüksiyon yönteminde nebulizatör uygulamasının ciddi öksürük nöbeti yaratması sebebiyle bulaş riski vardır

AÇLIK MİDE SUYU(AMS)

- ❑ Gece yutulan balgamın alınması için yapılır
- ❑ En az 6 saatlik açlığı takiben(8-10 saat) hasta yataktan kalkmadan nazogastrik sonda 25-50ml steril su veya serum fizyolojik mideye verilir ve aspire edilir
- ❑ 5-15ml açlık mide suyu en geç 1 saatte(mide suyunda basillerin daha hızlı ölmesi sebebiyle) laboratuvara ulaştırılmalıdır
- ❑ Basil saptama olasılığını arttırmak için ardışık 3 sabah örnek alınmalıdır

İDRAR

- ❑ Sabah ilk idrar orta akım alınır
- ❑ İdrar ile basil atılımı aralıklı olduğu için üç ardışık sabah orta akım idrar alınmalıdır
- ❑ En az 10ml (tercihen 40ml) alınmalıdır
- ❑ İdrar alınmadan dış genital bölge yıkanmalıdır
- ❑ 24 saat biriktirilmiş veya kateter torbasından alınan örnekler kabul edilmemelidir

STERİL VÜCUT SIVILARI

- ❑ BOS, plevra, perikard, sinovya, asit sıvısı, kan ve kemik iliği
- ❑ Cerrahi prosedürler veya aseptik aspirasyonla en az 10ml(BOS en az 2ml) alınmalıdır
- ❑ **Kemik iliği veya kan gibi pıhtılaşan sıvıların hasta başından mikobakteri kan kültürü besiyerlerine alınması önerilir**
 - ❑ Alınamıyorsa 0.2mg/ml heparin içeren tüplere alınmalı(Kesinlikle EDTA kullanılmamalı)
- ❑ BOS,kemik iliği, kan örnekleri kesinlikle buzdolabında saklanmamalı ve örnekler en kısa zamanda laboratuvara ulaştırılmalıdır

DOKULAR

- ❑ Periton,plevral ve perikardiyal biyopsi
- ❑ Aseptik koşullarda en az 1gr olacak şekilde, içerisinde fiksatif ve koruyucu madde içermeyen steril kaplara konulmalıdır
- ❑ Örnek miktarı azsa kurumalarını önlemek için 2-3ml steril serum fizyolojik eklenebilir
- ❑ Gazlı bez,pamuk gibi materyallere sarılmamalıdır

APSE VE YARA ÖRNEĞİ

- ❑ Steril serum fizyolojik veya %70'lik alkol ile yüzeyel eksüda uzaklaştırıldıktan sonra aseptik şartlarda, ponksiyon ile alınmalıdır
- ❑ Yeterli örnek içermemesinden dolayı sürüntü örnekleri önerilmemektedir
 - ❑ Başka örnek alınamadığı durumlarda larinks ve yara sürüntü örnekleri kullanılabilir
 - ❑ Sürüntü örnekleri 2-3ml steril serum fizyolojik içinde gönderilmelidir

DIŞKI

- ❑ Klinik yarar açısından tartışmalı
- ❑ İntestinal TB veya **AIDS'li hastalarda M. Avium-intracellulare** kompleksinin izolasyonu için yararlı olabilir
- ❑ 50ml'lik kapaklı polipropilen santrifüj tüpüne en az 1 gr kadar alınarak en kısa sürede laboratuvara götürmelidir

ÖRNEKLERİN SAKLANMASI VE NAKLİ

- ❑ TB basili balgamda bir hafta canlı kalabilmektedir fakat kültürde başarı ile üretme ihtimali zamanla azalır
- ❑ Eğer örnekler laboratuvara iki saat içinde gönderilemeyecekse(kan, kemik iliği ve BOS hariç) 4 derecede bekletilmesi önerilir

ÖRNEKLERİN SAKLANMASI VE NAKLİ

KURUMİÇİ TAŞIMA

- ❑ İkili kap sistemi
 - ❑ Birinci kap; örnek kabı
 - ❑ İkinci kap; kilitli, sızdırmaz, dayanıklı, su geçirmez ve içerisinde örnek kaplarını yerleştirmeye uygun örnek taşıma çantası

KURUM DIŞINA TAŞIMA

- ❑ Örneklerin alınması ile işlenmesi arasında geçen süre yedi günü aşmamalı
- ❑ Klinik örnekler(Kategori B) - Üremiş Kültürler (Kategori A)
- ❑ Üçlü taşıma Kabı
 - ❑ Uygun tüp içerisinde ağızları sıkıca kapatılmış olarak kilitli naylon poşete, naylon poşet ise taşıma kutusunda ayrılmış gözlere

Kategori B taşıma kaplarının özellikleri:

- **Birinci kap;** gönderici ve/veya paketlemeyi yapan tarafından kontrol edilmiş sızdırmaz, tercihen burgu kapaklı ve/veya contalı tipte olmak zorundadır (örnek kabının kendisi).
- **İkinci kap;** dayanıklı, su geçirmez ve sızdırmaz özellikte olmak zorundadır.
 - Birinci veya ikinci kap 95 kPa basınç testinden geçmiş sertifikalı olmalıdır.
- **Üçüncü kap ya da dış kap;**
 - Oluklu mukavva, oluklu plastik, köpük, kalın mukavva veya tahta gibi travma ve basınç etkilerine dayanıklı malzemeden yapılmış olmalı,
 - Kabin alt yüzeyi dışındaki bir yüzeyinde, ilgili evrak ve dokümanların düşmesini, ıslanmasını, kanşmasını ve kaybolmasını engelleyecek şekilde tasarlanmış ve paket ile birlikte taşınmasına yönelik hazırlanmış bir cep veya bölme olmalı
 - Dış kap en az 1,2 m'den düşmeye dayanıklı özellikte olmalı
 - İkinci kap ya da dış kap sert olmalı (fiber, kalın mukavva, köpük vb.)
 - Dış kabin yüzeylerinden en az biri 100x100 mm boyutlarında olmak zorundadır.

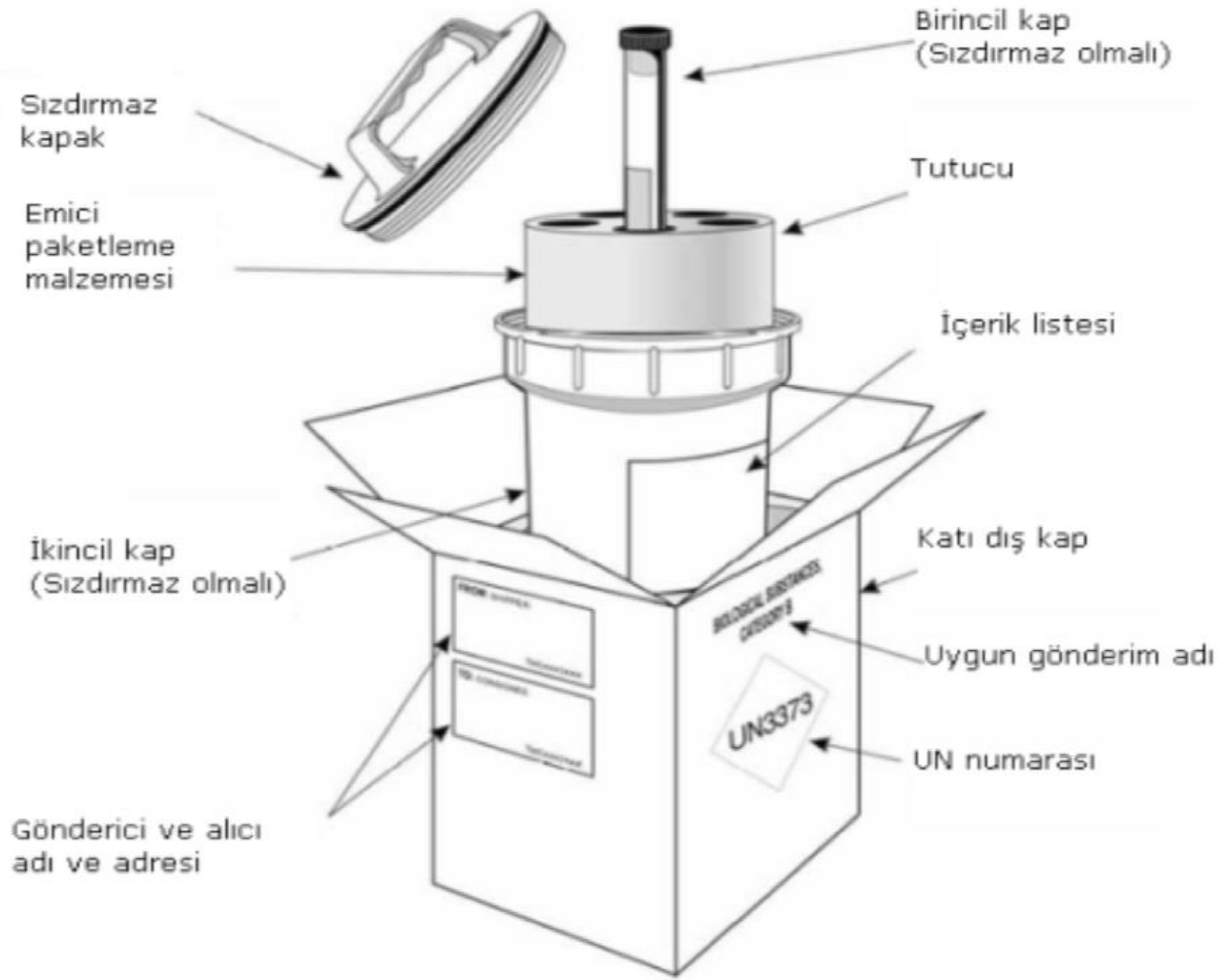
▪ Dış kabin üzerinde;

- Gönderici adı ve adresi
- Alıcı adı ve adresi
- Uygun gönderi adı "Biyolojik madde, Kategori B"
- UN etiketi (UN3373) yer almalıdır.

Klinik örneği paketlenme ve gönderme:

Kategori B örnekler, PT 650 talimatına uygun paketlenmeli, "**biyolojik materyal**" taşıma kurallarına uygun gönderilmelidir. Buna göre;

- Örnek kabının ağzı sıkıca kapatılmalı ve kilitli naylon poşete konulmalıdır.
- Her bir örnek kabı, yeterince absorban madde (gazlı bez, kâğıt havlu, süzgeç kâğıdı vb.) bulunan ikinci kabin içerisine kapağı üst tarafa gelecek şekilde dik olarak konulmalıdır.
- İkinci kabin kapağı kapatılmalı ve dış kabin içerisine konulmalıdır.
- Klinik örneklere ait 'içerik listesi' şeffaf dosya içinde ikinci kap ile dış kap arasına konulmalı ve dış kabin kapağı kapatılmalıdır.
- Toplam miktar 4 litre veya 4 kg'dan (buz aküsü, kuru buz, vb. hariç) fazla olmamalıdır.

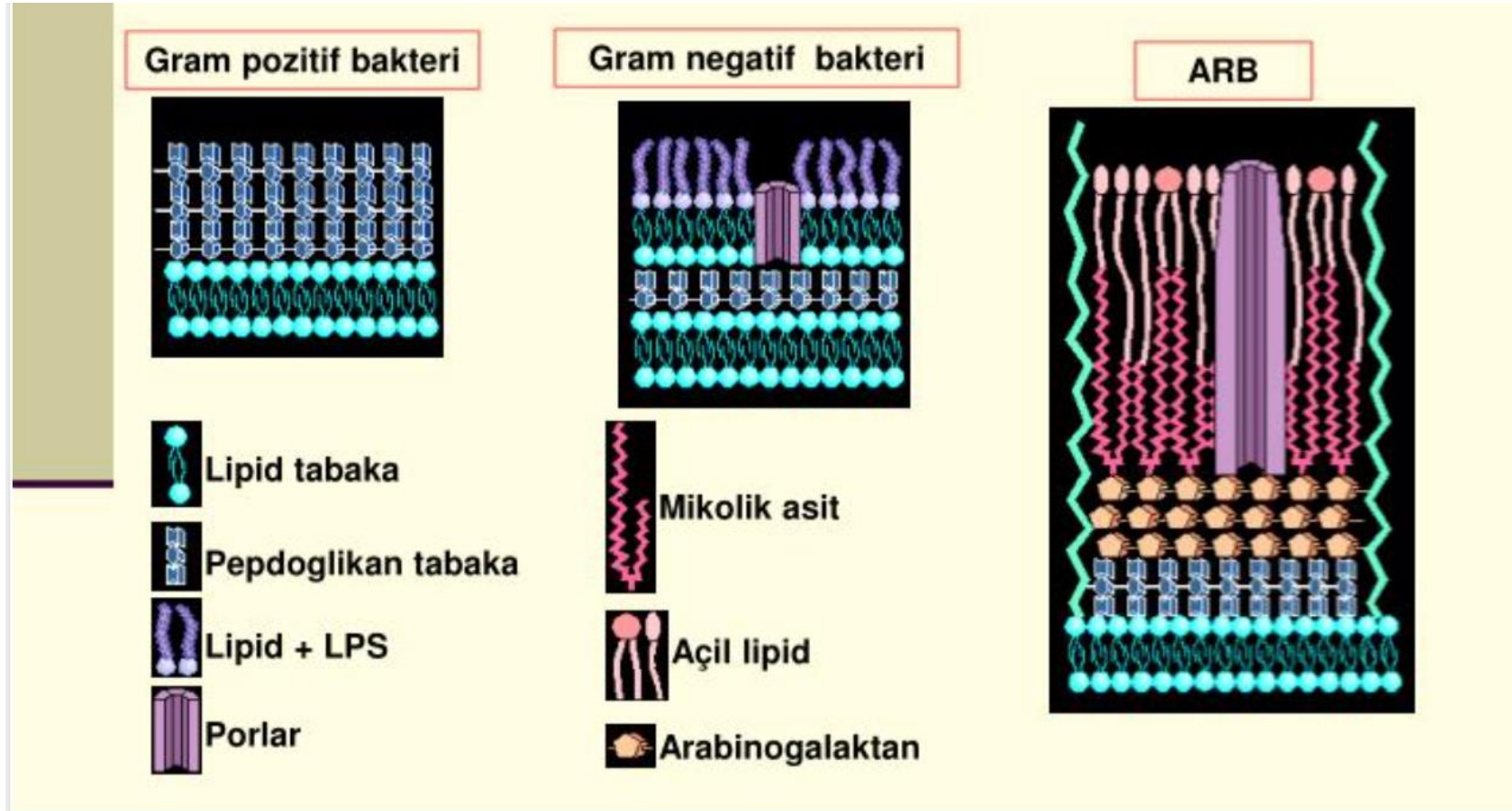




MİKROSKOPİK İNCELEME

- ❑ İlk yapılacak inceleme
- ❑ Mikroskopik inceleme her düzey tanı laboratuvarında uygulanabilen hızlı, basit, ucuz ve kolay bir yöntemdir
- ❑ İncelemenin duyarlılığı ve pozitif prediktif değeri
 - ❑ Hastalığın prevalansı
 - ❑ Örneğin türü ve kalitesi
 - ❑ Örneğin içerdiği bakteri miktarı
 - ❑ Uygulanan teknik
 - ❑ Yaymanın hazırlanması
 - ❑ Boyanma
 - ❑ Değerlendirme işlemlerinin kalitesi ile değişebilir

MİKROSKOPİK İNCELEME



MİKROSKOPİK İNCELEME

❑ Direkt Örnek

❑ İşlenmiş Örnek (Teksif)

❑ Homojenizasyon

❑ Dekontaminasyon

} N-asetil L-sistein sodyum
hidroksit yöntemi+Fosfat
Tamponu

❑ Konsantrasyon (Santrifüj)

↙
Yayma

↘
Kültür

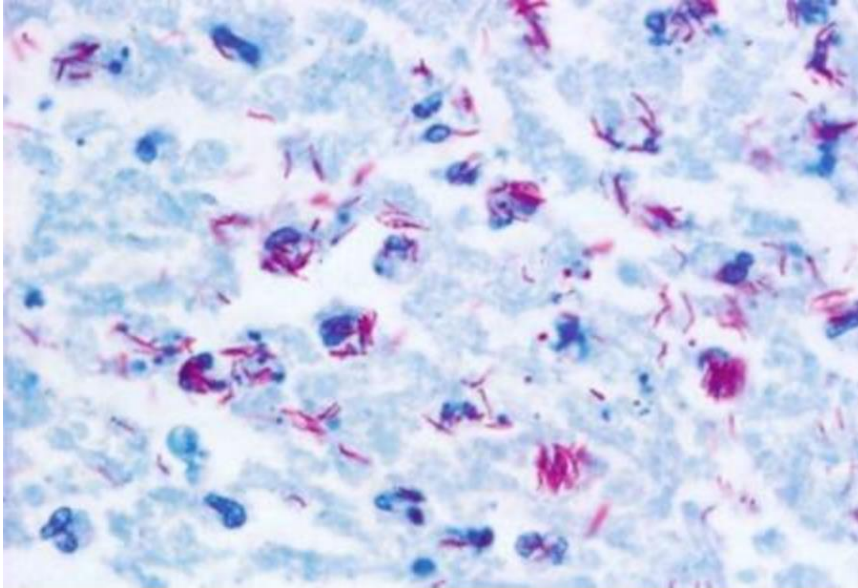
❑ Teksif ile hazırlanmış örnekte aside dirençli bakteri görülme şansı artmaktadır

❑ İşlenmiş örnekten mikroskopi yapılıyorsa direkt mikroskopi yapılmasına gerek yoktur

MİKROSKOPİK İNCELEME

❑ Karbolfuksin Boyama (EZN Boyama)

❑ Daha yoğun kullanılır



❑ Florokrom Boyama

❑ Daha duyarlıdır

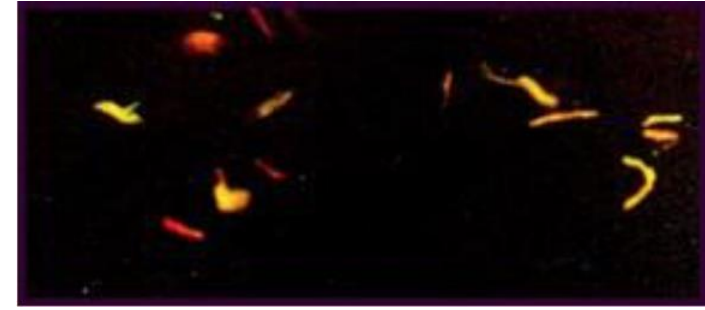
❑ Preparatların daha hızlı taranmasını sağlar



KARBOLFUKSİN BOYAMA(EZN BOYAMA)

- ❑ Bol lipid içeren mikobakteri duvarının karbol-fuksin boyasına aviditesi yüksektir
- ❑ Mikobakteri duvarı alkali özellikleri sebebiyle kırmızı karbol-fuksin boyasını almaktadır.
- ❑ Hücreler bir kere böyle boyandıklarında kuvvetli bir asit-alkol solüsyonu bile hücre duvarının rengini vermesi sağlayamaz
- ❑ Böylece lama zıt boyama(zemini metilen mavisi-EZN Boyama) yapıldığında mikobakteriler düzgün şekilde görülür.

FLOROKROM BOYAMA



- ☐ Auramin-rhodamin bakterinin hücre duvarındaki mikolik asit ile birleşir.
- ☐ Bu birleşme asit alkolle dekolorizasyonla giderilmez
- ☐ Zıt boyama amacıyla potasyum permanganat kullanılır
- ☐ UV ışınli floresan mikroskopta bakılır
- ☐ Mikobakteriler siyah zeminde sarı parlak çubuklar şeklinde görülür

MİKROSKOPİK İNCELEME

- ❑ Kan veya çok kanlı örneklerde mikroskopik inceleme yapılması önerilmemektedir
- ❑ Ürogenital bölgeyi kolonize eden saprofitik mikobakteriler sebebiyle idrar örnekleri rutin olarak mikroskopik incelenmez

MİKROSKOPİK İNCELEME

- ❑ Işık mikroskopunda x1000 büyütmede en az 300 alan
- ❑ Floresan mikroskopunda x250 büyütmede en az 30 alan
- ❑ Floresan mikroskopunda x400 büyütmede en az 70 alan

NEGATİF

❑ Her ARB negatif sonucu hastanın TB olmadığı anlamına gelmediği gibi, her pozitif sonuç da TB anlamına gelmez

MİKROSKOPİK İNCELEME

	Görülen ARB sayısı		
	Karbol fuksin boyama	Florokrom boyama	
	×1000	×250	×400
Negatif	0	0	0
Şüpheli, tekrar	1-2/300 alan	1-2/30 alan	1-2/70 alan
1+	1-9/100 alan	1-9/10 alan	2-18/50 alan
2+	1-9/10 alan	1-9/1 alan	4-36/10 alan
3+	1-9/1 alan	10-90/1 alan	4-36/1 alan
4+	>9/1 alan	>90/1 alan	>36/1 alan

KÜLTÜR

- ❑ Kesin tanı kültür aracılığı ile konur – Altın standart tanı yönetmi
- ❑ Yayması yapılan her materyalin kültüre ekilmesi gereklidir
- ❑ DSÖ, yayması yapılan her materyalin hem katı hem de sıvı besiyerine ekilmesini önermektedir
- ❑ Kültür yöntemi;
 - ❑ Basillerin üremesine
 - ❑ Basillerin tanımlanmasına
 - ❑ İlaç duyarlılık testleri
 - ❑ Epidemiyolojik moleküler çalışmalar

KÜLTÜR

- ❑ Kültürde üreme olabilmesi için örneklerin mililitresinde 10-100 canlı basil olması yeterlidir
 - ❑ Bu durum kültürün yaymaya göre daha yüksek duyarlılığa sahip olmasını sağlar
 - ❑ Kültür sayesinde saptanan olgu sayısı %30-50 artmaktadır

KÜLTÜR

- ❑ %5-10 Co² üremeyi artırır
- ❑ MTBC 2-3 haftalık inkübasyon süresinden sonunda üstü ve kenarları girintili çıkıntılı, kuru,sert kirli beyaz, 1-2mm çaplı pigmentsiz koloniler oluşturur

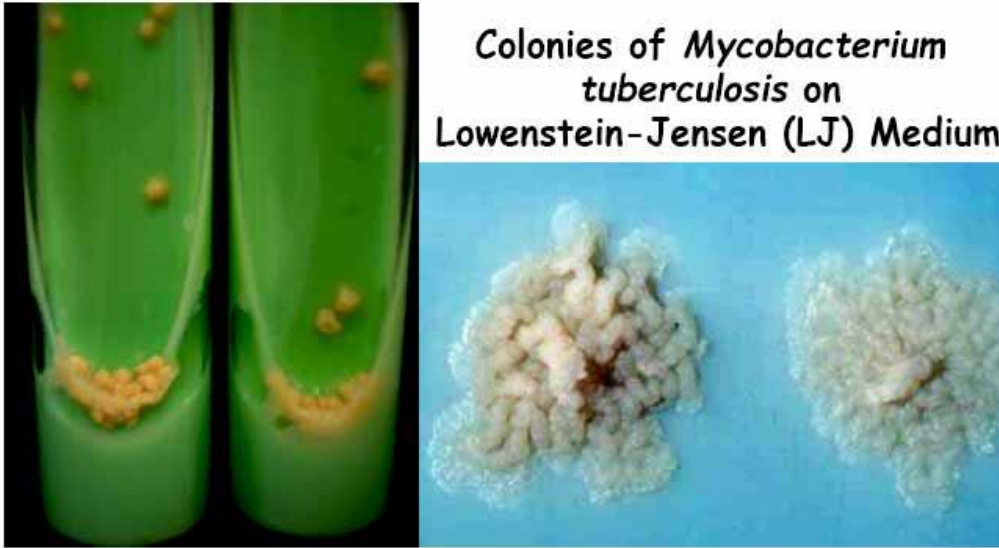
KÜLTÜR

- ❑ MTBC'in bölünme süresi 18-24 saate kadar uzadığından kültürde üreme 6-8 haftaya kadar uzamaktadır
- ❑ MTBC genel besi yerlerinde üretilmez, özgül maddelere ihtiyaç duyulur
- ❑ Diğer mikroorganizmaların üremesini engellemek için çeşitli antibiyotikler eklenir

KÜLTÜR

KATI BESİ YERLERİ	SIVI BESİ YERLERİ
☐ Gliserol ve asparajin içeren yumurta temelli veya agar temelli	☐ Serum ve sığır albümini ile zenginleştirilmiş
☐ Ortalama 6-8 haftada sonuç	☐ Ortalama 1-2 haftada sonuç
☐ Katı ve kontamine besi yerlerinde kolonilerin görülme şansı daha yüksek, tiplendirme için değerlendirme imkanı tanıyor	☐ Aynı tüp içerisinde İDT'ne geçilebilir
☐ Löwenstein-Jensen Besiyeri(Yumurta Bazlı), Middlebrook 7H10-7H11(Agar bazlı)	☐ Bactec 460, MGIT, MBBacT, Middlebrook 7H9, TK Kültür Sistemi(Salubris)

Colonies of *Mycobacterium tuberculosis* on Lowenstein-Jensen (LJ) Medium



Comparison of recoveries of mycobacterium tuberculosis using the automated BACTEC MGIT 960 system, the BACTEC 460 TB system, and Löwenstein-Jensen medium.

	BACTEC MGIT 960	BACTEC 460	Löwenstein- Jensen
TANI YÜZDESİ	96.4	92.7	81.8
TANI SÜRESİ(GÜN)	12.6	13.8	20.1
DIŞLAMA SÜRESİ(GÜN)	15.8	17.7	42.2
KONTAMİNASYON (YÜZDE)	3.7	2.9	1.2

KÜLTÜR

Kültür bulgusu	Rapora yazılacak not
ARB pozitif koloni yoksa	Üreme olmadı
1-19 koloni	1-19 koloni *ARB pozitif basil üredi
20-100 koloni	ARB pozitif basil üredi (1+)
100-200 koloni	ARB pozitif basil üredi (2+)
200-500 koloni	ARB pozitif basil üredi (3+)
500 üstü koloni	ARB pozitif basil üredi (4+)

NÜKLEİK ASİT AMPLİFİKASYON TESTLERİ (NAAT)

- ❑ Klinik örnekten TB tanısı
 - ❑ İlaç direncinin saptanması
 - ❑ Tür tanımlaması
 - ❑ Genotiplendirme (Moleküler epidemiyoloji)
-
- ❑ Çocukluk çağı TB ve akciğer dışı TB tanısında moleküler testlerin tanı değeri mikroskopiden daha yüksektir

NÜKLEİK ASİT AMPLİFİKASYON TESTLERİ(NAAT)

☐ PCR BAZLI YÖNTEMLER

- ☐ Örnek materyal DNA'sı manuel olarak ekstrakte edilir
- ☐ Amplifikasyon(Çoğaltma)
- ☐ Sarmallar denatürasyon ile tek sarmala dönüştürülür
- ☐ Sarmallar M.Tuberculosis için özgül propların bağlı olduğu gözlere ilave edilir
- ☐ Sonuçlar fotometrik olarak okunur

☐ Transcription mediated amplification (TMA)

- ☐ PCR'dan farklı olarak RNA'yı hedef alır
- ☐ Strand displacement amplification (SDA)
- ☐ Ligase chain reaction (LCR)
- ☐ Loop Mediated Isothermal Amplification(LAMP)

NÜKLEİK ASİT AMPLİFİKASYON TESTLERİ (NAAT)

❑ Klinik Örnekten TB Tanısı

- ❑ *Mycobacterium Tuberculosis* kompleks DNA/RNA'sının nükleik asit temelli yöntemlerle gösterilmesidir
- ❑ Gerçek zamanlı PCR yöntemi en sık kullanılan yöntem
- ❑ Testin sonucu en geç üç gün içinde raporlanmalı
- ❑ "*Mycobacterium tuberculosis* kompleks DNA'sı tespit edildi" şeklinde raporlanır
- ❑ Pozitif canlı basili göstermez, kültür ile doğrulanmalıdır

NÜKLEİK ASİT AMPLİFİKASYON TESTLERİ (NAAT)

❑ Klinik Örnekten TB Tanısı

❑ DSÖ tarafından Xpert MTB/RIF testi önerilmektedir

❑ Test başına maliyet yaklaşık 20-30 dolar civarı

XPert® MTB/RIF ASSAY VERSUS AFB AND CULTURE STATUS – SINGLE SPUTUM PER PATIENT

OVERALL SENSITIVITY CULTURE POSITIVE: 92.1%
SENSITIVITY AFB+/CULTURE+: 97.9%
SENSITIVITY AFB-/CULTURE+: 73.1%
SPECIFICITY: 99.0%

		AFB-		AFB+
		Culture POSITIVE	Culture NEGATIVE	Culture POSITIVE
Xpert MTB/RIF	MTB DETECTED	122	6	545
	MTB NOT DETECTED	45	605	12

XPert® MTB/RIF ASSAY VERSUS AFB AND CULTURE STATUS – THREE SPUTUMS PER PATIENT

OVERALL SENSITIVITY CULTURE POSITIVE: 96.2%
SENSITIVITY AFB+/CULTURE+: 97.9%
SENSITIVITY AFB-/CULTURE+: 90.0%
SPECIFICITY: 99.5%

		AFB-		AFB+
		Culture POSITIVE	Culture NEGATIVE	Culture POSITIVE
Xpert MTB/RIF	MTB DETECTED	153	3	605
	MTB NOT DETECTED	17	560	13

NÜKLEİK ASİT AMPLİFİKASYON TESTLERİ (NAAT)

1

Pour Sample Reagent into sample tube.
Incubate for 15 minutes at room
temperature. (Acceptable sample types:
unprocessed sputum or sediment from
concentrated specimen.)



2

Pipette diluted sample into cartridge.

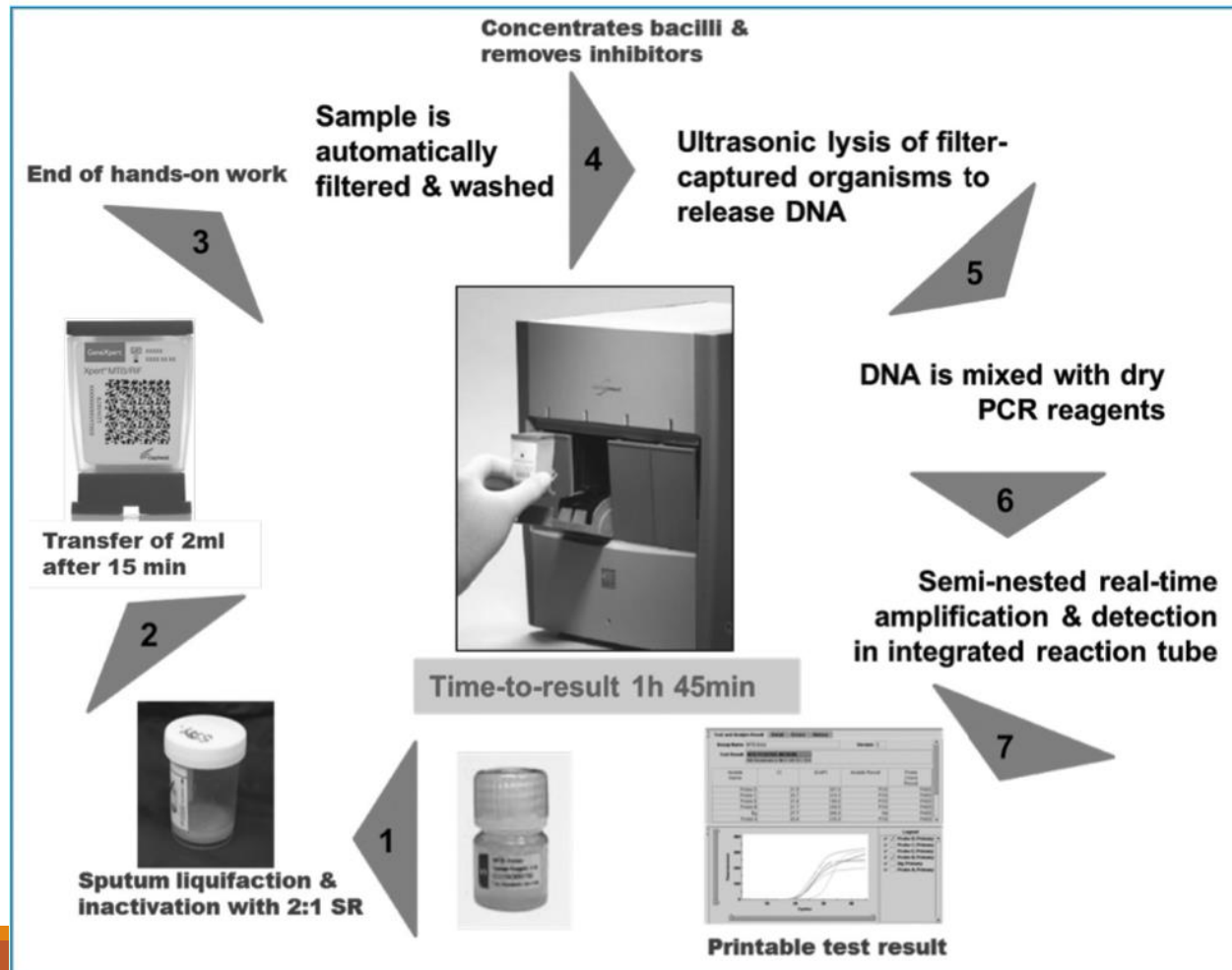


3

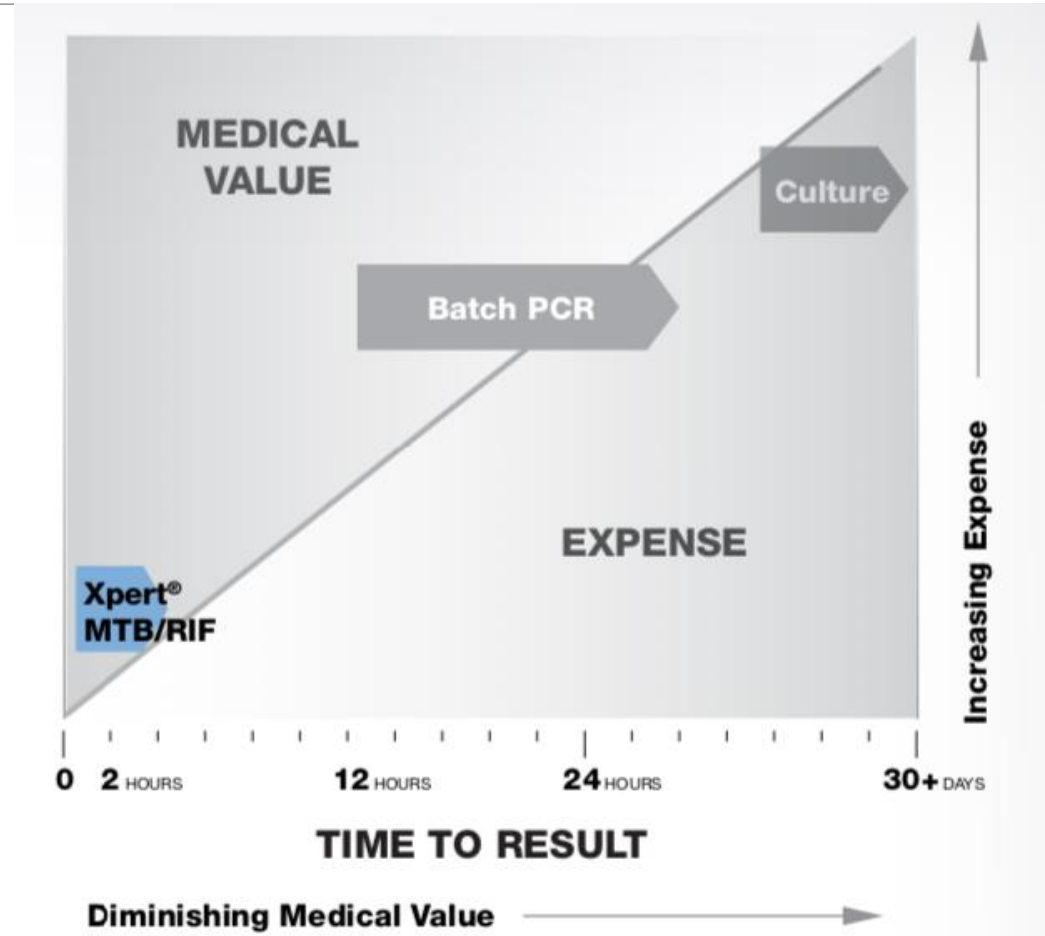
Insert Cartridge and start assay.



NÜKLEİK ASİT AMPLİFİKASYON TESTLERİ (NAAT)



NÜKLEİK ASİT AMPLİFİKASYON TESTLERİ (NAAT)



NÜKLEİK ASİT AMPLİFİKASYON TESTLERİ (NAAT)



Xpert® MTB/RIF Ultra

Raising the Standard for Tuberculosis Diagnosis

[➔ Ordering Info](#)

See more products in
[Critical Infectious Diseases](#)

Related Products

[Xpert Flu/RSV XC,](#)
[Xpert Flu,](#)
[Xpert EV,](#)
[Xpert Ebola,](#)

NÜKLEİK ASİT AMPLİFİKASYON TESTLERİ (NAAT)

- ❑ Aynı örnekte yayma pozitif, NAAT negatif > TB dışı aside dirençli etken
- ❑ TB şüpheli hastada yayma negatif iken NAAT pozitif > TB hastalığını düşündürür
- ❑ NAAT negatif olması TB tanısını dışlamaz
- ❑ Tedavi görmüş hastada, ölü basillerin NAAT pozitifliği gösterebilmesi nedeniyle aktif hastalık anlamına gelmez
 - ❑ NAAT, TB tedavisinin takibinde bakteriyolojik tetkik olarak kullanılmaz

NÜKLEİK ASİT AMPLİFİKASYON TESTLERİ (NAAT)

❑ Tür Tanımlanması

- ❑ Üremiş kültürden, mikobakteri türlerinin nükleik asit temelli yöntemlerle tanımlanmasıdır
- ❑ TDM (Tüberküloz dışı mikobakteri) tür tayini yapılması; enfeksiyon için klinik, laboratuvar ve bakteriyolojik tanı kriteri varlığında
- ❑ MTBC tür tayini yapılması; BCG ile ilişkili enfeksiyon şüphesinde (mesane tm sebebiyle tedavi alan, 2 yaş altı çocuklar, İDT sonucunda tek başına pirazinamid direnci saptanması) kullanılır

NÜKLEİK ASİT AMPLİFİKASYON TESTLERİ (NAAT)

❑ İlaç Direncinin Saptanması

- ❑ Klinik örnekte veya kültürde üremiş MTBC için ilaç direnci ilgili gen mutasyonlarının nükleik asit temelli yöntemlerle saptanmasıdır
- ❑ Günümüzde klinik örnekten tanı ile eş zamanlı en az RIF direncini de saptayan yöntemler yaygın kullanılmaktadır
- ❑ Moleküler yöntemler fenotipik testlerin yerini almamalı sadece belli durumlarda hızlı sonuç vermektedir

NÜKLEİK ASİT AMPLİFİKASYON TESTLERİ (NAAT)

- ❑ DSÖ tarafından Xpert MTB/RIF testi önerilmektedir
- ❑ RIF-dirençli *M. tuberculosis* suşlarının %95'inde *rpoB* geninin 81-bp'lik bölgesinde mutasyon bulunmaktadır

rpoB GENE 81 bp RIF RESISTANCE DETERMINING REGION

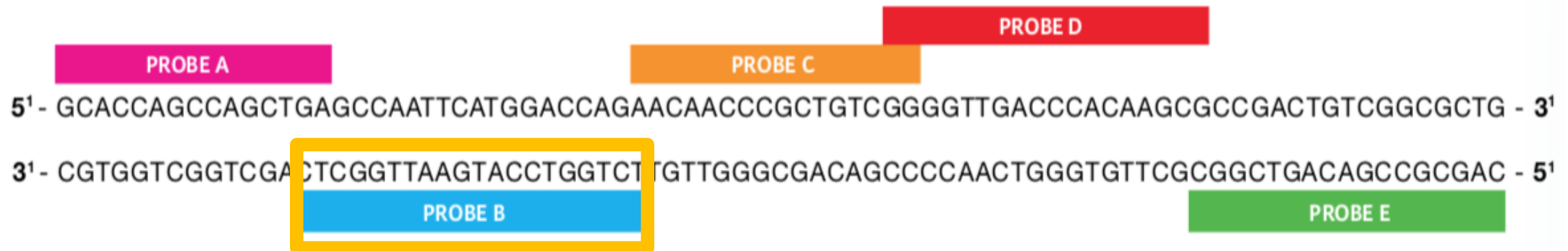
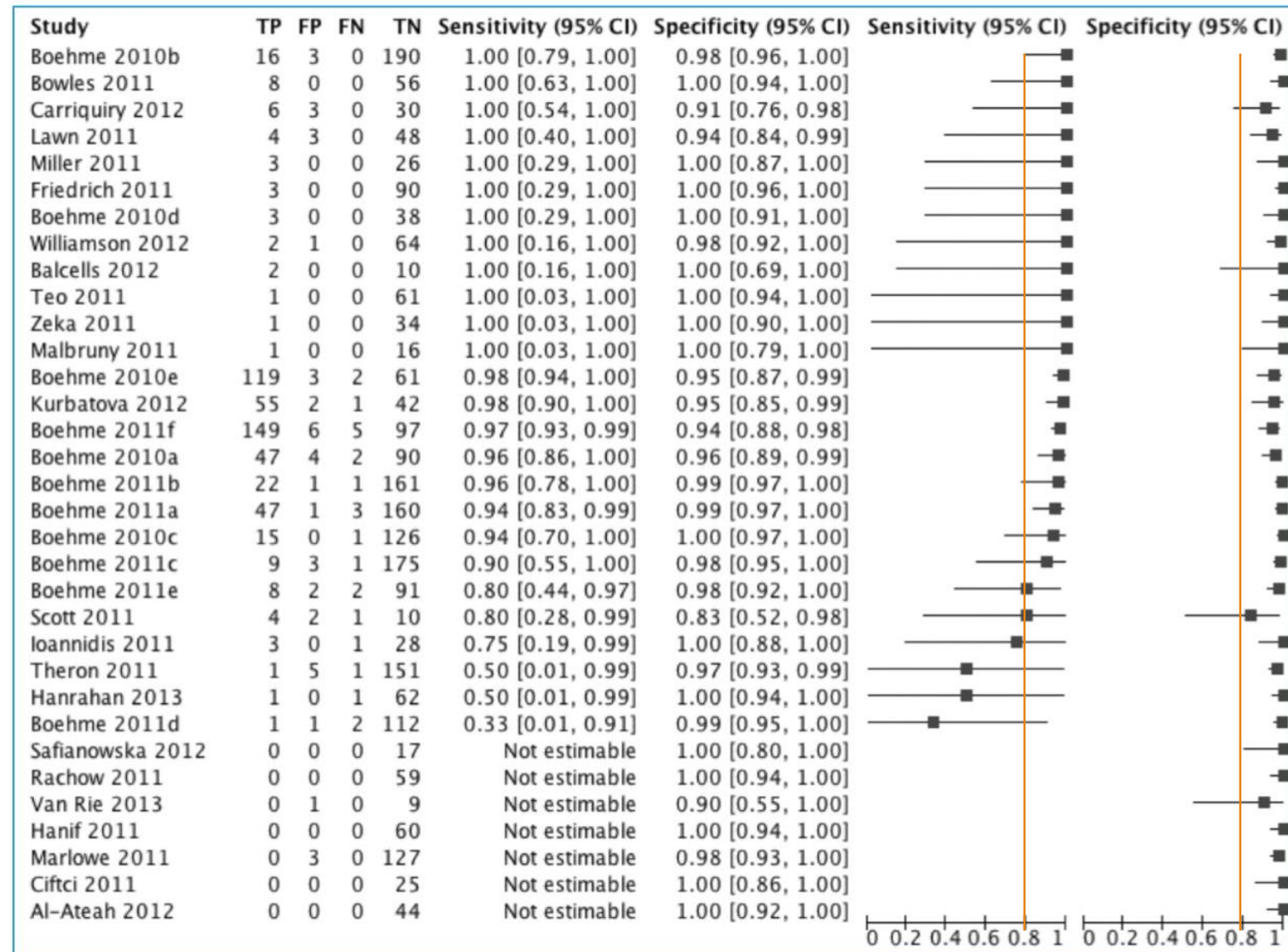


Figure 6. Forest plots of the sensitivity and specificity of Xpert MTB/RIF for detecting rifampicin resistance when Xpert MTB/RIF was used as an initial test replacing phenotypic culture-based drug-susceptibility testing in 24 studies (33 study centres)^a



TP, true positive; FP, false positive; FN, false negative; TN, true negative; CI, confidence interval.

NÜKLEİK ASİT AMPLİFİKASYON TESTLERİ (NAAT)

- ❑ Xpert MTB/RIF > Rifampisin Direnci
- ❑ Xpert MTB/RIF Ultra > Rifampisin Direnci
- ❑ Investigational Xpert Assay > Kinolon, Aminoglikozid, İzoniazid Direnci
- ❑ MTBDRplus > Rifampisin, İzoniazid Direnci (FDA onaylı değil)
- ❑ MTBDRs > Kinolon, İkinci Sınıf TBC ilaçları Direnci (FDA onaylı değil)

NÜKLEİK ASİT AMPLİFİKASYON TESTLERİ(NANT)

❑ Moleküler direnç testlerinin yapılması önerilen durumlar

- Yüksek direnç oranı olan ülke veya yerden gelmiş hasta
- ÇİD-TB teması olan hasta
- Tedaviye yanıt vermeyen hasta
 - Tedavinin üçüncü ayında hala yayma pozitif hasta
 - Tedaviye klinik yanıtı olmayan hasta
- Daha önceye ait tedavi öyküsü olan hasta
- Önceden tedavi görmüş olan aktif hasta ile temas öyküsü olan hasta

❑ Sonuçlar “ RIF direnci ile ilişkili mutasyon saptandı/saptanamadı” şeklinde raporlanır

❑ Moleküler yöntemlerle saptanan mutasyonlar her zaman direnci gösteremeyebileceği gibi, mutasyon saptanmaması da bakterinin her zaman duyarlı olduğu anlamına gelmez.

❑ Moleküler yöntemlerle saptanan sonuçlar fenotipik ilaç duyarlılık testleriyle doğrulanmalıdır.

NÜKLEİK ASİT AMPLİFİKASYON TESTLERİ(NANT)

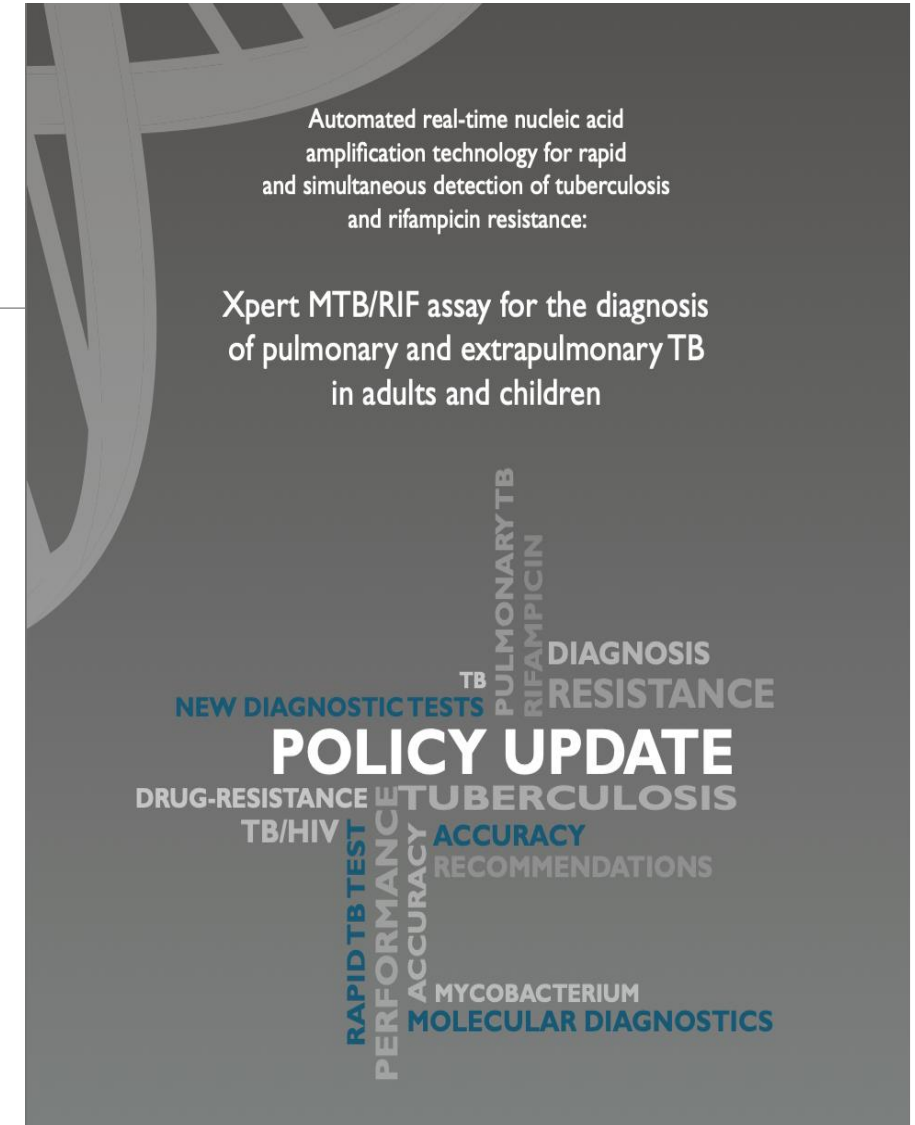
❑ Genotiplendirme

❑ MTBC izolatları arasındaki klonal ilişkinin nükleik asit temelli yöntemlerle tanımlanmasıdır

❑ Gerekli durumlarda TB kontrol programı kapsamında yetkili laboratuvarlarca yapılmaktadır

- TB Kontrol Programı'na bilgi sağlanması;
 - TB kontrol programının etkinliğinin değerlendirilmesi,
 - Tüberkülozun ulusal ve bölgesel epidemiyolojisinin anlaşılması,
 - Toplumda dolaşan MTBC suşlarının karakterizasyonun belirlenmesi,
 - Yeni bulaş için risk gruplarının belirlenmesi,
 - Yerel, ulusal ya da uluslararası şüpheli TB bulaşının doğrulanması.
- Reenfeksiyon-reaktivasyon ayrımı
- Laboratuvar çapraz kontaminasyonlarının tespit edilmesi.

- 2010'dan beri akciğer, akciğer dışı ve pediatrik TB tanısında Xpert MTB/RIF ile ilgili 85 çalışma yapılmıştır ve çalışmalar hala süremektedir
- 2010 yılından beri Xpert MTB/RIF hakkında bu kadar çalışma yapılması DSÖ''nünde bu konu hakkında bir çalışma ve rehber hazırlamasını zorunlu kılmıştır



9558 vakanın değerlendirildiği bir çalışmada

	SENSİTİVİTE	SPESİFİTİVE
Mikroskopi yerine ilk tanısal test olarak kullanıldığında	%88	%99
Negatif mikroskopiye ek test olarak kullanıldığında	%68	%99
Mikroskopi ve kültür pozitif olgularda kullanıldığında	%98	
Mikroskopi negatif kültür pozitif olgularda kullanıldığında	%68	
HIV'li bireylerde	%79	
HIV'li olmayan bireylerde	%86	
Rifampisin direncini belirlemede	%95	%98

TÜR AYRIMI

- ❑ Kültürde  reme olduğunda ilk yapılması gereken üremenin ARB pozitif basil olduğunun kanıtlanmasıdır
 - ❑ ARB negatif üremeler kontamine kültür olarak tanımlanmaktadır
- ❑ MTBC tanımlanması tedavi kararının etkilediğinden ilk hedef MTBC ve TDM ayrımı yapılmasıdır
- ❑ Gerekli durumlarda TDM ve MTBC'lerin tür tanımlanması da yapılmalıdır

TÜR AYRIMI

- ❑ MTBC ile TDM ayırımında hızlı immünokromatografik yöntemler kullanılır
 - ❑ MTBC'ye özgü MPB64 antijenini saptamaya yönelik işlemler
 - ❑ İzolatların üreme hızı, pigment, kord faktör ve biyokimyasal testler kesin tanı için yeterli değildir
- ❑ MTBC veya TDM içinde tür tayini için ise daha çok moleküler yöntemle(IS6110-RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)-HSP 65-PCR) kullanılır
 - ❑ Ters hibridizasyon testleri(Line Probe Assay(LPA))
- ❑ Tür düzeyinde tanımlama yapılmadığı sürece MTBC 'Mycobacterium tuberculosis kompleks', TDM 'TB dışı mikobakteri olarak' rapor edilir

İLAÇ DUYARLILIK TESTLERİ(İDT)

- ❑ Etkin tedavinin erken başlamasını sağlayarak ilaç direncini yayılmasını azaltır
- ❑ Hastalığın süresini kısaltır
- ❑ Kür oranını artırır
- ❑ Maliyeti azaltır

İLAÇ DUYARLILIK TESTLERİ(İDT)

- ❑ MTBC genlerindeki mutasyon hızı diğer bakterilere göre 10 kat daha fazladır
 - ❑ Bu durum özellikle eksik veya başarısız tedavide ilaç direncini daha hızlı gelişmesini sağlamaktadır
- ❑ Etkin tedavi alan hastada direnç gelişme olasılığı çok azdır
- ❑ Başta bir yada birkaç ilaca direnç varsa tedavi sırasında duyarlı olduğu ilaçlara direnç geliştirme olasılığı artar

İLAÇ DUYARLILIK TESTLERİ(İDT)

FENOTİPİK

- ☐ Geç üreme olmasına rağmen ucuz bir yöntem
- ☐ Löwenstein-Jensen sık olarak kullanılmaktadır

GENOTİPİK

- ☐ PCR

İLAÇ DUYARLILIK TESTLERİ(İDT)

- ☐ Besi yerinde üretilmiş mikobakteriler sıvı içerisinde süspansiyon haline getirilir
- ☐ 100 ve 10000 kez seyreltilir
- ☐ Seyreltilen çözelti ilaç içeren ve içermeyen besi yerlerine ekilir
- ☐ İnkübasyon sonrası koloni sayıları karşılaştırılır
- ☐ İlaçlı besiyerinde ilaçsızaya göre; izoniazid, rifampisin ve etambütol için %1'den fazla, streptomisin için ise %10'dan fazla koloni görülürse bakteri o ilaca dirençli kabul edilir

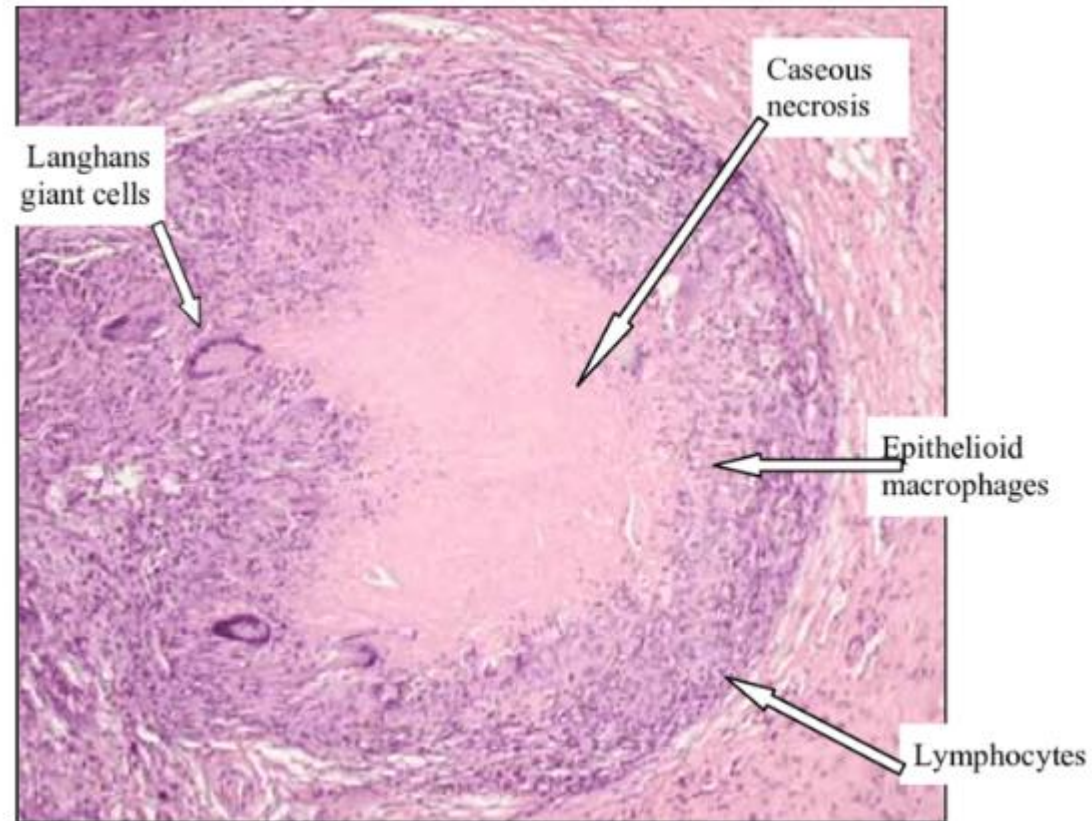
İLAÇ DUYARLILIK TESTLERİ(İDT)

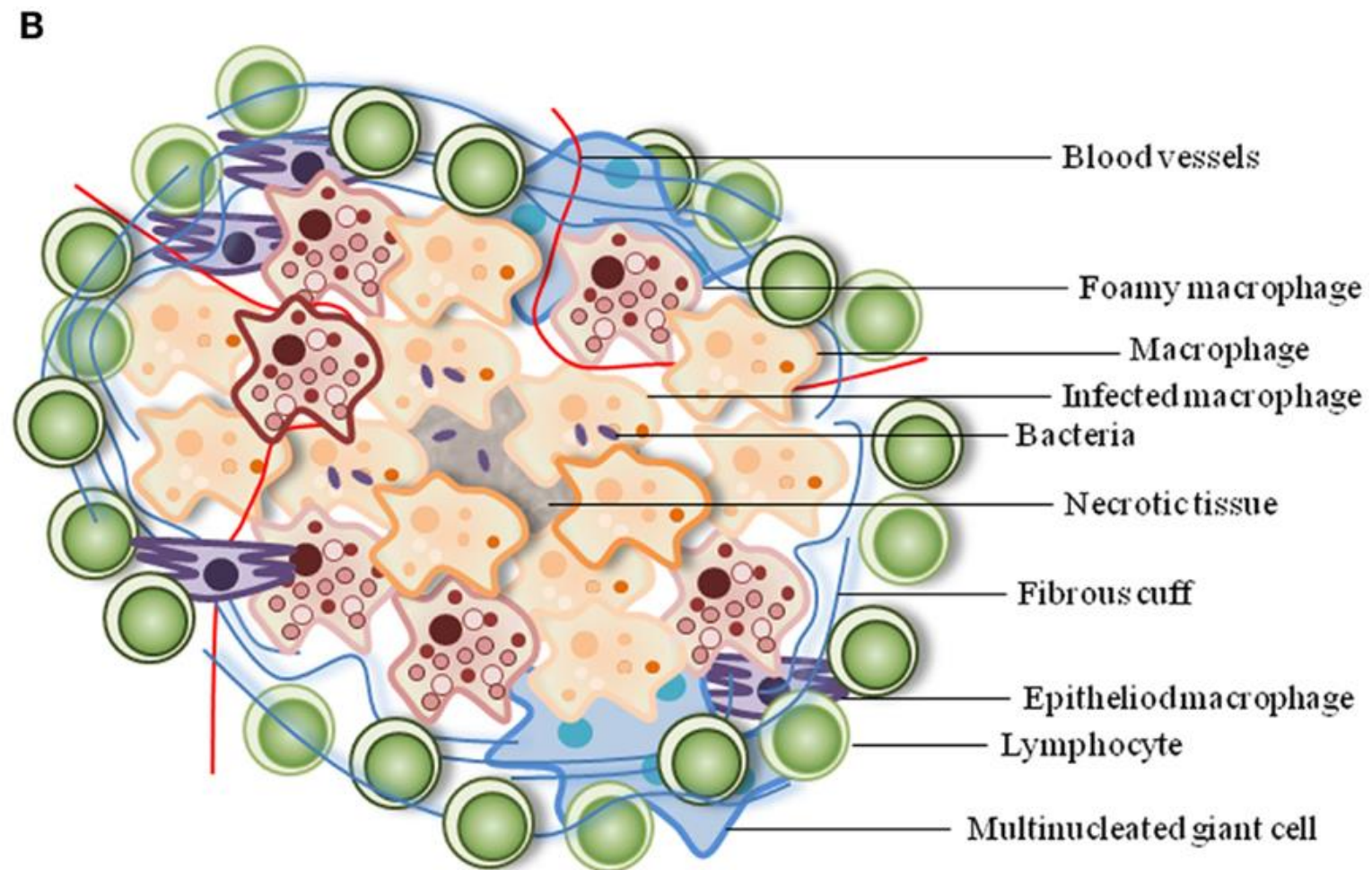
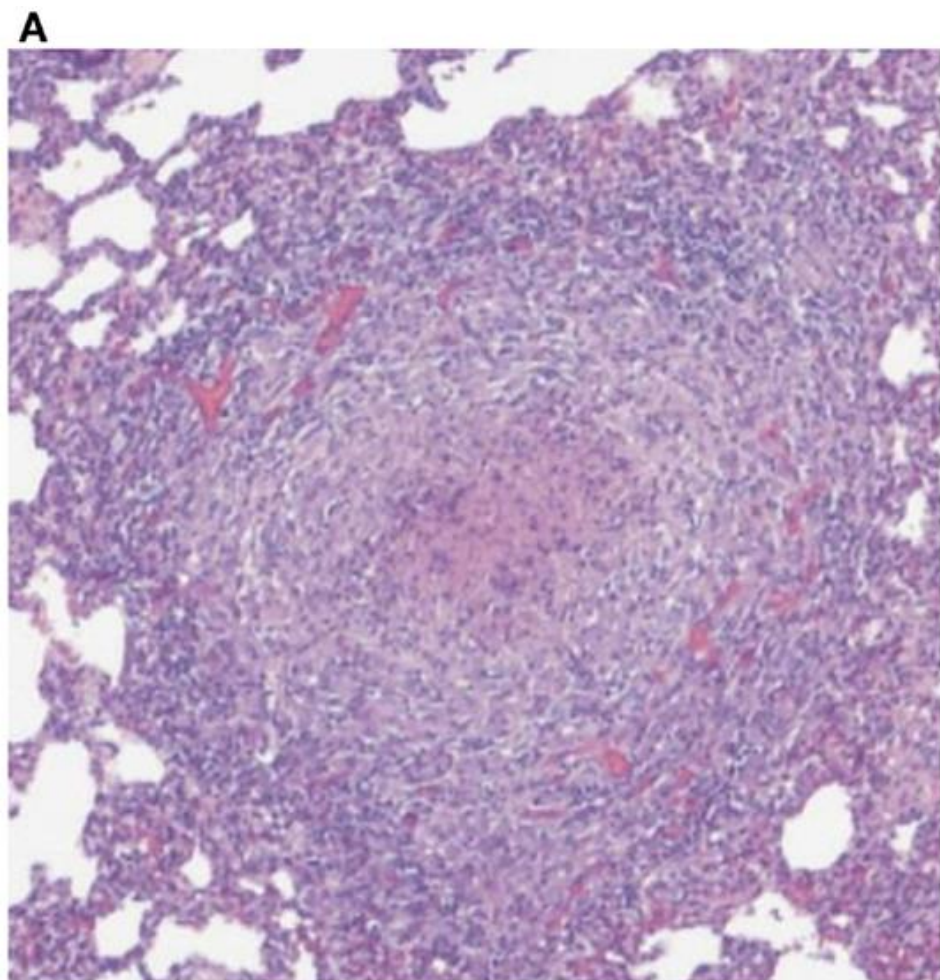
- ❑ Daha hızlı sonuç alınması sebebiyle hızlı kültür sistemleri kullanılmaktadır
- ❑ BACTEC MGIT(Becton Dickinson)
 - ❑ Middlebrook sıvı besi yerleri kullanılır fakat kullanıma hazır değildir
 - ❑ Uygulama öncesi liyofilize besi yeri ve test edilecek ilaçlar tüpe katılır
 - ❑ Kontaminasyon riski yüksek

HİSTOPATOLOJİ

- ❑ Nekrotizan Granülomatöz İnflamasyon
 - ❑ Makroskopik incelemede küçük parçacıklara ayrılıp kırıntılanan özelliği > Kazeöz Nekroz
 - ❑ Mikroskopik olarak; merkezde yer alan nekrozu çevreleyen epiteloid histiyositler ve Langerhans tipi histiyositik dev hücrelerden oluşan granülom yapılarının çevrelerinde lenfositik yanıt
- ❑ Nekroz varlığı şart değildir
- ❑ Kazeifikasyon nekrozu bir makroskopik tanımdır, mikroskopik incelemede karşılığı nekroz olup, tanıda patognomonik değildir

HISTOPATOLOJİ

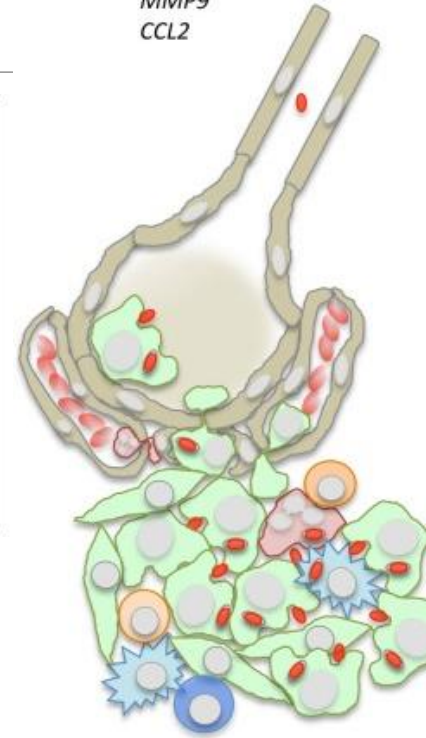




Primary Tuberculosis

Inflammatory infiltrate
Mtb Replication
Mtb Dissemination
Mtb Growth Control

MMP9
CCL2



Secondary Tuberculosis

Protective Granuloma
Mtb Growth Control
Mtb Elimination
Fibrotic Transformation
Calcification

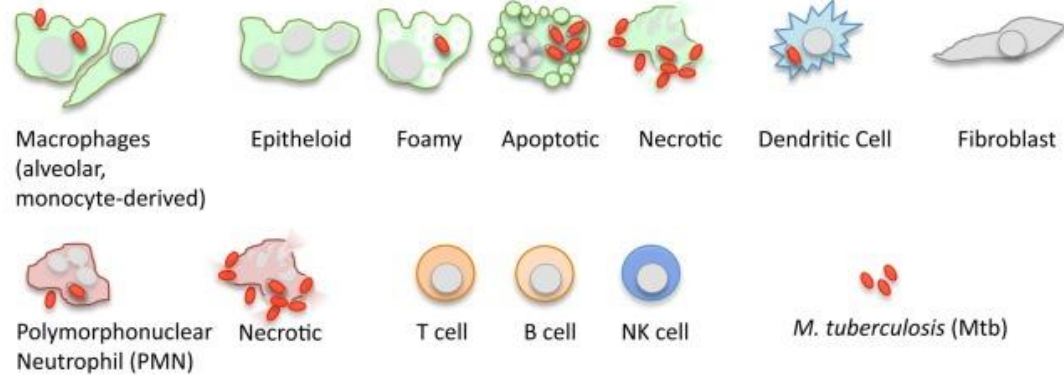
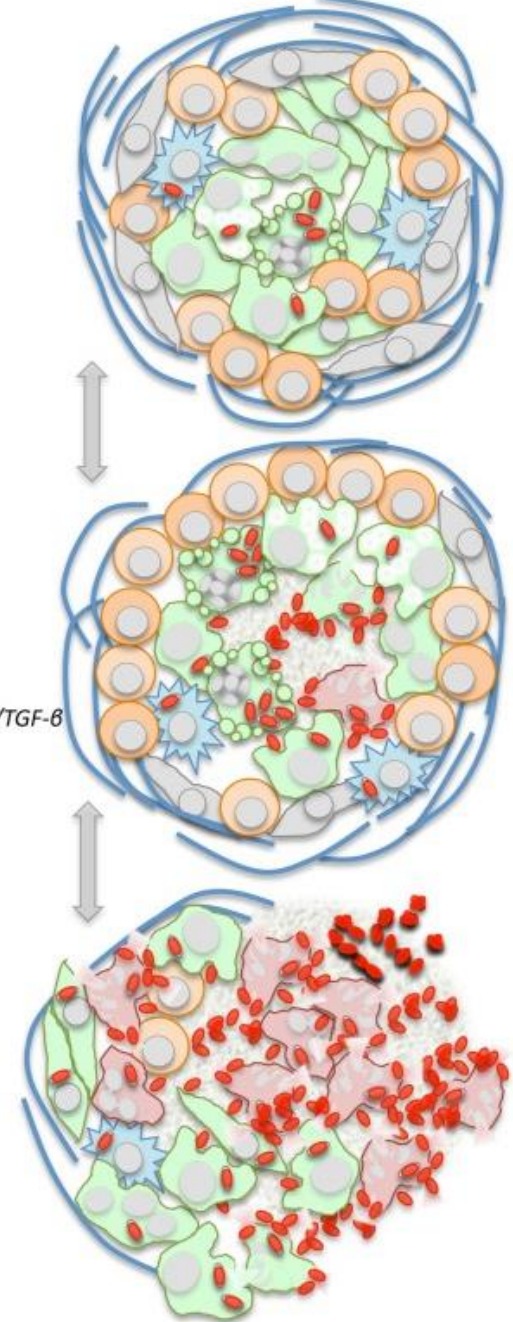
IFN-γ, *TNF-α*, *Granulysin*

Homeostatic Granuloma
Immune Balance
Latency
Mtb Sequestration
Mtb Dormancy
Mtb Metabolic adaption

T_{reg} cells
IFN-γ/TNF-α vs. *IL-4/IL-10/TGF-β*

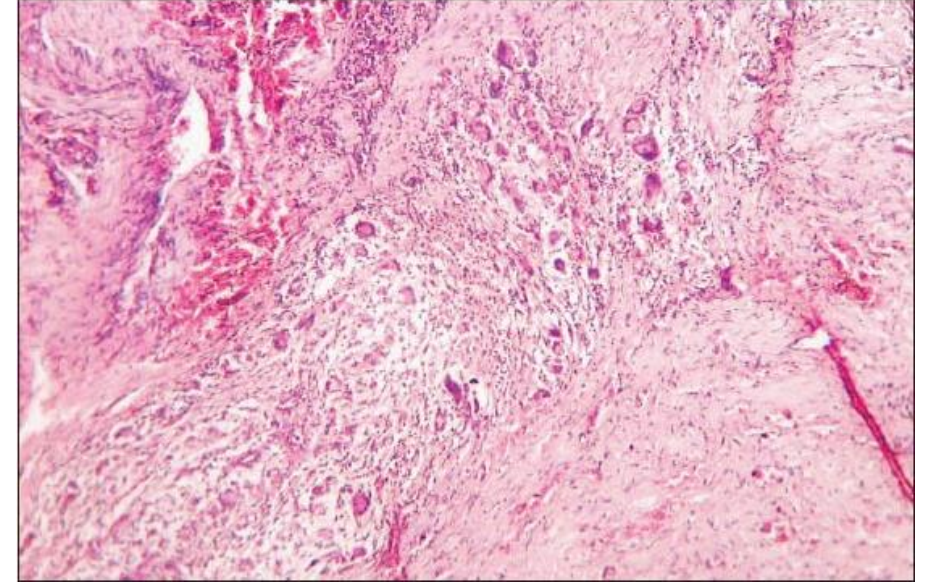
Transmissive Granuloma
Immunopathology
Neutrophil Dominance
Mtb Recrudescence
Mtb Growth

Immuno suppression
TH1/TH2 dysbalance
Superinfection
Hyperimmunity



HİSTOPATOLOJİ

- ❑ TB'yi destekleyen patolojik bulgular;
 - ❑ Granülomatöz reaksiyonun nekrotizan olması
 - ❑ Granülom yapılarında Langerhans tipinde dev hücrelerin varlığı



KAYNAKLAR

- ❑ Tüberküloz Tanı ve Tedavi Rehberi-2019
- ❑ Göğüs Hastalıklarındaki Son Gelişmeler
- ❑ Klinisyenler İçin Tüberküloz Kılavuzu
- ❑ https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112472/9789241506335_eng.pdf;jsessionid=0C00EC5EBF64BACC1298ECA205BD82C3?sequence=1
- ❑ <https://www.cepheid.com/uk/cepheid-solutions/clinical-ivd-tests/critical-infectious-diseases/xpert-mtb-rif-ultra>
- ❑ <https://www.uptodate.com/contents/diagnosis-of-pulmonary-tuberculosis-in-adults>