



Bu Proje Avrupa Birliği ve Türkiye Cumhuriyeti
tarafından finanse edilmektedir

Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi
(TR0802.16)

Ulusal Mikrobiyoloji Standartları **BULAŞICI HASTALIKLAR LABORATUVAR TANI REHBERİ**

CİLT III

T.C. Sağlık Bakanlığı
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ankara – 2014





Bu Proje Avrupa Birliği ve Türkiye Cumhuriyeti tarafından finanse edilmektedir

Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi
(TR0802.16)

Ulusal Mikrobiyoloji Standartları

BULAŞICI HASTALIKLAR

LABORATUVAR TANI REHBERİ

Sendromik Tanı Yaklaşımı, Örnek Yönetimi, Test Prosedürleri ve Mikrobiyolojik Tanı/Tanımlama

CİLT III

T.C. Sağlık Bakanlığı
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ankara – 2014



© T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
“Ulusal Mikrobiyoloji Standartları: Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi”

Bu doküman; Avrupa Birliği tarafından finanse edilen, Dünya Sağlık Örgütü tarafından yürütülen “Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi (TR0802.16)” kapsamında bastırılmıştır. Sözleşme makamı, Merkezi Finans ve İhaleler Birimi’dir. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, bu Projenin yararlanıcısı olup dokümanın hazırlanmasına liderlik etmiştir ve dokümanın tüm hakları T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu’na aittir. Kaynak gösterilmeksizin alıntı yapılamaz. Kısmen dahi olsa çoğaltılamaz ve yayımlanamaz. Alıntı yapıldığında kaynak gösterimi “Ulusal Mikrobiyoloji Standartları: Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 934, Ankara, 2014” şeklinde olmalıdır. Ücretsizdir. Parayla satılamaz. Dokümanın içeriği hiçbir şekilde Avrupa Birliği’nin görüşlerini yansıtmamaktadır.

ISBN: 978-975-590-489-4

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 934

Yayın tarihi: 15.04.2014

Baskı sayısı: 1000

Basım yeri: Ankara

Basım yılı: 2014

Baskı: Aydoğdu Ofset Matbaacılık Ambalaj San ve Tic Ltd Şti

Kapak fotoğrafı: Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Difteri-Boğmaca Referans Laboratuvarı

Arşivi’nden alınmıştır.



Ulusal Mikrobiyoloji Standartları

BULAŞICI HASTALIKLAR

LABORATUVAR TANI REHBERİ

Sendromik Tanı Yaklaşımı, Örnek Yönetimi, Test Prosedürleri ve Mikrobiyolojik Tanı/Tanımlama

CİLT III

T.C. Sağlık Bakanlığı
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ankara – 2014

EDİTÖR

EFSUN AKBAŞ
Dünya Sağlık Örgütü, Ulusal Danışman, Aydın

YARDIMCI EDİTÖRLER

HAKAN ABACIOĞLU
Dünya Sağlık Örgütü, Ulusal Proje Danışmanı,
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, İzmir

SELİN NAR ÖTGÜN
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları
Daire Başkanlığı, Ankara

ÖNEMLİ NOT

Bu Rehber

(Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi)
Tanı Standartları Çalışma Grupları tarafından hazırlanmış ve ön düzeltmeleri yapılarak yayına hazırlanmış bir

TASLAK

dokümandır.

Eş zamanlı olarak THSK web sitesinde (bkz. www.thsk.org.tr) de kullanıma sunulmuştur. Bu yayınlar yoluyla Rehber ilgili Uzmanlık derneklerinin, Meslek örgütlerinin ve sahadaki kullanıcıların görüşlerine de açılmış bulunmaktadır. Alınacak geri bildirimlere göre son şeklinin verilmesi ve 2014 yılı sonu itibarıyla onaylanmış "Ulusal Mikrobiyoloji Standartları" belgesi olarak yayınlanması hedeflenmektedir.

Rehber 3 yılda bir güncellenecektir.

YAZARLAR*

ALİ KUDRET ADILOĞLU

Ankara Eğitim Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Ankara

EFSUN AKBAŞ

Dünya Sağlık Örgütü, Proje Danışmanı, Aydın

NURHAN ALBAYRAK

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

AYŞE BAŞAK ALTAŞ

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

GÜLAY ARAL AKARŞU

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Bilim Dalı, Ankara

ERDİNÇ ATABEK

Etilik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Ankara

ŞÖHRET AYDEMİR

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, İzmir

ALPAY AZAP

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Ankara

ÖZLEM AZAP

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Ankara

NİHAL BABALIOĞLU

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Erken Uyarı-Cevap ve Saha Epidemiyolojisi Daire Başkanlığı, Ankara

CAHİT BABÜR

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

EMRAH BAŞKAYA

Halk Sağlığı Laboratuvarı, İstanbul

MEHMET BAYSALLAR

Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Ankara

HÜRREM BODUR

Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara

GÜLENDAM BOZDAYI

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Ankara

BEKİR ÇELEBİ

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

GÜLDEN ÇELİK

Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, İstanbul

NEVRESTE ÇELİKBİLEK

Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Ankara

YASEMİN COŞKUN

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

CANDAN ÇİÇEK

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, İzmir

NİLAY ÇÖPLÜ

Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Ankara

GÜLNAZ ÇULHA

Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji AD, Hatay

DERYA DİRİM ERDOĞAN

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji AD, İzmir

FUNDA DOĞRUMAN AL

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Ankara

MERT DÖŞKAYA

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji AD, İzmir

RIZA DURMAZ

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

RAİKA DURUSOY ONMUŞ

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı AD, İzmir

MESTAN EMEK

Halk Sağlığı Laboratuvarı, Antalya

GÜL BAHAR ERDEM

Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Ankara

HAKAN ERDEM

GATA Haydarpaşa Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul

AYNUR EREN TOPKAYA
Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Tekirdağ

SELDA ERENŞOY
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, İzmir

ÖNDER ERGÖNÜL
Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD, İstanbul

UFUK ERGÜN
Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nöroloji Kliniği, Ankara

ARİFE ERTÜRK
Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Ankara

BERRİN ESEN
Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Ankara

ALİ GÖKTEPE
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Erken Uyarı-Cevap ve Saha Epidemiyolojisi Daire Başkanlığı, Ankara

AYŞEGÜL GÖZALAN
Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Ankara

ZEYNEP GÜLAY
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, İzmir

DİLEK GÜLDEMİR
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

REVAŞİYE GÜLEŞEN
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

DENİZ GÜR
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Ankara

GÜL GÜRSEL
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları AD, Ankara

GÜLŞEN HAŞÇELİK
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Ankara

UFUK HASDEMİR
Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, İstanbul

TONAY İNCEBOZ
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji AD, İzmir

NİLGÜN KARABIÇAK
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

ÜLKÜ KARAMAN
Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji AD, Ordu

SELMA KARAAHMETOĞLU
Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İç Hastalıkları Kliniği, Ankara

ONUR KARATUNA
Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, İstanbul

ABDULLAH KILIÇ
Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Ankara

SELÇUK KILIÇ
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

ÖZGÜR KORU
Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Ankara

GÜLAY KORUKLUOĞLU
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

ALİ KÖSEKAHYA
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Bulaşıcı Hastalıklar Daire Başkanlığı

ÖZGÜR KURT
Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, İstanbul

BELKIS LEVENT
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

DİLEK MENEMENLİOĞLU
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

KENAN MİDİLLİ
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, İstanbul

ÖZLEM MİMAN
İzmir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji AD, İzmir

SELİN NAR ÖTGÜN
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans
Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

MEHMET ALİ ÖKTEM
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji
AD, İzmir

CÜNEYT ÖZAKIN
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD,
Bursa

BANU SANCAK
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji
AD, Ankara

ARZU SAYINER
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji
AD, İzmir

NEVGÜN SEPİN ÖZEN
Halk Sağlığı Laboratuvarı, Antalya

CEMİLE SÖNMEZ
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans
Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

SERAP SÜZÜK
Kırıkkale Yüksek İhtisas Hastanesi, Mikrobiyoloji
Laboratuvarı, Kırıkkale

HÜSNİYE ŞİMŞEK
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans
Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

MEHMET TANYÜKSEL
Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD,
Ankara

ANIL TAPISIZ
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve
Hastalıkları AD, Ankara

AYŞEGÜL TAYLAN ÖZKAN
Hitit Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Çorum

MERAL TURAN
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans
Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

NİLDEN TUYGUN
Dr Sami Ulus Kadın Doğum, Çocuk Sağlığı ve
Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Acil,
Ankara

NİLAY UÇARMAN
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans
Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

SELMA USLUCA
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans
Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

YAVUZ UYAR
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi
Mikrobiyoloji AD, İstanbul

NURVER ÜLGER
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji
AD, İstanbul

ZEHRA ÜNAL
Halk Sağlığı Laboratuvarı, İzmir

NİL ÜNAL
Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü
Müdürlüğü, Ankara

CANDAN ÜSTÜN
Bayındır Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara

DİLEK YAĞCI ÇAĞLAYIK
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans
Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

TÜLAY YALÇINKAYA
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans
Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

FÜGEN YARKIN
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji
AD, Adana

MİHRİBAN YÜCEL
Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi
Mikrobiyoloji, Ankara

PINAR ZARAKOLU KÖŞKER
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon
Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Ankara

AYŞİN ZEYTİNOĞLU
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD,
İzmir

(*) Soyadına göre alfabetik dizin

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI ÇEKİRDEK GRUBU*

NURHAN ALBAYRAK
Tüberküloz, MRLDB, Türkiye Halk
Sağlığı Kurumu, Ankara

AYŞE BAŞAK ALTAŞ
Viral Solunum Yolu Patojenleri,
MRLDB, Türkiye Halk Sağlığı
Kurumu, Ankara

DİLEK YAĞCI ÇAĞLAYIK
Akut Sendromik Yaklaşım,
MRLDB, Türkiye Halk Sağlığı
Kurumu, Ankara

REVASİYE GÜLEŞEN
Bakteriyel Enterik Patojenler,
MRLDB, Türkiye Halk Sağlığı
Kurumu, Ankara

NİLGÜN KARABIÇAK
Test Prosedürleri, MRLDB, Türkiye
Halk Sağlığı Kurumu, Ankara

SELÇUK KILIÇ
Bakteriyel Zoonotik
Enfeksiyonlar, MRLDB, Türkiye
Halk Sağlığı Kurumu, Ankara

GÜLAY KORUKLUOĞLU
Viral Enterik patojenler ve
Döküntülü Hastalıklar,
MRLDB, Türkiye Halk Sağlığı
Kurumu, Ankara

BELKIS LEVENT
Bakteriyel Enterik Patojenler,
MRLDB, Türkiye Halk Sağlığı
Kurumu, Ankara

DİLEK MENEMENLİOĞLU
Viral Hemorajik Ateşler,
MRLDB, Türkiye Halk Sağlığı
Kurumu, Ankara

AYŞEGÜL TAYLAN ÖZKAN
Parazitoloji, Hitit Üniversitesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji AD,
Çorum

SELİN NAR ÖTGÜN
Bakteriyel Solunum Yolu
Patojenleri, MRLDB, Türkiye
Halk Sağlığı Kurumu, Ankara

CEMİLE SÖNMEZ
Bakteriyel Cinsel Yolla Bulaşan
Enfeksiyonlar, MRLDB, Türkiye
Halk Sağlığı Kurumu, Ankara

MERAL TURAN
Bakteriyel Solunum Yolu
Patojenleri, MRLDB, Türkiye Halk
Sağlığı Kurumu, Ankara

HÜSNİYE ŞİMŞEK
Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri,
MRLDB, Türkiye Halk Sağlığı
Kurumu, Ankara

NİLAY UÇARMAN
Tüberküloz, MRLDB, Türkiye Halk
Sağlığı Kurumu, Ankara

SELMA USLUCA
Parazitoloji, MRLDB, Türkiye Halk
Sağlığı Kurumu, Ankara

TÜLAY YALÇINKAYA
Viral Cinsel Yolla Bulaşan
Enfeksiyonlar, MRLDB, Türkiye
Halk Sağlığı Kurumu, Ankara

(*) Soyadına göre alfabetik dizin

PROJE DANIŞMANLARI

VARALAKSHMI ELANGO
Dünya Sağlık Örgütü, Uluslararası Proje Danışmanı

HAKAN ABACIOĞLU
Dünya Sağlık Örgütü, Ulusal Proje Danışmanı

EFSUN AKBAŞ
Dünya Sağlık Örgütü, Ulusal Danışman

TÜRKİYE HALK SAĞLIĞI KURUMU YAYIN KOMİSYONU

HASAN IRMAK
Tüketici ve Çalışan Güvenliği Başkan Yardımcısı

MUSTAFA BAHADIR SUCAKLI
Erken Uyarı-Cevap ve Saha Epidemiyolojisi Daire Başkanı

NAZAN YARDIM
Obezite, Diyabet ve Metabolik Hastalıklar Daire Başkanı

KANUNİ KEKLİK
Toplum Sağlığı Hizmetleri Daire Başkanı

TEŞEKKÜR

T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu bu Rehberin hazırlanmasında görev alan ve emeği geçen herkese teşekkür eder.

İçindekiler

CİLT I

Kısaltmalar

Önsöz

Giriş

BAKTERİYOLOJİ

CİLT II

ENFEKSİYÖZ MADDE TAŞIMA REHBERİ

TEST PROSEDÜRLERİ

ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIK TESTLERİ (UAMDS)

CİLT III

PARAZİTOLOJİ

VİROLOJİ

SENDROMİK TANI YAKLAŞIMI

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

CİLT I

BAKTERİYOLOJİ

Mikrobiyolojik tanı/tanımlama

Solunum yolu patojenleri

- B-MT-01 Boğmaca
- B-MT-02 Difteri
- B-MT-03 *Neisseria meningitidis* enfeksiyonları
- B-MT-04 *Haemophilus influenzae* invaziv enfeksiyonları
- B-MT-05 *Streptococcus pneumoniae* invaziv enfeksiyonları
- B-MT-06 Lejyoner hastalığı

Enterik patojenler

- B-MT-08 *Salmonella* enfeksiyonları
- B-MT-09 *Shigella* enfeksiyonları
- B-MT-10 *Campylobacter* enfeksiyonları
- B-MT-11 EHEC enfeksiyonları
- B-MT-12 Kolera
- B-MT-13 Yersiniyoz
- B-MT-14 Listeriyoz
- B-MT-15 Botulismus

Cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar (CYBE)

- B-MT-16 *Chlamydia trachomatis* enfeksiyonları
- B-MT-17 Gonore
- B-MT-18 Sifiliz

Zoonozlar

- B-MT-19 Bruselloz
- B-MT-20 Şarbon
- B-MT-21 Tularemi
- B-MT-22 Q ateşi
- B-MT-23 Leptospiroz
- B-MT-24 Lyme hastalığı
- B-MT-25 Epidemik tifüs
- B-MT-26 Veba

CİLT II

ENFEKSİYÖZ MADDE TAŞIMA REHBERİ

GEN-ÖY-01 Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

TEST PROSEDÜRLERİ

B-TP-01	Suş saklama prosedürü	B-TP-13	Lizin - Ornitin - Arjinin dekarboksilaz/ dihidrolaz testleri
B-TP-02	Bile-eskülin hidrolizi	B-TP-14	Metilen mavisi (Loeffler's) boyama
B-TP-03	Gram boyama	B-TP-15	Nitrat / Nitrit redüksiyonu testleri
B-TP-04	Hareket testi	B-TP-16	Oksidaz testi
B-TP-05	Hippurat hidrolizi	B-TP-17	ONPG testi
B-TP-06	IMVIC testleri	B-TP-18	Optokin duyarlılığı
B-TP-07	İndoksil asetat testi	B-TP-19	PYR testi
B-TP-08	Karanlık alan mikroskopisi	B-TP-20	Safrada erime testi
B-TP-09	Karbonhidrat fermentasyon/oksidasyonu	B-TP-21	Tuz tolerans testi (%6.5 NaCl'de üreme)
B-TP-10	Katalaz testi	B-TP-22	Üreaz testi
B-TP-11	KIA/TSI testleri	B-TP-23	X, V ve XV faktör gereksinimi
B-TP-12	Koagülaz testi		

ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIK TESTLERİ (UAMDS)

AMD-TB-01	AMD testi hangi durumlarda yapılmalı, örnek yönetimi ve kavramlar
AMD-TB-02	Kullanılan standartlar ve farkları (CLSI, EUCAST)
AMD-TB-03	Antibiyoqram yorumlama kriterleri ve kısıtlı bildirim kuralları

Mikrobiyolojik tanı/tanımlama

AMD-MT-01	<i>Staphylococcus aureus</i> ve AMD testleri
AMD-MT-02	<i>Enterococcus faecalis/faecium</i> ve AMD testleri
AMD-MT-03	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ve AMD testleri
AMD-MT-04	<i>Escherichia coli</i> ve <i>Klebsiella pneumoniae</i> ve AMD testleri
AMD-MT-05	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ve AMD testleri
AMD-MT-06	<i>Acinetobacter baumannii</i> ve AMD testleri

Test Prosedürleri

AMD-TP-01	AMD testlerinde kullanılan besiyerlerinin hazırlanması
AMD-TP-02	McFarland opasite standardı hazırlanması
AMD-TP-03	Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi
AMD-TP-04	MIK saptama yöntemleri

CİLT III

PARAZİTOLOJİ

Örnek yönetimi

- P-ÖY-01 Dışkı örneklerinin parazitolojik incelemesi
P-ÖY-02 Diğer intestinal örneklerin parazitolojik incelemesi
P-ÖY-03 Kan ve kemik iliği örneklerinin parazitolojik incelemesi

Mikrobiyolojik tanı/tanımlama

- P-MT-01 Amibiyaz (*Entamoeba histolytica* enfeksiyonları)
P-MT-02 *Giardia intestinalis*
P-MT-03 *Cryptosporidium* türleri
P-MT-04 Kala azar
P-MT-05 Şark çıbanı
P-MT-06 Sıtma
P-MT-07 Ekinokokkoz (kistik, alveolar)
P-MT-08 Toksoplazmoz
P-MT-09 Trişinoz
P-MT-10 Şistozomiyaz (üriner)

Test prosedürleri

- P-TP-01 Mikroskop kalibrasyonu (oküler mikrometre)
P-TP-02 Dışkı örneklerinin direkt mikroskopisi
P-TP-03 Dışkı örneklerinin çoklaştırma yöntemleri
P-TP-04 Trikróm boyama
P-TP-05 Modifiye Kinyoun asit-fast boyama
P-TP-06 Giemsa boyama
P-TP-07 Kalın damla ve ince yayma

VİROLOJİ

- V-MT-01 Viral hepatitler
V-MT-02 HIV enfeksiyonu
V-MT-03 Norovirus enfeksiyonu
V-MT-04 Rotavirus enfeksiyonu
V-MT-05 Poliomyelit
V-MT-06 Kabakulak
V-MT-07 Kızamıkçık ve konjenital kızamıkçık
V-MT-08 Kızamık ve SSPE
V-MT-09 Suçiçeği
V-MT-10 İnfluenza ve avian influenza
V-MT-11 Viral hemorajik ateşler
V-MT-12 Kırım-Kongo kanamalı ateşi (KKKA)
V-MT-13 Hantavirus enfeksiyonları
V-MT-14 Sarı humma
V-MT-15 Batı Nil Virusu enfeksiyonu
V-MT-16 Chikungunya ateşi
V-MT-17 Kene kaynaklı ensefalitin (TBE)
V-MT-18 Akut solunum yetmezliği sendromu (SARS)
V-MT-20 Kuduz

SENDROMİK TANI YAKLAŞIMI

- SY-01 Akut ishal
SY-02 Akut hemorajik ateş
SY-03 Akut nörolojik sendrom
SY-04 Akut respiratuvar sendrom
SY-05 Akut sarılıklar

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

Kısaltmalar ve Tanımlar

ABD / Amerika Birleşik Devletleri

aerosol / belirli bir kuvvet etkisi altında sıvıların (veya katıların) ortam atmosferine damlacıklar halinde dağılması veya saçılması. Laboratuvarında pek çok işlem sırasında açığa çıkabilen ve mikroorganizmaları da içeren enfeksiyöz aerosoller laboratuvar kaynaklı enfeksiyonlar için önemli tehlike kaynaklarından biridir. pipetaj, çalkalama, sert yüzeylere düşme, dökülme-saçılma, özeyi alevde yakma, özenin besiyerinde soğutulması, santrifüj, vorteks, liyofilize ampullerin açılması, pipetteki son damlanın üflenmesi aerosol üreten işlemler arasında sayılabilir.

AIDS / acquired immune deficiency syndrom

aliko / (i) kısım, (ii) bir çözeltinin toplam miktarının bir bölümü, (iii) bir bütünün temsili bir parçası (kütle veya volüm olarak)

AMD / antimikrobiyal duyarlılık

ARB / aside-rezistan bakteri

ATCC / American Type Culture Collections

BAL / bronkoalveolar lavaj

BGD / biyogüvenlik düzeyi. mikroorganizmaların risk sınıflaması temelinde dört laboratuvar biyogüvenlik düzeyi tanımlanmıştır; ajanların bulaşma, yayılma potansiyeli ve patojenlik arttıkça laboratuvar korunma düzeyi BGD1'den BGD4'e doğru artar. klinik mikrobiyolojide karşılaşılan ajanların büyük kısmı BGD2 laboratuvar şartlarının sağlanmasını gerektirmektedir.

BGK / biyogüvenlik kabini

bildirim / sağlık otoritesinin resmi iletişim kanalları ile vakalar veya salgınlardan haberdar edilmesi işlemi.

bildirimi zorunlu hastalık / yasal bir gereklilik ile uygun yetkide bir mercie (yerel veya merkezi sağlık otoritesi) rapor edilmesi zorunlu olan hastalık.

BOS / beyin-omurilik sıvısı

buffy-coat / santrifüj edilmiş antikoagülanlı kanın eritrosit tabakası ve plazması arasında kalan ve beyaz kan hücrelerini içeren (bulutsu) katman

bulaş / doğrudan veya dolaylı olarak bir enfeksiyöz ajanın herhangi bir mekanizma ile başka bir konağa ulaşması.

bulaşıcı hastalık / bir mikroorganizma veya onun toksik ürünlerine bağlı olarak ortaya çıkan hastalıktır. etkenin, bir enfekte kişiden, hayvandan veya rezervuardan; hayvan konak, vektör veya cansız çevre aracılığıyla, doğrudan veya dolaylı olarak bir duyarlı konağa geçişiyle oluşur.

buyyon / sıvı besiyeri

CDC / Center for Disease Control and Prevention (Atlanta)

cfu / colony forming unit

CYBE / cinsel yolla bulaşan enfeksiyon

DFA / direkt floresan antikör (testi)

dk / dakika

DNA / deoksiribonükleik asit

DSÖ / Dünya Sağlık Örgütü (WHO)

duyarlı kişi / bir birey veya hayvanın bir mikroorganizma ile enfeksiyon gelişimine açık olması (*kural değilse de, genellikle mikroorganizmaya karşı spesifik koruyucu antikorların olmayışı konağın duyarlılığı için bir gösterge olarak değerlendirilir*).

EDTA / etilen diamin tetra asetik asit

EIA / enzyme immuno assay (ELISA ile aynı anlamda)

ELISA / enzyme linked immunosorbent assay

eliminasyon / bir enfeksiyon etkeni yeryüzünden yok edilemese bile neden olduğu hastalığın görülmemesinin sağlanması.

EMB / Eozine-Methylene-Blue (Agar)

endemik / bir enfeksiyon etkeninin veya hastalığın belirli bir coğrafyada veya toplulukta sürekli görülmesi durumu. hastalığın o bölgede veya grupta alışılmış bir prevalansının olması da aynı mesajı verir.

enfeksiyon / bir organizmanın bir konakçıda (insan, hayvan, arthropod) yerleşmesi, çoğalması ve genellikle bir immün yanıt oluşturmasını tanımlar. klinik bir hastalık tablosuna neden olabilir veya olmayabilir.

ENIVD / European Network for Diagnostics of "Imported" Viral Diseases (http://www.enivd.de/ENIVD_P.HTM)

epidemi (salgın) / bir hastalığın veya sağlıkla ilişkili spesifik bir durumun belirli bir coğrafyada veya toplulukta beklenenden daha fazla sayıda görülmesi. salgın, bazı kaynaklarda, kısa zamanda hızla yayılan enfeksiyon anlamında da kullanılmaktadır.

eradikasyon / hastalığın etkeni ile birlikte yeryüzünden yok edilmesidir.

ETA / endotrakeal aspirasyon (sıvısı)

FITC / fluorescein isothiocyanate (floresan boya)

genişletilmiş bağışıklama programı (GBP) / difteri, boğmaca, tetanos, tüberküloz, kızamık ve çocuk felci standart bağışıklama programının maternal tetanos önleme ve yenidoğan hepatit B aşılama ile birlikte uygulamaya konan son durumu.

gerçek-zamanlı / 'real-time' (PCR)

HAV / hepatit A virüs

- HBV** / hepatit B virüs
- HCV** / hepatit C virüsü
- HDV** / hepatit D virüs
- HEV** / hepatit E virüs
- HIV** / human immunodeficiency virüs
- IFA** / indirekt floresan antikor (testi)
- IgA** / immünglobulin A
- IgG** / immünglobulin G
- IgM** / immünglobulin M
- IHA** / indirekt hemaglutinasyon (testi)
- IMViC** / indol testi, metil kırmızısı testi, Voges-Proskauer ve sitrat testlerinin oluşturduğu ve bakteri tanımlamasında kullanılan bir biyokimyasal test paketini formüle eder. aradaki küçük "i" harfi ses uyumunu sağlamak üzere kullanılır.
- ihbar** / bazı bildirim zorunlu hastalıklarda vaka veya salgın söz konusu olduğunda tanı koyan sağlık kurumundan yerel sağlık otoritesine durumun en kısa zamanda iletilmesi.
- ilk tanımlama** / mikroorganizmaların kültür vasatlarında üremelerini takiben bir test veya test grubu uygulanarak yapılan tanımlama (primer identifikasyon).
- indeks vaka** / bir toplulukta (aile, okul, bir coğrafi bölgede yaşayanlar gibi..) bir hastalığın topluma yayılmasına yol açan ilk vaka (diğerleri için enfeksiyon kaynağı olabileceğinden dolayı önemlidir).
- insidans** / belirli bir toplulukta belirli bir süre içinde bir hastalığa ait yeni vaka sayısının o toplumda risk altında bulunan nüfusa bölünmesi ile elde edilen hız (salgın incelemelerinde *atak hızı* olarak kullanılır).
- invaziv** / derin doku ve organlara iletleyen ya da iletme yeteneğine sahip olan (mikroorganizma)
- invaziv metot** / örnek almak veya benzeri bir nedenle derin doku ve organlara ulaşmak için bir enstrümanın (enjektör, endoskopi borusu, tüp vb) kullanıldığı metot
- invazyon** / derin doku ve organlara iletme
- in-vitro** / laboratuvar ortamında ya da yapay koşullarda
- in-vivo** / canlı ortamda ya da yaşayan koşullarda
- KKD** / kişisel koruyucu donanım. laboratuvar işlemleri sırasında enfeksiyöz materyale maruziyetten korunmak için personelin giymesi veya takması gereken önlük, eldiven gibi kıyafet/donanım.
- koloni** / bir bakteriden köken alan bakteri topluluğu.
- kuru buz** / kuru buz, karbondioksitin (CO₂) katı halidir. renksiz, tatsız ve kokusuzdur; -79°C sıcaklığa sahiptir. sıvı CO₂'den elde edilir, yüksek basınç altında saklanabilir. kuru buz mühürlü taşıyıcı kutularla satılır. kutu açıldıktan sonra, kalıplar 4-7 gün içinde tüketilmelidir. ortam ısı ile temas halinde sıvı faza geçmeden buharlaşır (süblimleşme). kuru buz, tamamen buharlaşana kadar geçen süre boyunca (~5 gün) materyalin donmuş olarak korunması için efektif ortam sağlar. kuru buzda taşınması gereken enfeksiyöz materyalin nasıl paketleneyeceğine dair yeterli bilgi için ilgili rehbera bakılmalıdır (UMS, GEN-ÖY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).
- kümelenme** / hastalıkların belirli bir yer veya grupta beklenenden daha yüksek sayıda ortaya çıkması
- laboratuvara dayalı sürveyans** / belirli bir organizmanın laboratuvarda izolasyonu veya tanımlanması verisini başlangıç noktası olarak alan sürveyans (örn. salmonelloz sürveyansı..)
- LP** / lomber ponksiyon
- morbidite hızı** / her yüz bin popülasyonda, bir hastalığın etkilediği birey sayısı
- mortalite hızı** / her yüz bin popülasyonda, bir hastalıktan ölen birey sayısı
- MRDLB** / Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı (THSK'nın)
- NAAT** / nükleik asit amplifikasyon testleri
- nested** / yuvalama (PCR işleminde)
- normal flora** / deri, ağız- burun mukozası gibi vücut bölgelerinde normalde bulunan mikroorganizma topluluğu.
- nozokomiyal enfeksiyon** (hastane-kaynaklı enfeksiyon) / bir hastane ya da tıbbi kuruma başvuru sırasında herhangi bir enfeksiyon belirtisi yokken veya hastalığın inkübasyon süresi içinde olmadığı bilinen bir bireyde hastaneye yatıştan sonra ortaya çıkan enfeksiyon.
- OS** / oda sıcaklığı
- pasaj** / saf kültür elde etmek veya diğer amaçlar için bir mikroorganizma kolonisinin ürettiği besiyerinden alınarak yeni bir besiyerine ekilmesi (subculture)
- patojenite** / bir enfeksiyöz ajanın duyarlı bir konakta hastalık oluşturma yeteneği (*bazı patojen olmayan ajanlar da immün sistemi yetersiz bir konakta patojenik hale gelebilir*)
- PCR** / polimerase chain reaction (polimeraz zincir reaksiyonu)
- PNL** / polimorf nüveli lökosit
- prevalans** / belirli bir popülasyonda, yeni ve eski vaka ayrımı yapmaksızın, bir hastalık için hasta bireylerin tümünün, o toplumda risk altında bulunan nüfusa bölünmesi ile elde edilen hız.
- real time PCR** / gerçek-zamanlı PCR (rPCR)
- referans laboratuvar** / bir enfeksiyon etkeninin araştırılmasında tanıya yardımcı tüm teknikleri kullanabilen, söz konusu etken ile ilgili uzun dönemli bilgi ve deneyime sahip, gerektiğinde aynı çalışmalar yürüten uluslararası laboratuvarlarla işbirliği yapan, gerektiğinde epidemiyolojik araştırmalar için ulusal sağlık otoritesine (sağlık bakanlığı) uygun teknikler ile veri sağlayan, ulusal laboratuvar.
- rezervuar** / bir enfeksiyöz ajanın normal olarak bulunabileceği ve çoğalabileceği (ve diğer konaklar için enfeksiyon kaynağı olabilecek) kişi, hayvan, toprak veya çevredir.
- RNA** / ribonükleik asit
- RT-PCR** / revers transkriptaz PCR
- rutin sürveyans** / bir hastalığı veya sağlık olayını

izlemek için ihtiyaç duyulan bilginin düzenli ve sistematik olarak toplanmasıdır.

sa / saat

sendrom / her birinin tek başına bulunmasına kıyasla daha çok sıklıkla bir arada bulunması ile tanıya götüren semptomlar ve/veya bulgular kompleksi

sendromik bildirim / sürveyans altındaki bir sağlık olayının, spesifik bir hastalık tanımına göre *değil*, sendrom temelinde yapılmış bir vaka tanımına göre bildirilmesi (ör., *akut hemorajik ateş sendromu, Üretral akıntı sendromu, genital ülser sendromu...*)

sentinel sürveyans / bir hastalık için olguların erken saptanması veya eğilimler hakkında gösterge sayılabilecek bilgiye ulaşılmada; verilerin - toplumun kalan kısmındaki duruma işaret edecek şekilde- bir temsili nüfustan toplandığı sürveyans tipi (ör., *influenza virüs yapısının takip edilmesi veya aşının doğru antijenleri içerip içermediğinin kontrol edilmesinde influenza için bir kaç ildeki hastanelerin kullanılması ile yapılan sürveyans*)

SF / serum fizyolojik

sn / saniye

soğuk zincir / biyolojik bir maddenin bir yerden başka bir yere gönderilmesi, taşınması ve geçici süre ile saklanması esnasında tüm aşamalarda aksi belirtilmedikçe 2°-8°C (buzdolabı/buzluk ısı koşulları) ısı aralığı içinde tutulması

SPS / sodyum polyanetol sülfonat

SSS / santral sinir sistemi

sürvey / bilginin sistematik olarak toplandığı bir araştırmadır. genellikle belirlenmiş bir toplulukta, belli bir zaman aralığında yürütülür. (*sürveyanstan farklı olarak süreklilik arz etmez; bununla birlikte, eğer düzenli tekrarlanıyorsa, bir sürveyans sisteminin temelini sürveyler oluşturabilir*)

sürveyans / verilerin sistematik olarak toplanması, biriktirilmesi ve özellikle elde edilen sonuçlara göre harekete geçecek kişiler başta olmak üzere bu sonuçlara ihtiyacı olan birimlere zamanında geri bildirimini sağlayacak şekilde verilerin değerlendirilmesi sürecidir. *aktif sürveyans*: sürveyans sisteminde bildirim yapmakla yükümlü kişi veya birimlerin kendiliğinden rapor etmesini beklemeksizin, yetkili birimlerce düzenli olarak verilerin toplanması; *pasif sürveyans*: katılımcılardan aktif olarak veri toplanmayan, bildirim kendiliğinden yapılmasının beklendiği sürveyans sistemi.

temaslı / enfekte bir kişiyle, hayvanla veya kontamine çevreyle, o enfeksiyonu edinme olasılığı doğuran bir ilişkisi olmuş kişi veya hayvan.

THSK / Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (Sağlık Bakanlığının yeniden yapılanması kapsamında, başlıca, eski adı *Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı* olan kurum ile eski adı *Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü* olan birimleri bir çatı altında toplayan yapı)

TTA / transtrakeal aspirasyon (sıvısı)

UAMDS / Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyansı

UMS / Ulusal Mikrobiyoloji Standardı

UV / ultraviyole (ışık)

vaka / sürveyans amaçları veya salgın için yapılmış bir vaka tanımı ile uyumlu bir hastalığa ya da sağlık sorununa sahip kişi (*sürveyans veya salgın araştırma amacı için yapılmış bir vaka tanımının geleneksel klinik tanımlamalarla aynı olması bir gereklilik değildir*).

vaka bazlı sürveyans / her bir vakaya ait spesifik verinin toplanması yoluyla bir hastalığın sürveyansı (örn. *poliomyelit sürveyansında AFP vakalarına ait detaylı bilgi toplanması*)

vaka sınıflaması / kriterlerin destekleme derecesine göre "vaka" olma olasılığının derecelendirilmesi (örn., *olası vaka, kesin vaka...*) (*bu, özellikle vakanın çok erken bildirilmesi gerekli durumlarda (ebola hemorajik ateş v.b.) için ve kesin tanısının konulmasında güçlük olan (karmaşık laboratuvar testleri gerektiren v.b.) durumlar için kullanışlıdır*).

vaka tanımı / belli bir hastalığın sürveyansı veya salgın araştırma amaçları için bir bireyin bir "vaka" olarak tanımlanabilmesinde bir arada bulunması gereken tanısız kriterler seti (*vaka tanımları; kişi, yer ve zaman elemanlarıyla birlikte, klinik kriterler, laboratuvar kriterleri veya bunların bir kombinasyonu şeklinde olabilir*).

virülans / konağın dokulana invazyon yeteneğine ve/ veya neden olduğu hastalığın şiddetine göre, bir enfeksiyöz ajanın patojenite derecesinin ölçüm değeri.

VTM / viral transport medium

WHO / World Health Organization

zoonoz / hayvanlardan insanlara doğal koşullar altında geçebilen enfeksiyon hastalığıdır. endemik (enzootik) veya epidemik (epizootik) olabilir.

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

ÖNSÖZ

Bulaşıcı hastalıkların, insanlık tarihi boyunca hem bireyleri hem de toplumları etkileyerek ciddi sağlık tehdidi oluşturdukları bilinmektedir. Bulaşıcı hastalıkların küresel boyutta kontrol altına alınması, ulusal düzeylerde uygulanan kontrol programlarının başarısına bağlıdır. Bu nedenle ‘güvenilir’, ‘doğru’ ve ‘zamanında’ veri toplanması önem kazanmaktadır. Sürveyans ve kontrol programlarına veri sağlayan en önemli kaynaklardan biri ise laboratuvarlardır.

Ülkemizde bulaşıcı hastalıkların sürveyansı ve kontrolüne yönelik çalışmalar mevzuat ile düzenlenmiş olup sistemin kanıta dayalı işlemesi esas alınmıştır. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarları, kanıta dayalı bilgi üretmeleri nedeniyle ulusal sürveyans sisteminin vazgeçilmezi konumundadır. Ülkelerin laboratuvar tanı kapasitelerinin güçlendirilmesi, Uluslararası Sağlık Tüzüğü (2005)’nün 2007 yılından itibaren Dünya Sağlık Örgütü’ne taraf üye ülkelerde yürürlüğe konması ile birlikte, ayrıca önem kazanmıştır.

“Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi” kapsamında Başkanlığımız Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı tarafından ulusal laboratuvar tanı kapasitesinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalar; bildirim zorunlu bulaşıcı hastalıkların mikrobiyolojik tanısında geçerli yöntemlerin kullanımının yaygınlaştırılmasına gereksinim olduğunu göstermektedir. Projenin en önemli faaliyetlerinden biri “Mikrobiyoloji Laboratuvarı Performans Kalitesinde Sürekli İyileştirme Sağlanması ve Kalite Güvence Kılavuzları ile İşlemlerinin Desteklenmesi”dir. Bu çerçevede ülkemizde laboratuvar tanı kapasitesinin geliştirilmesi amacıyla “Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi” oluşturulmuştur.

Bu Rehber, bulaşıcı hastalıkların kesin tanısı ve erken uyarı-yanıt sistemini ilgilendiren halk sağlığı tehditlerinin araştırılmasında geçerli tekniklerin, geçerli teknik adımlarla uygulanması için yol gösterecek, ‘güvenilir’, ‘doğru’ ve ‘zamanında’ sonuçlar elde edilmesine hizmet edecektir.

“Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi”nin oluşturulmasında görev alan ve emeği geçen herkese teşekkür eder, çalışmalarında başarılar dileriz.

Prof. Dr. Seçil ÖZKAN
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanı

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

GİRİŞ

Laboratuvardan çıkan sonuç öncelikle 'hasta yararı' nı ilgilendirir. Doğru, güvenilir ve zamanında tanı hasta bireyin en kısa sürede uygun tedaviyi almasının güvencesidir. Laboratuvarın sonuçları 'hastalıklarla mücadele'yi de yakından ilgilendirmektedir. Zira laboratuvarlardan sunulan veriler sayesinde halk sağlığını tehdit eden sorunlara kanıta dayalı çözümler üretilebilir.

Bulaşıcı hastalıkların sürveyansı ve kontrolünde doğru, güvenilir ve zamanında veri toplanması son derece önemlidir. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarları sürveyans sistemine veri sağlayan temel yapılardan biridir. Ulusal mevzuatımız ve Uluslararası Sağlık Tüzüğü sistemin kanıta dayalı işlemlerini kaçınılmaz kılmakta, bu da tanı kapasitesinin geliştirilmesi gereğini beraberinde getirmektedir.

Avrupa Birliği fonlarından desteklenen ve Dünya Sağlık Örgütü'nün teknik danışmanlığında yürütülen "Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi" kapsamında ulusal laboratuvar tanı kapasitesinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalar bildirim zorunlu bulaşıcı hastalıkların tanısında geçerli yöntemlerin kullanımının yaygınlaştırılmasına gereksinim olduğunu göstermiştir.

REHBERİN AMACI

Elinizdeki Rehber (Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi) bu gereklerden doğmuş; doğru ve güvenilir tanı için geçerli yöntemlerin kullanımının yaygınlaştırılması ve ülkemizin mikrobiyolojik tanı kapasitesinin geliştirilmesi amacıyla oluşturulmuştur.

Rehberin bulaşıcı hastalıkların kesin tanısı ve erken uyarı/yanıt sistemini ilgilendiren halk sağlığı tehditlerinin araştırılmasında geçerli tekniklerin geçerli adımlarla uygulanmasına yol göstereceği öngörülmektedir. Rehberden beklenen diğer önemli etki de, tanıda laboratuvarlar arası standardizasyonu sağlamasıdır. Ayrıca hastalık kontrol programlarına doğru ve güvenilir veri sunulması sayesinde, etkin kontrol önlemlerinin geliştirilmesi mümkün olabilecektir. Rehberin kurumlar ve sektörler arası iletişim ve işbirliğinin güçlenmesine de katkı sağlayacağı umut edilmektedir.

REHBERİN HEDEF KİTLESİ

Rehberin başlıca dört farklı hedef gruba hizmet edeceği düşünülmektedir.

- 1 Öncelikle sahada klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında nihai karar sorumluluğu olan profesyonellere - tanıda standart yaklaşımları sunan bir kaynak olarak (gerektiğinde detaylı uzman görüşüne ayrıca başvurulmalıdır);
- 2 Hekimlere - laboratuvar hizmetlerinin standardı ve uygun testlerin seçimi /

- talep edilmesi hakkında bilgi sağlayan bir kaynak olarak;
- 3 Halk sağlığı otoritelerine – özellikle halk sağlığını yakından ilgilendiren enfeksiyon vakalarının ya da salgınların araştırılmasında, bir yandan olması gereken asgari laboratuvar kapasitesi hakkında bir yandan da 'kesin tanı'ya ulaşılması süreç ve süreleri hakkında bilgi sağlayan bir kaynak olarak;
 - 4 Ödeme kurumlarına – 'kesin tanı'ya ulaşılmasında asgari standart mikrobiyolojik işlem paketleri hakkında bilgi sağlayan ve ücretlendirmelerin rasyonel bir çerçeveye içinde yapılmasına destek verecek bir kaynak olarak.

REHBERİN KAPSAMI ve OLUŞTURULMA SÜRECİ

Rehber; saydam, katılımcı, kanıta dayalı, sürdürülebilir ve kurumsal olma ilkeleri temel alınarak oluşturulmuştur. Bu çerçevede başlangıç olarak "Ulusal Mikrobiyoloji Standartları Yönergesi" yazılmış ve "Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi"nin kapsamı belirlenmiştir. Kapsamda iki temel kategori ayırt edilebilir:

Birinci kategoride mikrobiyoloji laboratuvarlarının tanı süreçlerinde yararlanacağı standartlar yer almaktadır. Bu standartlar bildirim zorunlu enfeksiyon hastalıkları için mikrobiyolojinin ana dallarına göre -bakteriyoloji, viroloji ve parazitoloji olmak üzere- bölümlenmiş olup (i) örnek yönetimi ve (ii) mikrobiyolojik tanı/tanımlama, ve (iii) test prosedürleri belgeleridir.

Örnek yönetimi belgeleri klinik örneklerin seçimi ve uygun alınmasını; örneğin işlenmesine kadar geçen süre içinde özelliğini kaybetmeden korunmasını; alınması, taşınması ve işlenmesi sırasındaki güvenlik gereklerini ve örneğin işlenmesinde uygulanacak sistematik yaklaşımı açıklayan belgelerdir.

Mikrobiyoloji tanı/tanımlama belgeleri bildirim zorunlu hastalığın mikrobiyolojik tanısı veya patojen etkenin tanımlanmasında uygulanan ana işlem basamaklarını anlatan belgelerdir.

Test prosedürleri ise başlıca bakteriyolojide kullanılan tanımlama testlerinin yapılışını ayrıntılı olarak açıklayan, testin her seferinde ve farklı kişiler tarafından aynı biçimde yapılmasını sağlayan belgelerdir. Bu noktada belirtmek gerekirse; hem "test prosedürleri" başlığı altında verilenlerden, hem de diğer birçok UMS'nin içinde/ekinde yer alan prosedürlerden bildirim sistemi dışında kalan enfeksiyon hastalıklarının tanısında da laboratuvarların yararlanabilmesi hedeflenmiştir. Laboratuvarlar bunları örnek prosedür olarak diğer çalışmalarına uyarlayabilirler.

İkinci kategoride ise 'sendromik tanı yaklaşımı' belgeleri bulunmaktadır. Bu kategorideki belgeler ulusal sürveyans sisteminde yer alan ve erken uyarı/yanıt sistemini ilgilendiren halk sağlığı acillerine temel tanı yaklaşımının özetlendiği belgelerdir. Burada DSÖ'nün öngördüğü beş ana sendroma (akut gastroenterit, akut respiratuvar sendrom, akut hepatit/sarılık sendromu, akut nörolojik sendrom ve akut hemorajik sendrom) yönelik tanı algoritmaları verilmekte, bu algoritmalar doğrultusunda istenecek mikrobiyolojik incelemeler ve laboratuvara gönderilecek örnekler listelenmektedir. Sendromik Tanı Yaklaşımı belgeleri alanda çalışan hekimlere ve Halk Sağlığı Müdürlüklerine bu sendromlar karşısında olasılıkların hızla göz önüne getirilmesini sağlamak bakımından yol gösterici dokümanlar oldukları kadar, laboratuvarlara da bir sendrom ön tanısı ile gelen

örnekte hangi olasılıkları çalışmaya hazır olmaları gerektiği hakkında fikir vermesi beklenen “hazırlıklılık” dokümanlarıdır.

Rehberin oluşturulmasında bildirim zorunlu bulaşıcı hastalıklar listesi temel alınmıştır. Her etkenin/hastalığın ilişkili olduğu sendromlar, örnek yönetimi ve mikrobiyolojik tanı/tanımlama hususları ile tanıda kullanılan yöntemler ve bu yöntemlerin gerektirdiği biyogüvenlik düzeyleri belirlenmiştir. Takiben Rehberde yer alacak konu başlıkları belirlenmiş ve “Tanı Standartları Çalışma Grupları” oluşturulmuştur.

Çalışma Gruplarının konularında yetkin kişilerden oluşması hedeflendiğinden gruplara katılma kriterleri belirlenmiştir. Şu kriterlerden en az birini karşılayan uzmanlar Çalışma Gruplarına davet edilmişlerdir: (i) son beş yılda Pubmed/Türk Tıp Dizininde yer alan en az üç yayınının olması, (ii) kitap veya kitap bölümü yazmış olmak, (iii) Sağlık Bakanlığı'nın bilimsel komisyonlarında görev almak, (iv) KLİMUD veya TMC komisyonlarında görev almak, (v) Sağlık Bakanlığı, KLİMUD veya TMC'nin organize ettiği eğitimlerde eğitici olarak görev yapmış olmak, (vi) TÜbitak projesi veya uluslararası projelerde yer almak, (vii) önceki yıllarda hazırlanan “Bildirim Zorunlu Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısına Yönelik Standart Uygulama Prosedürleri” veya “Bulaşıcı Hastalıkların Tanısında Sahada Çalışan Hekimler için Laboratuvar Rehberi”nin yazılması ve gözden geçirilmesinde görev almış olmak.

Nihayet, Aralık 2013'te ‘Ulusal Mikrobiyoloji Standartları Çalıştayı’nda 89 uzman, Rehber kapsamında bulunan 107 konu başlığını hazırlamak üzere 12 Çalışma Grubu halinde bir araya gelmişlerdir. Her bir üye bilimsel ilkeler doğrultusunda, mevcut bilimsel kanıt ve bilgiler ışığında ve kendi deneyimlerinden de yararlanarak üstlendikleri konu ile ilgili güncel ve geçerli dokümanlar geliştirmişlerdir.

Çalıştayı ardından dokümanlarda dil birliği ve bilimsel bütünlüğün sağlanması amacıyla yoğun bir gözden geçirme süreci yaşanmış, “UMS Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi” yayına hazır hale getirilmiştir. Rehber, eş zamanlı olarak THSK web sitesinde (bkz. www.thsk.org.tr) de kullanıma sunulmaktadır.

Rehber bu haliyle bir TASLAK dokümandır. Böylece ilgili uzmanlık derneklerinin, meslek örgütlerinin ve sahadaki kullanıcıların görüşlerine açılmış bulunmaktadır. Alınacak geri bildirimlere göre son şeklinin verilmesi ve 2014 yılı sonu itibariyle de onaylanmış “Ulusal Mikrobiyoloji Standartları” belgesi olarak yayınlanması hedeflenmektedir.

REHBERİN KULLANIMI

“UMS Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi” 3 ciltten oluşmaktadır.

Birinci ciltte “Bakteriyoloji” başlığı altında solunum yolu patojenleri, enterik patojenler, cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar ve zoonozlara yönelik mikrobiyolojik tanı/tanımlama standartları yer almaktadır.

İkinci cilt enfeksiyöz madde taşıma rehberi, bakteriyolojik test prosedürleri ve antibiyotik duyarlılık test standartlarını içermektedir.

Üçüncü cilt ise “Parazitoloji”, “Viroloji” ve “Sendromik Tanı Yaklaşımı” bölümlerini kapsamaktadır. “Parazitoloji” bölümünde örnek yönetimi, mikrobiyolojik

tanı/tanımlama ve test prosedürleri yer alırken “Viroloji” bölümünde viral etkenlere yönelik mikrobiyolojik tanı/tanımlama standartları bulunmaktadır.

“UMS Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi”ne standartlar bir kodlama sistemi kullanılarak yerleştirilmiştir. Buna göre; bakteriyoloji “B”, viroloji “V”, parazitoloji “P” ile sembolize edilmektedir. Standart kategorisine göre ise sendromik tanı yaklaşımı “SY”, örnek yönetimi “ÖY”, mikrobiyolojik tanı/tanımlama “MT”, test prosedürleri “TP”, antimikrobiyal duyarlılık “AMD” olarak kısaltılmıştır. Kodlama sistemi yapılandırılırken ise önce dokümanın hangi mikrobiyolojik alana ait olduğunu belirtmek üzere “B”, “V”, “P”; ardından standart kategorisi ve numarası gelmektedir. Örneğin, bakteriyoloji grubundaki “Boğmacanın Mikrobiyolojik Tanısı”, “B-MT-01 Boğmaca” olarak kodlanmıştır.

Rehber modüler yapıdadır; bütünlüğü ve dokümanlar arasındaki bağlantı, atıflar yardımıyla sağlanmıştır. Örneğin “B-MT-02 Difteri” dokümanında ilgili diğer UMS dokümanlarına atıfta bulunulmuştur; bu atıflar da her belgenin sonunda “İlgili diğer UMS belgeleri” başlığı altında kod numaraları ve isimleri ile ayrıca listelenmiştir.

Günümüzde bilginin hızla değişen karakteri Rehberin sürekli gelişen “canlı” bir doküman olmasını bir bakıma zorunlu kılmaktadır. Bu nedenle basılı materyalin yanı sıra THSK web sitesinde de yayınlanarak güncellemelerin paylaşılması amaçlanmaktadır. UMS.LabTaniRehberi@thsk.gov.tr adresinden bize ulaşabilir; içerik ve diğer hususlarla ilgili her türlü önerinizi ve eleştirinizi ileterek veya uygulamada karşılaştığınız sorunları paylaşarak Rehberin geliştirilmesine katkı sağlayabilirsiniz.



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Dışkı Örneklerinin Parazitolojik İncelemesi

Hazırlayan Birim	Klinik Parazitoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Parazitoloji
Bölüm	Örnek Yönetimi
Standart No	P-ÖY-01
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
TEKNİK BİLGİLER	5
1 Örneklerin alınması	5
2 İnceleme için asgari laboratuvar koşulları	7
3 Dışkı örneklerinin parazitolojik incelemesi için akış şeması ..	8
4 Dışkı örneğinin rutin parazitolojik incelemesi	10
5 Bulguların değerlendirilmesi/yorumlanması raporlama	14
6 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	16
EKLER.....	17
Ek-1 Dışkının parazitolojik incelemesi için fiksatifler	17
Ek-2 Fiksatiflerin hazırlanması	18
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	19
KAYNAKLAR.....	20

Kapsam ve Amaç

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında "parazitolojik tanı" amacıyla en yaygın yapılan çalışma, dışkı örneklerinin incelenmesidir. Özellikle çocukluk yaş grubunda bağırsak parazitlerinin neden olduğu enfeksiyonların araştırılması ya da kreş, okul gibi kitle taramaları amacıyla, erişkinlerde de hem enfeksiyon tanısı için hem de işe giriş ya da portörlük muayenesi gibi gerekçelerle klinik laboratuvarlara büyük miktarlarda dışkı örneği akışı olmaktadır.

Ancak ülkemiz genelindeki laboratuvarlarda bu örneklerin çok büyük bir kısmının olası patojenleri gösterebilmek için gerekli asgari dışkı incelemesi teknikleri uygulanarak test edil(e)mediği tahmin edilmektedir. Sağlık Bakanlığının 2012 yılında gerçekleştirdiği anket çalışması bazı önemli sonuçlar sağlamıştır. Örneğin, ankete katılan laboratuvarların* büyük kısmında tanı direkt mikroskopik inceleme ile sınırlıdır; %88.7'si amibiya tanısında sadece direkt bakı ile elde ettiği sonucu rapor etmektedir (1). Boyama ve yoğunlaştırma tekniklerinin kullanılmayışı tanı duyarlılığını ileri düzeyde düşürdüğünden hasta yararının ve hastalık kontrolü ile ilgili çalışmaların bu durumdan önemli ölçüde etkilendiği söylenebilir.

Bu UMS'nin amacı klinik laboratuvarlara, intestinal paraziter enfeksiyonların tanısında dışkı örneklerinin **rutin** incelemesi (protozoon kist ve trofozoitleri ile helmint yumurta ve larvalarının hızlı, doğru ve güvenilir olarak saptanabilmesi) için kullanışlı bir akış şeması vermektir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

MİF Mertiyolat-iyot-formol (fiksatif)

PVA Polivinil alkol (fiksatif)

SAF Sodyum asetat- asetik asit-formol (fiksatif)

Genel Bilgi

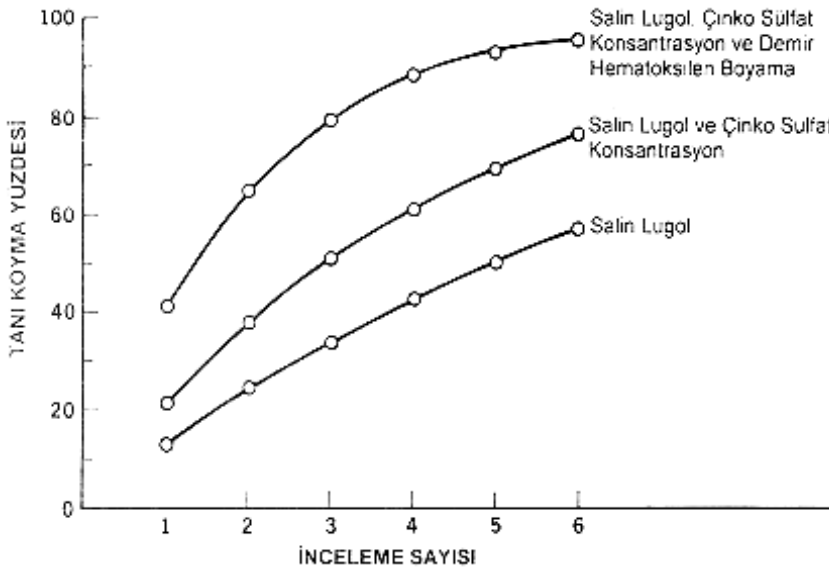
Rutin klinik laboratuvarlarda intestinal paraziter enfeksiyonların tanısı genellikle dışkının çoklaştırılmış ve/veya boyanmış preparatların ışık mikroskopuyla incelenmesi esasına dayanır (2). Dışkı örneklerindeki protozoon kist ve trofozoitleri ile helmint yumurta ve larvalarının mümkün olan en duyarlı inceleme prosedürü ile doğru ve güvenilir bir şekilde tanınması gerekir.

Dışkının parazitolojik incelemesinin başarısı pek çok faktörden etkilenir. Bunlar; örneklerin uygun alınmış, laboratuvara uygun koruyucuların (fiksatif) içinde (taze örnekler için uygun sürede) ulaştırılmış, laboratuvarında eğitimli personel tarafından incelemeye hazırlanmış ve incelemelerinin eğitimli ve deneyimli personel tarafından yapılmış olup olmaması şeklinde sıralanabilir (3,4). Bu faktörlerin her birinde olumsuz olabilecek etkileri en aza indiren bir yaklaşım tanı başarısını önemli ölçüde garantilemektedir.

* n=510; kamu, özel, yataklı, ayakta; her biri yılda semptomatik bireylerden ~2500 dışkı örneği inceliyor.

Tanı başarısını etkileyen diğer bir faktör de örneklerin laboratuvara teslim edildikten ne kadar süre içinde incelemeye başlanacağıdır. Bu sürenin kabul edilebilir sınırlar içerisinde olması tanı olasılığını arttırmaktadır (3).

Parazitlerin biyolojisine ve testlerin işlemsel özelliklerine bağlı olarak, şüphelenilen parazitin bulunup tanının doğrulanabilmesi için, sıklıkla birden çok örneğin incelenmesine gereksinim vardır. Birçok bağırsak protozoonu dışkıda her gün yeterli sayıda bulunmayabilir ve üç kez örnek alınması yeterli bir inceleme için alt sınır kabul edilir. Hekimlerin, tek bir dışkı örneğiyle başlıca parazitleri saptama olasılığı %50-60 iken üç örnek incelenmesiyle bu oranın %95'in üzerine çıktığını bilmeleri gerekmektedir (Şekil 1) (3). Protozoon enfeksiyonlarının tedavisi sonrasında 3-4 hafta, helmint enfeksiyonlarında ise 5-6 hafta sonra kontrol örnekleri de aynı şekilde incelenmelidir (2).



Şekil 1. Değişik tanı yöntemleri ve seri dışkı incelemeleri sonucu *E.histolytica/dispar* saptanmasında görülen artış (5).

Laboratuvar sonuçlarının başarısı örneğe laboratuvara kabul edilirken uygulanan işlemlere de bağlıdır. Uygun olmayan biçimde toplanmış / gönderilmiş örneklerle dayanan laboratuvar sonuçları zaman ve kaynak israfına yol açabildiği gibi, hekimi de yanlış yönlendirebilir. Bu nedenle örneklerin laboratuvara girişinde "ret kriterleri"nin uygulanması önem taşımaktadır (6).

En nihayet, doğru ve güvenilir bir tanı için örneklerle gerekli ve yeterli (optimal) bir prosedürün uygulanmış olup olmaması da önemlidir. İdeal olarak **rutin dışkı parazitolojisinde** optimal bir inceleme için taze ve/veya korunmuş (fiksatifte gelmiş) bütün dışkı örneklerinden;

- direkt (ıslak) mikroskopi **ve**
- kalıcı boyalı (trikrom/modifiye Kinyoun asit-fast) mikroskopi **ve**
- yoğunlaştırma (konsantrasyon) işlemi sonrası mikroskopi yapılarak incelenmesi ve rapor edilmesi gerekmektedir.

Teknik Bilgiler

1 Örneklerin alınması

1.1. Güvenlik önlemleri

Dışkı örnekleri dahil her türlü klinik örnek "enfeksiyöz" kabul edilmeli ve örnekleri alan ve taşıyan personel standart güvenlik önlemlerine uymalı, daima eldiven ve diğer uygun kişisel koruyucu donanımı kullanmalıdır. Bu önlemler, dışkı örnekleri koruyucu maddeler içinde olsa bile alınmalıdır, çünkü hala enfeksiyöz olabilirler.

1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Laboratuvar incelemelerinin hatasız olarak yapılabilmesi için dışkı örneklerinin hasta veya yakınları tarafından doğru biçimde alınması gereklidir. Hasta ile işbirliği yapılabiliriyorsa dışkı örneği hastanın kendisi tarafından alınır. İşbirliği yapılamayan çocuklar ve bebeklerin dışkı örnekleri yakınları tarafından alınır.

Bilgilendirme, testi isteyen hekimin veya laboratuvar personelinin sorumluluğudur; örneklerin nasıl alınacağı hasta ve yakınlarına anlaşılır bir biçimde tarif edilmelidir.

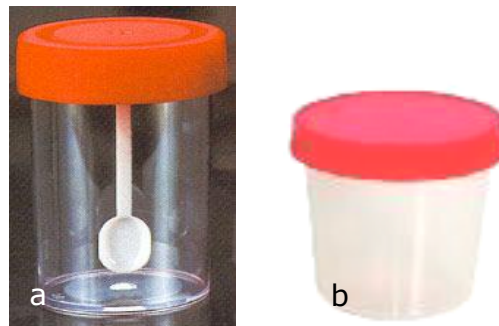
1.3. Dışkı örneği alma prosedürü

- İnceleme amacıyla gerekli miktar değişkenlik gösterir; şekilli dışkıları için 20-40 g (iri ceviz büyüklüğünde), sulu dışkıları için ise 5-6 yemek kaşığı hacminde (~25 mL) örnek rutin inceleme için yeterlidir.
- Bez kullanan bebeklerde, bezin emici iç yüzeyinden örnek alınmaz; çünkü -dışkının sıvı içeriği emici kısma geçtiğinden- bu örnekte parazit yapılarının bulunma olasılığı düşüktür. Bezin bebeğe ters bağlanması ve emici olmayan yüzeye yaptığı dışkının inceleme için kullanılması gerektiği hasta yakınına anlatılmalıdır. Dışkı örneği bir kaşık/spatula ile dışkı kabına aktarılır veya bez doğrudan laboratuvara teslim edilir.
- Dışkı örneklerinin su, idrar, yağ, toprak ve diğer yabancı maddelerle karışması önlenmelidir. Bu maddelerle kontamine olan örneklerde trofozoitler tahrip olabilirler veya içerdikleri serbest yaşayan organizmalar nedeniyle protozoon ve nematodlarla karıştırılarak tanıyı güçleştirebilirler. Bu nedenle klozetin içinden örnek alınmamalıdır.
- Baryum, bizmut, anti-diyareik veya mineral yağlar kullanıldıktan sonra alınan dışkı örnekleri inceleme için uygun değildir; çünkü, trofozoitler tahrip olur. Antibiyotik kullanımı da bağırsak florasını azaltarak veya değiştirerek flora ile beslenen parazitlerin azalmasına neden olur. Dışkı örneği bu durumlarda ~2 hafta sonra alınarak incelenmelidir.
- Tanı için antijen arama testleri de yapılacaksa fiksatif içine konmuş örneklerden bu testlerin yapılması uygun olmayabilir. Antijen arama testleri için taze veya -20°C'de saklanmış dışkı örnekleri kullanılır.
- Fiksatif seçimi laboratuvarında kullanılacak testlere göre yapılmalıdır.

- Hasta dışkı örneğini önerilen zaman içinde getiremeyecek ise veya laboratuvar koşulları örneğin hemen incelenmesine uygun değilse veya dışkı örneğinin bir başka laboratuvara gönderilmesi gerekiyorsa parazit yapılarını bozulmadan korumak amacıyla örneklerin fiksatif içeren kaplarla laboratuvara teslim edilmesi sağlanmalıdır.
 - Fiksatifler laboratuvarda hazırlanarak örnek kaplarına konabileceği gibi, ticari olarak hazır fiksatif içeren dışkı kapları da mevcuttur.
 - En sık kullanılan fiksatifler; PVA, Schaudinn fiksatifi, %5-10 formol, SAF ve MİF'dir. Bu fiksatiflerin kullanılma amaçları ve performansları farklılık göstermektedir (*bkz.* Ek-1).
 - Fiksatifli ve fiksatifsiz olarak kullanılacak, temiz, geniş ağızlı ve vida kapaklı kap örnekleri Şekil 2a ve 2b'de gösterilmektedir.
 - Örneğin fiksatif içeren kaplara alınması konusunda hastalar ayrıca bilgilendirilmelidir. Dışkı örneği ile fiksatifin doğru oranlarda ve iyi karıştırılması çok önemlidir. Kabul edilen yöntem, **üç kısım fiksatife bir kısım dışkı** örneği konulması ve iyice karıştırılmasıdır. Bu amaçla hastalara önce dışkılarını temiz, geniş ağızlı bir kaba koymaları için fiksatifsiz, buradan da bir çubuk yardımıyla uygun miktarda alınan dışkı örneğinin aktarılması için fiksatifli olmak üzere iki dışkı kabı verilmelidir.
 - Önerilen yaklaşım dışkı örneklerinin; (i) kalıcı preparat hazırlanmasına elverişli PVA fiksatifi içeren bir kap ve (ii) yoğunlaştırma uygulanabilmesi için %10 formol içeren diğer bir kap içerisine alınarak, iki kap ile laboratuvara teslim edilmesidir (*bkz.* Şekil 3).
- NOT: Laboratuvar, hareketli protozoon trofozoitlerini incelemek için SF taze dışkının konulduğu üçüncü bir örnek kabı daha kullanılabilir.
- İlk örneğin sonucu negatif ise hastanın 7-10 gün içinde, iki-üç gün aralıkla, iki kez daha dışkı örneği vermesi istenir. Bununla birlikte incelemelerde zaman ve maliyet göz önüne alınmalıdır. Antijen saptama testleri için şüpheli etkene göre test sayısı planlanmalıdır.

1.4. Dışkı örneğinin laboratuvara taşınması

- Taze dışkı örnekleri en kısa sürede laboratuvara ulaşmalıdır. Gecikme olasılığı varsa, kısa bir süre (~1 saat) için buzdolabında korunmalıdır.
- Örnekler fiksatif içine alınmış olsalar bile daima sızdırmaz, vida kapaklı kaplar içinde laboratuvara taşınmalıdır. Güvenli taşıma esastır; taşıyana veya çevreye güvenlik sorunu yaratılmamalıdır.



Şekil 2. (a) Kaşıklı dışkı kabı. (b) Vidalı kapaklı dışkı kabı;

2 İnceleme için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

Potansiyel enfeksiyöz organizmalar içerebileceğinden dolayı dışkı örnekleri ile ilgili incelemeler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmeli; bütün örnekler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi"nde belirtilen standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır. Dışkı örnekleri koruyucu maddelerle fikse edilmiş olsalar bile bu önlemler alınmalıdır; çünkü hala enfeksiyöz olabilirler. Bazı parazit ookist ve kistleri formol ile fikse edildikten günler, hatta haftalar sonra canlılıklarını yitirirler. Örneğin formolde saklanmış *Ascaris lumbricoides* yumurtaları gelişmeye devam edebilir ve enfeksiyözdür. Bu prosedür uygulanırken daima **eldiven** giyilmelidir!

Boyalı olsun veya olmasın, lamlar **kesici-delici atık** kabul edilir ve kesinlikle kesici-delici atık kutusuna atılırlar! Diğer biyolojik kirlilerin bulunduğu torbalara atılmaları halinde torbayı deler ve ciddi enfeksiyöz risk oluştururlar.

Kullanılan reaktifler veya fiksatiflerde bulunabilen fenol, formol, eter, cıva gibi maddeler toksik, koroziv ve/veya kanserojendir! Solunmasından ve/veya direkt temastan kaçınılmalı, bu kimyasallarla çeker ocak içinde ve ilgili kimyasal güvenlik tedbirleri alınarak çalışılmalıdır.

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) teknikleri uygulamadan önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) tekniklere tüm yönleriyle aşina olmalı, ve (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Bu UMS'nin uygulanmasından analist; tekniklerin prosedüre uygun yapılmasını sağlamaktan ve denetimi, değerlendirilmesi ve onaylanmasından (sonucun doğru ve güvenilir olmasından) Tıbbi Mikrobiyoloji/Parazitoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Reaktif, Kit, Donanım

Rutin inceleme için

NOT: Yoğunlaştırma ve boyama reaktifleri piyasadan hazır temin edilebilir veya laboratuvarda hazırlanabilirler.

- SF ve Lugol'ün iyodini (bkz. UMS, P-TP-02)
- Fiksatifler (bkz. Ek 1) ve yoğunlaştırma reaktifleri (bkz. UMS, P-TP-03)
- Trikrom boyama (bkz. UMS, P-TP-04) ve
- Modifiye Kinyoun asit-fast boyama reaktifleri (bkz. UMS, P-TP-05)
- Örnek kapları (sızdırmaz, vida kapaklı; fiksatif içerebilir)
- Lam (rodajlı ve rodajsız), lamel
- Kapaklı şaleler, Pastör pipetleri, 1 ve 10 mL pipetler
- Santrifüj ve 15 mL'lik konik santrifüj tüpleri
- Mikroskop, binoküler (rutin) – 10× (düşük), 40× (yüksek kuru), 100× (immersiyon) objektifleri ve 10× oküleri olan tercih edilir.

NOT: Bazı mikroskopistler 5× oküler tercih etmektedir. Ancak 5× oküler daha az büyütme sağlar ve inceleme duyarlılığını düşürür; bu nedenle 10× oküler kullanılması önerilmektedir (7).

İleri incelemeler için

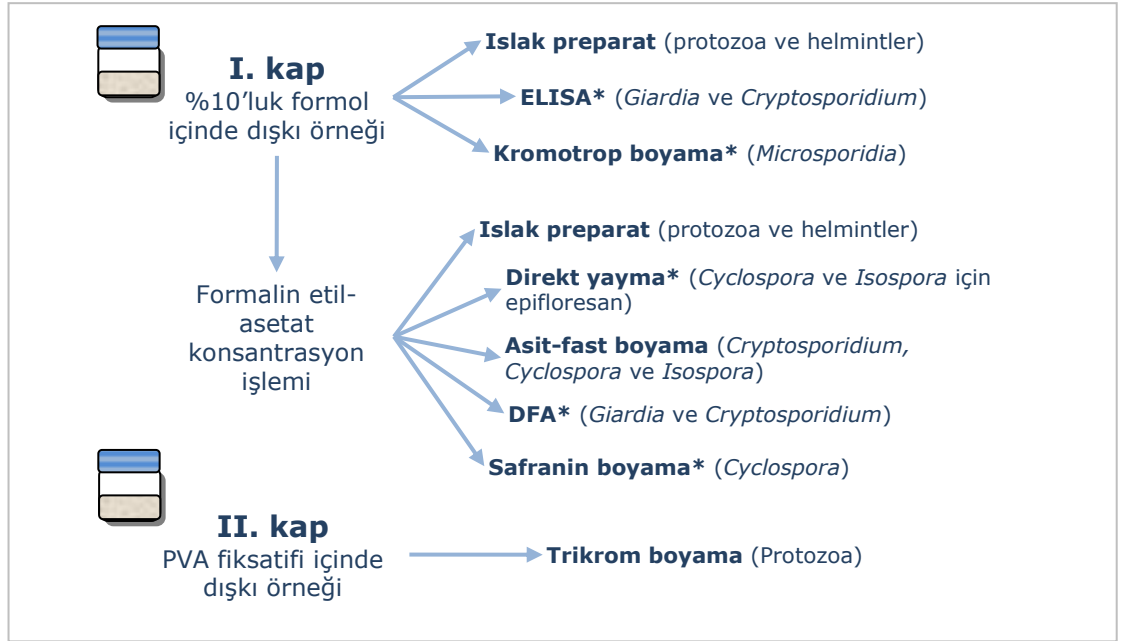
- *E. histolytica* tanımlanması için EIA kiti (*bkz.* UMS, P-MT-01)
- *Cryptosporidium spp* ve *Giardia intestinalis* tanısı için DFA/EIA kitleri (*bkz.* UMS, P-MT-02 ve P-MT-03)
- ELISA okuyucusu
- Floresan mikroskop - 20×, 40× kuru ve 100× immersiyon objektifleri, 10× oküleri ve FITC konjugat için uygun filtreleri olan

2.4. Kalite kontrol

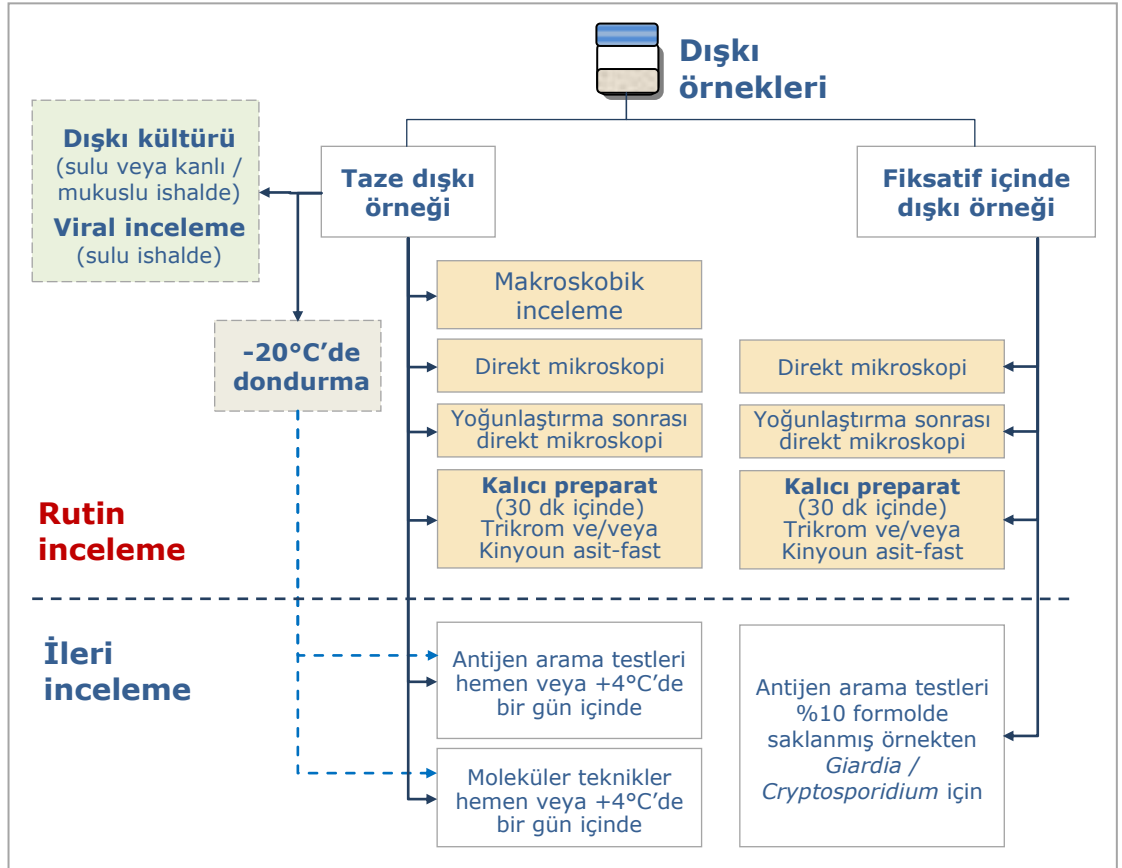
- Her yeni hazırlanan boya seti/kit lotu veya ticari reagenler, kullanıma sokulmadan önce pozitif kalite kontrol örnekleri ile test edilmelidir.
- Pozitif olduğu bilinen boyalı preparatlar, fotoğraflar ve kaynak kitaplar çalışma yerinde mevcut olmalıdır.
- Mikroskop belirli aralıklarla (yoğun kullanılıyorsa yılda en az bir kez) kalibre edilmelidir. Mikroskoba herhangi bir parça eklenmesi veya değiştirilmesi durumunda da kalibrasyon yapılmalıdır. Kalibrasyon için kullanılmış optikler mikroskobun üzerinde olmalıdır. Tüm objektifler için kalibrasyon faktörleri göz önündeki bir panoda asılı olmalıdır (*bkz.* UMS, P-TP-01 Mikroskop Kalibrasyonu).
- Kitlere dayalı testlerde daima kitin pozitif ve negatif kontrolleri kitin talimatına göre teste dahil edilmelidir. Laboratuvar aynı zamanda kendi kalite kontrol örneklerine sahip olmalı ve testlere dahil etmelidir.
- Bütün kalite kontrol sonuçları, kitin lot numarası, tarih ve diğer bilgiler kalite kontrol kayıt defterine veya kartlarına kaydedilmelidir.

3 Dışkı örneklerinin parazitolojik incelemesi için akış şeması

- Dışkının parazitolojik incelemesi **rutin inceleme** ve **ileri incelemeler** olmak üzere iki aşamalı ele alınır.
- **Rutin dışkı parazitolojisinde** optimal bir inceleme için taze ve/veya korunmuş (fiksatifte gelmiş) bütün dışkı örneklerinin;
 - 1 ıslak (direkt) mikroskopi ve,
 - 2 kalıcı boyalı mikroskopi ve,
 - 3 yoğunlaştırma işlemi sonrası mikroskopi yapılarak incelenmesi vebu 'inceleme paketi' ile elde edilmiş sonuçların rapor edilmesi gerekmektedir.
- Şekil 3 laboratuvara 'çift-fiksatif' (%10'luk formol ve PVA) içinde gelen dışkı örneklerinde bütün test seçeneklerini bir arada göstermektedir.
- Şekil 4'te ise dışkı örneklerine **rutin** inceleme kapsamında ve **ileri** inceleme kapsamında uygulanması gereken testler için genel bir yaklaşım şeması verilmiştir.



Şekil 3. Formol ve PVA'da gelen dışkı örneklerinden yapılabilecek testler. Bu şema hem rutin laboratuvarlarda hem de ileri test laboratuvarlarında dışkı örneklerinin %10'luk formolde ve PVA'da olmak üzere 'çift-fiksatif' ile alınmasının kullanışlı olabileceğini göstermektedir (8). " * " ile işaretlenmiş olanlar ileri incelemeler kapsamındaki testlerdir.



Şekil 4. Semptomatik bir vakada enfeksiyondan sorumlu olması muhtemel bütün intestinal parazitlerin tanımlanabilmesi için dışkı örneklerinin incelenmesinde kullanılan genel akış diyagramı. Sulu dışkı örneklerinin aynı zamanda bakteriyel ve viral patojenler için de incelenmesi gerekir.

4 Dışkı örneğinin rutin parazitolojik incelemesi

4.1. Örneklerin laboratuvara kabulü

- Laboratuvara gelen örnekler "**ret kriterleri**" göz önüne alınarak değerlendirilir. Aşağıdaki dışkı örnekleri, parazitolojik inceleme yapılması uygun olmadığı için ret edilir:
 - (a) Örnek kabı üzerinde hasta bilgileri yazılı olmayan veya hastaya ait uygun bir istek formu düzenlenmemiş örnekler.
 - (b) Uygun olmayan bir kaba (kibrit kutusu vb.) alınmış, kabın dışına sızmış veya taşıma kabı hasar görmüş örnekler,
 - (c) Su veya idrarla karışmış dışkı örneği; miktarı çok az veya beklemiş dışkı örneği (kurumuş vb.),
 - (d) Önerilen süre içerisinde, uygun ısıda gönderilmemiş örnekler;
 - (e) dondurulmuş (antijen testleri ve moleküler testler hariç) veya inkübatörde bekletilmiş dışkı örneği.
- Örnekler ve hastaya ait tüm bilgiler, Hastane Bilgi Yönetim Sistemi ve/veya Laboratuvar Bilgi Sistemi gereklerine göre kayıt altına alınır. Çocuk hastalarda veya iletişim kurulamayan debil hastalarda, hasta yakınına ait bilgiler (kişinin adı, soyadı, cinsiyeti; hastaya yakınlık derecesi; kısaca adresi, telefonu) de kayıt edilmelidir:
- Örnekler analiz için laboratuvarın ilgili bölümüne sevk edilmeli; bu arada örnek karışmalarını önleyecek tedbirler alınmalıdır.

4.2. Örneklerin incelemeye hazırlanması

- Enfeksiyon tanısını etkileyen en önemli faktörlerden birisi, dışkı örneğinin alınmasından sonra incelemeye kadar geçen süredir.
- Sıvı dışkıları laboratuvara teslim edildikten sonraki 30 dk içinde değil, dışkılamadan sonraki ilk 30 dk içinde incelenmelidir!
- Yumuşak/yarı şekilli dışkıları dışkılamadan sonraki en geç bir saat içinde incelenmelidir.
- Katı/şekilli dışkıları, örnek kabının kapağı iyice kapatılarak 2-8°C'de saklanmaları halinde 24 saat içerisinde incelenebilirler. Ancak bu örnekler fiksatif içerisinde saklanmadıklarından kalıcı preparat için kullanılamazlar.
- Mikroskopik inceleme için kullanılacak dışkı örnekleri dondurulmaz ve inkübatöre konmaz.
- Tüm dışkı örneklerine **rutin inceleme** için aşağıda a-d maddelerinde belirtilen parazitolojik incelemeler yapılmalıdır. "e" ve "f" maddelerinde belirtilen testler **ileri incelemeler**dir ve bu olanaklara sahip laboratuvarlarda uygulanabilir.
- Örneklerin hazırlanmasında, seçilen yöntemlere uyum önemlidir ve dikkat edilmelidir:

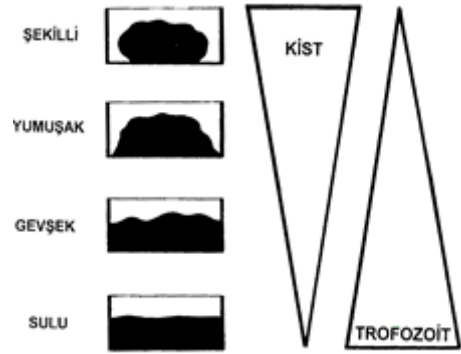
*Sıvı dışkıları
dışkılamadan
sonraki ilk
30 dk içinde
incelenmelidir!*

- Laboratuvara taze dışkı olarak teslim edilen örnekler ilk önce **makroskopik** olarak incelenir.
- Taze dışkı veya fiksatif içinde tespit edilen örnekler **direkt mikroskopik inceleme** için hazırlanır (bkz. UMS, P-TP-02).
- Taze dışkı veya fiksatif içinde tespit edilen örneklerde yapılan **yoğunlaştırma** işlemi (bkz. UMS, P-TP-03) sonrasında direkt mikroskopik inceleme için örnekler hazırlanır.
- Kalıcı preparat incelemeleri** için trikrom yöntemi (bkz. UMS, P-TP-04) ve modifiye Kinyoun asit-fast boyama (bkz. UMS, P-TP-05) yöntemleri ile preparatlar hazırlanır.
- Dışkıda antijen arama testleri (*E.histolytica* antijen ELISA; *Cryptosporidium* spp ve/veya *G. intestinalis* için ELISA ve DFA) üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanılır.
- Moleküler analizler için taze veya donmuş dışkı örnekleri kullanılır; üretici firmanın önerileri veya ilgili protokollere göre çalışılır.
- Dışkıdaki paraziter etkenler için bazı kültür yöntemleri bulunmaktaysa da bu yöntemlerin rutin tanı da yeri yoktur.

4.3. Örneklerin incelenmesi

Makroskopik inceleme

- Bütün örnekler **makroskopik** olarak incelenmeli ve bulgular mutlaka kaydedilmelidir.
- Taze dışkı örneklerinin makroskopik incelemesi fiksatif içindeki örneklerde yapılan makroskopik incelemeden daha değerlidir.
- Dışkının kıvamı şekilli, yumuşak ve sulu olarak sınıflandırılır. Gevşek ve sulu örneklerde trofozoit şekillerine sık, kist şekillerine ise daha nadir olarak rastlanır (Şekil 5) (9).
- Helmin yumurta ve larvalarına her kıvamdaki dışkıda rastlanabilir. Ancak az sayıda bulunduğu sulu dışkılarda saptamak daha güçtür. Bu nedenle sulu dışkılara yoğunlaştırma uygulanması ile az sayıdaki helmin yumurtalarının saptanması da mümkün olabilir.
- Dışkıda **kanın** varlığı her zaman rapor edilmelidir. Koyu renkte olan kan genellikle kanamanın gastrointestinal sistemin üst seviyelerinde olduğunu, açık renkli-taze kan ise, kanamanın alt seviyelerde veya rektum civarında olduğunu gösterir.
- Taze dışkı örneklerinde benek tarzında kan ve/veya mukus görüldüğünde dışkının trofozoit açısından dikkatlice incelenmesi gerekir.



Şekil 5. Dışkı örneğinin kıvamına göre kist ve trofozoit dağılımı (9)

- Sarı ve kötü kokulu dışkı örnekleri emilim bozukluğunu gösterir ve *G.intestinalis* enfeksiyonu için bir gösterge olabilir.
- Makroskobik inceleme sırasında *Taenia* spp halkaları ile *Ascaris lumbricoides* ve *Enterobius vermicularis* erişkinleri dışkı yüzeyinde veya dışkı kabında saptanabilir.
- Dışkı örnekleri tespit edilmeden, oda sıcaklığında bir gün bekletildiğinde kancalı kurtlar gibi bazı helmintlerin larvaları yumurtadan çıkabilir.

Direkt mikroskopik inceleme

- Kalibrasyonu yapılmış mikroskoplar kullanılmalıdır (bkz. UMS, P-TP-01).
- Hazırlanan preparatlar kısık ışıktaki 10× ve 40× objektifler kullanılarak protozoon trofozoit ve kistleri, helmint yumurta ve larvaları açısından araştırılır (bkz. UMS, P-TP-02).
- Oküler mikrometre ile, görülen parazit elemanlarının ölçümleri yapılarak not edilir (bkz. UMS, P-TP-01).

ÖNEMLİ: Direkt mikroskopik incelemede SF lameli tarafında trofozoitler tespit edilebilir. Hareketli olanların hareketleri izlenebilir. Lugol lamelinde ise protozoonların kist yapıları ve içerikleri daha belirgin olarak gözlemlenebilir. Bu nedenle direkt preparat incelemelerinde her iki solüsyon kullanılarak inceleme yapılması büyük önem taşımaktadır!

- Direkt mikroskopi ile görülen protozoonlar, kalıcı preparatlar incelenerek **doğrulandıktan sonra** raporlanmalıdır.
- Dışkıda bulunan ve parazitlere benzeyen yapılar (artefakt, yalancı parazit) yanlışlıkla parazit olarak değerlendirilebilir. Bu nedenle normal dışkı içeriğinin, kan ve doku hücrelerinin, sindirim atıklarının ve sindirim kanalından geçen diğer maddelerin de bilinmesi ve tanınması gerekir:
 - (a) Bitkisel maddeler: Bitki hücreleri ve tüyleri, sebze spiralleri, nişasta kümeleri, polen taneleri, turuncgil sporları
 - (b) Maya ve maya benzeri mantarlar
 - (c) Hayvan ve bitki tüyleri helmint larvalarına benzeyebilir.
 - (d) Eritrositler, vasküler patoloji, ülserasyon ve hemoraji nedeniyle görülebilir.
 - (e) Lökositler, yangısal olay varlığında görülebilir.
 - (f) Charcot-Leyden kristalleri, eozinofillerin yıkım ürünleridir. Alerjik hastalıklarda, amibiyaz ve helmint enfeksiyonlarında görülebilir.
 - (g) Makrofajlar, bakteriyel ve paraziter enfeksiyonlarda görülebilir. Amiplerle karıştırılabilir.
 - (h) Epitel hücreleri, intestinal kanal hücrelerinin dökülmesi sonucu görülebilir.
 - (i) Bitki nematodları ve beklemiş dışkılarda kontaminasyon nedeniyle artropod yumurta ve larvaları görülebilir.

Yoğunlaştırma yöntemi

- Yoğunlaştırma yöntemleri kullanıldığında helmint yumurta ve larvaları ile protozoonların kist ve ookistlerinin saptanma olasılığı yükselir. Ancak bu yöntemin uygulanması sırasında trofozoitlerde bozulma veya parçalanma meydana gelebilir.
- Laboratuvar olanakları doğrultusunda çöktürme (sedimentasyon) ve yüzdürme (flotasyon) yöntemleri birlikte uygulanabilir veya birisi tercih edilebilir (bkz. UMS, P-TP-03).
- Dışkının parazitolojik incelemesinde bu yöntemlerden en az birisi kullanılmalıdır.

Dışkının parazitolojik incelemesinde en az bir yoğunlaştırma yöntemi kullanılmalıdır!

Kalıcı preparat incelemeleri

- Trikrom boyalı preparatlar birçok protozoonun tanımlanmasını sağlar (boyama yöntemi için bkz. UMS, P-TP-04).
- Koksidian parazitlerden *Cryptosporidium spp.*, *Cyclospora cayetanensis* ve *Cystoisospora belli* protozoonları ancak modifiye Kinyoun asit-fast boyalı preparat incelemelerinde görülebilir. Yoğunlaştırma sonrasında hazırlanan modifiye Kinyoun asit-fast boyalı preparat incelemeleri parazit saptama olasılığını artırır (boyama yöntemi için bkz. UMS, P-TP-05).
- Bu yöntemlerle hazırlanan preparatlar 100× immersiyon objektifi ile incelenir. Oküler mikrometre ile görülen parazit yapılarının ölçümleri yapılarak not edilir.
- Kalıcı boyalı preparat incelemelerinin önemli avantajları vardır, bunlar;
 - (a) İyi boyanmış parazitlerin morfolojileri ayrıntılı olarak incelenebilir.
 - (b) Taze dışkı preparatlarında nadir görülmeleri veya küçük olmaları nedeniyle gözden kaçabilen parazitler daha kolay saptanabilir.
 - (c) Preparat incelemesi ertelenebilir ve preparatlar kalıcı kayıt olarak saklanabilir.
 - (d) Pozitif olarak değerlendirilen preparatlar referans veya araştırma materyali olarak kullanılabilir.
 - (e) Tanıda şüpheli durumlarda preparatlar bir başka merkeze gönderilerek incelenebilir.

Dışkının parazitolojik incelemesinde en az bir kalıcı boyama yöntemi kullanılmalıdır!

Antijen arama yöntemleri

- Antijen arama testleri ileri incelemeler kapsamındadır.
- Dışkının rutin parazitolojik incelemesinde etken saptanamadığı hallerde, vakanın parazit enfeksiyonu şüphesi devam ediyorsa, kullanılırlar.

- Ayrıca boyalı preparatlarda görülen ancak tanımlanamayan şüpheli elemanların doğrulanması amacıyla uygulanırlar.
- Rutin laboratuvarlardan ziyade eğitim, araştırma ve referans laboratuvarlarında çalışılır.
- *E. histolytica* ve *E. dispar* türlerini aynı anda saptayan veya patojen, invaziv *E. histolytica*'yı özgül olarak saptayan EIA ya da immünokromatografik kitler mevcuttur.
- İnvaziv *E. histolytica* için özgül kit ile pozitif bulunması "kesin tanı" bulgusudur (10,11).
- *G. intestinalis* kistleri ve/veya *Cryptosporidium* spp ookistlerini DFA yöntemi ile aramak için kitler mevcuttur. Floresan mikroskopunda 40x objektifi kullanarak inceleme yapılmalıdır. Pozitif bulunması "kesin tanı" bulgusudur (10,11).
- *E. histolytica*, *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp saptanmasına yönelik ayrı veya kombine immünokromatografik tanı kitleri de mevcuttur
- Antijen arama yöntemleri ile ilgili daha ayrıntılı bilgi için bkz. UMS, P-MT-01; P-MT-02; ve P-MT-03).

Moleküler yöntemler

- Bu olanaklara sahip laboratuvarlarda uygulanabilir.
- Konvansiyonel, gerçek-zamanlı veya mütipleks uygulamalar olabilir.
- Klinik örneklerde *E. histolytica*, *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp için PCR pozitifliği "kesin tanı" bulgusudur.

5 Bulguların değerlendirilmesi/yorumlanması raporlama

- Laboratuvarın bir referans preparat seti bulundurması hem eğitim amaçları hem de karşılaştırmalar için idealdir.
- Değerlendirmelerin doğru olmasını sağlamak için mikroskopi sonuçlarını 'gözden geçirme sistemi' kurulmalıdır. Gözden geçirme sisteminin bir gereği olarak her gün Tıbbi Mikrobiyoloji / Tıbbi Parazitoloji Uzmanı da bazı preparatlara bakmalıdır. Bu, hem uygulayıcı personelin eğitim ihtiyaçlarını belirlemeye hem de sonuçların klinik bilgi ile ilişkilendirilmesine yardımcı olur.
- Tüm sonuçlar tanı konulduktan sonra en kısa sürede Uzman tarafından değerlendirilmeli ve onaylanmalıdır.
- Rapor klinisyene yönelik hazırlanmalıdır.
- Raporda öncelikle dışkı örneğinin makroskopik değerlendirme bulguları (kıvam, renk, mukus/kan varlığı vb.) yazılmalıdır. Dışkıda **kanın** varlığı her zaman bildirilmelidir.
- Raporda incelemenin hangi teknik(ler) kullanılarak yapıldığı mutlaka yer almalıdır!

- Raporda görülen/saptanan parazitin adı ve formu yazılmalıdır.
 - (a) Direkt incelemede hareketli trofozoit görülebilir, ancak tür düzeyinde tanımlanamayabilir.
 - (b) *Giardia intestinalis* kistleri, sulu dışkılamada da trofozoitleri direkt incelemede tanınabilir. Bunlar "*Giardia intestinalis* kistleri (ve/veya trofozoitleri) görüldü" şeklinde rapor edilir.
 - (c) Direkt mikroskopik inceleme intestinal amibiyaz tanısında geçerli bir yöntem değildir. Bunun nedeni, patojen *E. histolytica*'nın, direkt mikroskopik inceleme ile non-patojen *E. dispar*'dan ayırt edilmesinin mümkün **olmamasıdır!** Direkt mikroskopi sonucuna göre *E. histolytica* rapor **edilmemelidir!**

NOT: *E. histolytica*/*E. dispar*'ın dışkıda bulunabilen diğer non-patojen *Entamoeba* türlerinden de direkt mikroskopik inceleme ile ayırt edilmesi güçtür. Deneyimsiz mikroskopistler tarafından lökositlerle karıştırılabilmektedir.
 - (d) Dışkıdan trikrom boyanmış preparatlarda **eritrosit fagosite etmiş** *E. histolytica* trofozoitlerinin ve/veya kistlerinin görülmesi güçlü bir şekilde amibiyaz lehine yorumlanır.

NOT: Ancak bu sonucun özgül *E. histolytica* Ag ELISA veya PCR ile doğrulanması gereklidir! Örnek, bu testleri yapabilen bir laboratuvara gönderilmelidir!
 - (e) Trikrom boyamada *Cryptosporidium* ookistleri mayalardan ayırt edilemezler. *Cryptosporidium* şüphesi varsa (özellikle sulu dışkı örneklerinde) modifiye Kinyoun asit-fast boyanmalıdır.
- Saptanan insana ait hücreler bildirilmelidir (ör., orta düzeyde lökosit, bol eritrosit, az makrofaj, nadir Charcot-Leyden kristalleri vb.).
- Maya hücreleri oransal olarak bildirilmelidir (ör., orta düzeyde tomurcuklanan maya hücreleri, nadir pseudohif vb.).
- Parazitlerin, hücrelerin, maya hücrelerinin ve artefaktların sayısal olarak belirtilmesinde aşağıdaki kriterler göz önüne alınmalıdır (12):
 - Az = her 10 immersiyon alanında <2 adet
 - Orta = her 10 immersiyon alanında 3-9 adet
 - Bol = her 10 immersiyon alanında >10 adet
- *E. histolytica*, *Giardia intestinalis* ve *Cryptosporidium* spp ülkemizde laboratuvaradan **bildirimi zorunlu** etkenlerdir (10). Bunlardan birine tanı koyulması halinde olguların kayıt ve bildirim için Sağlık Bakanlığının "Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi" izlenmelidir (11).

Direkt mikroskopik inceleme sonucu 'ön-rapor' niteliğindedir! Kesin rapor boyama ve yoğunlaştırma yöntemleri uygulandığında verilir.

- Saptanan helmint erişkin, larva ve yumurtaları da parazitin adı ve formu ile belirtilmelidir. Nadiren de olsa **bildirimi zorunlu** olan *Trichinella* spp larvaları ve *Schistosoma haematobium* yumurtalarının dışkı da görülebileceği unutulmamalıdır. Saptandıkları hallerde yukarıda bahsedilen Bildirim Sistemi süreçleri izlenmelidir.
- İlgili formlar ile hastanenin bildirim sorumlusuna sonuçlar hemen iletilmeli, bildirim sorumlusu tarafından da haftalık olarak Halk Sağlığı Müdürlüğü'ne bildirim yapılmalıdır.
- Bu etkenlere bağlı enfeksiyonların **salgın**larla seyredebileceği akılda tutulmalı ve şüpheli vaka kümelenmeleri dikkatinizi çekiyorsa hafta beklenmeden acilen Halk Sağlığı Müdürlüğü'ne bildirilmelidir.
- Bildirim zorunluluğu olmayan bir parazit hastalığı da, eğer salgın şüphesi varsa, yine Halk Sağlığı Müdürlüğü bilgilendirilmelidir.
- Pozitif kalıcı preparatlar pozitif kontrol olarak saklanmalıdır. Gerekli bilgiler lam üzerine yazılmalı ve bir arşivleme sistemi kurulmalıdır.

6 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Tek bir örnekten elde edilen negatif sonuç bir intestinal parazit enfeksiyonunu dışlamaz. Güvenilir bir sonuç için çok sayıda dışkı örneğinin (2-3 gün aralarla alınmış en az 3 örnek) incelenmesi gerekir.
- Doğru ve güvenilir bir sonuca ulaşmak için rutin dışkı inceleme yöntemleri hayli zaman alıcı ve emek yoğundur. Bu pek çok laboratuvarın Şekil 4'te şematize edilmiş olan 'inceleme paketi'ni uygulamaktan kaçınmasına neden olmaktadır. Hasta yararı açısından laboratuvarlar *tam* bir inceleme paketinin uygulanmasına teşvik edilmelidir.
- Mikroskopi tekniklerinin uygulayana bağlı oluşu önemli bir dezavantajdır. Dışkının rutin parazitolojik incelemesi ciddi düzeyde eğitilmiş ve deneyimli personel gerektirmektedir.
- Tüm dışkı inceleme yöntemleri için performansı yüksek tek bir koruyucu (fiksatif) mevcut değildir.

Dışkı örneğinin optimal rutin parazitolojik incelemesi

“ıslak mikroskopi ve kalıcı boyalı mikroskopi ve yoğunlaştırma işlemi sonrası mikroskopi”

şeklinde bir pakettir ve doğru hasta yönetimi için bu 'inceleme paketi' ile elde edilmiş sonuçların rapor edilmesi gerekmektedir.

Ekler

Ek-1 Dışkının parazitolojik incelemesi için fiksatifler¹³

Fiksatifler	Avantajları	Dezavantajları
%10 Formol Solüsyonu	<ul style="list-style-type: none"> Tamamıyla koruyucu amaçlıdır Hazırlanışı kolay ve raf ömrü uzun Helmint yumurtaları, larvaları, protozoon kistleri ve koksidiya morfolojilerini iyi korur Yoğunlaştırma prosedürleri ve floresan mikroskopi için uygun Asit-fast, safranin ve kromotrop boyamalar için uygun İmmünolojik test kitleri ile uyumlu 	<ul style="list-style-type: none"> Trikrom boyama için uygun değildir Protozoon trofozoitlerinin morfolojisinde yetersiz koruma sağlar Uzun süreli fiksasyon PCR'ı inhibe edebilir
MİF (Mertiyolat-İyot-Formaldehit)	<ul style="list-style-type: none"> Bileşenleri, sadece tespit etmez aynı zamanda organizmaları boyar Hazırlanışı kolay Uzun raf ömrü Saha çalışmaları için yararlı Yoğunlaştırma prosedürleri için uygun 	<ul style="list-style-type: none"> Trikrom boyama için uygun değildir Protozoon trofozoitlerinin morfolojisinde yetersiz koruma sağlar İyot, diğer boyalar ve floresan ile uyumsuz İyot protozoonların bozulmasına neden olabilir
LV-PVA (düşük viskoziteli polivinil alkol)	<ul style="list-style-type: none"> Protozoon kistleri ve trofozoitlerinin morfolojisini iyi korur Trikrom gibi kalıcı yaymaların boyanmasında kullanımı kolay Korunan örnekler birkaç ay sabitlenmiş kalır 	<ul style="list-style-type: none"> Helmint yumurtaları, larvaları, koksidiya ve mikrosporidiya morfolojilerini korumada yetersizdir Cıva klorür içerir, imha edilmesi zor ve pahalıdır Laboratuvarda hazırlanması zordur Yoğunlaştırma prosedürleri için uygun değildir İmmünolojik test kitleri ile kullanılamaz Asit-fast, safranin ve kromotrop boyamalar için uygun değildir
SAF (Sodyum asetat - Asetik asit-Formalin)	<ul style="list-style-type: none"> Sadece yoğunlaştırma prosedürleri değil aynı zamanda kalıcı Boyalı yayma hazırlanması için uygun Hazırlanışı kolay, raf ömrü uzun Asit-fast, safranin ve kromotrop boyamalar için uygun İmmünolojik test kitleriyle uyumlu 	<ul style="list-style-type: none"> Lama örneklerin yapışması için katkı maddesi (albümin, gliserin vb.) gerekir Kalıcı boyama için PVA ya da Schaudinn fiksatifine kadar iyi değil
Schaudinn fiksatif	<ul style="list-style-type: none"> Protozoon kistleri ve trofozoitlerinin morfolojisini iyi korur Kalıcı boyalı yaymaların hazırlanması kolay 	<ul style="list-style-type: none"> Yoğunlaştırma teknikleri için daha az uygun Cıva klorür içerir Yumurta, larva, koksidiya ve mikrosporidiya morfolojilerini korumada yetersizdir Lamlara likit veya mukoid örneklerin yapışması zayıftır
Modifiye PVA (Bakır veya Çinko)	<ul style="list-style-type: none"> Kalıcı yaymalar yapılabilir ve trikrom ile boyanabilir Çinko, bakırdan önceliklidir Cıva klorür içermez 	<ul style="list-style-type: none"> Boyamalar tutarlı değildir Organizma morfolojisi kalitesiz olabilir Bakır kullanıldığında kistlerin ve trofozoitlerin morfolojisi bozulabilir Çinko morfolojiyi korumada daha iyidir fakat LV-PVA ile kıyaslanamaz.

Ek-2 Fiksatiflerin hazırlanması

Schaudinn fiksatifi

Doymuş Cıva klorür solüsyonu

Cıva klorür (HgCl ₂) kristalleri	110 g
Distile/deiyonize su	1000 mL

Cıva klorür, distile su içinde ısıtılarak eritilir. Solüsyon soğumaya bırakılarak fazla cıva klorürün kristalleşmesi sağlanır.

Solüsyon cam kapaklı şişeye süzülür ve kullanıncaya kadar saklanır.

Schaudinn fiksatifi

Doymuş Cıva klorür solüsyonu	600 mL
Etil alkol (%95'lik)	300 mL
Gliserin	15 mL
Glasiyal asetik asit	5 mL

Doymuş Cıva klorür solüsyonu, etil alkol ve gliserin ile karıştırılır. Kullanıncaya kadar saklanır.

Kullanmadan hemen önce, kullanılacak her 100 mL stok solüsyona 5 mL glasiyal asetik asit eklenir.

Schaudinn fiksatifi (Bakır Sülfat Modifikasyonu)

Doymuş bakır sülfat solüsyonu

Bakır sülfat (CuSO ₄ .5H ₂ O)	20 g
Distile/deiyonize su	1000 mL

Bakır sülfat, distile su içinde ısıtarak eritilir. Solüsyon soğumaya bırakılır ve cam kapaklı şişede kullanıncaya kadar saklanır.

Schaudinn fiksatifi (Bakır sülfat modifikasyonu)

Doymuş bakır sülfat solüsyonu	600 mL
Etil alkol (%95'lik)	300 mL
Gliserin	15 mL
Glasiyal asetik asit	5 mL

Doymuş bakır sülfat solüsyonu, etil alkol ve gliserin ile karıştırılır. Kullanıncaya kadar saklanır.

Kullanmadan hemen önce, kullanılacak her 100 mL stok solüsyona 5 mL glasiyal asetik asit eklenir.

PVA fiksatif

Modifiye Schaudinn fiksatif

Cıva klorür (HgCl ₂) kristalleri	4.5 g
Etil alkol (%95'lik)	31 mL
Glasiyal asetik asit	5 mL

Cıva klorür, %95 etil alkol içinde eritilir. Glasiyal asetik asit yavaşça eklenir. Solüsyon oda ısısında saklanır.

PVA karışımı

PVA tozu	5 g
Gliserin	1.5 mL
Distile/deiyonize su	62.5 mL

Gliserin ve PVA tozu bir havan içinde cam bir çubukla bütün partiküller gliserin ile kaplanana kadar karıştırılır. Bu karışıma distile su eklenir. Karışım cam behere konur, kapağı kapatılır ve oda ısısında bir gece bekletilir.

PVA Fiksatif

Sıcak su banyosu 70-75°C'ye ısıtılır.

PVA karışımı içeren cam beher sıcak su banyosunda 10 dk bekletilir.

PVA tozunun çoğu eridiğinde, modifiye Schaudinn fiksatif solüsyonu eklenir, dairesel hareketlerle karıştırılır.

PVA tamamen eriyene kadar birkaç dakika daha döndürmeye devam ederek, hava kabarcıklarının çıkmasına izin verilir.

Beher ısıtıcıdan alınıp, soğumaya bırakılır, cam kapaklı bir şişede saklanır.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Dışkı Örneklerinin Parazitolojik İncelemesi) ayrıca aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir. Özellikle, inceleme örneklerinden direkt mikroskopi, yoğunlaştırma ve boyama yöntemlerinin yapılması hakkında yeterli bilgi için bu belgelere bakılması önerilir:

UMS P-TP-01	Mikroskop kalibrasyonu
UMS P-TP-02	Direkt mikroskopi
UMS P-TP-03	Yoğunlaştırma yöntemleri
UMS P-TP-04	Trikrom boyama
UMS P-TP-05	Modifiye Kinyoun asit-fast boyama
UMS P-MT-01	Amibiyazın mikrobiyolojik tanısı
UMS P-MT-02	<i>Giardia intestinalis</i> 'in mikrobiyolojik tanısı
UMS P-MT-03	<i>Cryptosporidium</i> türlerinin mikrobiyolojik tanısı
UMS P-MT-09	Trişinozun mikrobiyolojik tanısı
UMS P-MT-10	Şistozomiyazın (üriner) mikrobiyolojik tanısı

Kaynaklar

- 1 T.C. Sağlık Bakanlığı (Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi TR0802.16-01 Avrupa Birliği ve Dünya Bankası desteği ile) (Akbaş E, Pr Danışmanı). Türkiye'de Bulaşıcı Hastalıkların Tanısında Mikrobiyoloji Laboratuvar Kapasitesi Mevcut Durum Değerlendirmesi: Anket - LabKap2012. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kuşadası, 4 Kasım 2012.
- 2 Shimizu RY, Grimm F, Garcia LS, Deplazes P. Specimen collection, transport, and processing. *In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds). Manual of Clinical Microbiology. 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 2047-2063*
- 3 Limoncu E, Ok ÜZ. Taze dışkı örneğinin toplanması, tespit edilmesi ve nakli. *In: Korkmaz M, Ok ÜZ (eds). Parazitolojide Laboratuvar. 1. baskı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, Meta Basım, İzmir. 2011, p. 9-16*
- 4 <http://medinfo.ufl.edu/year2/mmid/bms5300/cases/a30a.html> (son erişim tarihi: 19.12.2013)
- 5 Garcia LS. Collection, preservation, and shipment of fecal specimens. *In: Garcia LS. (ed). Diagnostic Medical Parasitology. 5th ed. ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 761-781*
- 6 Garcia LS. Macroscopic and microscopic examination of fecal specimens. *In: Garcia LS (ed). Diagnostic Medical Parasitology. 5th ed. ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 782-730*
- 7 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. *In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.2.1-4*
- 8 CDC. DPDx - Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern. <http://www.cdc.gov/dpdx/diagnosticProcedures/stool/specimenproc.html> (son erişim tarihi: 22.01.2014)
- 9 Ash LR, Orihel TC (eds). Parasites: A Guide to laboratory procedures and identification. ASCP Press, Chicago. 1987, p. 7-52
- 10 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 11 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004. <http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 12 Kaplan RL. Microscopic examination of fecal specimens: permanent stained smear (Trichrome). *In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.6.1 - 9.3.6.6*
- 13 CDC. DPDx - Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern. <http://www.cdc.gov/dpdx/diagnosticProcedures/stool/specimencoll.html> (son erişim tarihi: 22.01.2014)



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Diğer İntestinal Örneklerin (anal, duodenal, sigmoidoskopik) Parazitolojik İncelemesi

Hazırlayan Birim	Klinik Parazitoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Parazitoloji
Bölüm	Örnek Yönetimi
Standart No	P-ÖY-02
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
TEKNİK BİLGİLER	4
1 Örneklerin alınması	4
2 İnceleme için asgari laboratuvar koşulları	6
3 Duodenal ve sigmoidoskopik örneklerin parazitolojik incelemesi için akış şeması.....	8
4 Örneklerin incelenmesi	8
5 Bulguların değerlendirilmesi/yorumlanması ve raporlama..	11
6 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	12
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	12
KAYNAKLAR.....	13

Kapsam ve Amaç

Enterobius vermicularis enfeksiyonunun tanısında bilinen dışkı inceleme yöntemleri çoğu kez sonuç vermez ve perianal bölgeden selofan bant ile alınan örneklerde tanı duyarlılığı en yüksektir. Öte yandan *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp, *Cystoisospora belli*, *Microsporidia*, *Fasciola hepatica*, *Strongyloides stercoralis* ve *Entamoeba histolytica* gibi barsak patojenleri dışkı örneklerinde saptanamadıklarında duodenal ve/veya sigmoid bölgelerden alınan örneklerin de incelenmesi gerekebilir.

Bu UMS'de de dışkı haricindeki intestinal örneklerde paraziter etkenlerin araştırılmasında doğru ve güvenilir bir tanı için örneklerin alınmasından sonucun değerlendirilmesine kadarki süreç adımlarının verilmesi hedeflenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

PVA Polivinil alkol (fiksatif)

SAF Sodyum asetat - asetik asit – formol (fiksatif)

Genel Bilgi

Kalın bağırsakta yaşayan *Enterobius vermicularis*'in dişi erişkinleri gece perianal bölgeye çıkararak yumurtalarını bırakırlar. Bu nedenle yumurtalar bilinen dışkı inceleme yöntemlerinde nadiren saptanabilirler. Selofan (anal) bant yöntemi enterobiyaz (kıl kurdu) enfeksiyonlarının tanısında en sık kullanılan ve en uygun yöntemdir (1).

Duodenal ve sigmoidoskopik örneklerin paraziter enfeksiyonların tanısı için incelenmesi sık kullanılan tanı metotları arasında değildir. Bununla birlikte dışkı incelemelerinde etkenin tanımlanamadığı durumlarda duodenal/sigmoidoskopik örneklerin incelenmesine başvurulabilir. Öte yandan, günümüzde dışkıda parazit antijenleri saptamaya yönelik testlerin yaygınlaşması duodenal sıvı aspirasyonu ve sigmoidoskopi gibi invaziv metotların daha nadir kullanımına yol açmıştır (2).

Duodenuma yerleşen bazı organizmaların dışkı örneklerinde saptanması zor olabilmektedir. Paraziter enfeksiyonun düşünüldüğü fakat çok sayıda dışkı incelemesi negatif bulunan hastalarda nazogastrik entübasyon veya duodenal kapsül yöntemi (String test) ile duodenumdan alınacak örnek incelenebilir. Kronik böbrek yetmezlikli çocuklarda dispepsi etiyolojisinde *Helicobacter pylori*'nin araştırılması için kullanılan duodenal kapsül yöntemiyle *Cryptosporidium* spp %16, *Cystoisospora belli* ise %9 sıklık ile saptanmıştır (3). Ülseri olmayan dispepsili hastaların dışkı ve duodenal aspirat örneklerinde *Giardia intestinalis*'in araştırıldığı bir çalışmada ELISA testinin her iki örnekte de mikroskopik incelemeden daha duyarlı olduğu gözlenmiştir (4). *Strongyloides stercoralis*'e bağlı duodenal obstrüksiyonlar ve kanamaların bildirildiği olgular mevcuttur. Bu olgularda tekrarlayan dışkı incelemeleri negatif olmasına rağmen patolojik kesitlerde ve aspirasyon sıvılarında parazitin belirlendiği bildirilmiştir (5,6).

Üst gastrointestinal sistem yakınmalı hastalarda yapılan endoskopiler sırasında alınan duodenal sıvının parazitolojik incelemesiyle Afrikalı AIDS olgularında *G.intestinalis* %22, *Cryptosporidium* spp %5 sıklıkla saptanmıştır (7).

Kolonun biyopsisi ile intestinal amibiyazın tanısı özellikle dışkıda parazit antijenlerini saptayan ELISA testlerin rutin uygulamaya girmesi nedeniyle günümüzde tercih edilmemektedir. Ancak farklı intestinal hastalıkların tanısı amacıyla alınan biyopsi örneklerinin incelenmesi sırasında tesadüfen amibiyaza rastlanabilmektedir (8). Sigmoidoskopik örneklerde *E. histolytica* trofozoitlerinin görülebilmesi için direkt preparatlarının hemen incelenmesi gerekmektedir (2).

Teknik Bilgiler

1 Örneklerin alınması

1.1. Güvenlik önlemleri

Her türlü klinik örnek "enfeksiyöz" kabul edilmeli ve örnekleri alan ve taşıyan personel standart güvenlik önlemlerine uymalı, daima eldiven ve diğer uygun kişisel koruyucu donanımı kullanmalıdır. Bu önlemler, klinik örnekler koruyucu maddelerle fiske edilmiş olsa bile alınmalıdır, çünkü hala enfeksiyöz olabilirler.

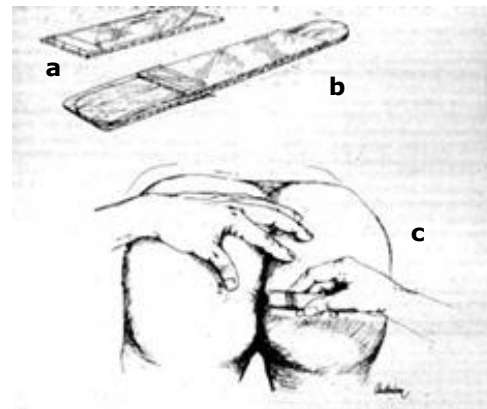
1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Anal bant hasta sabah ilk tuvaletine gitmeden önce alınması gereken bir örnektir. Bu nedenle işlemin evde yapılması ve örneğin hasta yakını (anne) tarafından alınması kaçınılmazdır. Bilgilendirme testi isteyen hekimin veya laboratuvar personelinin sorumluluğudur; örneğin nasıl alınacağı ve dikkat edeceği güvenlik hususları (eldiven ve el yıkama) anneye anlaşılır bir şekilde tarif edilmelidir.

Duodenal ve sigmoidoskopik örneklerin alınması hekimin sorumluluğudur. Müdahale odası şartlarında eğitilmiş ve deneyimli bir hekim tarafından gerçekleştirilmelidir. Alınan örneklerin uygun fiksatifte konarak uygun bir şekilde gönderilmesi konusunda bilgilendirme laboratuvar personelinin sorumluluğudur.

1.3. Selofan bant yöntemi ile örnek alma prosedürü

- *E.vermicularis* yumurtalarını saptamak için en uygun yöntemdir.
- Gerekli malzemeler (selofan bant, lam ve abeslang) hasta yakınına temin edilir. Bu amaç için hazır ticari ürünler de bulunmaktadır.
- Bant, hasta sabah uyandıktan sonra tuvalete gitmeden ya da anal bölge yıkanmadan önce uygulanmalıdır.



Şekil 1. Graham'ın selofan bant yöntemi (1)

- Yaklaşık 7-8 cm selofan bant lamın rodajlı kısmından 1.5 cm dışa taşacak (serbest uç) ve diğer ucu da katlanarak lamın alt kısmına yapışacak (sabit uç) şekilde lam üzerine yapıştırılır (Şekil 1a).
- Her iki ele eldiven giyilir. Bandın sabit ucunun olduğu taraftan lamın alt kısmına 2 cm dışa taşacak şekilde paralel olarak bir abeslang yerleştirilir (Şekil 1b).
- Bant serbest ucundan kaldırılıp soyularak abeslang üzerinden, yapışkan kısım dışa gelecek şekilde arka kısma doğru döndürülür.
- Abeslangın ucu (bandın yapışkanlı tarafı) perianal bölgenin sağ ve sol kısımlarına ve anal deliğin pilili bölgelerine değdirildikten sonra (Şekil 1c), yapışkanlı kısım lamın üzerine geri yapıştırılır.

1.4. Duodenal aspirat örneğinin alınması

- Duodenal örnekler *S. stercoralis* larvaları, *G. intestinalis* trofozoitleri, *Cryptosporidium* spp, ve *Cystoisospora* ookistlerinin varlığı açısından incelenir. Nadir de olsa örneklerde *F. hepatica* yumurtaları görülebilir. Örnekler *Microsporidia* sporlarının varlığı açısından da incelenebilir.
- Duodenal materyal nazogastrik entübasyon ile sıvı aspire ederek veya duodenal kapsül yöntemi (String test, Entero-test kapsül) ile elde edilir.
- İnceleme için >0.5 mL duodenal aspirasyon sıvısı yeterli olabilir. Örnek laboratuvara ağzı vidalı kapaklı bir tüp içerisinde gönderilmelidir (9).
- Parazitolojik inceleme için duodenal biyopsi örneği de alınabilir. Biyopsi örneği 30 dk içerisinde incelenemeyecekse iki tüpe ayrılır; birine kurumayı önlemek için ~1 mL steril SF, diğerine %10'luk formalin ilave edilir; tüpler birlikte laboratuvara gönderilir.
- String-test ise bir ipin ucuna bağlı kapsülün yutturularak duodenuma ulaştırılması prensibi ile çalışır. İpin ucu hastanın yanağına veya boynuna sabitlendikten sonra entero-test kapsül hastaya yutturulur. Bu süre içinde hasta herhangi bir şey yememeli, dinlenmelidir. 4 saat sonra kapsül geri çekilir. Kapsül steril vida kapaklı bir tüpün içine konarak laboratuvara gönderilir; 30 dk içinde incelenemeyecekse, kurumayı önlemek için ~1mL steril SF eklenmelidir (10).

1.5. Sigmoidoskopik örneklerin alınması

- İntestinal amibiyaz şüpheli olgularda en az üç dışkı örneğinde sonuç alınamadığı (*E.histolytica* saptanamadığı) durumlarda sigmoidoskopik materyalin incelenmesi tanıya yardımcı olabilir (11,12).
- Eğer mümkünse laboratuvar uzmanı işlemde hazır bulunmalıdır ve örneklerin direkt mikroskopik incelemesini hemen yapmalıdır. Fiksatif (Schaudinn veya PVA) içeren kaplarla birlikte bir laboratuvar teknisyenin de örnek alınırken bulunması sağlanmalıdır.
- Örnekler sigmoid kolonun ülserli alanlarından alınır. Örnek aspirasyon veya kazıntı yapılarak alınmalıdır. **Asla** eküvyon kullanılmaz!
- Belirgin lezyon yoksa mukozadan rastgele örnek alınır.
- Örnekler mukozal kesitler, mukus, dışkı içerebilir.

- En az 6 ayrı noktadan parça doku ve 1-2 mL dışkı/mukus içermelidir.
- Alınan örneklerden hemen mukus, dışkı ve biyopsi parçaları için ayrı ayrı olacak şekilde (mümkünse) lamların üzerine yaymalar yapılır.
- Kalanı steril, vida kapaklı bir tüpe konur. Preparatlar ve tüpler laboratuvara gönderilir. Tüp içindeki örneklerin kurumasına izin verilmemelidir! Gerekirse üzerine 1-2 mL serum fizyolojik eklenebilir. Sigmoidoskopik örnekler için formol içeren tüp kullanılmaz!
- Örnek miktarı çok az ise tek inceleme yöntemi seçilmeli ve PVA fiksatifinde laboratuvara ulaştırılmalıdır.
- Örnek miktarı *Cryptosporidium* spp ve *G. intestinalis* için antijen arama testlerin yapılmasına da yetecek kadar ise laboratuvara taze olarak gönderilmeli ve teste kadar -20°C'de saklanmalıdır.
- *E. histolytica* için özgül antijen saptayan kitlerin taze veya donmuş örneklerde kullanılması tanı için diğer bir seçenektir.

1.6. Örneklerin taşınması

- Selofan bantlı lam plastik Petri kabı ya da bir kutu içerisine konularak laboratuvara teslim edilir (1).
- Duodenal ve sigmoidoskopik örnekler mümkünse ikiye bölünmeli; bir kısmı taze olarak bir kısmı da %10 formalin (duodenal) ya da PVA (sigmoidoskopik, duodenal) içine konarak laboratuvara iletilmelidir.
 - (a) Taze örnekler ≤ 30 dk oda sıcaklığında veya < 24 saat $+4^{\circ}\text{C}$ 'de korunabilir, taşınabilir. Antijen arama testlerinde kullanılacak taze örnekler 1 hafta kadar buzdolabında saklanabilir. Daha uzun süreli saklama için derin dondurucuya (-20°C) konmalıdır.
 - (b) Fiksatif içinde örnekler oda sıcaklığında taşınabilir; 72 saat içinde laboratuvara iletilmelidir.

2 İnceleme için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

Potansiyel enfeksiyöz organizmalar içerebileceği için parazitolojik inceleme örnekleri ile ilgili testler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmeli ve daima "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi"nde belirtilen standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır.

Örnekler koruyucu maddelerle fikse edilmiş olsalar bile bu önlemler alınmalıdır; çünkü hala enfeksiyöz olabilirler. Bazı parazit ookist ve kistleri formol solüsyonu ile fikse edildikten günler, hatta haftalar sonra canlılıklarını yitirirler; örneğin, *Ascaris lumbricoides* yumurtaları formolde saklandığında bile gelişmeye devam edebilir ve enfeksiyözdür.

Boyanmış olsun veya olmasın bütün lamlar **kesici-delici atık** kabul edilir ve kesinlikle kesici-delici atık kutusuna atılırlar! Diğer biyolojik kirlilerin bulunduğu torbalara atılmaları halinde torbayı deler ve ciddi enfeksiyöz risk oluştururlar!

Güvenlik uyarısı! Metanol yüksek düzeyde toksik ve parlayıcıdır. Eğer yutulacak olursa (herhangi bir miktarı) körlüğe ve hatta ölüme neden olabilir. Kullanım harici zamanlarda metanol şişesi kilitli bir dolapta tutulmalıdır!

Kullanılan bazı fiksatiflerde bulunan cıva kanserojendir! İlgili kimyasal güvenlik tedbirleri alınarak kullanılmalıdır.

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

İnvaziv metot kullanılarak alınmış örneklerle ait preparatlar en kısa sürede ve **mutlaka** Tıbbi Mikrobiyoloji/Tıbbi Parazitoloji Uzmanı tarafından bizzat incelenmeli, değerlendirilmeli ve sonuçlandırılmalıdır.

Ayrıca, ilgili laboratuvar personeli; (i) tekniklerin uygulanmasından önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) tekniklere tüm yönleriyle aşina olmalı ve (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

2.3. Reaktif, Kit, Donanım

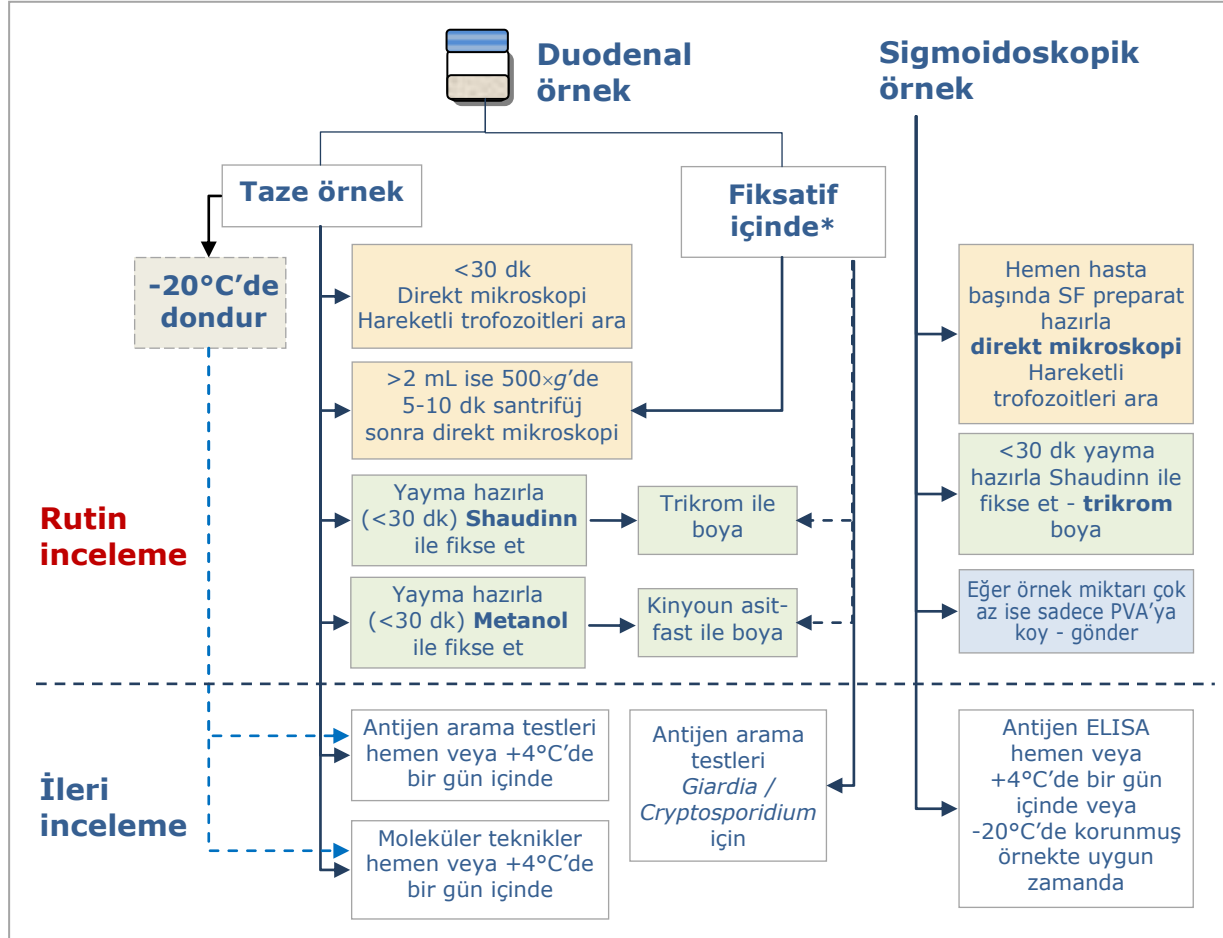
Dışkının rutin parazitolojik incelemesi için gerekli gereç ve donanım burada da geçerlidir. Belli başlıları:

- SF ve Lugol (*bkz.* UMS, P-TP-02)
- %5-10'luk formol, metanol ve diğer fiksatifler (*bkz.* UMS, P-ÖY-01)
- Trikrom boyası reaktifleri (*bkz.* UMS, P-TP-04)
- Modifiye Kinyoun asit-fast boyama reaktifleri (*bkz.* UMS, P-TP-05)
- *E. histolytica* tanımlanması için EIA kiti (*bkz.* UMS, P-MT-01)
- *Cryptosporidium* spp ve *Giardia intestinalis* için DFA/EIA /hızlı tanı kitleri (*bkz.* UMS, P-MT-02 ve P-MT-03)
- Mikroskop, binoküler (rutin) – 10× (düşük), 40× (yüksek kuru), 100× (immersiyon) objektifleri ve 10× oküleri olan (13).
- Ayrıca, uygulanacak immünoagnostik tekniğe göre ELISA okuyucusu ve/veya floresan mikroskop (20×, 40× kuru ve 100× immersiyon objektifleri, 10× oküleri ve FITC konjugat için uygun filtreleri olan)

2.4. Kalite kontrol

- Her yeni hazırlanan boya seti/kit lotu veya ticari reagentler, kullanıma sokulmadan önce pozitif kalite kontrol örnekleri ile test edilmelidir. Kitlere dayalı testlerde daima kitin pozitif ve negatif kontrolleri kitin talimatına göre teste dahil edilmelidir. Laboratuvar aynı zamanda kendi kalite kontrol örneklerine sahip olmalı ve testlere dahil etmelidir.
- Pozitif olduğu bilinen boyalı preparatlar, fotoğraflar ve kaynak kitaplar çalışma yerinde mevcut olmalıdır.
- Mikroskop belirli aralıklarla (yoğun kullanılıyorsa yılda en az bir kez) kalibre edilmelidir. Mikroskoba herhangi bir parça eklenmesi veya değiştirilmesi durumunda da kalibrasyon yapılmalıdır. Kalibrasyon için kullanılmış optikler mikroskobun üzerinde olmalıdır. Tüm objektifler için kalibrasyon faktörleri göz önündeki bir panoda asılı olmalıdır (*bkz.* UMS, P-TP-01 Mikroskop Kalibrasyonu) (13).
- Bütün kalite kontrol sonuçları kaydedilmelidir.

3 Duodenal ve sigmoidoskopik örneklerin parazitolojik incelemesi için akış şeması



Şekil 2. Duodenal ve sigmoidoskopik örneklerin incelenmesi için akış diyagramı.

* Hemen incelenemeyecek örnekler direkt inceleme için %5-10 formol içerisine, boyalı preparat hazırlanması için de Schaudinn, SAF ve/veya PVA fiksatifleri içine alınmalıdır. Antijen arama testleri için kullanılacaksa örnek %10'luk formole konmalıdır.

4 Örneklerin incelenmesi

4.1. Örneklerin laboratuvara kabulü

- Duodenal örneğin sarı renkte olmasına dikkat edilmelidir. Bu örneğin duodenumdan alındığını doğrular ve safrayla boyandığını gösterir.
- Laboratuvara gelen örnekler "ret kriterleri" göz önüne alınarak değerlendirilir. Aşağıdaki örnekler, parazitolojik inceleme yapılması uygun olmadığı için ret edilir:
 - (a) Örnek kabı üzerinde hasta bilgileri yazılı olmayan veya hastaya ait uygun bir istek formu düzenlenmemiş örnekler.
 - (b) Uygun olmayan bir kaba (kibrit kutusu vb.) alınmış, kabın dışına sızmış veya taşıma kabı hasar görmüş örnekler,

- (c) Miktarı çok az veya beklemiş, kurumuş örnekler,
- (d) Önerilen süre içerisinde, uygun ısıda gönderilmemiş örnekler; dondurulmuş (antijen testleri ve moleküler testler hariç) veya inkübatörde bekletilmiş örnekler.
- Örnekler ve hastaya ait tüm bilgiler, Hastane Bilgi Yönetim Sistemi ve/veya Laboratuvar Bilgi Sistemi gereklerine göre kayıt altına alınır. Çocuk hastalarda veya iletişim kurulamayan debil hastalarda, hasta yakınına ait aşağıdaki bilgiler de kayıt edilmelidir:
 - (a) Kişinin adı, soyadı, cinsiyeti,
 - (b) Hastaya yakınlık derecesi,
 - (c) Kısaca adresi
- Örnekler analiz için laboratuvarın ilgili bölümüne sevk edilmeli; bu arada örnek karışmalarını önleyecek tedbirler alınmalıdır.

4.2. Örneklerin incelemeye hazırlanması

Duodenal örnekler

- Taze örnekler laboratuvara ulaştığında bir saat içinde incelenmelidir.
- Hemen incelenemeyecek örnekler direkt inceleme için %5-10 formol içerisine, boyalı preparat hazırlanması için de Schaudinn, SAF ve/veya PVA fiksatifleri içine alınmalıdır.
- Örnek >2 mL ise 500 × g'de 5-10 dk santrifüj edilmelidir (2,9,14).

Sigmoidoskopik örnekler

- Örneklerin incelenmesi mümkünse hasta başında yapılmalı, mümkün değilse kurumaması için üzerine 0.5-1 mL SF eklenerek laboratuvara ulaştırılmalı ve 30 dk içinde incelenmelidir.
- Alınan materyalden hasta başında lamlara yaymalar hazırlanabilir.
- Kalıcı boya yapmak için örnekler Schaudinn veya PVA fiksatifleri içine alınmalıdır (1,11,12,14)

4.3. Selofan bant örneklerinin incelenmesi

- Alınan örnekler laboratuvara ulaştığında bir saat içinde incelenmelidir. Hemen incelenemeyecek örnekler 24 saate kadar +4°C'de saklanabilir.
- Selofan bantlı lam, 10× objektif ile kısık ışıkta ve kondansatör aşağıda tutularak incelenir. Farklı günlerde yapılan inceleme ile en az dört negatif sonuç alınması halinde şüpheli tanıdan uzaklaşılabilir.
- Yumurtaların daha iyi görünmesini sağlamak amacıyla, bant bir ucundan kaldırılarak orta kısma bir damla toluen ya da ksilen damlatılır ve bant tekrar eski yerine yapıştırıldıktan sonra incelenir.
- Yumurtalar oval, kalın çeperli, bir kenarı hafif yandan basık "D" harfi şeklindedir (Şekil 3).
- Yumurtalar yumurtlandıktan birkaç saat sonra enfektif hale geldiği için, lamdaki yumurtalar gelişmiş bir embriyo içerebilir.



Şekil 3. *E. vermicularis*'in erişkin ve yumurtaları (15)

- Bantta erişkin dişilere de rastlanabilir. Bunlar yaklaşık 1 cm, krem ya da beyaz renkte, sivri kuyruklu görünümündedir (Şekil 3).

4.4. Duodenal örneklerin incelenmesi

- Santrifüj sonrası çökeltiden SF-Lugol preparatı hazırlanarak incelenmelidir (bkz. UMS P-TP-02).
- 10× objektif tüm lamel alanı ve 40× objektifle de en az lamın 1/3'ü parazit yumurta, larva ve trofozitler için incelenmelidir.
- Duodenal sıvı mukus içerebilir ve parazitler genellikle mukus içerisinde olmaya eğilimlidirler. Bu nedenle santrifüjlenmiş mukus sedimentinin incelenmesi de önemlidir (9).
- Örnek mukoid ise lam üzerine bir damla SF eklendikten sonra örnek alınarak lamel kapatılmalıdır.
- *G. intestinalis* trofozoitleri için tarif edilen "düşen yaprak" hareketi, fiksatif uygulanmayan taze preparatlarda nadiren görülmektedir.
- Parazit mukus iplikleri arasında yakalanabilir, bu durumda daha çok kamçısının dalgalanması gözlenebilir.
- Yeterli örnek varlığında **yayma preparat hazırlanarak** hemen Schaudinn fiksatifi içeren şaleye yerleştirilir ve trikrom boyama yapılır (bkz. UMS, P-TP-04) ve/veya hazırlanan yayma preparat havada kurutulduktan sonra metanol ile tespit edilip modifiye Kinyoun asit-fast boyama ile boyanır (bkz. UMS, P-TP-05).
- *Cryptosporidium* spp DFA yöntemi için hazırlanan preparatlar floresan mikroskopunda 40× objektif ile incelenir (bkz. UMS, P-MT-03) (2).

4.5. Sigmoidoskopik örneklerin incelenmesi

- Örnekler hemen incelenmelidir.
- Alınan örnekten SF ile hazırlanan preparat mikroskopik olarak 10× ve 40× objektifler ile incelenir. Bu şekilde hareketli *E. histolytica/dispar* trofozoitleri görülebilir.
- Hasta başında alınan örneklerden yapılan yaymalar Schaudinn fiksatifi ile tespit edildikten sonra trikrom boyama (bkz. UMS, P-TP-04) yapılabilir.
- Boyalı preparatlar 100× immersiyon objektifi ile mikroskopik olarak incelenir. *E. histolytica/dispar* trofozoitleri görülebilir (2,12).

5 Bulguların değerlendirilmesi/yorumlanması ve raporlama

- İnvaziv yöntemlerle alınmış örneklere ait preparatlar en kısa sürede ve **mutlaka** Tıbbi Mikrobiyoloji/Tıbbi Parazitoloji Uzmanı tarafından bizzat incelenmeli, değerlendirilmeli ve sonuçlandırılmalıdır.
- Rapor klinisyene yönelik hazırlanmalıdır.
- Raporda incelemenin hangi teknik(ler) kullanılarak yapıldığı mutlaka yer almalıdır!
- Raporda görülen/saptanan parazitin adı ve formu yazılmalıdır.
 - (a) *Giardia intestinalis* kistleri ve trofozoitleri direkt incelemede tanınabilir. Bunlar "*Giardia intestinalis* kistleri (ve/veya trofozoitleri) görüldü" şeklinde rapor edilir.
 - (b) Direkt mikroskopik inceleme intestinal amibiyaz tanısında geçerli bir yöntem değildir. Bunun nedeni, patojen *E.histolytica*'nın, direkt mikroskopik inceleme ile non-patojen, *E.dispar*'dan ayırt edilmesinin mümkün **olmamasıdır!** Direkt mikroskopi sonucuna göre *E. histolytica* rapor **edilmemelidir!**
 - (c) Trikróm boyanmış preparatlarda **eritrosit fagosite etmiş** *E.histolytica* trofozoitlerinin ve/veya kistlerinin görülmesi güçlü bir şekilde amibiyaz lehine yorumlanır.
NOT: Ancak bu sonucun özgül *E.histolytica* Ag ELISA veya PCR ile doğrulanması gereklidir!
 - (d) Trikróm boyamada *Cryptosporidium* ookistleri mayalardan ayırt edilemezler. *Cryptosporidium* şüphesi varsa (özellikle sulu dışkı örneklerinde) modifiye Kinyoun asit-fast boyanmalıdır.
- Saptanan insana ait hücreler bildirilmelidir (ör., orta düzeyde lökosit, bol eritrosit, az makrofaj, nadir Charcot-Leyden kristalleri vb.).
- *E. histolytica*, *Giardia intestinalis* ve *Cryptosporidium* spp ülkemizde **laboratuvar**dan bildirim zorunlu etkenlerdir (16,17). Bunlardan birine tanı koyulması halinde olguların kayıt ve bildirim için Sağlık Bakanlığının "Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi" izlenmelidir (17).
- Pozitif kalıcı preparatlar pozitif kontrol olarak saklanmalıdır. Gerekli bilgiler lam üzerine yazılmalı ve bir arşivleme sistemi kurulmalıdır.

İnvaziv yöntemle alınmış örnek mutlaka ve en kısa zamanda bizzat uzman tarafından incelemeye hazırlanıp değerlendirilmelidir!

Entamoeba histolytica direkt mikroskopik inceleme sonucuna göre rapor edilmemelidir! Kesin rapor için en azından trikróm boyama uygulanmış olmalıdır.

6 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Duodenal ve sigmoidoskopik örneklerin invaziv işlemler uygulanarak, eğitilmiş ve deneyimli bir hekim tarafından alınması gerekliliği kullanımını sınırlar. Ancak kuvvetle şüpheli paraziter enfeksiyonlarda rutin dışkı incelemelerinin negatif olması durumunda tercih edilirler.
- Direkt bakılarının kısa süre içinde değerlendirilmesi gerekmektedir.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Diğer İntestinal Örneklerin Parazitolojik İncelemesi) ayrıca aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir. Özellikle, inceleme örneklerinden direkt mikroskopi ve boyama yöntemlerinin yapılması hakkında yeterli bilgi için bu belgelere bakılması önerilir:

UMS P-ÖY-01	Dışkı örneklerinin parazitolojik incelemesi
UMS P-TP-01	Mikroskop kalibrasyonu (oküler mikrometre ile)
UMS P-TP-02	Dışkı örneklerinin direkt mikroskopik incelemesi
UMS P-TP-03	Dışkı örneklerinin yoğunlaştırma yöntemleri
UMS P-TP-04	Trikrom boyama
UMS P-TP-05	Modifiye Kinyoun asit-fast boyama
UMS P-MT-01	Amibiyazın mikrobiyolojik tanısı
UMS P-MT-02	<i>Giardia intestinalis</i> 'in mikrobiyolojik tanısı
UMS P-MT-03	<i>Cryptosporidium</i> türlerinin mikrobiyolojik tanısı

Kaynaklar

- 1 Akısu Ç, Özkoç S. Diğer dışkı inceleme yöntemleri. *In: Korkmaz M, Ok ÜZ (eds). Parazitolojide Laboratuvar*. 1. baskı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, Meta Basım, İzmir. 2011, p.41-53
- 2 Garcia LS. Examination of other specimens from the intestinal tract and the urogenital system. *In: Garcia LS (ed). Diagnostic Medical Parasitology*. 5th ed. ASM Press, Washington D.C. 2007, p.850-858
- 3 El-Refaey AM, Abdelbasset A, Atia G, Matar M, Awad SI, Yahya RS. Duodenal microbiasis in children on regular hemodialysis. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2012;23(6):1278-80
- 4 Abulhasan M, Elshazly TA, Eida M, Albadry A. *Giardia intestinalis* in patients with non ulcer dyspepsia. *Arab J Gastroenterol* 2013;14(3):126-9
- 5 Cruz RJ Jr, Vincenzi R, Ketzer BM. Duodenal obstruction -an unusual presentation of *Strongyloides stercoralis* enteritis: a case report. *World J Emerg Surg* 2010;10(5):23
- 6 Bhatt BD, Cappell MS, Smilow PC, Das KM. Recurrent massive upper gastrointestinal hemorrhage due to *Strongyloides stercoralis* infection. *Am J Gastroenterol* 1990;85(8):1034-6
- 7 Elshazly MA, Serwadda DM, Freers J. Endoscopic study of African AIDS patients with upper gastrointestinal symptoms. *East Afr Med J* 1994;71(8):496-500
- 8 Pai SA. Amebic colitis can mimic tuberculosis and inflammatory bowel disease on endoscopy and biopsy. *Int J Surg Pathol* 2009;17(2):116-21
- 9 Cook-White JH. Duodenal Contents: Duodenal Aspirate. *In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.6.5.1 – 4
- 10 Cook-White JH. Duodenal Contents: String Test (Entero-Test Capsule). *In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.6.4.1 – 4
- 11 Garcia LS. Sigmoidoscopy Specimen: Direct Wet Smear. *In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.6.2.1 - 4
- 12 Garcia LS. Sigmoidoscopy Specimen: Permanent Stained Smear. *In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.6.3.1 - 3
- 13 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. *In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.2.1 - 4
- 14 Özensoy Töz S. Aspirasyon, vücut sıvıları ve idrar incelemeleri. *In: Korkmaz M, Ok ÜZ (eds). Parazitolojide Laboratuvar*. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, Meta Basım, İzmir. 2011, p.55-62
- 15 CDC. <http://www.cdc.gov/parasites/pinworm/> (son erişim tarihi: 19.12.2013)
- 16 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 17 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004. <http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Kan ve Kemik İliği Örneklerinin Parazitolojik İncelemesi

Hazırlayan Birim	Klinik Parazitoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Parazitoloji
Bölüm	Örnek Yönetimi
Standart No	P-ÖY-03
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
TEKNİK BİLGİLER	5
1 Örneklerin alınması.....	5
2 İnceleme için asgari laboratuvar koşulları.....	9
3 Kan ve kemik iliği örneklerinin parazitolojik incelemesi için akış şeması	10
4 Örneklerin incelenmesi	11
5 Bulguların değerlendirilmesi ve raporlama	14
6 Olası sorunlar/kısıtlılıklar	14
EKLER.....	15
Ek-1 QBC (kantitatif `buffy-coat')	15
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	16
KAYNAKLAR.....	16

Kapsam ve Amaç

Bu UMS'nin amacı; kan ve kemik iliği örneklerinin öncelikle Türkiye'de daha sık görülen ve bildirim zorunlu parazitler açısından mikroskopi, kültür ve diğer yöntemlerle hızlı ve doğru olarak incelenebilmesidir.

Bu UMS, kan ve kemik iliğinde bulunan parazitler etkenlerin araştırılması amacıyla örnek alınması, taşınması ve ön işlem aşamasına ilişkin işlemleri kapsamaktadır.

Kısaltmalar ve Tanımlar

buffy-coat	Santrifüj edilmiş antikoagülanlı kanın eritrosit tabakası ve plazması arasında kalan ve beyaz kan hücrelerini içeren (bulutsu) katmanı.
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
NNN	Novy-Nicolle- McNeal besiyeri (<i>Leishmania</i> spp besiyeri)
QBC	Kantitatif 'buffy-coat'; başta <i>Plasmodium</i> spp olmak üzere kan parazitlerinin tanısında kullanılan ve akridin oranj ile boyamayı esas alan bir tarama yöntemi

Genel Bilgi

Plasmodium spp, *Babesia* spp, *Leishmania* spp, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma* spp ve mikrofilaryalar gibi pek çok parazit yaşam döngülerinin bazı dönemlerinde kanda saptanabilirler. Bunlardan *Plasmodium* spp'nin neden olduğu sıtma ve *Leishmania* spp'nin neden olduğu kala azar Türkiye'de bildirim zorunlu hastalıklardır (1,2).

Plasmodium spp ve *Babesia* spp eritrositler içerisinde bulunurken, *Trypanosoma* spp ve mikrofilaryalar eritrositlerin dışında; *Leishmania* spp ve *T. gondii* çoğunlukla lökositler içerisinde görülür. Kemik iliği örneklerinde ise *Leishmania* spp, *Plasmodium* spp ve *Trypanosoma cruzi* saptanabilmektedir (3).

Kanda çoğunlukla az sayıda olan *Trypanosoma* spp ve mikrofilaryalar, taze kanda saptanmalarını kolaylaştıracak şekilde hareketlidirler. Bununla beraber, tüm kan parazitlerinin tanımlanması, boyalı ince yayma ve kalın damla kan preparatlarının incelenmesi ile yapılır. Bu preparatlar ya tam kan (kapiller kan) ya antikoagülanlı venöz kandan ya da *Trypanosoma* spp ve mikrofilaryaları yoğunlaştırma yöntemleri sonucu elde edilen çökeltisinden hazırlanır ve Giemsa boyası ile çok iyi sonuç alınır (4).

Plasmodium spp için çeşitli antijenleri saptayan ve tür düzeyinde tayin yapabilen hızlı tanı testleri ve PCR da kullanılmaktadır (bkz. UMS, P-MT-06).

QBC (Ek-1), sıtma etkenleri başta olmak üzere tüm kan parazitlerinin yoğunlaştırılmasını sağlayan bir tarama yöntemidir. QBC ile kalın damla preparattan daha duyarlı sonuç alınabilmekteyse de, ince yayma preparatın incelenmesi parazitlerin tür tayini açısından daha aydınlatıcıdır (4).

Kandan ve kemik iliğinden yapılan boyalı preparatların mikroskopisi Kala-azarda *Leishmania* spp'yi tanımlayabilmek için kullanılan yöntemlerden biridir (bkz. UMS, P-MT-04). Eğer kandan tanı konulacaksa, *Leishmania* spp ve *T. gondii* için 'buffy-coat' konsantrasyon yöntemi ile hazırlanan örnekten yayma yapılmalıdır. Kala azar tanısında aslında en duyarlı sonuç dalak aspirasyon örneği ile alınabilir ancak bu yöntem rüptür riski nedeniyle oldukça tehlikelidir. Kemik iliği incelemesi daha güvenli olduğu ve duyarlılığı düşük olmadığı (%70-80 civarında) için tercih edilmektedir. Kemik iliği aspirat örneklerine de, kan preparatlarında kullanılan boyalar uygulanmakta, Giemsa iyi sonuç vermektedir (5). Kan ve kemik iliğinin parazitolojik incelemesinde metotlar ve öneriler Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Kan ve kemik iliğinin parazitolojik incelemesinde metotlar ve öneriler (3)

Örnek	Prosedür ve örnekler	Önerilen metod ve aranan parazitler	Öneriler	
Kan	Mikroskopi: İnce yayma ve kalın damla; taze kan (tercih edilir) veya EDTA'lı kan (tüpün tam doldurulduğuna dikkat!)	Giemsa boyama (tüm kan parazitleri); kılıflı mikrofilaryalar için hematoksilen bazlı boyama. Sıtma için kalın damla ve ince yayma çok duyarlı; EDTA'lı kan 1 saat içinde işlenmeli.	Sıtmada EDTA'lı kandan yayma hazırlanması kan alındıktan sonra 1 saatten daha uzun sürdüyse, granüller görünmez hale gelebilir. Eğer kan oda sıcaklığında ve kapağı açık olarak bekletildiyse, mikrogametositlerin makrogametositleri döllemesinden meydana gelen ookinet <i>P. falciparum</i> 'un gametositleri ile karıştırılabilir.	
	Konsantrasyon yöntemleri (EDTA'lı kan)	Mikrofilaryalar ve <i>Trypanosoma</i> spp için 'buffy-coat', taze kan incelemesi. QBC (akridin oranjlı hematokrit tüpü); <i>Plasmodium</i> spp, <i>Babesia</i> spp, <i>Trypanosoma</i> spp ve mikrofilaryalar için kullanılan bir tarama yöntemi. Özellikle, <i>Plasmodium</i> spp'de tür ayrımı yapmak çok zor.		
	Antijen aranması: Sıtma için EDTA'lı kan, dolaşan antijenler için de serum veya plazma*	<i>Plasmodium</i> spp ve bazı mikrofilaryalar için ticari kit var.		
	PCR: EDTA'lı kan, tespit edilmiş veya edilmemiş ince yayma ve kalın damla preparatlar, koagüle kan; hemolizli veya donmuş kan örnekleri ile de yapılabilir	<i>Leishmania</i> spp saptamada kan örneğinde PCR ile duyarlılık mikroskopiden çok daha fazla (genellikle immün yetmezlikli bireylerde kullanılır). Sonrasında sekans analizi de yapılabilir.	Kit kullanılmadığında laboratuvar standartları oluşturulmalıdır.	
	Özgül antikor aranması: serum veya plazma, koagüle veya antikoagüle kan*	EIA, IFA, hızlı tanı testi (ör., visseral leişmanyaz için rK39 'dipstick' test, DAT), western blotting gibi	Tam olarak geliştirilmiş antijen azdır. Bununla birlikte VL'de EIA, IFA ve 'dipstick' test etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Ticari kit kullanılmıyorsa, laboratuvarlar testlerin duyarlılık ve özgüllüklerini belirlemelidir.	
Kemik iliği	Aspirasyon veya biyopsi örnekleri	Giemsa ile boyama (tüm kan parazitleri)	<i>Leishmania</i> spp amastigotları retiküloendotelyal sistem hücrelerinin içindedir. Eğer preparatlar örnek alınmasından hemen sonra hazırlanmazsa, enfekte hücreler parçalanabilir. Mikroskopinin duyarlılığı düşük olup başka yöntemlerle beraber kullanılması tanı duyarlılığını arttıracaktır.	
	Mikroskopi: EDTA'lı örnekten kalın damla ve ince yayma			
	Kültür: EDTA veya besiyeri sıvısına alınan steril örnek	<i>Leishmania</i> spp için		
	PCR: taze veya EDTA'lı aspirasyon örneği	<i>Leishmania</i> spp ve <i>T. gondii</i> için		

* Hemolizli kan sonuçları etkileyebilir.

DAT, direkt aglütinasyon testi; VL, visseral leişmanyaz

Teknik Bilgiler

1 Örneklerin alınması

1.1. Güvenlik önlemleri

Kan ve benzeri klinik örneklerle çalışılırken **en ciddi risk** personele kan-kaynaklı patojenlerin (hepatit virüsleri, HIV) bulaşma riskidir. Kan örneklerini alan personel mutlaka işlem sırasında **eldiven** giymelidir. Kan yaymalarını hazırlarken ya da serum/plazma ayırma işlemleri sırasında da daima eldiven giyilmelidir. Ayrıca genel olarak her türlü klinik örnek "enfeksiyöz" kabul edilmeli ve örnekleri alan personel standart güvenlik önlemlerine uymalı, uygun kişisel koruyucu donanımı kullanılmalıdır.

Güvenlik uyarısı! Metanol yüksek düzeyde toksik ve parlayıcıdır. Eğer yutulacak olursa (her hangi bir miktarı) körlüğe ve hatta ölüme neden olabilir. Kullanım harici zamanlarda metanol şişesi kilitli bir dolapta tutulmalıdır!

1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

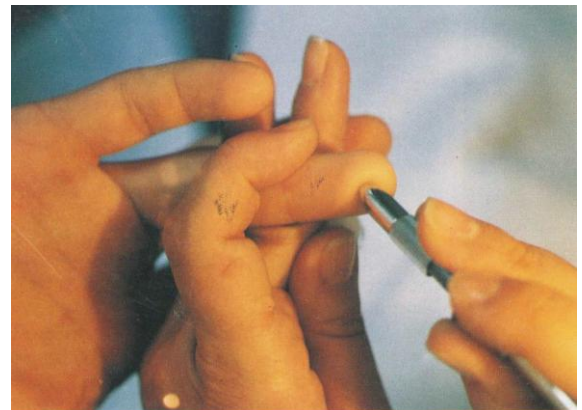
Kemik iliği örneklerinin alınması hekimin sorumluluğudur. Müdahale odası şartlarında eğitimli ve deneyimli bir hekim tarafından gerçekleştirilmelidir. Alınan örneklerin uygun bir şekilde gönderilmesi konusunda bilgilendirme laboratuvar personelinin sorumluluğudur.

1.3. Kan örneği alma prosedürü

- Tüm örnekler antiparaziter tedaviye başlamadan önce alınmalıdır.
- Örnekler kesinlikle **sızdırmaz** örnek tüpleri/kaplarına alınır ve taşınır.

Periferik kan

- Periferik kan parmak ucundan alınır. Ayrıca kulak memesi ve bebeklerde topuktan alınabilir. Periferik kan örneği kalın damla ve ince yayma hazırlamak için veya kapiller tüpe örnek almak için kullanılabilir (ayrıca bkz. UMS, P-TP-07)
- Parmak ucundan kan alınırken; önce cilt alkollü pamukla silinerek kurutulur.
- Genellikle dördüncü parmağın distal falanks volar yüzü, kanı alacak kişinin baş ve işaret parmağı arasında sabitlenir.
- Steril lanset ile **tek vuruş** şeklinde delme işlemi yapılır.



Şekil 1. Periferik kan almak için parmağın lanset ile delinmesi (6)

- Kanın serbest bir şekilde akabilmesi için deliğin yeterince derin olmasına dikkat edilmeli; parmak sıkılmamalıdır.

NOT: Kan çıkarmak için parmak sıkılırsa örnek doku aralığına sızan sıvı ile dilüe olacağı için düşük parazitemili hastalarda örnekteki parazit sayısı tespit sınırının altına inebilir.

- Parmak delindikten sonra **kalın damla** preparat hazırlamak için işlem adımları:

(a) Delinen parmakta –serbestçe- toplanmış kan damlası, önceden temizlenmiş bir lam üzerine lamın kenarından bir santim kadar mesafede orta bir noktaya (parmak lama değdirilmeden) alınır.

(b) Bir diğer lamın köşesi veya bir toplu iğne yardımıyla, kan damlası dairesel hareketlerle 1-1.5 cm çapında yayılır. Böylece kanın pıhtılaşmadan kuruması sağlanır (Şekil 2).

- **İnce yayma** hazırlamak için işlem adımları (ayrıca bkz. UMS, P-TP-07):

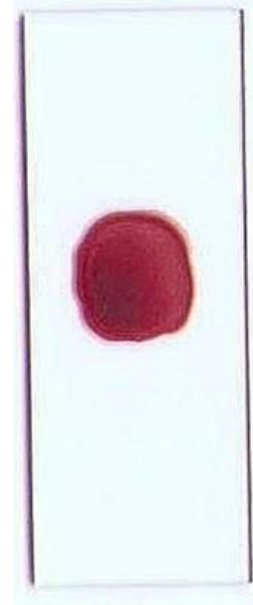
(a) Delinen parmakta –serbestçe- toplanmış ikinci kan damlası, lamın kenarından bir santim kadar mesafede orta bir noktaya (parmak lama değdirilmeden) alınır.

(b) Lam sol elin baş ve işaret parmakları arasında kan damlası işaret parmağının bulunduğu tarafta olacak şekilde düz bir şekilde tutulur.

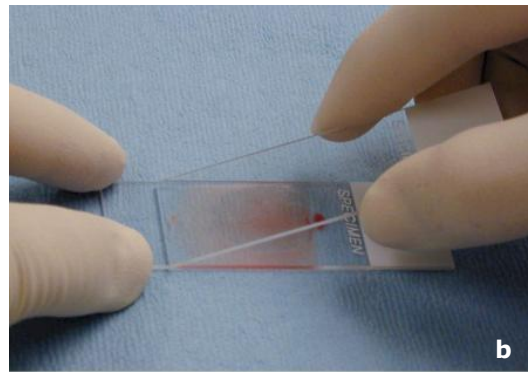
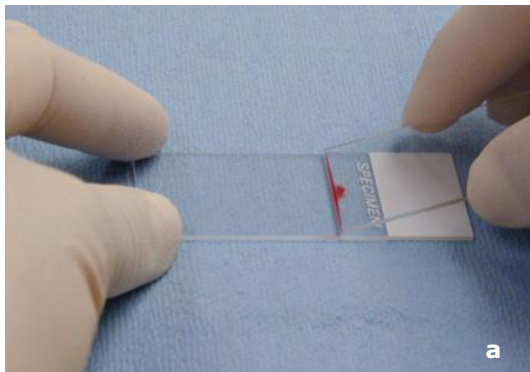
(c) Sağ elin baş ve işaret parmakları arasına alınan **diğer** bir lam, kan damlasının ön kısmına işaret parmağına bakan 45°C'lik bir açı yapacak şekilde temas ettirilir (Şekil 3a).

(d) Kanın *bu ikinci* lamın iki köşesine kadar yayılması için kısa bir süre beklenir ve açı muhafaza edilmek şartıyla *ikinci* lam sol tarafa tereddüt edilmeden sürülür (Şekil 3b).

(e) Lamelin peşinden sürüklenen kan içindeki hücreler bozulmadan ince bir tabaka halinde yayılır ve preparatlar havada kurutulur.



Şekil 2. Kalın damla preparat (6)



Şekil 3. İnce yayma preparatının hazırlanması (6)

- İnce yaymalar havada iyice kurutulur ve saf metanol ile sabitlenir. Kalın damla havada iyi kurutulur, ancak sabitlenmez! Preparat hem ince yayma hem de kalın damla aynı lamda olacak şekilde hazırlanmış ise, iyice kurutulduktan sonra sadece ince yayma kısmı sabitlenir.
- Kan örneği EDTA (0.02g/10mL kan) içeren tüpe venöz kan olarak da alınabilir (bkz. aşağıdaki kısım) ve yukarıda tarif edilen preparatlar bu tüpteki kandan hazırlanmış olabilir.
ÖNEMLİ: Antikoagülanlı kan kullanılacaksa, kan alındıktan sonraki 1 saat içinde preparat yapılmış ve sabitlenmiş olmalıdır.
- Örneğin alınma zamanı hastanın kliniği ile senkronizasyon açısından hem lamın kenarına hem de sonuç raporuna kaydedilmelidir.
- Hastalıktan şüphe edilir edilmez kan örneği alınmalıdır.
- İlk kan örneğinin mikroskopik incelemesi negatif çıkarsa, 6-12 saatte bir, 3-5 gün boyunca veya artık şüphe edilmeyinceye kadar kan örneği almaya devam edilmelidir.

Venöz kan

- Fazla miktarda kana ihtiyaç varsa, hastanın venöz kanı EDTA'lı (0.02 g/10 mL kan) vakumlu tüpe alınır. Kan antikoagülanlı tüpe alınırken belirtilen miktarda alınmalı ve kan/antikoagülan oranı uygun olmalıdır.
- Genellikle dirsek kıvrımındaki venler kullanılır.
- Kol, dirsek üzerinde turnike ile sıkılır (İki dakikadan fazla tutulmamalıdır). Yine cilt alkolle silinerek kurutulur. Cilde olabildiğince yakın bir açı ile tutulan enjektör iğnesi ile damara girilerek kan alınır.
- Kan alınır alınmaz EDTA ile iyice karışmasını sağlamak için 5-6 kez alt üst edilir, asla çalkalanmaz. Tampon gevşetilerek damardan çıkılır ve kuru pamukla kola tampon uygulanır. Alınan EDTA'lı kan bir saat içerisinde tespit edilmiş olmalıdır.
- Örneğin alınma zamanı hastanın kliniği ile senkronizasyon açısından hem tüpün üstüne hem de sonuç raporuna kaydedilmelidir.
- Hastalıktan şüphe edilir edilmez kan örneği alınmalıdır. İlk kan örneğinin mikroskopik incelemesi negatif çıkarsa, 6-12 saatte bir, 3-5 gün boyunca veya artık şüphe edilmeyene kadar kan örneği almaya devam edilmelidir.

Serum için venöz kanın alınması

- Serolojik tanı için serum elde etmek gerekir. Serum elde etmek için de venöz kan antikoagülan madde içermeyen tüplere alınır. Mümkünse jelli, vakumlu bir serum tüpüne yaklaşık 5 mL kan alınır.
- Kesinlikle çalkalamadan, sadece 5-6 kez yavaşça alt üst edilerek karıştırılır. Daha sonra 15-20 dk bekletilen kan örneği santrifüj edilerek laboratuvara gönderilir.
- Laboratuvara ulaşma süresi >48 saat ise (ya da jel içermeyen kan tüpü kullanılmış ise) serum kısmı santrifüj sonrası hemen steril bir tüpe ayrılmalı ve ayrılmış serum laboratuvara gönderilmelidir.

1.4. Kemik iliği aspiratı

- Kemik iliğinden ince iğne aspirasyon örneği aseptik şartlarda, lokal anestezi altında ve uzman hekim tarafından alınmalıdır.
- Steril kemik iliği aspirasyon iğnesi ve 10 mL'lik enjektör kullanılarak, krista iliaka veya vertebra çıkıntısı veya sternumdan alınır.
- Olabildiğince çok miktarda örnek alınmalıdır (1-2 mL). Ancak 3 mL'nin üzerindeki örneklerin periferik kanla karışmış olma olasılığı yüksektir; bu durum da örneğin dilüe olmasına yol açar.
- Kemik iliği örneği alınır alınmaz -hasta başında- yayma yapılmalı ve tespit edilmeli ve/veya laboratuvarından sağlanacak besiyerine ekilmeli; ya da hemen laboratuvara ulaştırılmalı; gönderilmesi gecikecekse EDTA içine alınmalıdır.

NOT 1: Antikoagülanlı örnek kullanılacaksa, kan alındıktan sonraki 1 saat içinde preparat yapılmış ve sabitlenmiş olmalıdır.

NOT 2: Yayma preparatların hasta başında yapılması, preparat kalitesinin uygunluğu ve tanı konulmasını kolaylaştırması açısından önemlidir. KI'den yayma preparat da kan örneğinininki gibi hazırlanır (*bkz.* "1.3 Kan örneği alma prosedürü" ve "UMS, P-TP-07").

- Örnek alma sayısı ve sıklığı hastanın klinik durumuna bağlıdır.

1.5. Örneklerin taşınması

- Kan veya kemik iliğinden yapılan yaymalar tespit edildikten sonra oda sıcaklığında laboratuvara ulaştırılır.

NOT: Klinik örneklerden hazırlanan yaymalar havada kurutulup, tespit edildikten sonra boyalı ya da boyasız olarak oda sıcaklığında bir süre (*ör.*, taşıma süresince, birkaç gün) saklanabilirler.

- Eğer yayma yapma imkanı yoksa EDTA'lı venöz kan örneği en kısa sürede +4°C (en fazla 24 saat içinde) laboratuvara ulaştırılmalıdır.

ÖNEMLİ NOT: Sıtmada EDTA'lı kandan yayma eğer kan alındıktan sonraki 1 saatin içinde yapılmadıysa (kan alınmasının üzerinden 1 saatten daha uzun süre geçtiyse) granüller görünmez hale gelebilir.

NOT: Eğer kan oda sıcaklığında ve kapağı açık olarak bekletildiyse, mikrogametositlerin makrogametositleri döllemesinden meydana gelen ookinet *P. falciparum*'un gametositleri ile karıştırılabilir.

- Kalın damla düz zeminde tutularak kurutulur. Kuruması için beklenirken kesinlikle sinek konmasına, aşırı ısınmasına ve güneş ışığına maruz kalmasına izin verilmemelidir.
- Eğer kalın damla preparatlar 48 saat içinde boyanmayacaklarsa distile su içerisinde bekletildikten sonra 27°C altında tutulmalıdırlar. Bu işlem yapılmadığı takdirde kalın damla ısı nedeniyle tespit olacağı için hemoglobin eritrositlerin içinde sabitlenir ve parazitlerin tanınması güçleşir.
- Lamların rodajlı kısmına çıkmaz (kuşun) kalemle hasta bilgileri yazılır. İnce yayma üzerine kazıma yöntemi ile hasta bilgisinin -eskiden

yapıldığı gibi- yazılması yöntemi artık önerilmemektedir! Lamlar bir lam kutusunda güvenli bir şekilde taşınmalıdır. Taşınırken lamların birbirleri ile teması önlenmelidir.

- Serum örnekleri testler için alındığı yerden uzakta başka bir merkeze gönderilecekse alındıktan sonraki 48 saat içinde +4°C'de taşınmalıdır.
- Aspirasyon ve biyopsi örnekleri taze materyal olarak saklan(a)maz, uzak laboratuvara nakledilemez! 15-20 dk içinde kurumadan uygun besiyerine ekim yapılmalı ya da yayma hazırlanmalıdır. Buna göre;
 - (a) *Leishmania* spp kültürü için kan, kemik iliği veya biyopsi alınmadan önce laboratuvar ile iletişime geçilerek NNN besiyeri sağlanmalı ve kullanılabildiği kadar buzdolabında saklanmalıdır.
 - (b) Kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirilecek olan besiyeri, inoküle edildikten sonra oda sıcaklığında saklanarak 24 saat içerisinde değerlendirileceği laboratuvara gönderilmelidir.
- Örnekler başka bir şehirdeki laboratuvara gönderilecekse, *paketleme* ve *taşıma* biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (7) (bkz. UMS GEN-ÖY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).

2 İnceleme için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

Kan ve benzeri klinik örnekler ile çalışılırken **en ciddi risk** personele kan-kaynaklı patojenlerin (hepatit virüsleri, HIV) bulaşma riskidir. Kan ve serum ile çalışılırken daima **eldiven** giyilmelidir.

Bu UMS'de bahsi geçen organizmalar ile ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmeli ve daima "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi"nde belirtilen standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır.

Boyanmış olsun veya olmasın bütün lamlar **kesici-delici atık** kabul edilir ve kesinlikle kesici-delici atık kutusuna atılırlar! Diğer biyolojik kirlilerin konduğu torbalara atılmaları halinde torbayı deler ve ciddi enfeksiyöz risk oluştururlar!

Güvenlik uyarısı! Metanol yüksek düzeyde toksik ve parlayıcıdır. Eğer yutulacak olursa (herhangi bir miktarı) körlüğe ve hatta ölüme neden olabilir. Kullanım harici zamanlarda metanol şişesi kilitli bir dolapta tutulmalıdır!

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) teknikleri uygulamadan önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) tekniklere tüm yönleriyle aşina olmalı, ve (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Bu UMS'nin uygulanmasından analist; tekniklerin prosedüre uygun yapılmasını sağlamaktan ve denetimi, değerlendirilmesi ve onaylanmasından (sonucun doğru ve güvenilir olmasından) Tıbbi Mikrobiyoloji/Parazitoloji Uzmanı sorumludur.

İnvaziv metot kullanılarak alınmış örneklerle ait preparatlar en kısa sürede ve mutlaka Tıbbi Mikrobiyoloji/Tıbbi Parazitoloji Uzmanı tarafından bizzat incelenmeli, değerlendirilmeli ve sonuçlandırılmalıdır.

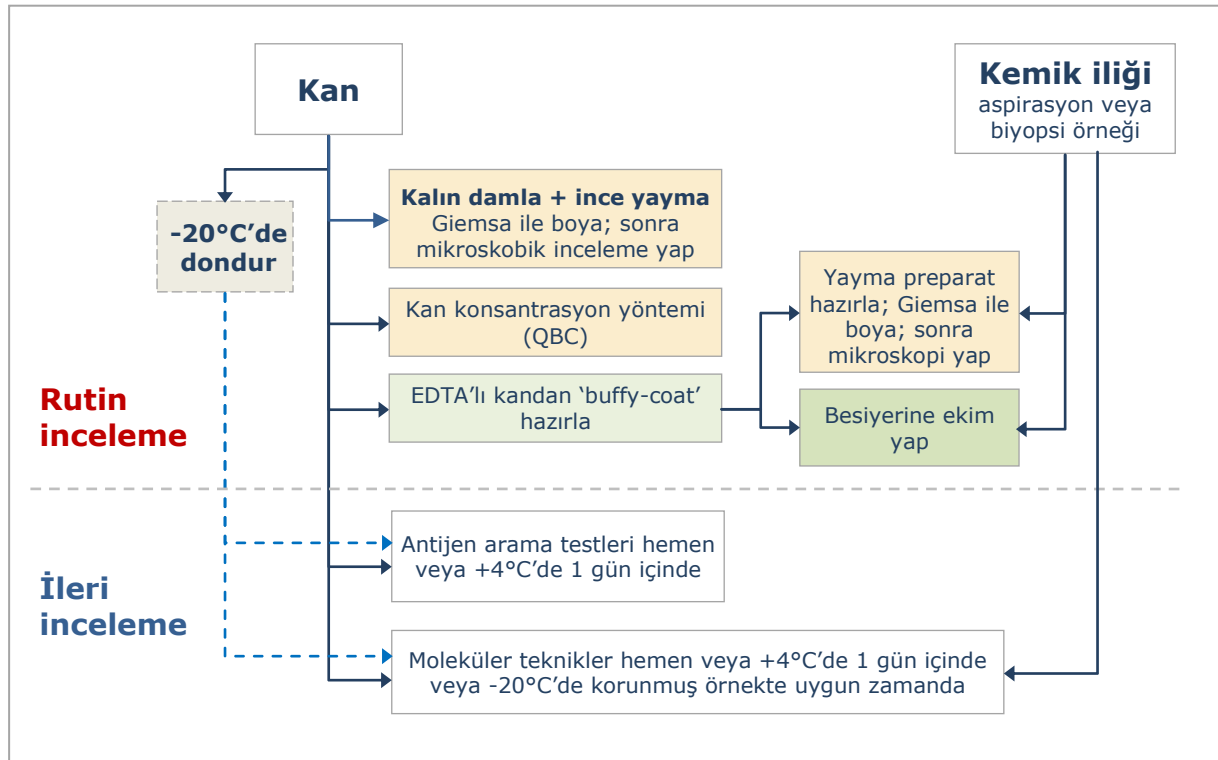
2.3. Reaktif, Kit, Donanım

- Giemsa boyası reaktifleri ve donanımı (bkz. UMS, P-TP-06).
- Metanol, saf (%100'lük; aseton içermeyen)
- NNN besiyeri
- Mikroskop, binoküler (rutin) – 10× (düşük), 40× (yüksek kuru), 100× (immersiyon) objektifleri ve 10× oküleri olan tercih edilir (8).
- Lam (rodajlı ve rodajsız), lamel

2.4. Kalite kontrol

- Pozitif olduğu bilinen boyalı preparatlar, fotoğraflar ve kaynak kitaplar çalışma yerinde mevcut olmalıdır.
- Laboratuvar aynı zamanda kendi kalite kontrol örneklerine sahip olmalı ve testlere dahil etmelidir.
- Mikroskop belirli aralıklarla (yoğun kullanılıyorsa yılda en az bir kez) kalibre edilmelidir. Tüm objektifler için kalibrasyon faktörleri göz önündeki bir panoda asılı olmalıdır (bkz. UMS, P-TP-01) (8).
- Bütün kalite kontrol sonuçları kaydedilmelidir.

3 Kan ve kemik iliği örneklerinin parazitolojik incelemesi için akış şeması



Şekil 4. Kan ve kemik iliği örneklerinin parazitolojik incelenmesinde laboratuvarında izlenecek başlıca adımlar için akış şeması.

4 Örneklerin incelenmesi

4.1. Örneklerin laboratuvara kabulü

- Laboratuvara gelen örnekler "ret kriterleri" göz önüne alınarak değerlendirilir. Aşağıdaki örnekler, parazitolojik inceleme yapılması uygun olmadığı için ret edilir:
 - (a) Kırılmış yayma lamaları, ya da kazınmış, bozulmuş kan yaymaları
 - (b) Hemolizli serum örnekleri
 - (c) Miktarı çok az olan EDTA'lı kan örnekleri
 - (d) Bakteri veya mantarla kontamine olmuş örnekler
 - (e) Önerilen süre içerisinde, uygun ısıda gönderilmemiş örnekler; dondurulmuş (antijen testleri ve moleküler testler hariç) veya inkübatörde bekletilmiş örnekler.
 - (f) Örnek kabı üzerinde hasta bilgileri yazılı olmayan veya hastaya ait uygun bir istek formu düzenlenmemiş örnekler.
- Şehirlerarası mesafeden gönderilen örnekler biyolojik madde taşıma kurallarına uygun gönderilmiş olmalıdır (*bkz.* UMS, GEN-ÖY-01) (7). Sızdırmış, kabını kontamine etmiş örnekler incelemeye alınamaz ve güvenlik gerekleri nedeniyle imha edilir.
- Örnekler ve hastaya ait tüm bilgiler, Hastane Bilgi Yönetim Sistemi ve/veya Laboratuvar Bilgi Sistemi gereklerine göre kayıt altına alınır. Çocuk hastalarda veya iletişim kurulamayan debil hastalarda, hasta yakınına ait aşağıdaki bilgiler de kayıt edilmelidir:
 - (a) Kişinin adı, soyadı, cinsiyeti,
 - (b) Hastaya yakınlık derecesi,
 - (c) Kısaca adresi
- Örnekler analiz için laboratuvarın ilgili bölümüne sevk edilmeli; bu arada örnek karışmalarını önleyecek tedbirler alınmalıdır.

4.2. Örneklerin incelemeye hazırlanması

Kan

- Yayma preparatların hazırlanması için temiz, tercihen rodajlı lamalar kullanılmalı; önceden temizlenmiş lamalar bile alkol ve hav bırakmayan bir bez ile temizlenmelidir.
- Laboratuvara gelir gelmez kapiller veya antikoagülanlı (EDTA) kandan veya kemik iliğinden birçok ince yayma ve kalın damla preparat hazırlanmalı ve Giemsa ile boyanmalıdır (*bkz.* UMS, P-TP-06 ve UMS, P-TP-07).
- Sıtma tanısında kapiller kan veya antikoagülanlı (EDTA'lı önerilir) kan, kalın damla ve ince yayma preparatlar hazırlanarak Giemsa ile boyanarak incelenir.

- (a) Eğer EDTA'lı kan kullanılacaksa, kan alındıktan sonra 1 saat içerisinde preparatlar tespit edilmiş olmalıdır (bkz. UMS, P-MT-06).
- (b) QBS yöntemi ile de incelemeye alınabilir (bkz. Ek-1)

- Eğer *Trypanosoma* spp veya mikrofilarya aranıyorsa, EDTA'lı tam kan filtrasyon veya Knott yöntemleri ile yoğunlaştırma uygulandıktan sonra boyalı ve boyasız mikroskopi yapılır. Mikrofilaryalar için parmak ucundan alınan kan yoğun olduğundan yoğunlaştırma yöntemlerine ihtiyaç yoktur.

NOT: Knott yönteminde; 1 mL düz veya sitratlı kan 10 mL %2'lik formol içeren bir santrifüj tüpüne konularak vortekslenir. 500 x g'de 2 dk veya 300 x g'de 5 dk santrifüj edilir. Üst sıvı dikkatlice dökülerek çöktelden yayma preparat hazırlanır. Preparatlar kuruduktan sonra Giemsa veya Hematoksilen boylarıyla boyanıp mikroskopta incelenir.

- Eğer kanda *Leishmania* spp veya *T. gondii* aranacaksa, yoğunlaştırma ile elde edilen 'buffy-coat' örneğine mikroskopi yapılmalıdır. Eğer ekim yapılacaksa besiyeri buzdolabından çıkarılmalı, oda sıcaklığına getirilmelidir. *T. gondii* içinse hücre kültürü veya fare hazırlanmalıdır (bkz. UMS, P-MT-04, P-MT-05, P-MT-08).
- 'Buffy-coat' örneği (kan çekirdekli hücre tabakası) elde etmek için;
 - (a) Venöz kan 100 x g'de 15 dk santrifüj edilir. Eritrositler ve plazma arasındaki ince beyaz tabaka kapiller pipet ile doğrudan alınır veya bu beyaz tabaka, plazmayla birlikte başka bir tüpe alınarak tekrar 300 x g'de 15 dk santrifüj edildikten sonra ayrılır.
 - (b) Santrifüj işlemi mikrohematokrit tüpünde de yapılabilir. 'Buffy-coat' tabakası hizasından tüp kırılarak yayma preparat hazırlanır.
- Kalın damlaya kıyasla daha fazla miktarda kanın incelenebilmesi ve lökositlerin yoğunlaştırılmış olması 'buffy-coat' yönteminin avantajı iken, doğru tabakayı almanın zorluğu ve yoğunlaşan trombositlerin bazı parazitlerin tanısını zorlaştırması da dezavantajı olarak sayılabilir (2).
- Piyasada *Plasmodium* spp, *Leishmania* spp ve filarya araştırılmasına yönelik ticari olarak temin edilebilecek immünokromatografik hızlı tanı kitleri mevcuttur.
- Kan ve/veya serum örnekleri 1 hafta içinde çalışılmayacaksa, en az -20°C'de saklanmalıdır.

Kemik iliği

- *Leishmania* spp amastigotları retiküloendotelial sistem hücrelerinin içindedir. Eğer yaymalar örnek alınır alınmaz hazırlanmazsa, enfekte hücreler parçalanabilir. Yaymalar Giemsa ile boyandıktan sonra mikroskopta 100x objektif (immersiyon) ile incelenir. Mikroskopinin duyarlılığı düşük olup başka yöntemlerle beraber kullanılması tanı duyarlılığını arttıracaktır.
- Eğer ekim yapılacaksa besiyeri (NNN vb.) buzdolabından çıkarılmalı, oda sıcaklığına getirilmelidir (bkz. UMS, P-MT-04).
- Kemik iliği örnekleri *Leishmania* spp ve *T. gondii* tanısında PCR testleri için de kullanılabilir.

4.3. Direkt mikroskopik inceleme

- Direkt kan örneğinden veya 'buffy-coat'tan hazırlanan yaymalar her hangi bir boyama veya fiksasyon yapmaksızın *Trypanosoma* spp ve mikrofilaryaları saptamak için doğrudan incelenir.
- Amaç hareketli parazitleri görmektir.

4.4. Boyalı mikroskopik inceleme

- Kalın damla ve ince yayma preparatların boyalı mikroskopisi kesin tanı için en güvenilir ve etkin inceleme yöntemidir (bkz. UMS, P-TP-06). Kalıcı olmasının yanında referans laboratuvara göndermeye de uygundur.
- Kalın damla ve ince yayma preparatları aynı lam üzerinde ya da iki ayrı lamda hazırlanabilirler. Bir lama ince yayma, diğerine kalın damla, bir diğerine de ikisi beraber hazırlanması önerilmektedir.
- İnce yayma kısa sürede boyanabileceğinden özellikle yüksek parazitemisi olan hastalarda çabuk sonuç vermeye yarar. Kalın damlanın kuruması daha uzun sürer ancak düşük parazitemisi olanlarda etken saptanabilir. Kombinasyon lamında da daha uzun süre kuruması beklenerek daha iyi bir boyama yapılır ve doğrulama için kullanılır.
- İkişer tane preparat hazırlanmalı sadece birer tanesi boyanmalıdır. Diğer preparatlar ise boyamada bir yanlışlık olması halinde tekrarlayabilmek için veya referans laboratuvara gönderilmek üzere boyanmadan saklanmalıdır.
- Preparatlar *Trypanosoma* spp ve mikrofilaryalar açısından önce küçük büyütme ile incelenir. Eğer larva saptanırsa kesin tanımlama için daha büyük büyütme ile morfolojik detaylar incelenir.
- Diğer parazitler etkenler için immersiyon objektifi gerekir. Hem kalın damlada hem de ince yaymada 200-300 alan (15-20 dk) incelenmelidir.
- *Trypanosoma* spp, daha çok ince yaymanın kalın kısmında tanımlanır. *Plasmodium* spp ve *Babesia* spp, hücre içi parazitleri olarak kalın damlada saptanır, ancak ince yaymada tanımlanırlar.
- *Plasmodium* spp'nin kantitasyon için parazit sayısı ince yaymalarda eritrosit ve kalın damlalarda da lökosit sayısına göre hesaplanır. İnce yaymada 500-2000 eritrosit sayılmalı ve enfekte eritrositlerin %'si hesaplanmalıdır. Kalın damlada ise 500 parazit veya 1000 lökosit sayılıp lökosit sayısından faydalanılarak μL 'deki parazit sayısı hesaplanabilir.

4.5. Diğer yöntemler

- **QBC** - Bu yöntem başta *Plasmodium* spp olmak üzere diğer kan parazitleri için de uygulanabilecek bir konsantrasyon yöntemidir. Ayrıntılı bilgi için bkz. Ek-1.
- **Hızlı tanı testleri** - *Plasmodium* spp, *Leishmania* spp ve filaryaların araştırılmasına yönelik ticari immünokromatografik hızlı tanı kitleri firmanın önerileri doğrultusunda kan veya serum örneği ile çalışılır.

- **Moleküler yöntemler** - *Plasmodium* spp, *Leishmania* spp ve *Babesia*, filarya, *Trypanosoma*, *Toxoplasma* vb. diğer kan parazitlerinin araştırılmasına yönelik moleküler yöntemler ancak ileri düzey tanı laboratuvarlarında uygulanabilmektedir. Pozitif bulunan örnekler tür tayini ve direnç araştırılması amacıyla Referans laboratuvara gönderilir.

5 Bulguların değerlendirilmesi ve raporlama

- *Plasmodium* spp görülmesi halinde hekim hemen aranmalıdır. Raporunda görülen/saptanan parazitin adı ve formu yazılmalıdır. Saptanan insana ait hücreler de bildirilmelidir (ör., orta düzeyde lökosit, bol eritrosit, az makrofaj, nadir Charcot-Leyden kristalleri vb.). Raporunda incelemenin hangi teknik(ler) kullanılarak yapıldığı mutlaka yer almalıdır!
- Örnek alınma zamanı, klinisyenin diğer semptomlar ile parazitemiyi ilişkilendirebilmesi için sonuç raporunda belirtilmelidir. Ayrıca raporda, tek kan örneğinin mikroskopik incelemesiyle alınacak negatif sonucun paraziter enfeksiyonu dışlamayacağı belirtilmelidir.
- *Plasmodium* spp ve *Leishmania* spp ülkemizde laboratuvarlardan **bildirimi zorunlu** etkenlerdir (1,2). Bunlardan birine tanı koyulması halinde olguların kayıt ve bildirim için Sağlık Bakanlığının "Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi" izlenmelidir (2).
- Pozitif kalıcı preparatlar pozitif kontrol olarak saklanmalıdır. Gerekli bilgiler lam üzerine yazılmalı ve bir arşivleme sistemi kurulmalıdır. Laboratuvarın bir referans preparat seti bulundurması hem eğitim amaçları hem de karşılaştırmalar için idealdir.
- Değerlendirmelerin doğru olmasını sağlamak için 'mikroskopi sonuçları gözden geçirme sistemi' kurulmalıdır. Bu sistemin bir gereği olarak her gün Uzman da bazı preparatlara bakmalıdır. Bu, hem uygulayıcı personelin eğitim ihtiyaçlarını belirlemeye hem de sonuçların klinik bilgi ile ilişkilendirilmesine yardımcı olur.

6 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Özellikle sıtma tanısında sadece bir kez ince yayma-kalın damla incelemesi yeterli değildir. İlk kan alımından 4-6 saat sonra ikinci kez örnek alınması gerekir.
- QBC tarama yöntemi olup duyarlılığı fazladır ancak tür tayini için çoğunlukla diğer inceleme yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.
- Özellikle *Plasmodium* spp için EDTA'lı kan alındıktan en geç 1 saat sonra tespit edilmiş olmalıdır. Yoksa Schüffner granülleri görünmez hale gelir. 4-6 saat sonra ise parazitlerin şekillerinde bozulma başlar.
- Kalın damla preparat ile *Plasmodium* morfolojisini değerlendirmek güçtür ancak ince yaymaya göre 20 kat daha fazla saha taranabilir (9); bu nedenle **mutlaka** her vakanın kalın damla örneği de incelenmelidir.

Ekler

Ek-1 QBC (kantitatif 'buffy-coat')

Sıtma tanısında kullanılan bir tarama testidir (1,4).

Gereç, donanım

- Ticari 'QBC malaria' tüpü - içerisinde yüzen bir plastik bulunan cam bir mikro-hematokrit tüpü olup antikoagülan ve akridin oranj boya ile kaplanmıştır.
- Plastik tüp inceleme tutucusu
- Hematokrit santrifüjü
- Floresan mikroskobu

Testin yapılışı

1. 50-60 µL'lik kapiller veya venöz kan QBC tüpü içine alınır. Hematokrit santrifüjünde (14387 x g'de) 5 dk santrifüj edilir.
2. Bu sırada akridin oranj parazitleri boyar ve plastik parça da boyalı parazitlerle enfekte eritrositleri 'buffy-coat'un hemen altında ve cama yakın olarak konsantre olmaya zorlar.
3. Santrifüjden sonra, plastik tutucuya yerleştirilen tüpte, tüp içinde plastik parçanın durduğu kısım parazit ve enfekte eritrositler yönünden floresan mikroskobu altında incelenir. Olgun formlar 'buffy-coat'a doğru, genç formlar ise eritrositlere doğru yerleşmiştir.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Kan ve kemik iliği örneklerinin parazitolojik incelemesi) aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

UMS, P-TP-01	Mikroskop kalibrasyonu
UMS, P-TP-06	Giemsa boyama
UMS, P-TP-07	Kalın damla ve ince yayma
UMS, P-MT-06	Sıtmanın mikrobiyolojik tanısı
UMS, P-MT-04	Kala-azarın mikrobiyolojik tanısı
UMS, P-MT-05	Şark çıbanının mikrobiyolojik tanısı
UMS, P-MT-08	Toksoplazmozun mikrobiyolojik tanısı
UMS, GEN-OY-01	Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 2 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurveLa bReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 3 Garcia LS. Practical Guide to Diagnostic Parasitology. In: Garcia LS (ed). Specific test procedures and algorithms. 2nd ed., ASM Press, Washington D.C. 2009, p. 87-217
- 4 Bullock-Iacullo S, Garcia LS. Detection of blood parasites. In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 3th ed., ASM Press, Washington D.C. 2010, p. 9.8.5.1 - 9.8.5.5
- 5 HPA UK Standards for Microbiology Investigations: Investigation of Bone Marrow. Issued by the Standards Unit, Microbiology Services Division, HPA Bacteriology.
http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1317132858115 (son erişim tarihi: 05.01.2014)
- 6 Ergüven S. A-16 Sıtma. Bildirimi Zorunlu Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısına Yönelik Standart Uygulama Prosedürleri. Laboratuvar Eğitim Kitabı. Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Ankara. 2008, p. 5-20
- 7 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.
- 8 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.2.1 - 4
- 9 WHO. Basic Malaria Microscopy. Part 1: Learner's guide. Second edition, Switzerland. 2010.
http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547826_eng.pdf (son erişim tarihi: 18.12.2013)



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Amibiyazın (*Entamoeba histolytica* enfeksiyonunun) **Mikrobiyolojik Tanısı**

Hazırlayan Birim	Klinik Parazitoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Parazitoloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	P-MT-01
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	4
Hastalığın önemi.....	4
Parazitin özellikleri.....	4
Klinik özellikleri	4
Laboratuvar tanısı.....	5
TEKNİK BİLGİLER	7
1 Hedef mikroorganizma	7
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	7
3 Amibiyaz tanısında kullanılan teknikler	11
4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim	15
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	16
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	17
KAYNAKLAR.....	18

Kapsam ve Amaç

Çok eski yıllardan beri bilinen bağırsak yerleşimli protozoon *Entamoeba histolytica*, diğer amiplerden farklı olarak patojendir ve invaziv seyir göstererek bağırsak ve bağırsak dışı amibiyaza neden olmaktadır.

İnvaziv amibiyaz tanısında **geçerli asgari yöntem** trikrom boyalı mikroskopidir. Dışkı örneklerinde amip antijenlerini saptamaya yönelik testler (ELISA, hızlı tanı testleri) ve özellikle bağırsak dışı tutulumu olan hastalarda oldukça yararlı olan antikor saptamaya yönelik serolojik testler (ELISA, IHA, kompleman fiksasyon, lateks aglütinasyon) hali hazırda pratik ve sürekli geliştirilen yöntemlerdir. Dışkı, rektal biyopsi ve karaciğer apse örneklerinden parazit, ksenik (difazik ve monofazik) ve aksenik kültürlerde üretilmektedir. Moleküler yöntemler de, *E. histolytica*'nın tanımlanmasında yüksek duyarlılık ve özgüllükte sonuç verir. Gerek dışkıda antijen saptama testlerinin gerekse moleküler testlerin en önemli avantajı mikroskopi hatalarını -dışkı lökositlerinin hatalı bir şekilde amip olarak değerlendirilmesi olasılığını- da ortadan kaldırmalarıdır.

Türkiye'de *E. histolytica*'nın (akut bağırsak amibiyaz etkeni olarak) bildirim zorunludur (1). Sağlık Bakanlığı'na her yıl yaklaşık 20-30 bin arasında bildirim yapılmaktadır. Ancak laboratuvarların -standart vaka tanımına uygun olmadığı halde- yaygın bir şekilde direkt mikroskopik incelemeye dayalı sonuç verdikleri bilindiğinden, bu değerlerin ülkemizdeki patojen *E. histolytica* enfeksiyonlarının gerçek sıklığını yansıtmadığı kabul edilmektedir (2). Nitekim ülkemiz genelinde mikrobiyoloji laboratuvar kapasitesinin mevcut durumunun değerlendirildiği bir çalışmanın sonuçlarına göre klinik laboratuvarların oldukça azı (%11.3) **geçerli** teknikleri kullanarak sonuç verebilmektedir (3). Vakaların önemli bir kısmının bu nedenle hatalı tanı aldığı düşünülürse hem hasta yönetiminin hem de enfeksiyonun kontrolüne yönelik çabaların olumsuz yönde etkilendiği tahmin edilebilir. Dolayısı ile uygun bir prosedürün el altında olması doğru tanının yaygınlaşmasını teşvik edeceği için önemli görünmektedir.

Bu nedenlerle bu UMS'de insanda hastalık oluşturabilen *E. histolytica*'nın doğru tanısı için laboratuvarlara standart bir prosedürün verilmesi hedeflenmiştir. Bu belgede sonuçların yorumlanması ve raporlanmasında dikkat edilecek hususlar ile şüpheli olgulara tanı konmadığı durumlarda başvurulacak alternatif teknikleri içeren bir tanı şeması da yer almaktadır.

Kısaltmalar ve Tanımlar

Ag	Antijen
IHA	İndirekt hemaglutinasyon
PVA	Polivinil alkol (fiksatif)
SAF	Sodyum asetat-asetik asit- formol (fiksatif)

Genel Bilgi

Hastalığın önemi

Entamoeba histolytica invaziv bağırsak ve bağırsak dışı amibiyaza neden olabilen, özellikle tropikal ve subtropikal bölgelerde daha sık olmak üzere bütün dünyada yaygın olarak görülen bir protozoon parazittir. Paraziter hastalık kaynaklı ölümler içinde sıtma ve şistozomiyazdan sonra üçüncü sırada yer almaktadır. Dünyada her yıl yaklaşık olarak 50 milyon birey etkilenmekte; invaziv amibiyazdan kaynaklanan komplikasyonlara bağlı olarak her yıl 100 bin ölüm görülmektedir. Suyun kirli ve sanitasyon koşullarının yetersiz olduğu ılıman bölgelerde de enfeksiyon sıklığı tropikal bölgelerde görülme oranlarına yaklaşıyor. Göçmenlerin bir arada yaşadığı kamplar ve benzeri diğer toplu yaşam birimlerinde bulunan bireylerde enfeksiyon daha sık görülebilmektedir (4,5).

Enfeksiyonun yayılmasında dışkı ile kirlenmiş su ve yiyeceklerin tüketilmesi primer rolü oynar. Nadir olarak seksüel geçiş de olabilmektedir. Homoseksüel erkekler arasında geçiş sıklığı %30'un üzerinde bildirilmiştir (5). *E. histolytica*'nın doğadaki tek konağı insandır.

Parazitin özellikleri

E. histolytica/dispar gerçekte morfolojik olarak birbirinden ayırt edilemeyen, ancak genetik dizi farkı nedeniyle biri patojen (invaziv), diğeri ise patojen-olmayan (non-invaziv) iki farklı tipi (sırasıyla *E. histolytica* ve *E. dispar*) ifade etmektedir. Biyokimyasal ve immünolojik veriler de iki farklı tipin varlığını desteklemektedir (6,7).

Klinik özellikleri

E. histolytica/dispar ile enfeksiyon asemptomatik, doku invazyonsuz, semptomatik ve doku invazyonlu semptomatik olmak üzere farklı klinik tablolar şeklinde ortaya çıkabilir. Enfekte bireylerin yaklaşık %90'ı asemptomatik olup bunların da çok büyük kısmı non-invaziv *E. dispar* ile ilişkili bulunmuştur. Patojen olan ve olmayan tiplerin ayrımı tedavi ve hastalık kontrolü ile ilgili uygulamaları yakından ilgilendirmektedir (6,7,8).

Bağırsak amibiyazı *E. histolytica* trofozoitlerinin dokulara invazyonu sonucu oluşmaktadır. Enfekte bireylerin sadece %10'unda dizanteri, kolit veya nadir olarak ameboma gibi klinik semptomlar gelişir. Bağırsak amibiyazının dizanterik formunda kanlı ve/veya mukuslu ishal (5-10 kez/gün), tenezm, abdominal kramp, gaz, bazen hafif ateş bulguları ile seyreden hastalık tablosu vardır. Dizanterik olmayan (kronik) formunda ise kabızlık ve zaman zaman ishal nöbetleri, karın ağrısı, gaz bulguları ile seyreden hastalık tablosu görülür. Dizanterik amibiyaz, kanlı ishal tablosu ile başta basilli dizanteri olmak üzere diğer dizanteri benzeri tablolardan ayırt edilemediğinden, tanı laboratuvar incelemesine dayanır. Özellikle tedavinin yönlendirilmesinde (antibiyotik veya antiparaziter ilaç uygulaması ayrımı için) laboratuvar kritik öneme sahiptir (5,6,7,9).

E. histolytica trofozoitlerinin bağırsak duvarını geçerek kan yoluyla karaciğere, daha az sıklıkla da akciğer, beyin, perikard ve diğer alanlara yerleşmesi sonucu bağırsak dışı formlar gelişebilir. Karaciğer amibiyazında, özellikle sağ üst lobda, submukozada yerleşim görülür. Semptomlar yavaş veya aniden ortaya çıkabilir. Sağ üst kadranda ağrı, 38-39°C ateş en sık bulgulardır. Halsizlik, kilo kaybı, öksürük, terleme de görülebilir. Hepatomegali olur. Karaciğer fonksiyon testleri normaldir veya hafif yükselir. Sarılık çok nadirdir. Apse ultrason, radyolojik veya radyonükleer inceleme ile saptanabilir. Olguların çoğunda sağ üst lobda tek apse vardır. Plevral alana rüptür en sık görülen komplikasyondur. Apse periton içerisine ve deriye de yayılabilir (7,8,9).

Karaciğer apsesi olan olguların sadece bir kısmının dışkısında *E. histolytica* kist ve trofozoitleri saptanır. Hastaların %60'ında bağırsak semptomları veya dizanteri öyküsü yoktur. Karaciğer amibiyazının atipik seyredebileceği ve bu nedenle tanının atlanabileceği unutulmamalıdır (7,8,9).

Laboratuvar tanısı

Amibiyazın tanısı laboratuvar incelemesine dayanır.

Patojen olan ve olmayan türlerin ve tiplerin ayrımı tedavi ve hastalık kontrolü ile ilgili uygulamaları yakından ilgilendirdiği için barsak amibiyazının laboratuvar tanısı özellik arz eder.

Ne yazık ki basit ve ekonomik olması nedeniyle yaygın bir

şekilde uygulanan nativ-Lugol **direkt mikroskopinin**

(patojen olan ve olmayan tiplerin ayrımının yapılması mümkün olmadığı için) tek başına **tanısal değeri yoktur**. Direkt mikroskopiye dayalı olarak rapor edilmiş sonuçlar çok büyük olasılıkla hem hasta tedavisini hem de hastalık kontrolüne yönelik çalışmaları hatalı yönlendirmektedir (4,10).

Tanıda asgari kriter, taze dışkı örneğinin **trikrom** yöntemi ile boyanmış yaymalarında **eritrositleri fagosite etmiş amip trofozoitlerinin** gözlenmesidir (7,8). Trofozoit sitoplazması içinde eritrosit görülmesi *E. histolytica* için tanı koydurucu özelliktir ve "trikrom boyalı preparatta eritrosit içeren *E. histolytica* trofozoitleri gözlendi" şeklinde rapor edilir. Eğer trofozoitler morfolojik olarak benziyor ancak eritrosit gözlenmiyorsa "*E. histolytica/E. dispar*" olarak rapor edilir (10,11).

E. histolytica/E. dispar ayrımının yapılamadığı durumda (ideal olarak da her iki durumda) tanı dışkıda özgül *E. histolytica* antijenini saptayan ELISA testi ile konur. Monoklonal antikorların kullanımına dayalı kitlerin *E. histolytica* enfeksiyonlarının *E. dispar*'dan ayrımının yapılmasında duyarlılık ve özgüllüklerinin ileri düzeyde gelişmiş olduğu kabul edilmektedir. Piyasada *E. histolytica* antijenlerini dışkıda saptayabilen ancak *E. dispar* enfeksiyonundan ayırt edemeyen kitlerin de olduğu akılda tutulmalıdır. Bu nedenle laboratuvarın özgül olarak patojen *E. histolytica* enfeksiyonunu saptayan bir kit ile çalıştığından emin olması gerekir (12).

Kullanım kolaylığı, pratik ve genelde ekonomik olmaları nedeniyle taze dışkı örneklerinde *E. histolytica*'nın antijenlerini saptamaya yönelik ELISA gibi testler hali hazırda sürekli geliştirilen yöntemlerdir. Bazı çalışmalarda bu testlerde de tanısal sıkıntılar olduğu, yeni ve eski enfeksiyonun ayrımında sorun yaşandığı ve *E. dispar* ile yalancı pozitiflik verebildiği de rapor edilmiştir (5,7,8).

Amibiyaz tanısında direkt mikroskopik incelemenin tek başına tanısal değeri yoktur!

E. histolytica klinik örneklerin kültürlerinden de izole edilebilir. Dışkı, rektal biyopsi ve karaciğer apse materyalleri kullanılarak yapılan *E. histolytica* kültür yöntemleri 80 yılı aşkın süredir kullanılmaktadır. Ksenik olarak, Robinson, TYSGM-9 (Diamond) besiyeri, Boeck ve Drobohlav'ın Locke-Egg-Serum (LES) besiyeri, Dobell besiyeri, aksenik olarak ise TYI-S 33, YI-S ve LYI-S 2 en sık kullanılan besiyerleridir. Zahmetli ve maliyetli olması, zaman alması, kontaminasyon riskinin yüksekliği (özellikle *Blastocystis* spp ve *Entamoeba coli*), duyarlılığının ise hayli düşük olması gibi nedenlerle 'altın standart' olarak kabul edilen kültür yöntemi günümüzde laboratuvarlarda yaygın biçimde kullanılmamaktadır. Ayrıca referans laboratuvarlarda bile başarı oranı %50-70 oranındadır (5,7,13,14).

Kültür-zimodemi ile patojen-non patojen ayrımı mümkündür, ancak pratik olmaması ve kontaminasyon nedeniyle yaygın kullanılmamaktadırlar (4).

Antikor saptamaya yönelik serolojik testler (ELISA, IHA, kompleman fiksasyon, IFA, lateks aglütinasyon, immünoelektroforez test) ise bağırsak dışı tutulum olan (ör., karaciğer amibiyazı) hastalarda oldukça yararlı testlerdir. Antikor saptamaya yönelik ELISA testi, bağırsak dışı amibiyaz vakalarının %95'inde, aktif bağırsak enfeksiyonlu hastaların %70'inde ve *E. histolytica* kistleri taşıyan asemptomatik bireylerin %10'unda *E. histolytica* için özgül antikorları saptayabilmektedir. Başarılı bir tedaviye rağmen özgül antikorlar yıllarca pozitif kalabilir, bu nedenle antikorların varlığı akut ya da kronik enfeksiyonu ayırt edemez (7,13,12).

Uygulama kolaylığı ve tarama testi olarak kullanılma gibi avantajları bulunan hızlı tanı testlerinin ise gerek maliyet açısından gerekse de duyarlılık ve özgüllük ile ilgili sıkıntıları vardır. Amibiyaz tanısı için geliştirilen 'dipstick' testlerin sonuçları ilk planda umut verici görünse de duyarlılığı ELISA ve PCR'a göre oldukça düşüktür. Dışkıda *Giardia intestinalis*, *E. histolytica*/*E. dispar* ve *Cryptosporidium parvum*'un antijenlerinin aynı anda tespitine dayanan bir hızlı tanı kiti de geliştirilmiştir. Hızlı ve taze/donmuş dışkı örneklerinde çalışılabilme kolaylığı olmakla birlikte, maliyetinin yüksek oluşu ve *E. histolytica*'yı ayırt edememesi dezavantajları arasındadır (5,11).

Trikrom boyamada eritrosit fagosite etmiş trofozoitler görülmesi E. histolytica için tipiktir!

Amibiyaz tanısında moleküler yöntemler; klinik örneklerde genetik materyali saptamaya ve *E. histolytica*'nın genotiplendirmesine yönelik yöntemler olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Tanıda ve epidemiyolojik prevalansın değerlendirilmesinde uygulama olanakları bulunan moleküler yöntemler (konvansiyonel PCR, multipleks PCR, gerçek-zamanlı PCR vb.), *E. histolytica*'nın tanımlanmasında yüksek duyarlılıkta ve özgüllükte sonuçlar verirler.

Geleneksel yöntemlerle konan tanının doğrulanması ve tür tayini çalışmalarında, moleküler yöntemlerin ELISA'ya karşı üstünlükleri göz ardı edilemez. Dışkı örneklerinde *E. histolytica* antijeni saptayan ELISA ya da DNA saptama testleri kesin tanı için şimdilik en bilimsel seçeneklerdir (5,7,8,13,14,11). Gerçek-zamanlı PCR en duyarlı yöntemdir.

Türkiye'de *E. histolytica* akut bağırsak amibiyazı etkeni olarak laboratuvarından bildirimi zorunlu bir parazittir. Standart vaka tanımına göre laboratuvarların tanı yöntemi olarak trikrom boyalı mikroskopik inceleme ve/veya *E. histolytica* özgül antijenini saptayan ELISA ve/veya PCR yöntemlerinden en az biri ile elde edilmiş sonucu rapor etmesi gerekmektedir (1,2).

Öte yandan Sağlık Bakanlığı'na her yıl klinik laboratuvarlar tarafından yaklaşık 20 ila 30 bin arasında *E. histolytica* bildirim yapılmaktadır (ör., ülke genelindeki laboratuvarlardan 2008-2011 yıllarında Bakanlığa bildirilmiş *E. histolytica* tanı sayısının yıllara göre dağılımı sırasıyla şöyledir: 32.766, 22.278, 22.404, 21.692. *Kaynak*: Sağlık Bakanlığı, [eski adı] Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Bulaşıcı Hastalıklar Daire Başkanlığı). Laboratuvarların yaygın bir şekilde direkt mikroskopik incelemeye dayalı sonuç verdikleri bilindiğinden, bu değerlerin ülkemizdeki patojen *E. histolytica* enfeksiyonlarının gerçek sıklığını yansıtmadığı kabul edilmektedir (2). En son 2012 yılında ülke genelinde laboratuvar kapasitesinin analizi amacıyla gerçekleştirilen bir anket çalışmasında klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının (n=510) büyük kısmının (%88.7) *E. histolytica* tanısında tek başına direkt mikroskopik incelemeye dayalı sonuç verdikleri ortaya konmuştur. Çalışmada incelenen laboratuvarların 2011 yılında rapor ettikleri toplam *E. histolytica* pozitif sonuç sayısı da 36.691'dir. Sadece geçerli tekniklerle tanı koyan laboratuvarlara ait veriler esas alındığında sonuç 6.570 (%17.9) bulunmaktadır. Eğer bu sonuçlar vaka yönetimini belirliyorsa, ülke genelinde laboratuvarlara başvuran ve amibiyaz tanısı alan vakaların %80'inin hatalı olarak amibiyaz tedavisi aldığı/almakta olduğu ileri sürülebilir (3).

Laboratuvarların büyük kısmında rutin parazitolojik inceleme ile *E. histolytica* / *E. dispar* ayrımının yapılamayışı dünyanın diğer pek çok ülkesinde de bir sorundur. DSÖ bu sorun çerçevesinde 1997'de amibiyazın raporlanması ile ilgili laboratuvarlara ve tedavisi ile ilgili de hekimlere yönelik tavsiyeler yayımlamıştır. Bu tavsiyelerde; laboratuvar, eğer mikroskopik tanı koyuyor ve iki tipi ayırt etmek için hiçbir yöntem kullanmıyorsa sonuç raporuna sadece '*E. histolytica* / *E. dispar* tespit edildi' şeklinde yazılmalı; tedavideki farklılıkları nedeniyle rapor trofozoit ve/veya kist görülüp görülmediği bilgisini de içermelidir, denmektedir. Enfeksiyon *E. dispar* ile ilişkili olduğunda kesinlikle tedavi önerilmezken, *E. histolytica* ile ilişkili bulunduğu semptomatik olup olmadığına bakılmaksızın tedavi önerilmektedir (4,8).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizma

Entamoeba histolytica varyant *histolytica*

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

Potansiyel enfeksiyöz organizmalar içerebileceğinden dolayı dışkı örnekleri ile ilgili incelemeler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmeli; bütün örnekler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır (bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi"). Dışkı örnekleri koruyucu maddelerle fikse edilmiş olsalar bile bu önlemler alınmalıdır; çünkü hala enfeksiyöz olabilirler. Özellikle kalın cidarlı bazı parazit ookistleri ve kistleri formolde fikse edildikten haftalar sonra ölürler.

Ascaris lumbricoides yumurtaları formolde saklandığında bile gelişmeye devam edebilir ve enfeksiyözüdür.

Bu prosedür uygulanırken daima **eldiven** giyilmelidir!

Boyalı olsun veya olmasın, bütün lamlar **kesici-delici atık** kabul edilir ve kesinlikle kesici-delici atık kutusuna atılırlar! Diğer biyolojik kirlilerin konduğu torbalara atılmaları halinde torbayı deler ve ciddi enfeksiyöz risk oluştururlar.

Güvenlik uyarısı! Kullanılan reaktifler veya fiksatiflerde bulunabilen fenol, formol, eter, cıva gibi maddeler toksik, koroziv ve/veya kanserojendir! Solunmasından ve/veya direkt temastan kaçınılmalı, bu kimyasallarla çeker ocak içinde ve ilgili kimyasal güvenlik tedbirleri alınarak çalışılmalıdır.

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) tekniğin uygulanmasından önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) tekniklere tüm yönleriyle aşina olmalı, ve (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Laboratuvara **amibiyaz** ön tanısı ile gelmiş örnekler veya bütün **kanlı/mukuslu** dışkı örnekleri ya da **invaziv** bir teknik kullanılarak alınmış örnekler en kısa sürede ve **mutlaka** Tıbbi Mikrobiyoloji / Tıbbi Parazitoloji Uzmanı tarafından bizzat incelenmeye hazırlanmalı, değerlendirilmeli ve sonuçlandırılmalıdır.

2.3. Örnek, Reaktif, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

Örneklerinin alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden ve örnek yönetimi ile ilgili UMS belgesinden (UMS, P-ÖY-01) edinilebilir.

Aşağıda bazı önemli hususlara tekrar dikkat çekilmektedir:

- Dışkı - Bağırsak amibiyazı tanısı için **vücut sıcaklığına getirilmiş** bir kap içine alınmalı, laboratuvara hemen teslim edilmeli ve trofozoitler dejenere olmadan mikroskopik boyamalar yapılmalıdır. Bu nedenle dışkının konacağı kabın önceden inkübatörde ısıtılarak vücut sıcaklığına (37°C) getirilmesi önerilir.

NOT: Eğer örnek 30 dk içinde incelenemeyecekse dışkı üç kaba ayrılmalıdır: birinci, fiksatif koymadan (taze); ikinciye, dışkı miktarının 3 katı kadar %10'luk formol; üçüncüye de dışkı miktarının 3 katı kadar PVA veya SAF konarak laboratuvara gönderilir (*bkz.* UMS, P-ÖY-01).

- Sigmoidoskopik örnek - Bağırsak amibiyazı düşünülen vakalarda dışkı incelemesinden sonuç alınmadığı durumlarda başvurulur. Alınan örneklerden mümkünse hemen mukus, dışkı ve biyopsi parçaları için ayrı ayrı olacak şekilde lamların üzerine yaymalar yapılmalı ve metanol ile sabitlenmelidir. Kalan örnekler steril, vida kapaklı tüplere konur ve preparatlarla birlikte laboratuvara gönderilir (*bkz.* UMS, P-ÖY-02).

NOT: Tüplere formol konmaz! Kurumayı önlemek için 1-2 mL SF eklenebilir.

- Apse aspirasyon örneği - Karaciğer apsesinde aspirat tanı açısından değerli bir örnek olmakla birlikte bu yöntem nadiren uygulanmakta ve örnek nadiren uygun şekilde alınmaktadır. Hekim örnek almadan önce laboratuvar ile iletişim kurulmalıdır. Şu hususlara önem verilmelidir:
 - (a) Örnekler aseptik koşullarda alınıp steril, geniş ağızlı, vidalı kapaklı bir kap veya tüpe konur. Örnekler asla formol içermemelidir!
 - (b) Etken, apsenin merkezindeki nekrotik artıklardan değil, apse duvarından alınan materyalde saptanabilir; en az iki ayrı örnek alınmalıdır.
 - (c) Örnekler, antibiyotik ve/veya antiparaziter bir tedaviye başlanmadan önce alınmalıdır.
- İmmünoagnostik veya moleküler yöntemlerde kullanılacak örnekler (dışkı veya diğer) 1 haftaya kadar +4°C'de ya da çalışılıncaya kadar -20°C'de saklanabilirler.
- Serum - Bağırsak dışı amibiyaz şüphesinde serolojik tanı için antikoagülan içermeyen tüplere alınmış kan örnekleri tercih edilmelidir.

Reaktif /Kit

- Mikroskopik inceleme için - Trikrom boyama (bkz. UMS, P-TP-04) ve nativ-Lugol reaktifleri (bkz. UMS, P-TP-02).
- Antijen saptayan yöntemler - ELISA kiti (özgül *E.histolytica* monoklonal antikorların kullanıldığı); piyasadan temin edilebilir.
- Hızlı tanı testleri - duyarlılık ve özgüllüğü yüksek test tercih edilmeli.
- Serolojik yöntemler (antikor tespiti için) - Bağırsak dışı amibiyaz şüphesinde uygun bir kit (ELISA, IHA, IFA vb.); piyasadan temin edilebilir; duyarlılık ve özgüllüğü yüksek testler tercih edilmelidir.
- Moleküler yöntemler - Piyasadan hazır temin edilebilen DNA izolasyon ve PCR kitleri kullanılabilir. Ayrıca reaktiflerin bir araya getirilmesi ile öz-yapım geleneksel PCR da kullanılabilir. PCR'ın duyarlılığını artırmak amacıyla dışkıdan DNA izolasyonunda uygun modifikasyonların kullanılması gerekebilir.

Diğer gereç, donanım

Mikroskopi için;

- Mikroskop, binoküler (rutin) - 10× (düşük), 40× (yüksek kuru), 100× (immersiyon) objektifleri ve 10× oküleri olan tercih edilir.
NOT: 5× oküler önerilmez! Daha az büyütme sağladığı için inceleme duyarlılığı düşüktür. 10× oküler kullanılmalıdır (15).
- Önceden temizlenmiş lamlar (25×75 mm) - tercihen kenarı rodajlı
- Kurşun kalem - lamin rodajlı kenarına örnek numarası vb. yazmak için
- Lamel (22×22mm)
- Tahta veya plastik örnek alma çubuğu
- Trikrom boyama gereç ve donanımı - bkz. UMS, P-TP-04.
- Kesici-delici atık kabı ve toksik boya atıkları için kimyasal atık kabı

ELISA için;

- ELISA okuyucu, yıkayıcı
- Ayarlanabilir otomatik mikropipetler (5-1000 µL) ve pipet uçları

PCR ve diğer moleküler testler için;

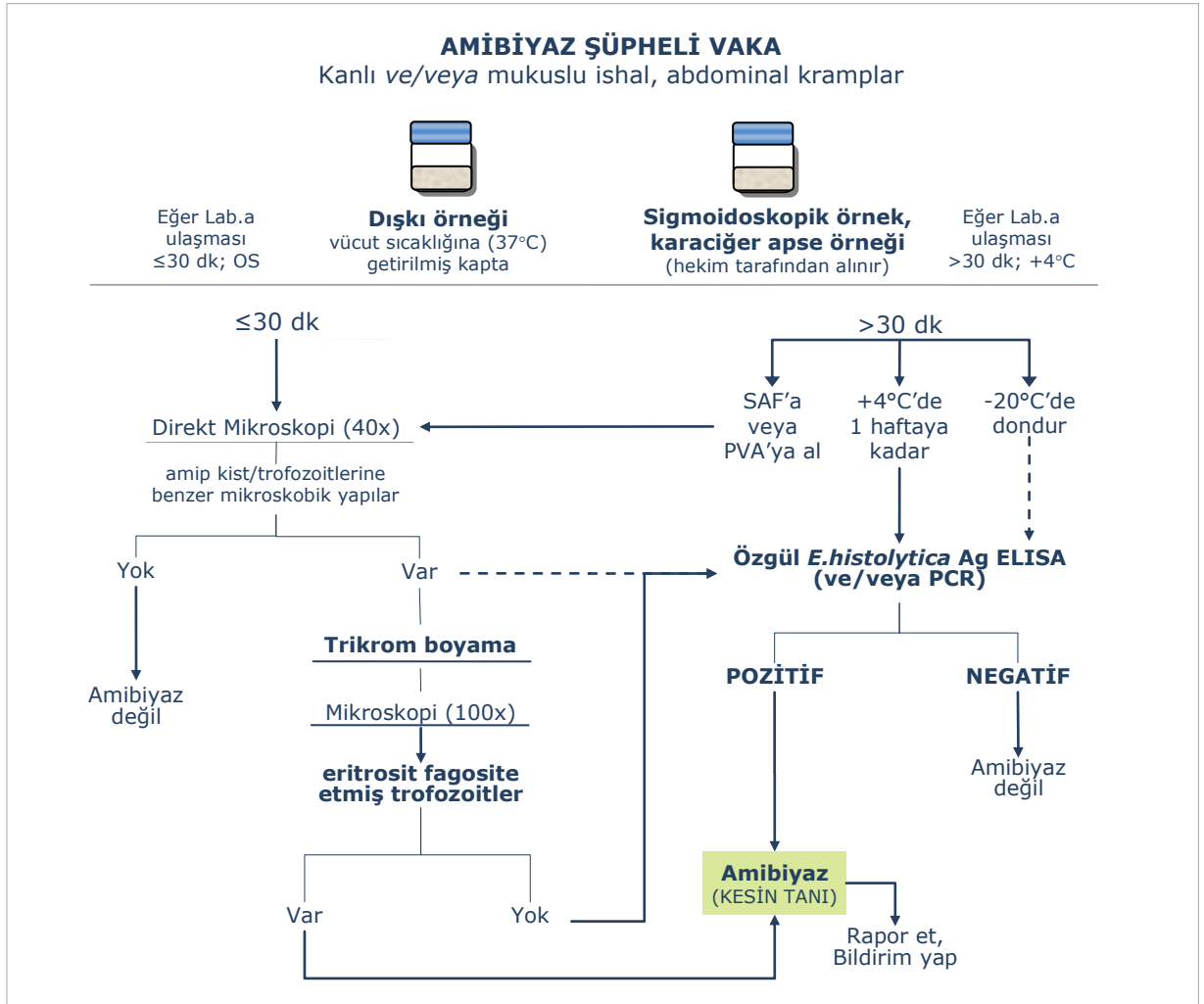
- En az üç ayrı oda - Nükleik asit ekstraksiyonu, PCR karışımının hazırlanması, amplifikasyonun ve sonuç gözetiminin yapılabileceği ayrı odalar. İdeal olarak PCR karışımı hazırlama odası (temiz oda) pozitif basınçlı, agaroz jel elektroforezi yapılan oda (kirli oda) negatif basınçlı havalandırmaya sahip olmalıdır.
- Donanım – biyogüvenlik kabini, santrifüj, soğutmalı mikrosantrifüj, hassas terazi, vorteks, su banyosu, yatay çalkalayıcı, PCR ısı döngü cihazı (gerçek zamanlı veya geleneksel), mikrodalga fırın, jel görüntüleme sistemi, elektroforez ünitesi vb.

2.4. Kalite kontrol

- Mikroskop belirli aralıklarla (yoğun kullanılıyorsa yılda en az bir kez) kalibre edilmelidir. Mikroskoba herhangi bir parça eklenmesi veya değiştirilmesi durumunda da kalibrasyon yapılmalıdır. Kalibrasyon için kullanılmış optikler mikroskobun üzerinde olmalıdır. Tüm objektifler için kalibrasyon faktörleri göz önündeki bir panoda asılı olmalıdır (*bkz.* UMS, P-TP-01 Mikroskop Kalibrasyonu) (15).
- Boyama sonuçlarının uygunluğundan emin olmak için, eğer elde varsa pozitif örnekler veya referans *E. histolytica* suşu (HM-1:IMSS) teste dahil edilmelidir.
- Pozitif kalite kontrol lamaları PVA veya SAF içinde saklanmış *E.histolytica* içeren dışkı örneklerinden hazırlanır.
- Hazırlanan her preparat -ıslak iken- arkasından gazete kağıdı okunabilecek kalınlıkta olmalıdır.
- Her yeni -hazırlanmış veya ticari- reaktif seti veya kit lotu, kullanıma sokulmadan önce pozitif kalite kontrol örnekleri ile test edilmelidir.
- Her kullanımdan önce solüsyonlar bulanıklık ve renk değişimi yönünden kontrol edilmeli; bulanık veya renk değişikliği olmuş solüsyonlar değiştirilmelidir.
- Kullanılan kitlerin (moleküler testler için olanlar dahil) son kullanma tarihleri ve saklama koşullarına dikkat edilmelidir.
- Tüm ekipmanın bakım ve kalibrasyonu düzenli olarak yapılmış olmalıdır.
- Floresan mikroskobu her açıldığında ampulün saatinin çalıştığından emin olunmalı ve kullanım sonrası süre kaydedilerek ampulün ömrü takip edilmelidir.
- Moleküler testlerin kalite kontrolünde referans merkezlerinden temin edilmiş kontrol DNA örnekleri veya laboratuvarında pozitif bulunup saklanmış örnekler pozitif kontrol olarak teste dahil edilmelidir.
- Tüm kalite kontrol sonuçları kaydedilmelidir.

3 Amibiyaz tanısında kullanılan teknikler

3.1. Amibiyaz tanısı için akış şeması



Şekil 1. Amibiyaz tanısında önerilen yöntemler ve uygulama yaklaşımını özetleyen akış şeması. dk, dakika; OS, oda sıcaklığı; Lab., laboratuvar; Ag, antijen

3.2. Örneklerin inceleme için hazırlanması

Dışkı örnekleri

- Taze dışkı örneği dışkılamadan sonraki 30 dk içinde incelemeye alınmış olmalıdır. İnceleme için hemen bir **nativ-Lugol** preparat (*bkz.* UMS, P-TP-02) ve **trikrom boyama** için yayma preparatlar (*bkz.* UMS, P-TP-04) hazırlanır (Şekil 1).
- Dışkı makroskopik olarak iyice incelenmiş olmalı, preparatlar dışkının özellikle kan ve mukus içeren kısımlarından örnek alınarak yapılmalıdır. Yayma hazırlarken örnek en az 1 cm çapında bir alana yayılmalıdır.

- Nativ-Lugol hemen incelenmeli ve hareketli formların varlığı açısından değerlendirilmelidir.
- Boyama için hazırlanan yaymalar ise hemen (kesinlikle kurumadan) Schaudinn fiksatifine daldırılarak 30 dk bekletilir; sabitlenir.
- Dışkı örneği 30 dk içinde incelenemeyecekse daha sonra trikrom boyama için yayma hazırlamak üzere PVA ve/veya SAF içine alınır.
- Preparatların (nativ-Lugol veya boyama için) her zaman bir gazete yazısı okunabilir kalınlıkta hazırlanmasına dikkat edilmelidir.

Apse aspiratı örnekleri

- Alınan örnekler laboratuvara ulaştığında bir saat içinde incelenmelidir.
- Hemen incelenemeyecek örnekler boyalı preparat hazırlanması için Schaudinn, SAF ve/veya PVA fiksatifleri içine alınmalıdır (Şekil 1).
- Apsel materyali kültür için de kullanılabilir; kültür yapılacaksa örneğin bir kısmı fiksatife konmaz.
- Daima bir miktar materyal PCR için -20°C veya daha düşük sıcaklıkta saklanmalıdır (Şekil 1).
- Aspirat örneklerinin bir kısmının bakteriyoloji laboratuvarı ile paylaşarak Gram boya ile de değerlendirilmesi önerilir.
- **Mukus içeren** örneklere örnek kadar veya örneğin yarısı ila üçte ikisi hacminde bir mukolitik ajan eklenerek oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilir. 1000 x g'de 5 dk santrifüjlenir. Çökelti direkt bakı ve boyalı yaymalar hazırlamada kullanılır.
- **Hücre artığı ve protein içeren**, sindirim gerektiren örneklerde organizmayı serbest bırakmak için proteolitik enzimlerin (Streptokinaz) kullanımı önerilir (5 birim örneğe 1 birim enzim solüsyonu). 30 dk-1 saat kadar 37°C'de bekletilen karışım 15 dk'da bir çalkalanmalıdır. 1000 x g'de 5 dk santrifüj edildikten sonra çökelti direkt bakı ve boyalı yaymalar hazırlamada kullanılabilir veya kültüre ekilebilir.
- **Anlamlı miktarda kan içeren** örnekler, örnek hacmi kadar eritrosit eritici bir ajanla oda ısısında 5 dk inkübe edilmelidir. 1000 x g'de 5 dk santrifüj edildikten sonra çökelti direkt bakı ve boyalı yaymalar hazırlamada kullanılabilir.
- Aspirattan hem direkt olarak, hem de santrifüj edilmiş çökeltisinden yayma hazırlanıp boyanmalıdır. Santrifüj edilmiş örneklerden üst sıvı dezenfektan içeren bir atık kabına atılır.
- Çökeltiden veya direkt örnekten 1 damla lam üzerine konur, üzerine 1 damla PVA fiksatif eklenir. Karıştırılıp düzgün ince bir tabaka olarak lama yayılan preparat tamamen kuruduktan sonra trikrom boyası (bkz. UMS, P-TP-04) ile boyanır.

3.3. Örneklerin mikroskopik incelemesi (Trikrom boyama)

- Amibiyaz tanısında laboratuvarın mikroskopik incelemeye dayalı bir sonuç verebilmesi için şüpheli örneklerden *hem* direkt mikroskopik inceleme *hem de* trikrom boyama yapmış olması gerekir.

- Şüpheli vaka örneğinin dışkılamadan sonraki ilk 30 dk içinde nativ-Lugol incelemesinde, nativ preparatta hareketli formların bulunup bulunmadığına bakılır. Ayrıca diğer parazit elemanlarının ve/veya eritrositlerin vb. varlığı yönünden de preparatlar incelenir.
- Nativ-Lugol incelemesinde *E. histolytica* tanısı konulamaz; bu inceleme ile patojen *E. histolytica*'nın, non-patojen *E. dispar*'dan ayırt edilmesi mümkün olmadığı gibi, *E. histolytica*/*E. dispar* dışkıda bulunabilen diğer non-patojen *Entamoeba* türlerinin formları ve lökositler ile de yaygın olarak karıştırılırlar. Bu nedenle, direkt mikroskopik inceleme bağırsak amibiyazı tanısında geçerli bir yöntem **değildir**. Dışkı örneğinin Nativ-Lugol incelemesi şüpheli formların bulunup bulunmadığını değerlendirmek amacıyla yapılır ve **sadece** ön tanı değeri taşır. Eğer şüpheli formlar mevcut ise hazırlanmış ve sabitlenmiş yaymalar hemen trikrom ile boyanmalı ve incelemelidir.
- Trikrom ile boyanmış preparatlarda trofozoit sitoplazması içinde eritrosit görülmesi *E. histolytica* için tanı koydurucu özelliktir (bkz. Şekil 2c,d,e ve f) ve "trikrom boyalı preparatta eritrosit içeren *E. histolytica* trofozoitleri gözlemlendi" şeklinde rapor edilir.
- Eğer trikrom ile boyanmış preparatta trofozoitler morfolojik olarak benziyor ancak eritrosit gözlenmiyorsa "*E. histolytica*/*E. dispar*" olarak rapor edilir (Şekil 2a ve b). Bu sonucun özgül *E. histolytica* antijen ELISA veya PCR ile doğrulanması gereklidir.

3.4. Parazit antijenlerinin aranması (*E. histolytica* Ag ELISA)

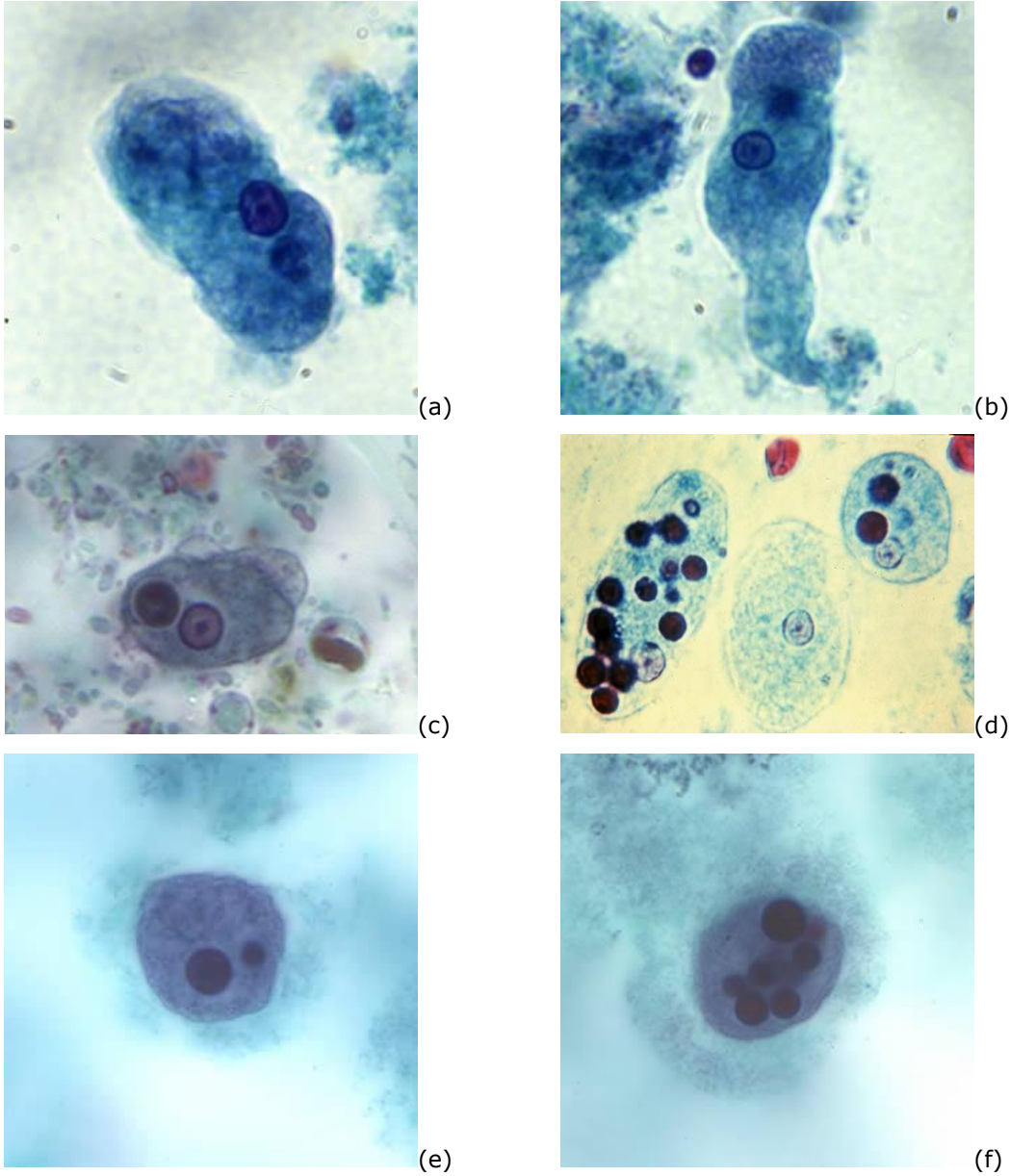
- İki türün (*E. histolytica*/*E. dispar*) antijenlerinin aynı anda saptandığı veya patojen, invaziv *E. histolytica* antijenlerinin özgül olarak ayrıca saptandığı kitler (özgül *E. histolytica* Ag ELISA) mevcuttur.
- *E. histolytica*/*E. dispar* Ag kiti **tarama** amaçlı, *E. histolytica* için özgül kit **doğrulama** amaçlı kullanılır.
- Şüpheli mikroskopi bulgularının doğrulanmasında *E. histolytica* için özgül kit (doğrulama amaçlı kit) kullanılmalıdır ve bu kit ile elde edilen pozitif sonuç "kesin tanı" bulgusudur.
- Tarama amaçlı kit ile elde edilen pozitif sonuç da tek başına anlamlı değildir; özgül *E. histolytica* Ag ELISA ile doğrulanmalıdır.
- Kitlerin duyarlılık ve özgüllüklerine göre farklı sonuçlar alınabileceği akılda tutulmalıdır.

3.5. Seroloji

- Bağırsak dışı amibiyazı tanısında serolojik testler daha uygundur. Serolojik testler üreticinin talimatı doğrultusunda çalışılmalı ve değerlendirilmelidir. Kullanılacak kitlerin duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olması tercih edilmelidir.

3.6. Moleküler tanı

- Klinik örnekte *E. histolytica* için PCR pozitifliği "kesin tanı" bulgusudur.



Şekil 2. Trikrom boyalı preparatlarda *E.histolytica*/*E.dispar* trofozoitlerinin (a,b) ve eritrosit fagosite etmiş *E.histolytica* trofozoitlerinin (c,d,e,f) görünüşü. Sitoplazma içine alınmış eritrositler koyu renkli inklüzyonlar şeklinde görülmektedir.

E.histolytica/*E.dispar* trofozoitleri düzgün dağılmış periferel kromatini ve merkezi yerleşmiş bir karyozomu olan tek bir nükleusa sahiptir. Ancak, bu tipik nükleus görünümüne her zaman rastlanmayabilir; bazı trofozoitlerde karyozom merkezden kaymış ve periferel kromatin düzensiz dağılmış olabilir. *E.histolytica*/*E.dispar* trofozoitleri genellikle 15-20 µm (10-60 µm arasında) boyutlarındadır ve özellikle ishelli dışkılarda uzun olmaya eğilimlidir. Sitoplazma granüler veya buzlu cam görünümünde olabilir. Eritrofagositoz (parazit tarafından eritrositin hücre içine alınması) sadece *E. histolytica*'ya özgü bir morfolojik özelliktir; *E.histolytica*'yı *E.dispar*'dan ayırır ve kalıcı boyalı preparatlarda gözlenebilir. Ancak eritrofagositoz her zaman gözlenebilir bir özellik değildir (11).

Tablo 1. Amibiyaz tanısında kullanılan testlerin duyarlılık ve özgüllükleri (9).

Yöntem	Amibik Kolit		AKA
	Duyarlılık	Özgüllük	Duyarlılık
Mikroskopi (dışkı)	Orta	Düşük	Düşük
Mikroskopi (apse sıvısı)	-	-	Düşük
Dışkıda antijen saptama ELISA	Mükemmel	Mükemmel	-
Serumda antijen saptama ELISA	Orta	Mükemmel	Mükemmel (ilk 3 gün) Düşük (geç dönem)
Apsede antijen saptama ELISA	-	-	Mükemmel (tedavi öncesi)
Serumda antikör saptama ELISA	İyi	İyi	İyi (akut dönem) Mükemmel (geç dönem)
Serum antikör saptama (IHA, IFA)	Mükemmel	-	Mükemmel (geç dönem)
PCR (dışkı, apse materyali)	Mükemmel	Mükemmel	Mükemmel

AKA, Amibik Karaciğer Apsesi

3.7. Saklama, Referans merkeze gönderme

- Pozitif kalıcı boyalı preparatlar eğitim ve benzeri amaçlar için saklanmalıdır. Gerekli bilgiler lam üzerine yazılmalı ve bir arşivleme sistemi kurulmalıdır.
- Pozitif kalite kontrol lamaları hazırlamak için laboratuvar *E.histolytica* içeren bir dışkı örneğini PVA veya SAF içinde saklamalıdır.
- Taze dışkı örnekleri ELISA, hızlı tanı testleri ve PCR için +4°C'de 1 haftaya kadar saklanabilirler. Bu süre içinde analiz edilmeyecekse test gününe kadar -20°C'de saklanırlar. Taze örnekler yalnızca bu testler için +4°C'de şehirlerarası gönderilebilirler.
- Eğer ileri tanı veya moleküler testler için örnekler başka bir şehirdeki laboratuvara gönderilecekse, *paketlenme* ve *taşıma* biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (16) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).

4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim

- Trikrom boyamada trofozoit sitoplazması içinde eritrosit görülmesi *E.histolytica* için tanı koydurucu özelliktir ve aşağıdaki gibi rapor edilir:
'Trikrom boyalı preparatta eritrosit içeren *Entamoeba histolytica* trofozoitleri gözlemlendi'
- Eğer trofozoitler morfolojik olarak benziyor ancak eritrosit gözlenmiyorsa 'Trikrom boyalı preparatta *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* trofozoitleri gözlemlendi' şeklinde rapor edilir.
NOT: Tedavideki farklılıkları nedeniyle rapor trofozoit ve/veya kist görülüp görülmediği bilgisini içermelidir.

- Laboratuvar, eğer mikroskopik tanı koyuyor ancak iki tipi ayırt etmek için hiçbir yöntem (boyama) kullanmıyorsa sonuç raporuna sadece; '*E. histolytica* / *E. dispar* ile uyumlu olabilecek parazit kist ve (veya) trofozoitleri tespit edildi' şeklinde yazılmalıdır.
NOT: Raporda hekime ayrıca kesin tanı için örneğin boyama ve/veya antijen ELISA testlerinin yapılabileceği bir laboratuvara gönderilmesi gerektiği not düşülmelidir.
- Sonuçlar raporlanırken mutlaka incelemenin hangi teknik ya da boya kullanılarak yapıldığı da rapora yazılmalıdır.
- ELISA ile elde edilmiş pozitif sonuç "kesin tanı" bulgusudur.
- Hızlı tanı testi kullanılmış ve sonuç pozitif bulunmuş ise sonuç trikrom boyama ve/veya antijen ELISA testi ile doğrulanmalıdır (Şekil 1).
- Dışkı incelemesi sonuçlarının genel değerlendirilmesi, yorumlanması ve raporlama ile ilgili ayrıntılı bilgi için "UMS P-OY-01 Dışkı örneklerinin parazitolojik incelemesi" başlıklı belgeye bakılmalıdır.
- *Entamoeba histolytica* ülkemizde **laboratuvardan** bildirim zorunlu bir etkidir (1). Tanı koyulması halinde olguların kayıt ve bildirim için Sağlık Bakanlığının "Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi" izlenmelidir (2).
- Vakanın bir salgınla ilişkili olabileceği hatırlanmalı ve bildirimler mümkün olan en kısa süre içinde yapılmalıdır.

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Amibiyaz etkeni *Entamoeba histolytica*'nın tanısında sorunlar yaşanmaktadır. İnvaziv amibiyaz tanısı ne yazık ki, ekonomik ve basit olması nedeniyle yaygın olarak Nativ-Lugol mikroskopi ile konmaktadır. Ancak, morfolojik yapı benzerlikleri yüzünden *E. dispar* ve *E. moshkovskii* (patojen- ve invaziv-olmayan kökenler) mikroskopi ile hem birbirlerinden hem de *E. histolytica*'dan ayırt edilememektedirler.
ÖNEMLİ: Direkt mikroskopi ile *E. histolytica* olarak rapor edilmiş her 10 hastadan dokuzunun aslında *E. dispar* olma ihtimali çok yüksektir; dolayısıyla bu hastalar YANLIŞ tanı ve gereksiz tedavi (ve olası ciddi tedavi yan etkileri) ile karşı karşıyadırlar.
- Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kabul edilebilir düzeyde yüksek bir duyarlılık ve özgüllük ile yaygın kullanılabilecek yöntem **trikrom boyama**dır. Ancak laboratuvarlar yoğun iş yükü gerekçesi ile boyama yöntemlerine zaman ayırmamaktadırlar.
- Antijen saptamaya yönelik ELISA görece yüksek maliyeti ve hasta akışı bakımından çoğu laboratuvar için kitin verimli tüketilme olasılığının düşük olması nedeniyle ister istemez az sayıdaki merkezde çalışabilmektedir.

- Bu sınırlayıcı özellikler göz önüne alındığında tanı aşağıdakine benzer basamaklı bir sistem kullanılarak konabilir *bkz.* Şekil 1):
 - (a) Direkt mikroskopide şüpheli formların görülmesi (*bütün laboratuvarlar*),
 - (b) Şüpheli formlar görülmüş örneğin trikrom boyanması (*>200 yatak kapasiteli hastane laboratuvarları*),
 - (c) Trikrom boyamada trofozoitler mevcut ancak eğer eritrosit fagosite etmiş trofozoit gözlenmiyor ise *E.histolytica/E.dispar* ayrımı için antijen ELISA çalışan bir merkeze örneğin gönderilmesi (*eğitim, araştırma, üniversite hastanesi laboratuvarları vb.*).
- Dışkının hemen incelenmesi zorunludur. Trofozoitlerin gözlenebilmesi için dışkının taze olması ve preparat hazırlanıp inceleninceye kadar sıcaklığının muhafaza edilmesi gereklidir.
- Dışkının makroskopik incelemesi ihmal edilmemelidir. Böylece kan ve mukus varlığı gözlenebilir. Boyalı mikroskopik incelemede tanı şansını bu kısımlardan yapılmış preparat ile yükseltmek mümkündür.
- Mukuslu dışkılar trofozoitin hareketlerini engelleyebildiği için bu formlar rahatlıkla gözden kaçabilmektedir.
- Tek bir örnekten elde edilen negatif sonuç bir intestinal parazit enfeksiyonunu dışlamaz. Güvenilir bir sonuç için çok sayıda dışkı örneğinin (2-3 gün aralarla alınmış en az 3 örnek) incelenmesi gerekir.
- Örnek kalitesi de sonucu etkiler. Florayı etkileyen antibiyotikler ve klorokin gibi antimalaryal ilaçlar, bağırsak protozoonlarının yakalanma olasılığını azaltır. Dışkıya idrar karışmamış olmalıdır. Dışkı örneklerinin parazitolojik inceleme için alınmasından önce hastaya baryum, kaolin, magnezi kalsine, antiasitler, bizmut, hint yağı, mineral yağı verilmemiş olmalıdır. Baryum verilmesinden sonra en az bir hafta geçmelidir.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Amibiyazın Mikrobiyolojik Tanısı) ayrıca aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve ilave bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

UMS, P-ÖY-01 Dışkı örneklerinin parazitolojik incelemesi

UMS, P-ÖY-02 Diğer intestinal örneklerin parazitolojik incelemesi

UMS, P-TP-01 Mikroskop kalibrasyonu

UMS, P-TP-02 Direkt mikroskopi

UMS, P-TP-04 Trikrom boyama

UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi

Kaynaklar

- 1 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 2 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 3 T.C. Sağlık Bakanlığı (Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi TR0802.16-01 Avrupa Birliği ve Dünya Bankası desteği ile) (Akbaş E, Pr Danışmanı). Türkiye’de Bulaşıcı Hastalıkların Tanısında Mikrobiyoloji Laboratuvar Kapasitesi Mevcut Durum Değerlendirmesi: Anket - LabKap2012. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kuşadası, 4 Kasım 2012.
- 4 Anonymous. WHO/PAHO/UNESCO, Report of a consultation of experts on amebiasis. *Weekly Epidemiology Record* 1997;72:97-99
- 5 Araz E. Amibiyazın Tanısı: Laboratuvarında Klasik Tanı Yöntemleri *In: Tanyuksel M (ed). Entamoeba histolytica ve Klinik/Laboratuvar Yönleriyle Amibiyaz*. Atlas Kitapçılık, Ankara. 2014, p.136-166
- 6 Garcia LS. Intestinal Protozoa: Amebae. *In: Garcia LS. (ed). Diagnostic Medical Parasitology*. 4th ed. ASM Press, Washington D.C. 2001, p. 6-35
- 7 Tanyuksel M, Petri WA Jr. Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 2003, p.713-29
- 8 Tanyuksel M, Petri WA Jr. Amebiasis. *In: Raker RE, Bope ET (eds). Conn’s Current Therapy*. Saunders Elsevier, Philadelphia. 2006, p. 66-71
- 9 Leber AL, Novak-Weekley S. Intestinal and urogenital amebae, flagellates, and ciliates. *In: Versalovic J (ed in chief). Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed., ASM Press, Washington, DC. 2011, p. 2149-2171.
- 10 CDC. Laboratory diagnosis of amebiasis. *Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar*.
http://www.cdc.gov/dpdx/resources/pdf/benchAids/Entamoeba_benchaid.pdf (son erişim tarihi: 30.01.2014)
- 11 CDC. Amebiasis. *Entamoeba histolytica*. DPDx - Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern. <http://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/index.html> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 12 CDC. Amebiasis: *Entamoeba histolytica* - Laboratory diagnosis. DPDx - Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern. <http://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/dx.html> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 13 Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriotts D, Ellis J, Harkness J. Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. *Clin Microbiol Rev* 2007, p. 511-32
- 14 Clark CG, Zaki M, Ali IKM, Genetic diversity in *Entamoeba histolytica*. *J Biosci* 2002;6 (Suppl 3): 603-7
- 15 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. *In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.2.1-4
- 16 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Giardiyazın (*Giardia intestinalis* enfeksiyonunun) **Mikrobiyolojik Tanısı**

Hazırlayan Birim	Klinik Parazitoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Parazitoloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	P-MT-02
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
TEKNİK BİLGİLER	4
1 Hedef mikroorganizma	4
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	4
3 Giardiyaz tanısında laboratuvar teknikleri	6
4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim	10
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	10
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	11
KAYNAKLAR.....	11

Kapsam ve Amaç

Giardiyaz dünya genelinde insanlarda en yaygın görülen bağırsak parazitozudur. Etkeni *Giardia intestinalis* (sinonimleri; *Giardia duodenalis*, *Giardia lamblia*) olup, parazit ince bağırsağın üst kısımlarında mukozaya tutunarak yaşar. Mukozanın salgı tübüllerinin içine penetre olabilir, zaman zaman safra kesesi ve safra yolunda bulunabilir. Hijyenik koşulların yetersiz olduğu toplu yaşam yerlerinde (huzurevleri, yurtlar, çocuk bakım evleri) giardiyaz sık görülmektedir.

Giardiyaz tanısı başlıca direkt mikroskopik incelemeye dayanır ve klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın bir şekilde uygulanabilmektedir. Ancak dışkıda bulunabilen benzer şekilli yapılardan ayrımı ve gerektiğinde yöntemin duyarlılığının yükseltilmesi hususları önemlidir.

Bu nedenle bu UMS'de hem ülke genelinde *Giardia* spp tanısı için uygulanabilecek standart bir prosedürün, hem de laboratuvarlara prosedürün sınırlılıkları, elde edilen sonuçların yorumlanması ve raporlanmasında dikkat edilecek konular ile şüpheli olgulara tanı konmadığı durumlarda başvurulacak alternatif teknikleri içeren bir tanı şemasının verilmesi hedeflenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

PVA Polivinil alkol (fiksatif)

SAF Sodyum asetat-asetik asit- formol (fiksatif)

Genel Bilgi

Giardiyaz dünya genelinde insanlarda en yaygın görülen bağırsak parazitozudur. Hijyenik koşulların yetersiz olduğu toplu yaşam yerlerinde (huzurevleri, yurtlar, çocuk bakım evleri) daha sık görülmektedir. Hastalık parazitin dört çekirdekli olgun kistlerinin ağız yoluyla alınmasıyla bulaşır (1,2).

Parazitin patojen etkisi, alınan suşa, parazit sayısına ve kişinin yaşına göre değişmektedir. Olguların %80-85'i asemptomatiktir. Klinik olarak akut ve kronik seyredebilir. Akut seyreden olgularda şiddetli bol, pis kokulu yağlı ishal görülür. Kronik olgularda ise yağ ve yağda eriyen vitaminlerin emilimi bozularak, malabsorbsiyona yol açabilir. Genellikle çocuklarda kilo alımının durmasına, malnütrisyon ve gelişme geriliğine sebep olabilir. Giardiyaz enfeksiyonunda pankreatik enzimlerde ve intestinal mukozada disakkaridaz aktivitesinde azalma, vitamin B12, vitamin A, yağ, folik asit ve d-ksiloz malabsorbsiyonu gösterilmiştir. Klinik ve patolojik bulgular Çölyak hastalığını da taklit edebilir (1,2).

Tanıda en yaygın kullanılan yöntem dışkının direkt mikroskopik incelemesidir. Daha yüksek bir duyarlılık gerektiğinde dışkı örneklerinde *G. intestinalis* antijenleri için özgül immünoagnostik testlere (ELISA, DFA) ve/veya moleküler tanı tekniklerine başvurulabilir. Gerektiğinde duodenal aspirat ve/veya biyopsilerde de benzeri incelemeler yapılabilir. Salgınlarda bulaş kaynağının gösterilmesi için genotiplendirme çalışmalarında PCR önerilir (3,4,5).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizma

Giardia intestinalis (trofozoit ve kistleri)

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

Potansiyel enfeksiyöz organizmalar içerebileceğinden dolayı dışkı örnekleri ile ilgili incelemeler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmeli; bütün örnekler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır (bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi"). Dışkı örnekleri koruyucu maddelerle fikse edilmiş olsalar bile bu önlemler alınmalıdır; çünkü hala enfeksiyöz olabilirler. Özellikle kalın cidarlı bazı parazit ookistleri ve kistleri formolde fikse edildikten haftalar sonra ölürler. *Ascaris lumbricoides* yumurtaları formolde saklandığında bile gelişmeye devam edebilir ve enfeksiyözdür.

Bu prosedür uygulanırken daima **eldiven** giyilmelidir!

Boyanmış olsun olmasın, bütün lamlar **kesici-delici atık** kabul edilir ve kesinlikle kesici-delici atık kutusuna atılırlar! Diğer biyolojik kirlilerin bulunduğu torbalara atılmaları halinde torbayı deler ve ciddi enfeksiyöz risk oluştururlar.

Güvenlik uyarısı! Kullanılan reaktifler veya fiksatiflerde bulunabilen fenol, formol, eter, cıva gibi maddeler toksik, koroziv ve/veya kanserojendir! Solunmasından ve/veya direkt temastan kaçınılmalı, bu kimyasallarla çeker ocak içinde ve ilgili kimyasal güvenlik tedbirleri alınarak çalışılmalıdır.

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) tekniğin uygulanmasından önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) tekniklere tüm yönleriyle aşina olmalı, ve (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Bu UMS'nin uygulanmasından analist; tekniklerin prosedüre uygun yapılmasını sağlamaktan ve denetimi, değerlendirilmesi ve onaylanmasından (sonucun doğru ve güvenilir olmasından) Tıbbi Mikrobiyoloji/Parazitoloji Uzmanı sorumludur.

İnvaziv teknik kullanılarak alınmış örnekler en kısa sürede ve **mutlaka** Tıbbi Mikrobiyoloji / Tıbbi Parazitoloji Uzmanı tarafından bizzat incelenmeye hazırlanmalı, incelenmeli, değerlendirilmeli ve sonuçlandırılmalıdır.

2.3. Reaktif, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

Örneklerinin alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden ve örnek yönetimi ile ilgili "UMS, P-ÖY-01" ve "UMS, P-ÖY-02" belgelerinden edinilebilir.

Aşağıda bazı önemli hususlara tekrar dikkat çekilmektedir:

- Dışkı – Direkt mikroskopik inceleme için ideal olarak dışkı laboratuvara hemen, vücut sıcaklığını kaybetmeden verilmelidir ve inceleme de trofozoitler dejenere olmadan hemen yapılmalıdır (*bkz.* UMS, P-ÖY-01).
 - Duodenal sıvı veya biyopsi örnekleri - Taze veya fiksatif içinde (%10 formolde ve PVA veya SAF içinde) gönderilir (*bkz.* UMS, P-ÖY-02).
- NOT: İmmünoagnostik veya moleküler yöntemlerde kullanılacak örnekler (dışkı veya diğer) fiksatif içine alınmamalı ve çalışılıncaya kadar -20°C'de saklanmalıdır.

Reaktif/Kit

- Mikroskopi için - SF ve Lugol'ün iyot solüsyonu için *bkz.* UMS, P-TP-02. Trikrom boyama yapılacaksa *bkz.* UMS, P-TP-04.
- Antijen saptayan yöntemler ve hızlı tanı testleri – Piyasada çeşitli ELISA ve DFA kitleri mevcuttur. *G. intestinalis* için özgül antikörlerin kullanıldığı duyarlılık ve özgüllüğü yüksek testler tercih edilmelidir.
- Moleküler yöntemler için – Piyasadan hazır temin edilebilen DNA izolasyon ve PCR kitleri kullanılabilir. Ayrıca reaktiflerin bir araya getirilmesi ile *öz-yapım* geleneksel PCR da kullanılabilir. PCR duyarlılığını artırmak amacıyla dışkıdan DNA izolasyonunda uygun modifikasyonların kullanılması gerekebilir.

Diğer gereç, donanım

Mikroskopi için;

- Mikroskop, binoküler (rutin) – 10× (düşük), 40× (yüksek kuru), 100× (immersiyon) objektifleri ve 10× oküleri olan tercih edilir.
- NOT: 5× oküler daha az büyütme sağlar ve inceleme duyarlılığını düşürür; bu nedenle 10× oküler kullanılması önerilmektedir (6).
- Önceden temizlenmiş lamalar (25×75 mm) – tercihen kenarı rodajlı
 - Kurşun kalem - lamenin rodajlı kenarına örnek numarası vb. yazmak için
 - Lamel (22×22mm)
 - Tahta veya plastik örnek alma çubuğu
 - Trikrom boyama gereç ve donanımı için *bkz.* UMS, P-TP-04.
 - Kesici-delici atık kabı ve toksik boya atıkları için kimyasal atık kabı

ELISA/DFA için;

- ELISA okuyucu, yıkayıcı
- Floresan mikroskop - FITC konjugat için uygun filtreler ile iyi çalışır durumda (365 nm eksitasyon ve 450 nm emisyon filtreleri ve 490 nm eksitasyon ve 510 nm emisyon filtreleri)
- Ayarlanabilir otomatik mikropipetler (5-1000 µl) ve pipet uçları

PCR ve diğer moleküler testler için;

- En az üç ayrı oda - Nükleik asit ekstraksiyonu, PCR karışımının hazırlanması, amplifikasyonun ve sonuç gözetiminin yapılabileceği ayrı odalar. İdeal olarak PCR karışımı hazırlama odası (temiz oda) pozitif basınçlı, agaroz jel elektroforezi yapılan oda (kirli oda) negatif basınçlı havalandırmaya sahip olmalıdır.

- Donanım – biyogüvenlik kabini, santrifüj, soğutmalı mikrosantrifüj, hassas terazi, vorteks, su banyosu, yatay çalkalayıcı, PCR ısı döngü cihazı (gerçek zamanlı veya geleneksel), mikrodalga fırın, jel görüntüleme sistemi, elektroforez ünitesi vb.

2.4. Kalite kontrol

- Mikroskop belirli aralıklarla (yoğun kullanılıyorsa yılda en az bir kez) kalibre edilmelidir. Mikroskoba herhangi bir parça eklenmesi veya değiştirilmesi durumunda da kalibrasyon yapılmalıdır. Kalibrasyon için kullanılmış optikler mikroskobun üzerinde olmalıdır. Tüm objektifler için kalibrasyon faktörleri göz önündeki bir panoda asılı olmalıdır (*bkz.* UMS, P-TP-01 Mikroskop Kalibrasyonu) (6).
- Her yeni hazırlanmış veya ticari reaktif seti veya kit lotu -moleküler testler için olanlar dahil- kullanıma sokulmadan önce pozitif kalite kontrol örnekleri ile test edilmelidir. Kullanılan kitlerin son kullanma tarihleri ve saklama koşullarına dikkat edilmelidir.
- Her kullanımdan önce solüsyonlar kontrol edilmeli; bulanık veya renk değişikliği olmuş solüsyonlar değiştirilmelidir.
- Hazırlanan her preparat -ıslak iken- arkasından gazete kağıdı okunabilecek kalınlıkta olmalıdır.
- Pozitif kalite kontrol lamaları PVA ile saklanmış *G. intestinalis* içeren dışkı örneklerinden hazırlanır. Boyama yapılacaksa, sonuçların uygunluğundan emin olmak için pozitif örnekler teste dahil edilmelidir.
- Floresan mikroskobu her açıldığında ampulün saatinin çalıştığından emin olunmalı ve kullanım sonrası süre kaydedilerek ampulün ömrü takip edilmelidir.
- Tüm ekipmanın bakım ve kalibrasyonu düzenli olarak yapılmış olmalıdır.
- Tüm kalite kontrol sonuçları kaydedilmelidir.

3 Giardiyaz tanısında laboratuvar teknikleri

3.1. Örneklerin inceleme için hazırlanması

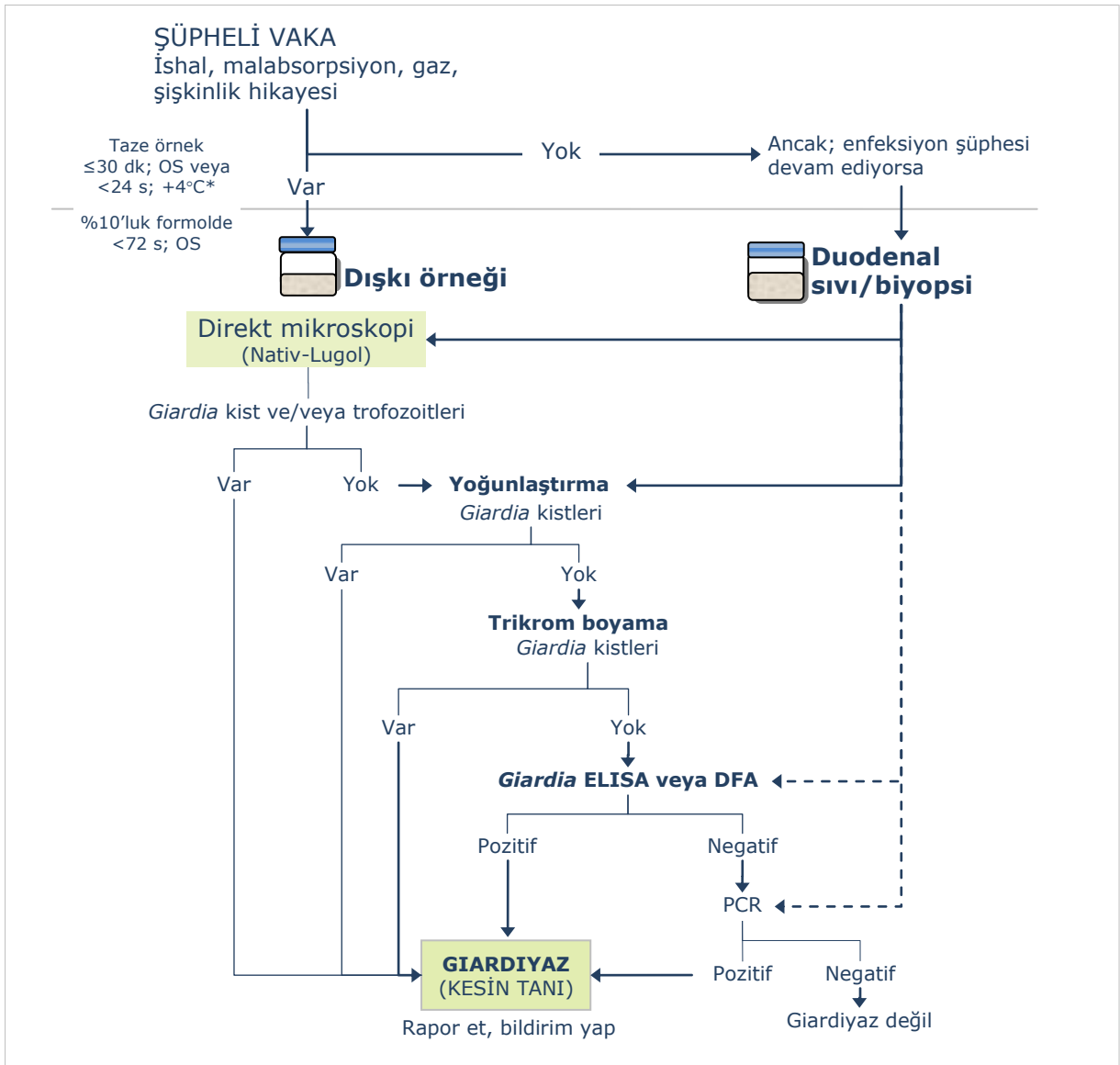
- Taze dışkı örneğinden nativ-Lugol preparat hazırlanmalıdır (*bkz.* UMS, P-TP-02). Sulu ishal durumunda örnek dışkılamadan sonraki 30 dk içinde incelemeye alınmış olmalıdır. Temiz bir lamın üzerine bir damla SF ve bir damla Lugol damlatılır. Örnek çubuğu ile küçük bir parça dışkı alınır ve lam üzerindeki SF ile homojenize edilir. Aynı işlem Lugol için tekrarlanır. Her iki süspansiyonun üzeri lamelle kapatılır.

NOT 1: Dışkı örneği 30 dk içinde incelenemeyecekse daha sonra yapılacak işleme uygun fiksatif içine alınmalıdır.

NOT 2: Kitlere dayalı teknikler (DFA, ELISA, hızlı tanı) ve PCR taze veya dondurulmuş örneklerden çalışılır. Bu tekniklerin çoklaştırılmış örneklerle uygulanıp uygulanmayacağı için üreticinin kullanma talimatındaki öneriler izlenmelidir.

- Çöktürme yöntemi (formol-etil asetat) uygulanmış dışkı örneğinden de çöktelden benzer şekilde nativ-Lugol preparat hazırlanır. Yüzdürme yönteminde yoğun yüzdürme solüsyonu üzerine konmuş lamel alınarak doğrudan incelenir veya o yöntem için önerildiği şekilde yüzeyden örnek alınarak preparat hazırlanır (bkz. UMS, P-TP-03).
- Boyama yapılması gerektiğinde lam üzerine dışkıdan yayma hazırlanır. Bunun için bir damla SF ile dışkı homojenize edilir; 1 cm çapında bir alana yayılır ve Schaudinn fiksatifine içine daldırılarak 30 dk bekletilir; sabitlenir (bkz. UMS, P-TP-04).
- Preparatların kalınlığı (nativ-Lugol veya boyama için) kontrol edilmelidir; her zaman bir gazete yazısı okunabilir kalınlıkta olmasına dikkat edilmelidir.

3.2. Tanı için akış şeması



Şekil 1. Giardiyaz tanısında kullanılan teknikler ve karar adımları.

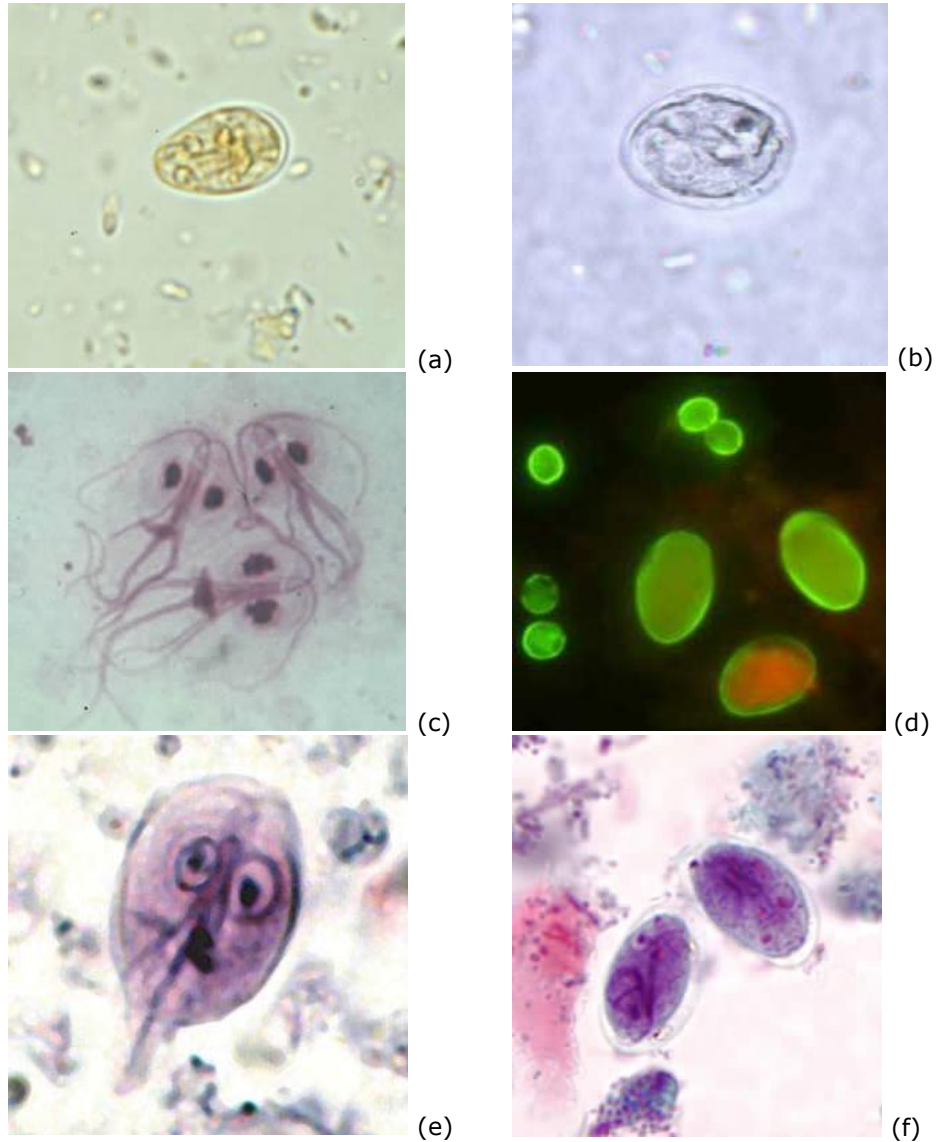
* DFA/ELISA veya moleküler yöntemlerde kullanılacak örnekler 1 haftaya kadar 4°C'de ya da daha uzun süreler için çalışılincaya kadar -20°C'de saklanabilir. OS, oda sıcaklığı; dk, dakika; s, saat

3.1. Direkt mikroskopik inceleme

- Giardiyaz tanısı esasen direkt mikroskopik incelemeye dayanmaktadır. Taze örnekten ve örneğe bir yoğunlaştırma yöntemi uygulamasından sonra yapılmış preparatların incelenmesi çoğu zaman tanı koymak için yeterli olabilir.
- Özellikle ishal vakalarında hemen incelemeye alınmış dışkı örneğinde direkt mikroskopik inceleme ile hareketli trofozoitleri görmek mümkündür.
- Işık mikroskopunda *Giardia* kistleri 11-14 µm boyutlarında oval-elips bir şekle sahip oldukça tipik görünüşleri ile kolay ayırt edilirler. Olgunlaşmamış kistlerde 2 ve olgun kistlerde 4 nükleus ayırt edilir. Kistler içinde intrasitoplazmik fibriller de görünür (bkz. Şekil 2a,b) (7).
- Trofozoitler mevcut ise, nativ preparatta genellikle tipik düşen yaprak veya yuvarlanma hareketi ile ayırt edilirler. Armut şekline benzerler ve 10-20 µm boyutlarındadır. Trofozoit yandan bir kaşık gibi görünür ve karın bölgesindeki büyük vantuz (emme-diski) da gözlenebilir (8).
- Eğer direkt mikroskopi veya konsantrasyon yöntemi ile organizma ayırt edilememiş ise kalıcı boyama (trikrom) yapılmalıdır. İncelemede iki büyük nükleus, karın vantuzu, medyan cisimcikler ve kamçuları genellikle ayırt edilir (bkz. Şekil 2e,f) (9).
- Eğer dışkı incelemesinde *Giardia* formları saptanamamış, ancak enfeksiyon şüphesi halen devam ediyor ise duodenal örnekler incelenebilir. Duodenal örneklerde direkt mikroskopik inceleme ile hareketli trofozoitleri görmek mümkündür. Ancak bugün duodenal örnek almak için hastaya zahmet veren girişimlerde bulunmak yerine, önce dışkıda parazit antijenlerini saptayan yöntemlere başvurulması tercih edilmektedir.

3.2. Parazit antijenlerinin aranması

- DFA özellikle dışkının tekrarlayan incelemelerde negatif bulunduğu durumlarda ve ayrıca tarama gerektiren durumlarda (ör., salgın araştırmasında suların incelenmesinde) tercih edilen bir yöntemdir (8).
- DFA kitleri piyasada; FITC konjuge özgül monoklonal antikolar ile sadece *Giardia* kistlerini saptayabilen özellikte, veya hem *Giardia* kistlerini hem de *Cryptosporidium* ookistlerini aynı anda saptayabilen kombine kit şeklinde mevcuttur.
- Bu kitlerin duyarlılık ve özgüllükleri mikroskopi ile karşılaştırıldığında %100'dür (8). Kitler laboratuvarında üreticinin talimatı doğrultusunda kullanılır. Floresan mikroskop altında *Giardia* kistleri yeşil, parlak, oval nesnelere sekinde görülür (bkz. Şekil 2d)
- DFA testinde kist ve ookistler sayılabilir ki bu özellikle epidemiyolojik amaçlarla ve kontrol çalışmalarında kullanışlı olabilir (10).
- Giardiyaz tanısına yönelik ELISA kitleri de bulunmaktadır. Kitlerin duyarlılık ve özgüllüklerine göre farklı sonuçlar alınabileceği akılda tutulmalıdır.



Şekil 2. Direkt ve boyalı preparatlarda *Giardia* kist ve trofozoitleri. (a) Lugol'ün iyodu ile boyalı ıslak preparatta *Giardia* kistleri, (b) Boyasız ıslak preparatta *Giardia* kistleri, (c) Giemsa boyalı mukozal biyopsi baskı preparatında *Giardia* trofozoitleri, (d) DFA ile boyanmış preparatta *G.intestinalis* kistleri (sağ altta) ve *Cryptosporidium parvum* ookistleri (sol üstte), (e) ve (f)'de trikrom ile boyanmış preparatlarda sırasıyla bir trofozoit ve iki kist (Kaynak 9 ve 10)

3.3. Diğer yöntemler

- İmmüno-kromatografik temele dayalı hızlı testler (sadece giardiyaza özgü ya da *Cryptosporidium* ile kombine test şeklinde) mevcuttur. Ancak dışkıda rutin parazit incelemesinin yerine kullanılamaz!
- Klinik örneklerde *G. intestinalis* DNA'sının aranması için PCR tekniği kullanılabilir. Pozitif sonuç "kesin tanı" bulgusudur. Moleküler testler *Giardia* alt tiplerinin belirlenmesinde de kullanışlıdır; ancak klinik pratik için alt tiplerin belirlenmesi anlamlı değildir.

3.4. Saklama, Referans merkeze gönderme

- Pozitif kalıcı boyalı lamalar eğitim ve benzeri amaçlar için saklanmalıdır. Gerekli bilgiler lam üzerine yazılmalı ve arşivleme sistemi kurulmalıdır.
- Pozitif kalite kontrol lamaları hazırlamak için laboratuvar *G. intestinalis* pozitif olan bir dışkı örneğini PVA veya SAF içinde saklamalıdır.
- Eğer ileri tanı veya moleküler testler için örnekler başka bir şehirdeki laboratuvara gönderilecekse, *paketleme* ve *taşıma* biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (11) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).
- Taze dışkı örnekleri ELISA, hızlı tanı testleri ve PCR için +4°C'de 1 haftaya kadar saklanabilirler. Bu süre içinde analiz edilmeyecekse test gününe kadar -20°C'de saklanırlar. Taze örnekler yalnızca bu testler için +4°C'de şehirlerarası gönderilebilirler.
- Yaymalar; Schaudinn veya PVA fiksasyonu ile sabitlenmedikçe şehirlerarası gönderilemezler. Sabitlenmiş lamalar, lam kutusu içine birbirine teması önlenerek şekilde yerleştirilir ve oda sıcaklığında gönderilirler.

4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim

- Sonuçların değerlendirilmesi, yorumlanması ve raporlama ile ilgili ayrıntılı bilgi için "UMS P-OY-01 Dışkı Örneklerinin Parazitolojik İncelemesi" başlıklı belgeye bakılmalıdır.
- Direkt mikroskopik incelemede incelenen preparat sonucunun negatif olduğunu söyleyebilmek için; düşük büyütmede ($\times 100$) bütün lamel alanının, yüksek kuru büyütmede ($\times 400$) ise lamel alanının en az üçte birinin incelenmiş olması gerekir (12).
- Direkt mikroskopik incelemede *Giardia intestinalis* kistleri, sulu dışkılamada da trofozoitleri kolaylıkla tanınabilir. Pozitif bulgu; "*Giardia intestinalis* kistleri (ve/veya trofozoitleri) görüldü" şeklinde rapor edilir.
- DFA veya ELISA ile elde edilmiş pozitif sonuç "kesin tanı" bulgusudur.
- *Giardia intestinalis* ülkemizde **laboratuvardan** bildirim zorunlu bir etkidir (13). Tanı koyulması halinde olguların kayıt ve bildirim için Sağlık Bakanlığının "Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi" izlenmelidir (14).
- Vakanın bir salgınla ilişkili olabileceği hatırlanmalı ve bildirimler mümkün olan en kısa süre içinde yapılmalıdır.

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Giardiyaz tanısında tek başına taze dışkı örneğinin direkt mikroskopik incelemesi yeterli değildir. Örneklerin ayrıca en az bir yoğunlaştırma yöntemi ile incelenmesi ve trikrom boyanması da gerekir.

- Tek bir örnekten elde edilen negatif sonuç bir intestinal parazit enfeksiyonunu dışlamaz. Güvenilir bir sonuç için çok sayıda dışkı örneğinin (2-3 gün aralarla alınmış en az 3 örnek) incelenmesi gerekir
- Dışkının hemen incelenmesi zorunludur. Trofozoitlerin gözlenebilmesi için dışkının taze olması ve preparat hazırlanıp inceleninceye kadar ısısının muhafaza edilmesi gereklidir. Mukuslu dışkılar trofozoitin hareketlerini engelleyebildiği için bu formlar rahatlıkla gözden kaçabilmektedir.
- Örnek kalitesi de sonucu etkiler. Florayı etkileyen antibiyotikler ve klorokin gibi antimalaryal ilaçlar, bağırsak protozoonlarının yakalanma olasılığını azaltır. Dışkıya idrar karışmamış olmalıdır. Ayrıca dışkı örneklerinin parazitolojik inceleme için alınmasından önce hastaya baryum, kaolin, magnezi kalsine, antiasitler, bizmut, hint yağı, mineral yağı verilmemiş olmalıdır. Baryum verilmesinden sonra en az bir hafta geçmelidir.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Giardiyazın Mikrobiyolojik Tanısı) ayrıca aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir. Özellikle, uygun inceleme örneklerinin seçimi ve inceleme örneklerinden direkt mikroskopi, yoğunlaştırma ve boyama yöntemlerinin yapılması hakkında yeterli bilgi için bu belgelere bakılması önerilir:

- UMS P-ÖY-01 Dışkı örneklerinin parazitolojik incelemesi
- UMS P-ÖY-02 Diğer intestinal örneklerin parazitolojik incelemesi
- UMS P-TP-01 Mikroskop kalibrasyonu
- UMS P-TP-02 Direkt mikroskopi
- UMS P-TP-03 Yoğunlaştırma yöntemleri
- UMS P-TP-04 Trikrom boyama
- UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Intestinal and urogenital protozoa. *In: Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA (eds). Medical Microbiology. 4th ed. Mosby. 2002, p.701-703*
- 2 Leber AL, Novak-Weekley S. Intestinal and urogenital amebae, flagellates, and ciliates. *In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds). Manual of Clinical Microbiology. 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 2149-2171.*
- 3 Girginkardeşler N, Ok ÜZ. Kalıcı Boyalı Yayımlar. *In: Korkmaz M, Ok ÜZ (eds). Parazitolojide Laboratuvar. 1. baskı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, Meta Basım, İzmir. 2011, p. 29-37*
- 4 Kilimcioğlu AA, Ok ÜZ. Yoğunlaştırma Yöntemleri. *In: Korkmaz M, Ok ÜZ (eds). Parazitolojide Laboratuvar. 1. baskı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, Meta Basım, İzmir. 2011, p. 23-28*
- 5 Ok ÜZ, Girginkardeşler N, Kilimcioğlu A, Limoncu E. Dışkı İnceleme Yöntemleri. *In: Özcel MA, Altıntaş N (eds). Parazit Hastalıklarında Tanı. 1. baskı. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir. 1997, p. 1-61*

- 6 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. *In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.2.1-4
- 7 Bauman RW, Machunis-Masuoka E, Montgomery JE, Cosby CD, Fulks J, Lammert JM (eds). Microbial diseases of the digestive system: Protozoan diseases of the intestinal tract. Chapter 23: *In: Microbiology with Diseases by Body System*. 3rd ed. Pearson Education, Inc., San Francisco, CA. 2012, p. 728-31
- 8 Healy GR, Garcia LC. Intestinal and urogenital protozoa. *In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH eds. Manual of Clinical Microbiology*, 6th ed. ASM, Washington D.C. 1995, p. 1204-1228
- 9 CDC. Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. Image Library - Giardiasis. http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Giardiasis_il.htm (son erişim tarihi: 08.02.2013)
- 10 CDC. Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. Detection of Parasite Antigens. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/DiagnosticProcedures.htm> (son erişim tarihi: 08.02.2013)
- 11 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.
- 12 Garcia LS, Shimizu RY, Paltridge GP. General approaches for detection and identification of parasites. *In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds). Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p.2047-2063
- 13 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 14 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004. <http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Cryptosporidium türlerinin Mikrobiyolojik Tanısı

Hazırlayan Birim	Klinik Parazitoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Parazitoloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	P-MT-03
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
Parazitin özellikleri.....	3
Hastalığın önemi.....	4
Klinik özellikleri	5
Laboratuvar tanısı.....	5
TEKNİK BİLGİLER	6
1 Hedef mikroorganizma(lar)	6
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	6
3 Kriptosporidiyoz tanısında kullanılan teknikler	10
4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim	15
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	15
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	16
KAYNAKLAR.....	16

Kapsam ve Amaç

Cryptosporidium spp insan ve hayvanların sindirim ve solunum sisteminde yerleşebilen protozoon parazitlerdir. Bu etkenlerin neden olduğu kriptosporidiyoz, asemptomatik taşıyıcılıktan özellikle immün sistemi baskılanmış kişilerde ölümcül seyrebilen ishale kadar değişebilen geniş bir klinik spektruma sahiptir. Kriptosporidiyoz, enfektif *Cryptosporidium* spp ookistlerinin fekal-oral yolla alınması sonucu bulaşır. Klinik bulgular özgül olmadığından tanı yalnızca laboratuvar incelemesiyle konur.

Cryptosporidium spp su kaynaklı kitlesel salgınlar yapabildiğinden, halk sağlığı önemine sahip bir etkindir ve ülkemizde laboratuvarından bildirim zorunludur (1,2,3). Ancak, ülkemizde klinik laboratuvarların çok azı (%4) bu etkenin tanısı ile ilgili inceleme yapabilmektedir (4). Vakaların önemli bir kısmının bu nedenle tanı alamadığı düşünülürse, uygun bir prosedürün el altında olması tanının yaygınlaşmasını teşvik edecek bir araç olarak önemli görünmektedir.

Bu UMS belgesinin amacı klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarına şüpheli vakalara kriptosporidiyoz tanısının konulmasında kullanabilecekleri inceleme yöntemleri için yardımcı bir rehber sunmaktır.

Kısaltmalar ve Tanımlar

- FM** Floresan mikroskopi (auramin-rhodomine boyama için)
KOH Potasyum hidroksit
MAF Modifiye Kinyoun asit-fast
PVA Polivinil alkol (fiksatif)
SAF Sodyum asetat-asetik asit- formol (fiksatif)

Genel Bilgi

Cryptosporidium ile insan enfeksiyonları altı kıtada 60'dan fazla ülkede bildirilmiştir. Farklı ülkelere, dışkıda ookistlerin görülmesiyle belirlenen enfeksiyon prevalansı, gelişmekte olan ülkelere daha yüksek olup, bu oran, Avrupa ve Amerika'da %1-3 iken, Asya ve Afrika gibi daha az sanayileşmiş ülkelere %5-10 arasında değişmektedir. Ülkemizde değişik bölgelerde ve çeşitli hasta gruplarında (ishalli, immün yetmezlikli vb.) kriptosporidiyoz görülme sıklığı üzerinde yapılan çalışmalarda oranların %1-30 arasında olduğu görülmektedir (5).

Parazitin özellikleri

Kriptosporidiyoz, omurgalıların sindirim ve solunum sistemi epitelinde hücre içi, ancak sitoplazma dışı yerleşim gösteren *Cryptosporidium* türlerinin neden olduğu bir protozoon hastalığıdır. Diğer koksidiya cinslerinden farklı olarak ookistlerinin içinde sporokist olmaması nedeniyle *Cryptosporidium* olarak isimlendirilmiştir.

İnsanlarda ilk vaka 1976 yılında tanımlanmış ve etken olarak *Cryptosporidium* belirlenmiştir. Bugün farklı konakları enfekte eden 26 *Cryptosporidium* türü olduğu, bunların bir kısmının insanlardaki enfeksiyondan da sorumlu olduğu bilinmektedir. Ancak insanda en sık hastalığa neden olan türler *C.parvum* ve *C. hominis*'tir (5,6,7,8).

C. parvum doğada birçok kuş ve memeli türünün (sığır, koyun ve bazen köpek, kedi, kemirgenler) bağırsaklarında bulunan yaygın bir koksidiyal parazittir. Enfektif ookistler bu konaklar tarafından çevreye yayılır (5,7).

İnsanlar ookistleri kontamine su veya gıda ile aldıklarında ince bağırsaklarda sporozoitler açığa çıkar ve bunlar epitel hücreleri içine girerek merozoite dönüşürler. Merozoitlerin bazıları zigotları oluşturmak üzere seksüel üreme fazına geçerler. Zigotların fertilizasyonu sonucu da ince ve kalın duvarlı yeni ookistler meydana gelir. İnce duvarlı ookistler daha çok konağın yeniden enfeksiyonundan ('autoinfection') sorumludurlar. Kalın bir duvarla çevrilmiş içinde dört tane çıplak sporozoit (her biri $\sim 1 \times 5 \mu\text{m}$) bulunan ookistler ise çevreye yayılırlar ve yeni bir konağa geçtiklerinde yeni yaşam döngüsü başlatırlar (3,6,8).

Bulaş *Cryptosporidium* spp ookistleri ile kontamine olmuş içme suyu, gıdalar veya daha nadir olarak yüzme suları aracılığıyla fekal-oral yoldan olmaktadır. Ayrıca insandan insana direkt veya solunum yoluyla da bulaşabilir (6,9).

Hastalığın önemi

Halk sağlığı açısından önemi, öncelikle, *Cryptosporidium* ookistlerinin boyutlarının içme suyu arıtma tesislerinin kum filtreleri tarafından tutulamayacak kadar küçük (4-6 μm) olmasından kaynaklanır. Dolayısı ile şehir şebeke suyuna geçebilirler. Daha da ilerisi, klor gibi suyun dezenfeksiyonunda kullanılanlar dahil (ör., %3'lük hipoklorid, iyot bileşikleri, kresilik asit, benzalkonyum klorid vb.) dezenfektanlara da ileri derecede dirençlidirler. Soğuk, nemli ortamlarda canlılık ve enfektivitesini aylarca koruyabilen bu ookistlerin enfeksiyon dozunun hayli düşük -10 ila 100 ookist- olması da sorunu ağırlaştıran diğer bir özelliğidir (8).

Bu özellikleri, içme sularının fekal kontaminasyonu ve yetersiz işlenmesi ile ilişkili büyük kitlesel salgınlarını izah etmektedir. Dünyada bugüne kadar kontamine içme suyunun tüketimine ya da kontamine sularda yüzme ve diğer aktivitelere bağlı olduğu bilinen çok sayıda su kaynaklı kriptosporidiyoz salgını kaydedilmiştir. İçme suyu aracılığıyla bulaş sonucu 1984'de Texas'da 5.900, 1987'de ABD'nin Carroll eyaletinde 13.000 ve 1993'de Milwaukee'de 403.000 kişiyi enfekte eden büyük salgınlar olmuştur. Milwaukee salgını bilinen en büyük su kaynaklı salgın olup, salgın sırasında kanalizasyon örneklerinin %90'ında, nehir suyu örneklerinin %75'inde ve içme suyu örneklerinin de %28'inde ookistlerin varlığı gösterilmiştir. 1986-1998 yılları arasında da halka açık havuzlar, su eğlence parkları, göl veya nehir sularında yüzme ile gelişen ve 10.000'den fazla kişiyi etkileyen kriptosporidiyoz salgınları rapor edilmiştir (6,8).

Kriptosporidiyoz çocukluk çağı ishalleri arasında da önemli bir yer tutar ve 1-5 yaş arasında pik yapmaktadır. Çocuklar ile aile içi temas veya mesleğe bağlı karşılaşma nedeniyle 20-40 yaş grubu erişkinler kriptosporidiyoz prevalansı açısından ikinci önemli grubu oluşturmaktadır. Ayrıca enfeksiyonun mevsimsel özellik gösterebildiği, özellikle daha sıcak ve nemli aylarda sık görüldüğü ancak insidansın her ülkede farklı dönemlerde artabileceği bildirilmiştir (5).

Klinik özellikleri

Kriptosporidiyozun inkübasyon süresi 5 ila 28 gün arasında değişir. İshal en yaygın semptomdur ve karakteristik olarak suludur; hatta bazen koleradakinine benzer bir sulu ishal gözlenebilir. Daha az olarak hastalarda karın ağrısı, ateş, bulantı-kusma ve kilo kaybı da görülür. Enfeksiyonun şiddeti kişinin immün sisteminin durumuna bağlıdır. Enfeksiyon sağlıklı bireylerde asemptomatik veya kendini sınırlayan bir hastalık ile seyredebileceği gibi, AIDS başta olmak üzere immün sistemi baskılanmış bireylerde ciddi uzamış ishalle birlikte, solunum sistemi, hepatobiliyer sistem ve pankreası da etkileyerek hayatı tehdit eden tablolara neden olabilmektedir (6,8).

Laboratuvar tanısı

Kriptosporidiyozda klinik bulgular özgül olmadığından tanı laboratuvar incelemesine dayanmaktadır. Tanı amacıyla en sık kullanılan materyal dışkıdır. İmmün sistemi baskılanmış kişilerde ince bağırsak aspirasyon sıvısı/biyopsisi, safra ya da karaciğer biyopsi örneği, solunum sistemi örnekleri ve mide yıkama suyu da tanı amaçlı kullanılabilir (7,10).

Küçük yuvarlak ookistlerin genellikle dışkıda az sayıda olmaları ve mayalara çok benzemeleri nedeniyle boyasız preparatlarda (dışkının direkt mikroskopisinde) saptanması pratik olarak mümkün değildir. Bu nedenle tanıda asgari yöntem asit-fast boyama teknikleri ile (modifiye Kinyoun asit-fast) boyanmış dışkı yaymalarının mikroskopik incelemesinde *Cryptosporidium* spp ookistlerinin gözlenmesidir (3,7,10). Dışkı yaymalarının floresan veren özel asit-fast boyalarla (auramine-rhodamine) boyanması ve floresan mikroskopta incelenmesi ile de *Cryptosporidium* spp ookistleri gösterilebilir. Ayrıca, dışkı örneklerinden DFA, özgül antijen varlığını saptayan ELISA ve immünokromatografik hızlı tanı testi gibi immünoagnostik teknikler ve nükleik asit saptama yöntemleri (PCR) de tanıda kullanılmaktadır (11,12).

DFA, *Cryptosporidium* spp tanısında duyarlılık ve özgüllük açısından "altın standart" kabul edilir. Ancak floresan mikroskopu gerektirdiği için pahalı bir yöntem olup gelişmiş laboratuvarlarda uygulanabilmektedir (3,12).

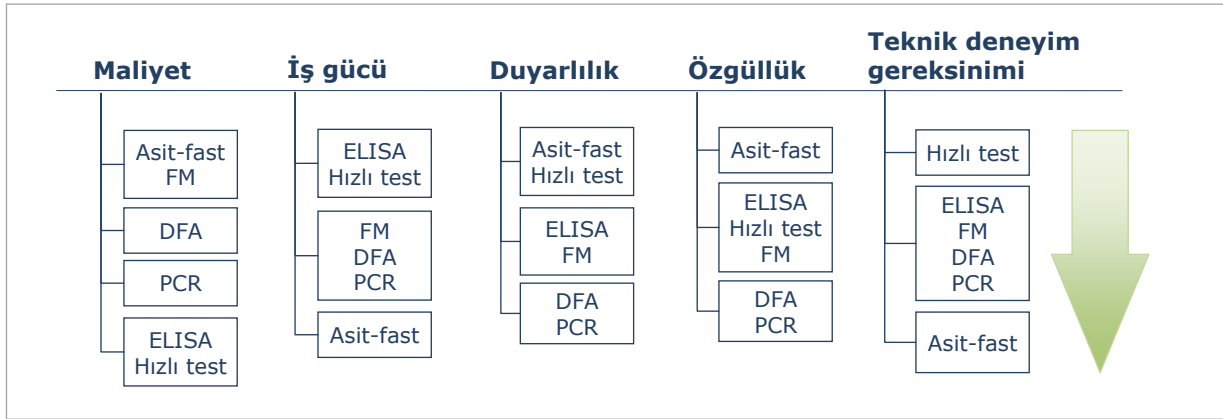
Etkeni yakalama olasılığını yükseltmek için, ya da sonucu "negatif" olarak rapor etmeden önce, en az 3 dışkı örneği incelenmiş olmalıdır. Ookistlerin elde edilme olasılığını artırmak için formolde veya başka bir fiksatif içinde gelmiş dışkının önce konsantre edilmesi (ör., formol-etil asetat yoğunlaştırma yöntemi ile en az 10 dk 500 × g'de santrifüj) ve daha sonra boyanması önerilir. Ancak eğer örnek ELISA veya hızlı tanı testi ile analiz edilecekse antijen kaybı olabileceği için yoğunlaştırma önerilmez (3).

Tanı tekniklerinin seçimi mevcut donanım, reaktifler ve deneyime, ayrıca zaman ve maliyet değerlendirmelerine bağlıdır. Tanı testlerinin seçimine yardımcı olabilecek bazı özellikler Şekil 1'de özetlenmiştir.

Ülkemizde kriptosporidiyoz ilk olarak 2004 yılında *-laboratuvardan bildirim zorunlu* bir etken olarak- bildirim zorunlu hastalıklar listesine konmuştur (13). Hemen hemen aynı dönemde İzmir'e yakın bir kırsal bölgede patlak veren ilk su kaynaklı kriptosporidiyoz salgını da rapor edilmiştir (1).

Bu gelişmeler dikkatleri *Cryptosporidium* spp enfeksiyonuna bir nebze yöneltse de halen bildirim oldukça sınırlıdır ve rutin bildirim sistemi içinde bildirilen vakaların ciddi ölçüde beklenen vaka sayılarının altında olduğu tahmin edilmektedir. Bunda tanının ülkemizdeki laboratuvarlar arasında yeterince yaygınlaşmamış olmasının rolü olduğu ileri sürülebilir. Halen klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının sadece %4'ünde *Cryptosporidium* spp için geçerli bir yöntem ile tanı konulabilmektedir (4).

Tanının yaygınlaşmamasında; etkenin akla getirilmeyişi ve buna bağlı olarak hekimin laboratuvardan inceleme talebinde bulunmayışı gibi nedenler de sayılabilir. Ancak *Cryptosporidium* spp **sulu ishal** incelemesinin bir parçasıdır ve eğer laboratuvar tanısına yönelik faaliyetin amacı fekal-oral kontaminasyon sonucu gelişmiş bir enfeksiyonda (ishal yakınması ile gelen bir hastada) etiyolojik ajanının ne olduğunu açığa çıkarmak ise o zaman *Cryptosporidium* spp dahil bütün olası patojenler araştırılmalıdır.



Şekil 1. Tanı testlerinin bazı özelliklerinin en düşükten yükseğe doğru sıralanışı (10).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizma(lar)

Cryptosporidium spp

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

Potansiyel enfeksiyöz organizmalar içerebileceğinden dolayı dışkı örnekleri ile ilgili incelemeler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmeli; bütün örnekler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır (*bkz.* "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

Dışkı örnekleri koruyucu maddelerle fikse edilmiş olsalar bile bu önlemler alınmalıdır; çünkü hala enfeksiyöz olabilirler. Özellikle kalın cidarlı bazı parazit ookistleri ve kistleri formolde fikse edildikten haftalar sonra ölürlür. *Ascaris lumbricoides* yumurtaları formolde saklandığında bile gelişmeye devam edebilir ve enfeksiyözdür.

Güvenlik uyarısı! *Cryptosporidium* spp ookistleri oldukça enfektiftir; kalın cidarlı ookistler %2.5'lük potasyum dikromat koruyucu içinde bir yıla kadar canlılıklarını koruyabilirler. Bu prosedür uygulanırken **daima** eldiven giyilmelidir!

Boyanmış olsun olmasın bütün lamlar **kesici-delici atık** kabul edilir ve kesinlikle kesici-delici atık kutusuna atılırlar! Diğer biyolojik kirlilerin bulunduğu torbalara atılmaları halinde torbayı deler ve ciddi enfeksiyöz risk oluştururlar!

Güvenlik uyarısı! Metanol yüksek düzeyde toksik ve parlayıcıdır. Eğer yutulacak olursa (herhangi bir miktarı) körlüğe ve hatta ölüme neden olabilir. Kullanım harici zamanlarda metanol şişesi kilitli bir dolapta tutulmalıdır!

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) tekniğin uygulanmasından önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) tekniğe tüm yönleriyle aşina olmalı, ve (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Bu UMS'nin uygulanmasından analist; tekniğin prosedüre uygun yapılmasını sağlamaktan ve denetimi, değerlendirilmesi ve onaylanmasından (sonucun doğru ve güvenilir olmasından) Tıbbi Mikrobiyoloji/Parazitoloji Uzmanı sorumludur.

İnvaziv teknik kullanılarak alınmış örnekler en kısa sürede ve **mutlaka** Tıbbi Mikrobiyoloji / Tıbbi Parazitoloji Uzmanı tarafından bizzat incelenmeli, değerlendirilmeli ve sonuçlandırılmalıdır.

2.3. Örnek, Reaktif, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

Örneklerinin alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden ve ilgili diğer UMS belgelerinden edinilebilir. İlgili UMS'lerin bir listesi bu belgenin sonunda verilmiştir. Aşağıda bazı önemli hususlara tekrar dikkat çekilmektedir:

- Dışkı - En sık incelenen örnektir. Taze dışkı veya formolle korunmuş örnek olmalıdır. Hemen boyanamayacak örnekler için formol en uygun fiksattir. SAF diğer bir seçenektir. PVA'da korunmuş örnekler asit-fast boyama için uygun değildir!

Dışkı, eğer ilk örnek incelemesinin sonucu negatif ise, negatif sonuç vermeden önce 1-2 gün ara ile en az 2 kez daha incelenmelidir.

NOT 1: Eğer örnek 30 dk içinde incelenemeyecekse dışkı üç kaba ayrılmalıdır: birinci, fiksatif koymadan (taze); ikinciye, dışkı miktarının 3 katı kadar %10'luk formol; üçüncüye de dışkı miktarının 3 katı kadar PVA veya SAF konarak laboratuvara gönderilir (bkz. UMS, P-ÖY-01).

NOT 2: İmmünohistokimyasal veya moleküler yöntemlerde kullanılacak örnekler (dışkı veya diğer) 1 haftaya kadar +4°C'de ya da çalışılıncaya kadar -20°C'de saklanabilirler.

- Ayrıca, immün sistemi baskılanmış, açıklanamayan gastrointestinal şikayeti olan ve/veya kolanjitli hastalarda ince bağırsak aspirasyon sıvısı veya biyopsi örneği, safra, karaciğer biyopsi örneği; solunum sistemi şikayeti olan hastalarda balgam, BAL vb. örnekler; sinüziti olan hastalarda mide yıkama suyu incelenebilir (10). Diğer intestinal örneklerin parazitolojik incelemesi için (bkz. UMS, P-ÖY-02)
- Su örneği - Su kaynaklı bir salgından şüphelenildiği zaman en az 10 L su veya en az 10 L su geçirilmiş filtre kartuşu
- Serum - İnsanlarda prevalans veya seroepidemiolojik araştırmalarda

Reaktif/Kit

Mikroskopi

- Dışkının çoklaştırılmasında gerekli reaktifler - bkz. UMS, P-TP-03.
- Modifiye Kinyoun asit-fast boyama reaktifleri - bkz. UMS, P-TP-05.
- Auramine-Rhodamine floresan boya - Piyasadan hazır temin edilebilir. Boyama için gerekli diğer solüsyonlar aşağıdaki gibi hazırlanır:
 - (a) %0.5 asit alkol: 99.5 mL %70'lik etil alkole 0.5 mL konsantre HCl eklenerek edilir. Asit daima alkolün üzerine ve yavaş eklenmelidir! Asla tersi uygulanmaz! (Hazırda %70'lik etil alkol yoksa, hazırlamak için 70 mL saf etil alkole 30 mL distile su eklenir).
 - (b) %0.5'lik potasyum permanganat: 0.5 g potasyum permanganat 100 mL distile suya eklenir; manyetik karıştırıcıda karıştırılarak iyi erimesi sağlanır. Whatman No. 1 filtre kağıdından süzülerek koyu renkli bir şişeye alınır, etiketlenir.

Antijen saptama yöntemleri

- Hızlı tanı testleri (immünokromatografik kart test) - Piyasadan temin edilebilir.
- DFA kitleri - Tek başına veya diğer protozoonlarla (ör., *Giardia* sp) birlikte *Cryptosporidium* spp'yi saptayabilen bu kitlerin duyarlılık ve özgüllükleri genellikle yüksektir.
- ELISA - *Cryptosporidium* spp'ye özgü antikorların kullanıldığı duyarlılık ve özgüllüğü yüksek kitler tercih edilmelidir

Moleküler yöntemler:

- Piyasada hazır DNA izolasyon ve PCR kitleri mevcuttur.
- PCR reaksiyonu moleküler laboratuvar ortamında, enzimler (Hotstart DNA polimeraz, urasil DNA glikozilaz), nükleotidler, primer ve problemlerin (18S rRNA; epizomal tekrarlar [SREHP gen bölgelerinin kullanıldığı]) belli oranlarda karıştırılması ile öz-yapım geleneksel PCR olarak da gerçekleştirilebilir. PCR duyarlılığını artırmak amacıyla dışkıdan DNA izolasyonunda uygun modifikasyonların kullanılması gerekebilir.

Diğer gereç, donanım

Mikroskopi için;

- Mikroskop, binoküler (rutin) – 10× (düşük), 40× (yüksek kuru), 100× (immersiyon) objektifleri ve 10× oküleri olan tercih edilir.

NOT: 5× oküler daha az büyütme sağlar ve inceleme duyarlılığını düşürür; bu nedenle 10× oküler kullanılması önerilmektedir (14).

- Modifiye Kinyoun asit-fast boyama gereç/donanımı (bkz. UMS, P-TP-05)
- Önceden temizlenmiş lamlar (25×75 mm) – tercihen kenarı rodajlı
- Kurşun kalem - lamların rodajlı kenarına örnek numarası vb. yazmak için
- Tahta veya plastik örnek alma çubuğu
- Kesici-delici atık kabı ve toksik boya atıkları için kimyasal atık kabı

ELISA/DFA için;

- ELISA okuyucu, yıkayıcı
- Floresan mikroskobu - objektifler 40× ve 100× immersiyon; oküler 10×; 365 nm eksitasyon, 450 nm emisyon filtreli; ve 490 nm eksitasyon, 510 nm emisyon filtreli.
- Ayarlanabilir otomatik mikropipetler (5-1000 µl) ve pipet uçları

PCR ve diğer moleküler testler için;

- En az üç ayrı oda - Nükleik asit ekstraksiyonu, PCR karışımının hazırlanması, amplifikasyonun ve sonuç gözetiminin yapılabileceği ayrı odalar. İdeal olarak PCR karışımı hazırlama odası (temiz oda) pozitif basınçlı, agaroz jel elektroforezi yapılan oda (kirli oda) negatif basınçlı havalandırmaya sahip olmalıdır.
- Donanım – biyogüvenlik kabini, santrifüj, soğutmalı mikrosantrifüj, hassas terazi, vorteks, su banyosu, yatay çalkalayıcı, PCR ısı döngü cihazı (gerçek zamanlı veya geleneksel), mikrodalga fırın, jel görüntüleme sistemi, elektroforez ünitesi vb.

2.4. Kalite kontrol

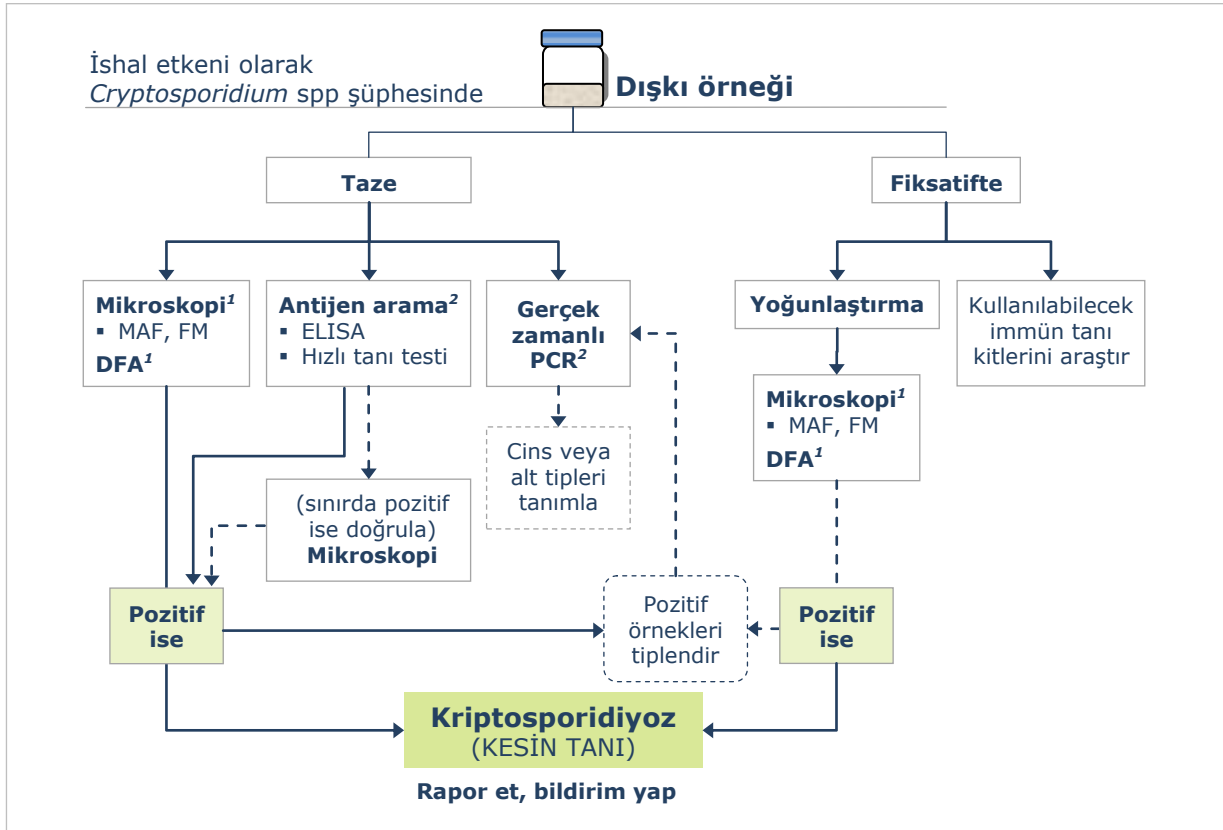
- Mikroskop belirli aralıklarla (yoğun kullanılıyorsa yılda en az bir kez) kalibre edilmelidir. Mikroskoba herhangi bir parça eklenmesi veya değiştirilmesi durumunda da kalibrasyon yapılmalıdır. Kalibrasyon için kullanılan optikler mikroskobun üzerinde olmalıdır. Tüm objektifler için kalibrasyon faktörleri göz önündeki bir panoda asılı olmalıdır (bkz. UMS, P-TP-01 Mikroskop Kalibrasyonu) (14).
- Her yeni hazırlanmış veya ticari reaktif seti veya kit lotu -moleküler testler için olanlar dahil- kullanıma sokulmadan önce pozitif kalite kontrol örnekleri ile test edilmelidir. Kullanılan kitlerin son kullanma tarihleri ve saklama koşullarına dikkat edilmelidir.
- Her kullanımdan önce solüsyonlar kontrol edilmeli; bulanık veya renk değişikliği olmuş solüsyonlar değiştirilmelidir.
- Hazırlanan her preparat -ıslak iken- arkasından gazete kağıdı okunabilecek kalınlıkta olmalıdır.
- Pozitif kalite kontrol lamları formolde ile saklanmış *Cryptosporidium* spp içeren dışkı örneklerinden hazırlanır. Boyama sonuçlarının uygunluğundan emin olmak için bu pozitif örnekler her zaman teste dahil edilmelidir.

NOT: %10 formolde saklama süresi uzadıkça aside dirençli boyamalarda ookistlerin kaybolduğuna dair tartışmalar vardır.

- Boyamalar için hazırlanan her preparat -ıslak iken- arkasından gazete kağıdı okunabilecek kalınlıkta olmalıdır.
- Auramin-rhodamin boya şalesi oda sıcaklığında ve gün ışığından korunacak şekilde muhafaza edilmelidir.
- Renk giderici solüsyon içeren şale her boyamadan sonra yıkanıp, yeniden doldurulmalıdır.
- Potasyum permanganat ilk hazırlandığında ve şale dibinde tortu olduğunda süzülmesi veya yeni boya hazırlanmalıdır.
- Her kullanımdan önce solüsyonlar kontrol edilmeli; bulanık veya renk değişikliği olmuş solüsyonlar değiştirilmelidir.
- Floresan mikroskobu her açıldığında ampulün saatinin çalıştığından emin olunmalı ve kullanım sonrası süre kaydedilerek ampulün ömrü takip edilmelidir.
- Tüm ekipmanın bakım ve kalibrasyonu düzenli olarak yapılmış olmalıdır.
- Tüm kalite kontrol sonuçları kaydedilmelidir.

3 Kriptosporidiyoz tanısında kullanılan teknikler

3.1. Tanı için akış şeması



Şekil 2. İshal etiolojisinde *Cryptosporidium* spp tanısı için akış şeması (10).

¹ Direkt / konsantre edilmiş dışkı yaymaları

² Bu testler $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 'de dondurulmuş örneklerden de çalışılabilir.

3.2. Örneklerin inceleme için hazırlanması

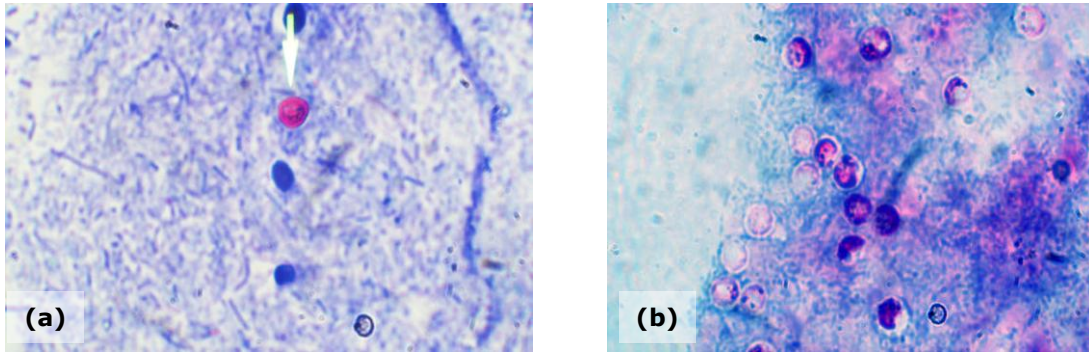
- Dışkı veya diğer klinik örnekler doğrudan veya bir yoğunlaştırma işlemi sonrası incelemeye alınabilir.
- Örneklerde ookist sayısı az olduğu tahmin ediliyorsa duyarlılığı yükseltmek için önce yoğunlaştırma uygulanması önerilir.
- %10 formol ile laboratuvara gelen dışkı örnekleri veya ishal vakalarına ait bol sulu örnekler 10 dk 500 xg'de formol-etil asetat yöntemi ile çökeltirilmelidir.
- Formol-etil asetat yönteminden başka, şeker (Sheather'in), tuz veya çinko sülfat solüsyonunda yüzdürme yöntemlerinden biri de yoğunlaştırma için kullanılabilir. Yoğunlaştırma uygulamaları için bkz. UMS-P-TP-03.
- *Cryptosporidium* spp enfeksiyonunda tipik olarak gözlenen sulu dışkının varlığında ookistlerin çoğu mukus kısımlar içinde kalabilir ve incelenen örnekte bulunamayabilir. Mukuslu örneklere %10'luk KOH işleminin uygulanması önerilir. Bu amaçla dışkı örneği makroskopik olarak mukuslu kısımların varlığı yönünden iyi değerlendirilmelidir.
 - (a) Örnek mukuslu ise; örneğe 10 damla %10'luk KOH eklenip, şiddetli karıştırılarak (vorteksenerek) homojenize edilir. Ardından %10'luk formol eklenip, 500 x g'de 10 dk santrifüj edilir. Üst sıvı atılıp, dipteki çökeltiden yayma hazırlanır.
 - (b) İyi bir yaymada, kurumadan önce ıslakken bakıldığında altına konmuş bir gazete yazısını okumak mümkün olmalıdır.
- Diğer örnekler de (duodenal aspirat, safra, balgam, mide suyu vb.) santrifüj edilerek (500 x g'de 10 dk) çökeltirilmeli ve preparat çökeltiden hazırlanmalıdır.
- Kitiyle dayalı teknikler (DFA, ELISA, hızlı tanı) ve PCR için taze veya dondurulmuş örnekler kullanılabilir. Bu tekniklerin konsantre edilmiş tekniklere uygulanıp uygulanmayacağı ile ilgili olarak üreticinin kullanma talimatındaki öneriler izlenmelidir.
- Kriptosporidiyoz şüphesinde kullanılan tanı yöntemleri Şekil 2'de verilen akış şemasında özetlenmiştir

3.3. Örneklerin mikroskopik incelemesi

Modifiye Kinyoun asit-fast (MAF) boyama

- Taze dışkı örneklerinden veya çökeltirilmiş örneklerden hazırlanan yayma preparatlar modifiye Kinyoun asit-fast tekniği ile boyanır ve 100x objektifle incelenir (bkz. UMS, P-TP-05).
- *Cryptosporidium* spp ookistleri (4-6 µm) mavi bir zeminde kırmızı, pembe, koyu mor boyanmış olarak görünürler (bkz. Şekil 3a ve b).
- Ancak boyanma değişkenlik gösterebilir; ookistler arasında renk yoğunluğu yönünden farklılık gözlenebilir. Bazı ookistler boya almamış veya kısmen boyanmış olabilir (hayalet ookist) (bkz. Şekil 3b).
- Olgun ookistlerde sporozoitler (4'e kadar) ayırt edilebilir.

- Mayalar ve fekal debris düz kırmızı boyanır. Bazı bakteri sporları da kırmızı boyanabilir ancak bunlar çok küçüktürler ve karışıklığa neden olmazlar.
- MAF boyama kriptosporidiyoz tanısında geçerli asgari tekniktir. Bir diğer ifade ile MAF uygulanmış preparatlarda *Cryptosporidium* spp ookistlerinin görülmesi "kesin tanı" bulgusu olarak kabul edilir.
- Tek bir dışkı örneğinin incelenmesiyle *Cryptosporidium* spp enfeksiyonlarının sadece yarısı saptanabilir. İlk dışkı örneğinde negatif sonuç alınması tanıyı dışlamaz. Kesin negatif sonuç için 1-2 gün arayla ikinci gerekirse üçüncü dışkı örneği incelenmelidir.



Şekil 3. Dışkıda modifiye Kinyoun asit-fast boyama yöntemiyle boyanmış *Cryptosporidium* spp ookistleri (5).

Auramin-rhodamin floresan boyama

- Çöktürme yöntemi ile elde edilmiş örnek çökeltisinden Pastör pipeti yardımıyla 1-2 damla lam üzerine konur. 1 cm çapında bir daire oluşturacak şekilde yayma yapılır ve havada kurumaya bırakılır.
NOT 1: Yedek olarak en az iki yayma hazırlanması boyama ve değerlendirmede hataların azaltılmasını sağlar.
NOT 2: Boyama öncesinde yaymalar tamamen kurumuş olmalıdır.
- Yaymalar boya köprüsü üzerine alınır; üzerini tamamen kaplayacak şekilde saf metanol dökülerek 1 dk fikse edilir. Süre sonunda alkolün fazlası dökülerek havada kurumaya bırakılır.
- Yaymalar auramine-rhodamine boya içeren şaleye daldırılır ve 15-20 dk inkübe edilir.
- Ardından steril distile suyla yıkanılırlar.
- Lamlar %0.5'lik asit alkol (70 mL alkol, 0.5 mL HCl, 30 mL distile su) içeren şaleye daldırılır ve 2-3 dk bekletilir.
- Tekrar steril distile suyla yıkanılırlar.
- Lamlar %0.5'lik potasyum permanganat solüsyonu ile dolu şaleye aktarılır ve 3-4 dk bekletilirler.
- Son olarak steril distile suyla yıkanılırlar.

- Lamlar havada kurutulduktan sonra immersiyon yağı damlatılarak floresan mikroskopunda 365 nm eksitasyon ve 450 nm emisyon filtreleri ile incelenir.
- Bu boyama ile aside dirençli olan ookistler ultraviyole altında turuncu-sarı renkli floresan veren yuvarlak-oval hücreler olarak gözlenir.

3.4. Direkt Floresan Antikor (DFA) Testi

- DFA *Cryptosporidium* spp tanısında duyarlılık ve özgüllük açısından "altın standart" kabul edilir.
- DFA testi, FITC ile işaretli cinse özgül *Cryptosporidium* monoklonal antikorlarının, hasta örneğindeki ookistlerin yüzeyine bağlanarak görünür hale getirmesi prensibine dayanır. Formol içeren örnekler uygulanabilir. Santrifüj sonrası inceleme yapılması tanı şansını artırır.
- Her kit mutlaka üreticinin talimatına göre kullanılmalıdır ve her test mutlaka pozitif ve negatif kontrol örneklerini içermelidir. Uygulama için bir talimat yoksa basitçe aşağıdaki adımlar izlenebilir:
 - (a) Üretici tarafından tavsiye edilen çapta kuyucuklara sahip teflonlu lamlarda dışkı yaymaları hazırlanır, metanol ile 1-2 dk sabitlenir ve havada kurutulur.
 - (b) Kuyucuk üzerine 50 µL FITC ile işaretli özgül monoklonal antikorları içeren reaktif eklenir.
 - (c) Lamlar yatay bir şekilde, nemli bir ortamda, 37°C'de 30-60 dk karanlıkta inkübe edilir.

NOT: Nemli ortam sağlamak için kapaklı bir cam tepsinin veya Petri kutusunun tabanına nemlendirilmiş filtre kağıdı konur; üzerine lam köprüsü yerleştirilir ve üzerine lamlar dizilir. Kapağı kapatılır ve inkübatöre konur.
 - (d) Fazla antikorlar PBS ile yıkanarak uzaklaştırılır.
 - (e) Kapatma solüsyonu ('mounting medium') damlatılıp, lamel kapatılır.
 - (f) Floresan mikroskopunda 20× ve 40× objektiflerle incelenerek ookist varlığı araştırılır. Bir FITC filtre sistemi (maksimum eksitasyon 490 nm, ve ortalama emisyon 530 nm) kullanıldığında monoklonal antikorların bağlandığı ookistler parlak elma yeşili floresan verirler.
- Floresan mikroskopta floresan boyalı ookistlerin görülmesi ile elde edilen pozitif sonuç "**kesin tanı**" bulgusudur.
- En önemli dezavantajı pahalı donanım ve yetişmiş personel gerektirmesidir. Bu özellikleri kullanımını sınırlamaktadır.

3.5. ELISA/Hızlı tanı testleri

- ELISA yüksek düzeyde duyarlı ve özgül bir yöntemdir ve en önemli özelliği çok sayıda örneğin aynı anda incelenbilmesidir. ELISA cihazı bulunan her laboratuvarında uygulanabilmesi bir diğer avantajdır.

- İmmünokromatografik temelde hızlı tanı kitleri de yüksek düzeyde duyarlı ve özgül testler olup, hiçbir cihaz gerektirmeksizin uygulanabilmesi nedeniyle özellikle klinik laboratuvarlarda **yaygın** bir şekilde kullanıma uygundur.
- Tercihen taze dışkı ile çalışılır. Formol içeren örnekler de kullanılabilir. Kitler üreticinin talimatlarına göre kullanılmalıdır.
- ELISA ya da hızlı tanı testleri ile pozitif sonuç "**kesin tanı**" bulgusudur.
- ELISA ya da hızlı tanı testlerinde sınırdaki pozitif değerler DFA ile doğrulanmalıdır.

3.6. Moleküler tanı yöntemleri

- *Cryptosporidium* spp enfeksiyonlarının tanısında en duyarlı ve özgül moleküler yöntem gerçek-zamanlı PCR'dir.
- Konvansiyonel, 'nested'-PCR, PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) ve gerçek-zamanlı PCR dışında birden fazla etkeni saptayabilen multipleks PCR yöntemleri de geliştirilmiştir. Tür ve genotiplerin belirlenmesinde en sık kullanılan hedef bölgeler SSU rRNA, COWP, GP60, HSP70, Aktin ve β -tubulin'i kodlayan genlerdir.
- Dışkı örneğinden pozitif PCR sonucu "**kesin tanı**" bulgusudur.

3.7. Saklama, Referans merkeze gönderme

- Pozitif kalıcı boyalı preparatlar eğitim ve benzeri amaçlar için saklanmalıdır. Gerekli bilgiler lam üzerine yazılmalı ve bir arşivleme sistemi kurulmalıdır.
- Pozitif kalite kontrol lamaları hazırlayabilmek için laboratuvar *Cryptosporidium* spp içeren bir dışkı örneğini SAF içinde saklamalıdır.
- Eğer ileri tanı veya moleküler testler için örnekler başka bir şehirdeki laboratuvara gönderilecekse, *paketlenme* ve *taşıma* biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (15) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).
- **Mikroskobik inceleme amaçları için** taze örnekler en fazla 24 saat içinde +4°C'de şehirlerarası gönderilebilirler.
- Eğer örnekler *Cryptosporidium* yönünden hemen incelenemeyecekse, ideal olarak %10 formol içinde saklanmalıdır. Bu şekilde hem diğer mikroorganizmaların aşırı üremesi olasılığı ortadan kaldırılmış olmakta, hem de protozoonun morfolojisi korunmaktadır.
NOT: Aslında mikroskopi için ookist morfolojisi de PCR DNA yapısı da +4°C'de uzun süre korunabilmektedir. Bununla birlikte zorunlu olmadıkça, özellikle mikroskobik amaçlar için daha güvenli saklama yöntemleri tercih edilmelidir.
- **ELISA, hızlı tanı testleri ve PCR için** ise taze dışkı örnekleri +4°C'de 1 haftaya kadar saklanabilirler. Bu süre içinde analiz edilmeyecekse test gününe kadar -20°C'de saklanırlar.

NOT: Dondurulmuş dışkı örneklerinin moleküler analizler için, DNA yapısı etkilenmeden 2 yıldan uzun süreler boyunca saklanabileceği bildirilmektedir. Hatta uzun dondurma süresinin ardından DNA ekstraksiyon oranlarının arttığı, bunun muhtemelen dondurma sonucu zayıflamış ookist duvarının kolay parçalanması ile ilgili olabileceği ileri sürülmüştür. Dondurularak saklanmış dışkı örneklerinde, DNA hasar görebileceği için tekrarlayan çözdürme-dondurma işleminden kaçınılması gerektiği belirtilmektedir.

- Yayma preparatlar; sabitlenmedikçe (tercihen metanol ile) şehirlerarası gönderilemezler. Sabitlenmiş preparatlar, lam kutusu içine birbirine teması önlenerek şekilde yerleştirilir ve oda ısısında gönderilirler.

4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim

- MAF, DFA ve hızlı tanı testlerinin sonucu örneğin laboratuvara geldiği gün rapor edilebilir. ELISA ve PCR için laboratuvar vaka biriktikçe inceleme yapıyor olabileceği için sonuç çıkış süresi değişebilir. Her seferinde pozitif örnek kullanılacağı göz önüne alındığında DFA testinin de ekonomik nedenlerle vaka biriktirilerek çalışılması kaçınılmaz olabilir.
- Hatırlanması gereken önemli bir husus vakanın bir salgın ile ilişkili olma ihtimalidir. Bu nedenle sonuçların her zaman mümkün olan en kısa sürede verilmesi hedeflenmelidir.
- MAF, DFA veya PCR ile elde edilen pozitif sonuç **kesin tanı** bulgusudur. ELISA veya hızlı tanı testleri ile elde edilen pozitif sonuçların ise MAF veya DFA ile ya da PCR ile doğrulanması gerekir.
- Genel olarak dışkı incelemesi sonuçlarının değerlendirilmesi, yorumlanması ve raporlama ile ilgili ayrıntılı bilgi için "UMS P-OY-01 Dışkı örneklerinin parazitolojik incelemesi" başlıklı belgeye bakılmalıdır.
- Sonuçlar raporlanırken mutlaka incelemenin hangi teknik/boya kullanılarak yapıldığı rapora yazılmalıdır.
- Sonuçlar raporlanırken mutlaka saptanan parazitin adı ve formu kısaltma kullanılmadan açık olarak yazılmalıdır; "*Cryptosporidium* spp ookistleri görüldü" gibi.
- *Cryptosporidium* spp ülkemizde **laboratuvardan** bildirim zorunlu bir etkidir (2). Tanı koyulması halinde olguların kayıt ve bildirim için Sağlık Bakanlığının "Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi" izlenmelidir (13). Vakanın bir salgınla ilişkili olabileceği hatırlanmalı ve bildirimler mümkün olan en kısa süre içinde yapılmalıdır.

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Tek bir örnekten elde edilen negatif sonuç bir intestinal parazit enfeksiyonunu dışlamaz. Güvenilir bir sonuç için çok sayıda dışkı örneğinin (2-3 gün aralarla alınmış en az 3 örnek) incelenmesi gerekir.

- Dışkının makroskopik incelemesi ihmal edilmemelidir. Böylece mukus varlığı gözlenebilir. Çünkü, eğer mukus varsa ookistlerin mukus içinden serbestleşmesini sağlayabilmek için örneğe potasyum hidroksit uygulanması gerekir.
- Örnek kalitesi de sonucu etkiler. Florayı etkileyen antibiyotikler ve klorokin gibi antimalaryal ilaçlar, bağırsak protozoonlarının yakalanma olasılığını azaltır. Dışkıya idrar karışmamış olmalıdır. Dışkı örneklerinin parazitolojik inceleme için alınmasından önce hastaya baryum, kaolin, magnezi kalsine, antiasitler, bizmut, hint yağı, mineral yağı verilmemiş olmalıdır. Baryum verilmesinden sonra en az bir hafta geçmelidir.
- DFA ve auramin-rodamin boyları ile inceleme yapmak için floresan mikroskop gereklidir ve bu yöntemlerle canlılık belirlenemez. Antijen saptamaya yönelik testler ile de morfolojik doğrulama yapılamaz.
- Bazı hızlı tanı testlerinin kalite kontrolü ve güvencesinde sorunlar vardır. Moleküler yöntemler pahalıdır, ayrıca, en sık kullanılan örnek olan dışkı hem, bilirubin ve safra tuzları gibi PCR inhibitörleri içerir. Bazı fiksatifler de PCR'yi inhibe edebilir. Yıkama uygulanmalıdır.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (*Cryptosporidium* Türlerinin Mikrobiyolojik Tanısı) ayrıca aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir. Özellikle, uygun inceleme örneklerinin temini ve boyama işlemine hazırlanması hakkında yeterli bilgi için bu belgelere bakılması önerilir:

- UMS, P-ÖY-01 Dışkı örneklerinin parazitolojik incelemesi
- UMS, P-ÖY-02 Diğer intestinal örneklerin parazitolojik incelemesi
- UMS, P-TP-01 Mikroskop kalibrasyonu (oküler mikrometre ile)
- UMS, P-TP-03 Dışkı örneklerinin yoğunlaştırma yöntemleri
- UMS, P-TP-05 Modifiye Kinyoun asit-fast boyama
- UMS, GEN-OY-01 Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Aksoy U, Akisu C, Sahin S, Usluca S, Yalcin G, Kuralay F, Oral AM. First reported waterborne outbreak of cryptosporidiosis with *Cyclospora* co-infection in Turkey. *Euro Surveill* 2007;12(2):E070215.4. <http://www.eurosurveillance.org/ew/2007/070215.asp#4> (son erişim tarihi: 15.05.2012)
- 2 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 3 Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. Cryptosporidiosis http://www.cdc.gov/dpdx/resources/pdf/benchAids/Crypto_benchaid.pdf (son erişim tarihi: 31.01.2014)
- 4 T.C. Sağlık Bakanlığı (Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi TR0802.16-01 Avrupa Birliği ve Dünya Bankası desteği ile) (Akbaş E, Pr Danışmanı). Türkiye'de Bulaşıcı Hastalıkların Tanısında Mikrobiyoloji Laboratuvar Kapasitesi Mevcut Durum Değerlendirmesi: Anket - LabKap2012. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kuşadası, 4 Kasım 2012.

- 5 Dirim Erdoğan D. İnsanlarda Cryptosporidiosis Tanısında Dışkı Örneklerinde Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yönteminin Yeri (Uzmanlık Tezi). Ege Üniversitesi, İzmir. 2003, p.116
- 6 Eckert J. Protozoa. *In: Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM (eds). Medical Microbiology. Thieme New York, USA. 2005, p. 476-542*
- 7 Doğruman Al F. Cryptosporidiosis. *In: Korkmaz M, Ok ÜZ (eds). Parazitolojide Laboratuvar. 1. baskı. Türkiye Parazitolojisi Derneği Yayınları, Meta Basım, İzmir. 2011, p. 359-364*
- 8 Prescott LM, Harley JP, Klein DA eds. Human Diseases Caused by Fungi and Protozoa: Cryptosporidiosis. *In: Microbiology. 5th ed., The McGraw-Hill Companies, USA. 2002, p. 952-3*
- 9 McHardy IH, Wu M, Shimizu-Cohen R, Couturier MR, Humphries RM. Clinical laboratory diagnosis of intestinal protozoa. *J Clin Microbiol* 2013, p.1-35
- 10 Chalmers RM, Katzer F. Looking for Cryptosporidium: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends in Parasitology* 2013;29(5):237-251
- 11 Turgay N. Özel Boyama Yöntemleri. *In: Korkmaz M, Ok ÜZ (eds). Parazitolojide Laboratuvar. 1. baskı. Türkiye Parazitolojisi Derneği Yayınları, Meta Basım, İzmir. 2011, p.37-41*
- 12 OIE. Cryptosporidiosis. Chapter 2.9.4. *In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Terrestrial Manual). The World Organization for Animal Health (OIE). 2013, p. 1192-1212*
http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.04_CRYPTO.pdf (son erişim tarihi: 26.01.2014)
- 13 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı. Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 14 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. *In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.2.1-4*
- 15 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Kala-azarın Visseral Leyişmanyazın (*Leishmania infantum*, *Leishmania donovani* enfeksiyonu) **Mikrobiyolojik Tanısı**

Hazırlayan Birim	Klinik Parazitoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Parazitoloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	P-MT-04
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
TEKNİK BİLGİLER	5
1 Hedef mikroorganizmalar	5
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	5
3 Kala-azar tanısında kullanılan teknikler	8
4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim	13
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	13
EKLER.....	14
Ek-1 NNN besiyerinin hazırlanması ¹²	14
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	15
KAYNAKLAR.....	15

Kapsam ve Amaç

Leyişmanyaz, tatarcık (*Phlebotomus*; yakarca) adı da verilen kum sineklerinin sokması sonucu *Leishmania* spp'nin bulaşması ile gelişen bir enfeksiyondur.

Visseral leyişmanyaz (VL; iç organlar leyişmanyazı) Kala-azar olarak da adlandırılan kronik sistemik bir hastalıktır. Hastalık, *Leishmania* spp amastigotlarının retiküloendotelyal sistem hücrelerinde yerleşmesi ile gelişir. Türkiye'de etken *Leishmania infantum* türüdür. Tedavi edilmediğinde ölümlerle sonuçlanabilen ve bazı özellikleri ile sıtma, lösemi, lenfoma gibi hastalıklarla karışabilen VL'nin kesin tanısı laboratuvara dayanır. Kala-azar ülkemizde bildirim zorunlu bir hastalıktır (1,2). Aktif vaka saptama ve tedavi hastalığın kontrolünde anahtar unsurlar olarak kabul edilmektedir (3).

Bu UMS'nin amacı, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarına Kala-azar şüpheli vaka tanısında izleyebilecekleri inceleme yöntemleri için ve gerektiğinde *diğer* laboratuvara yönlendirmeye yardımcı bir rehber sunmaktır.

Kısaltmalar ve Tanımlar

buffy-coat	Santrifüj edilmiş antikoagülanlı kanın eritrosit tabakası ve plazması arasında kalan ve beyaz kan hücrelerini içeren (bulutsu) katmanı.
DAT	Direkt aglütinasyon testi
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
IFAT	İndirekt floresan antikör testi
NNN	Novy-MacNeal-Nicolle medium
VL	Visseral leyişmanyaz

Genel Bilgi

Leyişmanyaz, *Leishmania* cinsi parazitler ile enfekte dişi kum sineklerinin (tatarcık; *Phlebotomus*) kan emerken insanlara bulaştırdığı bir hastalıktır.

DSÖ'ye göre leyişmanyaz hala dünyanın en ihmal edilen hastalıklardan biridir. Yoksullukla ileri düzeyde ilişkili olup gelişmekte olan yoksul ülkeler başta olmak üzere 100'e yakın ülkede her yıl yaklaşık 2 milyon kişinin leyişmanyaza yakalandığı, dünya genelinde de 350 milyondan fazla insanın risk altında olduğu belirtilmektedir (3).

Kala azar (VL) dünyada tropikal ve subtropikal bölgelerin kırsal kesimleri başta olmak üzere pek çok ülkede endemiktir. Türkiye'de de görülen bu hastalık özellikle Akdeniz ve Ege bölgelerinden olmak üzere hemen her bölgeden sporadik olarak bildirilebilmektedir.

Kala-azar esasen bir zoonozdur ve etkenin başlıca rezervuarları evcil ve yabani kanidlerdir (köpek, tilki, çakal). Etken doğada konaklar arasında vektörler aracılığı ile yayılır.

Kala-azar insana esasen vektör *Phlebotomus*'ların sokması ile bulaşırsa da kan transfüzyonu, organ transplantasyonu, ortak iğne kullanımı; laboratuvar kazası sonucu ya da transplasental olarak da geçebilir (4).

Türkiye'de "Akdeniz tipi" enfeksiyon görülür. Hastalık, akut, subakut (en sık) ve kronik seyirli olabilir. İnkübasyon süresi 3 hafta ila 2 yıl arasında değişebilir. Enfeksiyon sırasında görülen belirti ve bulgular, düzensiz ateş, kronik zayıflama, güçsüzlük, splenohepatomegali, ileri dönemlerde asit oluşumu, anemi, lökopeni, trombositopeni ve hipergamaglobulinemi olarak sıralanabilir. Klinikte lenfoma, lösemi gibi hastalıklarla karıştırılabilmektedir (5,6).

Kala-azar sıklıkla çocuklarda görülür, ancak erişkinlerde de ortaya çıkabilir.

Hastalığın kesin tanısı laboratuvar incelemesi ile konur (3).

Laboratuvar tanısı başlıca çeşitli doku örneklerinde amastigotların varlığının gösterilmesine veya kültürlerde üreme sonucu promastigotların gözlenmesine dayanır (3,4,5,6).

Tanıda, kemik iliği başta olmak üzere, dalak, karaciğer, lenf nodlarından aspirasyon sıvıları veya biyopsi örnekleri, kan gibi klinik örnekler kullanılır. Tüm örnekler invaziv yöntemler ile elde edilebilen tipte örneklerdir. Örnekler arasında etkenin en yüksek olasılıkla saptanabildiği organ dalak olmakla birlikte, komplikasyon riski yüksek olduğu için, alınması daha az riskli olan kemik iliği aspiratı tercih edilmektedir (3,7).

Tanıda klinik örneklerden yapılan Giemsa boyalı preparatların mikroskopik incelemesi, kültür, PCR ve serolojik yöntemler kullanılabilir.

Amastigotlar periferik kanda bulunabilirlerse de en sıklıkla dalak, kemik iliği veya lenf nodu aspiratlarının mikroskopisinde gözlenebilirler. Kültür, PCR veya hayvan (hamster) inokülasyonu ise özellikle enfeksiyonun erken döneminde, parazit yükü düşük iken oldukça kullanışlı tekniklerdir. Doku aspiratları veya biyopsi örneklerinde amastigotların görülmesi "altın standart" olarak kabul edilmektedir.

Leishmania türleri dış ortam şartlarına çok duyarlı organizmalardır. Örnekler mümkün olan en kısa sürede işlenmeli; hastadan alındıktan sonraki en geç 20 dakika içinde örnekten kültür besiyerlerine ekim yapılmalıdır. Bu nedenle, kültür için besiyeri önceden laboratuvardan temin edilmiş olmalıdır (7,8).

Leishmania spp tür düzeyinde mikroskopi ile ayırt edilemez. Hastanın kliniği yol gösterici olsa da kesin tür ayrımı için moleküler yöntemler kullanılır (9).

Moleküler teknikler için örnekler EDTA içeren tüplerde tam kan/kapiller kan, biyopsi ve aspirasyon sıvısı ve/veya boyanmamış preparatlar olabilir. *Leishmania* spp'nin tür düzeyinde tanımlanmasında yaygın kullanılan standardize bir protokol bulunmamaktadır. Moleküler yöntemlerin özellikle AIDS hastalarında VL tanısında serolojiden daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (10).

Leyişmanyazın visseral formunda seroloji kullanışlı bir yöntemdir. Serolojik testlerin duyarlılık ve özgüllükleri kullanılan antijene göre değişir. Amastigot antijeni K39'un rekombinantı olan rK39 antijenini kullanan serolojik testler ile promastigot antijenlerini kullanan DAT, IFAT, ELISA gibi testler arasında, rK39 hızlı tanı testinin ('dipstick' test) ve direkt aglütinasyon testinin (DAT) en yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu bildirilmektedir. IFAT testi de bu iki teste yakın sonuçlara sahiptir (11). 'Dipstick' testinin özellikle endemik bölgelerde tanının yaygınlaşması bakımından çığır açtığı söylenebilir.

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizmalar

Leishmania infantum, Leishmania donovani

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

Potansiyel enfeksiyöz organizmalar içerebileceği için parazitolojik inceleme örnekleri asgari BGD2 laboratuvar şartlarında incelenmeli ve daima "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi"nde belirtilen standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır. Bu önlemler, örnekler koruyucu maddelerle fikse edilmiş olsa bile alınmalıdır, çünkü hala enfeksiyöz olabilirler.

Serolojik çalışmalarda en ciddi risk kan-kaynaklı patojenlerin (HIV, hepatit etkenleri) bulaşması riskidir. Serum ayırma vb. işlemler yapılırken daima eldiven giyilmeli, standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır.

Lamlar, boyanmış olsun olmasın, **kesici-delici atık** kabul edilir ve kesinlikle kesici-delici atık kutusuna atılırlar! Diğer biyolojik kirlilerin bulunduğu torbalara atılmaları halinde torbayı deler ve ciddi enfeksiyöz risk oluştururlar!

Güvenlik uyarısı! Metanol yüksek düzeyde toksik ve parlayıcıdır. Eğer yutulacak olursa (herhangi bir miktarı) körlüğe ve hatta ölüme neden olabilir. Kullanım harici zamanlarda metanol şişesi kilitli bir dolapta tutulmalıdır!

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) tekniklerin uygulanmasından önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) tekniğe tüm yönleriyle aşina olmalı, ve (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

İnvaziv teknik kullanılarak alınmış örnekler en kısa sürede ve **mutlaka** Tıbbi Mikrobiyoloji/Tıbbi Parazitoloji Uzmanı tarafından bizzat incelenmeli, değerlendirilmeli ve sonuçlandırılmalıdır.

Leishmania kültürleri bakteri ya da mantar kontaminasyonuna son derece yatkındır ve eğer laboratuvar personeli besiyerlerinin hazırlanmasında ya da aspirat, biyopsi materyali gibi örneklerin inokülasyonunda deneyimli değilirse sonuçlar doğrudan etkilenir.

2.3. Örnek, Besiyeri, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

Örneklerin alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden ve ilgili diğer UMS belgelerinden edinilebilir. Aşağıda bazı önemli noktalara tekrar dikkat çekilmektedir. Buna göre:

- Aspirasyon örnekleri - mikroskopik inceleme ve kültür için kemik iliği, dalak, karaciğer, lenf nodu gibi dokulardan en az 0.3 mL olmalıdır.
NOT: Kemik iliği aspirasyonu dalak biyopsisinden daha güvenlidir ve en sık tercih edilir. Dalak aspiratları tanı için en duyarlı örneklerdir ancak %0.1 sıklıkta hayatı tehdit eden kanama riski vardır.
Eğer dalak aspiratı alınacaksa işlem eğitimli ve ileri düzeyde deneyimli bir uzman tarafından ve çok dikkatli uygulanmalıdır. Ayrıca işlemin yapıldığı yerde kan transfüzyonu ve cerrahi girişim şartları mevcut ve hazır olmalıdır (3).
- Doku biyopsileri (2-3 parça) ve/veya tam kan ('buffy-coat') - mikroskopik inceleme ve kültür için
- Serum - serolojik testler için; 1 hafta içinde çalışılmayacaksa, -20°C'de saklanmalıdır. Laboratuvara ulaşma süresi >48 saat ise (ya da jel içermeyen kan tüpü kullanılmış ise) serum kısmı santrifüj sonrası hemen steril bir tüpe ayrılmalıdır. **Filtre kağıdı** (Whatman III) üzerine alınacak tam kan ile de tüm serolojik testleri çalışmak mümkündür.
- Moleküler teknikler için – EDTA'lı tüplerde tam kan/kapiller kan/'buffy-coat'; biyopsi veya aspirasyon sıvısı örnekleri; boyanmamış preparatlar ve filtre kağıdına emdirilmiş tam kan kullanılabilir.

Besiyeri / Reaktif / Kit

- NNN besiyeri – bifazik, kanlı bir besiyeridir; laboratuvarında hazırlanır (bkz. Ek-1).
- Modifiye NNN besiyerleri - Offutt'un modifikasyonu veya Evan'ın modifiye ettiği Tobie'nin besiyeri, ve/veya Schneider'in *Drosophila* besiyeri de *Leishmania* izolasyonunda kullanılabilir ve laboratuvarında hazırlanabilirler. Bazıları izolasyonda başarı şansını artırmak için örneklerin iki farklı besiyerine inokülasyonunu önermektedir (12).
- Diğer besiyerleri - ticari olarak mevcut hücre kültürü besiyeri RPMI 1640, Schneider'in besiyeri veya Medium 199 da kullanılabilir.
- Antibiyotik supplement – besiyeri hazırlanırken katılabileceği gibi bazı uygulamalarda inokülasyon yapıldıktan sonra da katılabilmektedir.
- Giemsa boyası (bkz. UMS, P-TP-06)
- Hızlı tanı testi (rK39) ('dipstick test') - Piyasada mevcuttur.
- DAT, IFAT veya ELISA kitleri – Ticari olarak piyasada mevcuttur veya laboratuvarında da hazırlanabilir.

Diğer gereç, donanım

Mikroskopik inceleme ve kültür için;

- Mikroskop, binoküler (rutin) – 10×, 40× yüksek kuru, 100× immersiyon objektifler; faz kontrast ve/veya diferansiyel-interferans-kontrast optikler tercih edilir.
- Binoküler invert mikroskop – önerilir, opsiyonel
NOT: Mikroskoplarda okülerler 10× olmalıdır. 5× oküler daha az büyütme sağladığı için inceleme duyarlılığını düşürür (13).

- Önceden temizlenmiş lamalar (25×75 mm), tercihen kenarı rodajlı
- Kurşun kalem, lamin rodajlı kenarına örnek numarası vb. yazmak için,
- 3 veya 4 şale, 100 mL'lik - yaymaları boyamak için
- Pastör pipetleri, 1 ve 10 mL pipetler
- Santrifüj, tercihen soğutmalı
- Biyogüvenlik kabini; önerilir, opsiyonel
- İnkübatör, 22-25°C'ye ayarlanabilen
- Su banyosu, 80°C'ye kadar ısınabilen
- Buzdolabı (4°C) ve derin dondurucu (-20°C)
- Manyetik karıştırıcı ve manyetik balıklar; pH metre
- Erlen, balon, mezür vb. cam malzeme (100-1000 mL)
- Tüpler, steril ve steril olmayan (16×125 mm), tüp sporları
- Derin dondurucu tüpleri (1.5 mL'lik)
- Filtre kağıdı, Whatman no. 42
- Membran filtre, 0.22 µm por çapında
- Biyolojik atık kapları, kesici-delici atık kabı ve toksik boya atıklarını toplamak için kap (kimyasal atık kabı)

Seroloji için;

- Floresan mikroskop - 10×, 40× yüksek kuru, 100× immersiyon objektifler ve 10× oküleri olan tercih edilir.
- ELISA yıkayıcı, ELISA okuyucu
- Ayarlanabilir otomatik mikropipetler (5-1000 µL) ve pipet uçları
- Laboratuvar saati

PCR ve diğer moleküler yöntemler için;

- En az üç ayrı oda - Nükleik asit ekstraksiyonu, PCR karışımı hazırlama, amplifikasyon ve sonuç gözetimi için ayrı odalar. İdeal olarak PCR karışımı hazırlama odası (temiz) pozitif basınçlı, agaroz jel elektroforezi yapılan oda (kirli) negatif basınçlı havalandırmaya sahip olmalıdır.
- Donanım - BGK, soğutmalı mikrosantrifüj, hassas terazi, vorteks, su banyosu, PCR ısı döngü cihazı (gerçek zamanlı veya geleneksel), mikrodalga fırın, jel görüntüleme sistemi, elektroforez ünitesi vb.

2.4. Kalite kontrol

- Mikroskop belirli aralıklarla (yoğun kullanılıyorsa yılda en az bir kez) kalibre edilmelidir. Mikroskoba herhangi bir parça eklenmesi veya değiştirilmesi durumunda da kalibrasyon yapılmalıdır. Kalibrasyon için kullanılmış optikler mikroskobun üzerinde olmalıdır. Tüm objektifler için kalibrasyon faktörleri göz önündeki bir panoda asılı olmalıdır (bkz. UMS, P-TP-01 Mikroskop Kalibrasyonu) (13).
- Boyama sonuçlarının uygunluğundan emin olmak için, saklanmış pozitif örnekler veya referans suşlar teste dahil edilmelidir.
- Bütün besiyeri ve solüsyonlar en az haftada bir kontrol edilmeli, bulanıklık veya bakteriyel/fungal kontaminasyon bulgusu olan besiyeri veya solüsyonlar değiştirilmelidir.
- Besiyeri sterilite kontrolü için - ekim yapılmamış 2 adet besiyeri 35-37°C'de 24 saat inkübe edilmelidir.

- Besiyeri üreme kontrolü için - kontrol *Leishmania* suşu kullanılır. Bu nedenle *Leishmania* spp stok kültürü düzenli olarak sürdürülmelidir:
 - (a) Stok kültür haftada bir pasajlanmalıdır.
 - (b) Daima bir hasta örneği kültür besiyerine inoküle edilirken, aynı anda stok *Leishmania* da kültürü de pasajlanmalıdır.
 - (c) Eğer stok organizma 96 saat içinde canlı kalıp çoğalıyorsa, hasta sonucu ondan sonra rapor edilmelidir (12).
 - (d) Hasta örneğinin kültüründen preparat hazırlanırken paralel olarak stok kültürden de hazırlanıp boyanmalıdır.
 - (e) Boyama sonuçları, eğer kontrol suşu iyi boyanmış ise kabul edilir.
- Tüm ekipmanın bakım ve kalibrasyonu yapılmış olmalıdır.
- Tüm kalite kontrol sonuçları kaydedilmelidir.

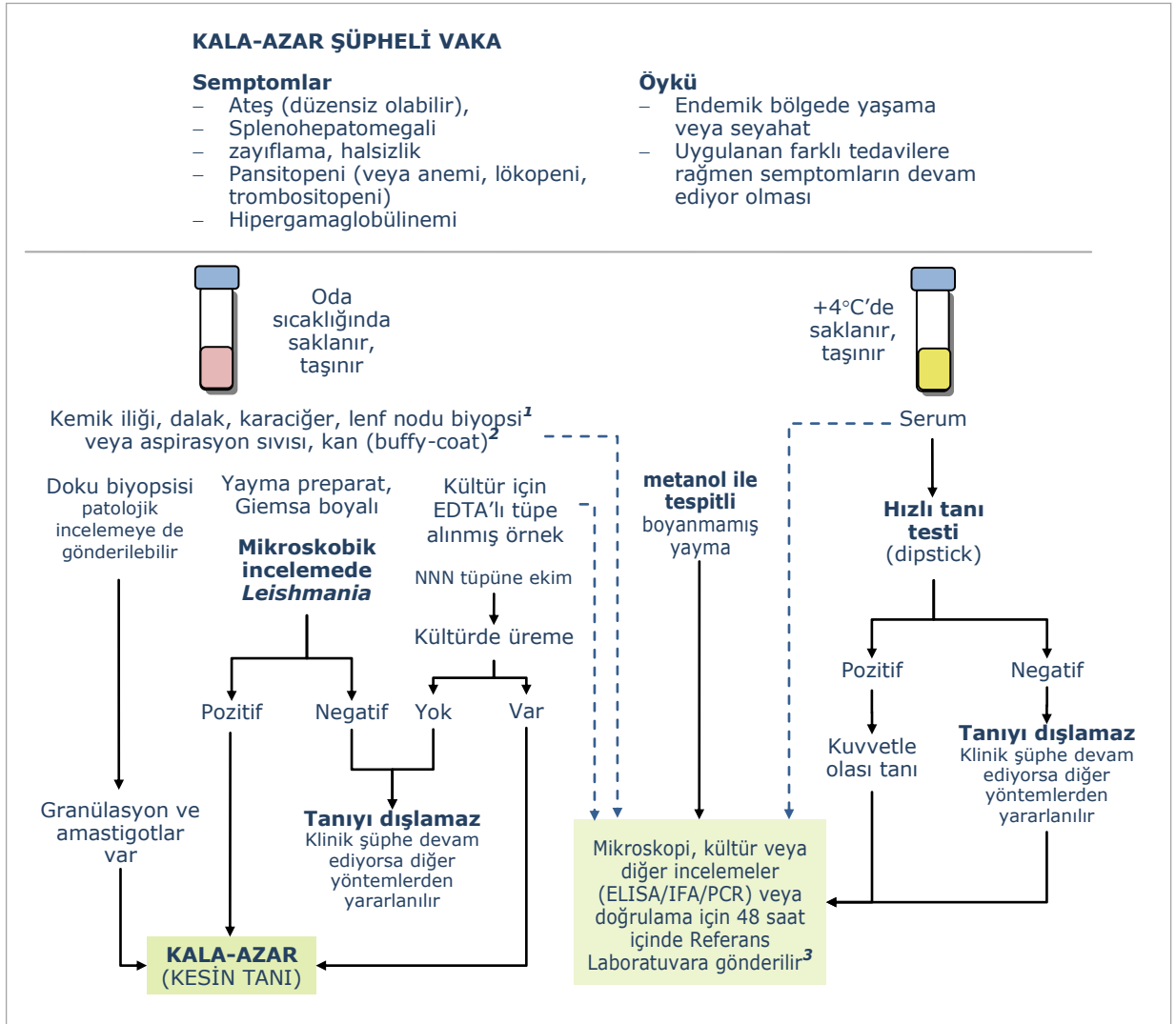
3 Kala-azar tanısında kullanılan teknikler

3.1. Tanı akış şeması

- Kala-azarın tanısı için alınabilecek örnekler ve tanı yöntemleri için akış şeması Şekil 1'de verilmektedir.

3.2. Örneklerin incelemeye hazırlanması

- Kemik iliği, dalak, karaciğer, lenf nodu biyopsi veya aspirasyon örnekleri laboratuvara doğrudan gönderilmiş olabilirler. Bu durumda laboratuvara gelen örneklerden **ilk olarak** hemen kültür tüplerine ekimler yapılmalıdır (*bkz.* aşağıda "3.4 Kültür").
- Daha sonra yaymalar hazırlanır. Tanı şansını yükseltmek için her örnekten –olabildiğince- birden fazla yayma hazırlanmalıdır.
- Biyopsi örneklerinden izolasyon şansını yükseltmek için örnekler aseptik şartlarda olabildiğince küçük parçalara ayrılmalıdır. Biyopsi materyalini ezme parazite zarar verir ve üreme şansını düşürür; bu nedenle ezme yerine **parçalama** işlemi yapılmalıdır.
- Ekimden sonra kalan biyopsi örneklerinden önceden temizlenmiş lamaların üzerine bastırarak preparatlar yapılır ('impression smears'). Yapılabildiğince çok yayma yapılmalıdır.
- Lenf bezi ve dalak aspirasyonu ile elde edilen örnek çok az olacağından besiyeri sıvısı içinde karıştırılarak da yayma preparat hazırlanabilir.
- Tam kandan 'buffy-coat' konsantrasyon yöntemi ile yoğunlaştırılmış çekirdekli kan hücrelerinden yaymalar hazırlanır. Bunun için tam kan örneği 700 × g'de 30 dk santrifüj edilir; beyaz hücre tabakasından (plazma ve eritrositler arasında kalan kısımdan) Pastör pipeti yardımıyla örnek alınır ve yayma hazırlanır. Kandan paraziti izole etmek nadir de olsa mümkün olabilmektedir; bu nedenle bu örnekten kültür tüplerine de ekim yapılır.



Şekil 1. Kala-azarın tanısı için alınabilecek örnekler ve tanı yöntemleri için akış şeması.

¹ Taze biyopsi hemen laboratuvara ulaştırılmayacaksa temiz lamlara bastırarak preparat yapılır. Biyopsi ya da aspirasyon örnekleri iki adet NNN tüpüne alınır. NNN tüpleri önceden laboratuvardan temin edilmiş olmalıdır. NNN yoksa biyopsi ya da aspirasyon örneği nötral pH'da, tamponlu steril bir ortama (tamponlu SF, RPMI, Eagle, Schneider, Tobie vb.) alınır ve oda sıcaklığında en fazla 48 saat içinde gönderilirler.

² Örnekler ikiye bölünmelidir.

³ Örnekler alındıktan sonra Referans laboratuvarına doğrudan da gönderilebilir.

- Hasta başında veya laboratuvarda hazırlanıp sabitlenmiş yaymalar Giemsa boyası ile boyanırlar (uygulama için bkz. UMS, P-TP-06)
- Serolojik testler için +4°C ya da derin dondurucuda saklanan serum örnekleri oda sıcaklığına getirilir. Daha sonra uygulanacak testler için hasta isimleri kayıt edilmeli ve örnekler sıralanmalıdır.
- Moleküler testler için hastadan alınan tam kan örnekleri, DNA izolasyonu aynı gün içinde yapılacaksa +4°C'de, daha sonra yapılacaksa -20°C'de saklanmalıdır. Moleküler testler için ayrılan örnekler testlerin güvenilirliği için EDTA hariç diğer antikoagülanlarla ve başka kimyasal maddelerle mümkün olduğunca karıştırılmamalıdır.

3.3. Mikroskopik inceleme

- Giemsa boyalı preparatlar mikroskopta 100× objektif ile (immersiyon yağı kullanılarak) en az 25-30 dakika incelenir.
- Doku biyopsileri, aspiratları veya 'buffy-coat' yaymalarında genellikle mononükleer hücrelerin içinde *Leishmania* spp amastigot formları aranır. Hücre sınırları belli, nükleus ve kinetoplastı ayırt edilebilen parazitler aranmalıdır.
- *Leishmania* spp amastigotları genellikle retiküloendotelyal sistem fagositik hücrelerinin içinde 3-5 µm çaplı yuvarlak veya oval organizmalar şeklinde görülürler.
- Bir amastigotta Giemsa ile kırmızı-mor boyanan nükleus, oldukça küçük daha koyu kırmızı-mor boyanmış kinetoplast ve açık mavi sitoplazma fark edilir. Trombositler ve boya artıkları ile karıştırılabilirler.
- İmmersiyon objektifi ile yapılan incelemede negatif sonuç vermeden önce, tercihen preparatın kenarlarını kapsayacak şekilde en az 300 mikroskop alanı taranmış olmalıdır.
- Mikroskopik incelemede amastigotların görülmesi klasik doğrulayıcı testtir ve "kesin tanı" koydurur.
- Özgüllük yüksek olmakla birlikte mikroskopinin duyarlılığı incelenen örneğe göre değişir; dalak aspiratında duyarlılık %93-99 iken kemik iliğinde %53-86 ve lenf nodu aspiratlarında %53-65'tir (3).

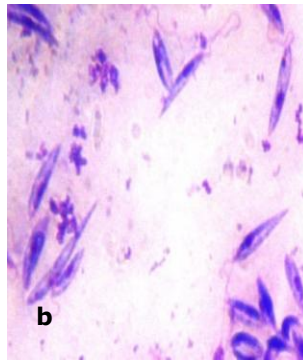
3.4. Kültür

- *Leishmania* spp izolasyonu için kültür mikroskopik tanıya destektir ve tanı şansını yükseltmek için kullanılmalıdır.
- Mümkünse örnekler hasta başında kültür tüplerine inoküle edilmelidir.
- Örnekler doğrudan laboratuvara gelmiş ise önce kültüre alınmalıdır. En çok tercih edilen besiyeri NNN'dir (Şekil 2). VL örnekleri **aseptik şartlarda** biyogüvenlik kabini içerisinde ya da bek alevi başında NNN veya tercih edilen bir başka besiyerine ekilir. Tüpler inokülasyon öncesinde oda sıcaklığına getirilmiş olmalıdır. NNN besiyerinin hazırlanışı Ek-1'de verilmiştir.
- Örnek inoküle edilmeden önce besiyeri tüpleri buzdolabından çıkarılır ve oda sıcaklığına gelmeleri için beklenir.
- Dipte birikmiş kondansasyon sıvısı üzerine 1 mL steril tamponlu SF veya PBS eklenerek besiyeri ekim yapmaya hazır hale getirilir.
- Tüplerin üzerine hastanın adı, protokol numarası, ekim tarihi yazılır. Her bir örnek en az 2 kültür tüpüne ekilmelidir.
- Aspirat örnekleri ve biyopsi parçaları NNN besiyerinin dip sıvısına ekilir. Fazla miktarda örnek inokülasyonu gelişimi baskılayabileceği için bir tüpe 2-3 damladan fazla örnek konmamalıdır.
- Eğer örnek miktarı fazla ise, 1500-2000 devirde 5 dk santrifüj edilerek üst sıvı atılır ve çökeltiden ekim işlemi yapılır.

- Ekimden sonra tüpler, 23-25°C'de 45°'lik açı ile inkübe edilir.
- Ekilen örneklerde etken varsa, genellikle 5-7 günde promastigotlar gözlenir. Eğer 10-15 gün sonra üreme yoksa yeni pasaj yapılarak her iki tüp birlikte de izlenebilir.
- Üremenin olup olmadığına, besiyerinin sıvı fazından alınan örneklerin incelenmesi ile karar verilir.
- 4 hafta boyunca 2-3 üç günde bir besiyerinin sıvı fazından örnek alınıp lam-lamel arası veya Giemsa boyalı preparatlar hazırlanır ve mikroskopta kamçılı promastigotların varlığı yönünden değerlendirilir (bkz. Şekil 3).
- Kültür sıvısında özellikle lökositlerin küme yaptığı bölgeler dikkatlice incelenmelidir.
- Negatif sonuç, kültürler 4 haftaya kadar takip edildikten sonra üreme halen gözlenmemiş ise, verilmelidir.
- Kültür ile tanının duyarlılığı, ekim sırasında aseptik koşullara dikkat edilmesi ve daha sonraki günlerde kültürlerin etken yönünden dikkatli incelenmesi ile artırılabilir.



Şekil 2. NNN besiyeri
(Kaynak: Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Hatay, 2013)



Şekil 3. Kültürde üremiş *Leishmania* promastigotlarının (a) boyanmamış ve (b) Giemsa ile boyanmış preparatlarının 100× immersiyon objektifinde görünümü
(Kaynak: Mustafa Kemal Üniv., Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Hatay, 2013)

3.5. Seroloji

- IFAT, ELISA veya Western blotting teknikleri ile antikorlar aranabilir. Tanısal duyarlılıkları yüksektir. Ancak donanım gerektirmeleri nedeniyle sahada yaygın kullanıma uygun değildir.
- İki serolojik test, direkt aglütinasyon testi (DAT) ve rK39 özgül antijeninin kullanıldığı immünokromatografik hızlı tanı testi ('dipstick') özellikle saha kullanımı için geliştirilmiş testlerdir ve çoğu endemik bölgede yüksek tanısal duyarlılık ile kullanılmaktadırlar.

- rK39 temelli testlerin uygulanması çok kolaydır, hızlıdır ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmektedir. Bu nedenle VL'nin erken tanısında hem periferal hem de merkezi düzeyde kullanılabilir.
- Bütün serolojik testlerin başlıca sınırlayıcı özellikleri şunlardır: birincisi, özgül antikolar yıllarca pozitif kalır; bu nedenle relapslar serolojik yöntemlerle tanımlanamaz. İkincisi, endemik bölgelerde sağlıklı bireylerin de hayli önemli bir yüzdesinde anti-leyişmanyal antikolar pozitif bulunabilir. Bu nedenle antikor arama testleri mutlaka klinik vaka tanımına uygun semptomatik vakalarda kullanılmalıdır.

3.6. Moleküler tanı

- Kan ve kemik iliği örneklerinden parazitin DNA'sının tespiti için PCR mikroskopiden çok daha fazla duyarlıdır. Ancak bu yöntemin kullanımı araştırma ve referans merkezleri ile sınırlanmıştır. Uygulamayı genişletmek için gelişmiş donanım gerektirmeyen ve kolayca okunabilir PCR formatları geliştirilme aşamasındadır (3).
- Örnekte *Leishmania* spp varlığını saptamak için, çeşitli *Leishmania* türlerinde ortak olan rRNA `internal transcribed spacer 2' (ITS2) bölgesi kullanılır (9). Ayrıca kinetoplastik DNA, telomerik sekanslar, gp63, minieksonlar, β -tubulin gibi hedefler de kullanılmaktadır.
- PCR kullanıldığında -yüksek duyarlılık nedeniyle- asemptomatik vakalar daha sık tanımlanmaktadır. VL olmayan febril splenomegali olgularında da PCR pozitifliği (yanlış pozitif sonuç) nadir olmakla birlikte elde edilebilmektedir (3).
- Akut hastalığın tanısı için daha özgül ve kantitatif PCR teknikleri geliştirilme yolundadır; ancak en önemlisi bunların standardizasyonu ve klinik ortamda tanısız doğruluğunun sınanmasıdır.

3.7. Saklama, Referans merkeze gönderme

- Biyopsi ve aspirasyon örnekleri taze materyal olarak saklan(a)maz, uzak laboratuvara nakledilemez! 15-20 dk içinde kurumadan uygun besiyerine ekim yapılmalı ya da yayma hazırlanmalıdır.
- Klinik örneklerden hazırlanan yaymalar havada kurutulup, saf metanol ile tespit edildikten sonra boyalı ya da boyasız olarak oda sıcaklığında bir süre (ör., taşıma süresince, birkaç gün) saklanabilirler. Tespit edilmiş boyalı veya boyasız preparatlar ve NNN kültür tüpleri oda sıcaklığında ileri testler için referans laboratuvara gönderilebilir.
- Eğer ileri tanı veya moleküler testler için örnekler başka bir şehirdeki laboratuvara gönderilecekse, *paketleme* ve *taşıma* biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (14) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).
- Laboratuvar pozitif yaymaları eğitim materyali olarak saklamalıdır.
- Pozitif örneklerden yapılmış fazla yaymalar gelecek boyama kontrolleri olarak, uygun bir kabın içinde, lamlar birbirine yapışmayacak ve çizmeyecek şekilde yerleştirilerek, derin dondurucuda saklanmalıdır.

4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim

- Örnek yaymaları aynı gün içinde incelenip raporlanmalıdır. Giemsa boyanmış yaymalarda amastigot formların saptanması ile **kesin tanı** konur; "*Leishmania* spp amastigotları görüldü" şeklinde rapor verilir.
- Kültürde promastigot formların saptanması **kesin tanı** bulgusudur ve "*Leishmania* spp üredi" şeklinde rapor verilir.
- Moleküler testler oldukça duyarlı ve özgüldür. *Leishmania* DNA'sının saptanması **kesin tanı** kriteridir.
- rK39 hızlı tanı testi ile pozitif sonuç tanıyı destekler; ancak doğrulama için diğer tekniklere başvurulması gerektiği raporda belirtilmelidir.
- DAT, IFAT veya ELISA ile elde edilen pozitif sonuçlar çapraz reaksiyon olasılığına ve enfeksiyondan sonra 9-12 ay pozitif bulunabilmesine rağmen yüksek oranda değerlidir; **kesin tanı** kriteri kabul edilir (2). İdeali, pozitif seroloji sonuçları diğer tanı testleri ile desteklenmesidir.
- VL bildirimi zorunlu bir hastalıktır. Tanı koyulması halinde olguların ilgili prosedürlere göre bildirimi yapılır (1,2).

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- VL tanısı için örneklerin alınması invaziv yöntemlerin kullanılmasını gerektirmektedir. Bu yöntemler ancak uzman ve deneyimli personel tarafından uygulanabilir. Sonucun güvenilirliği, hastaya sıkıntı veren bu işlemler sırasında hiç hata yapılmamasına bağlıdır.
- Örnekler usulüne uygun alınmamış veya boyama düzgün yapılmamış ise testlerin tanı duyarlılığı düşer.
- Biyopsi ve aspirasyon örnekleri taze materyal olarak saklan(a)maz ve uzak laboratuvara nakledilemez! 15-20 dk içinde kurumadan uygun besiyerine ekim yapılmalı ya da yayma hazırlanmalıdır. Hemen işlenemeyecek örneklerin laboratuvara transferinin nasıl yapılacağına en iyisi ilgili laboratuvar ile iletişime geçerek karar verilmelidir.
- Kültür yöntemleri ile etkeni üretebilmek en az 3-7 gün alabilmektedir. İlk izolasyon için en az iki kültür tüpüne ekim yapılmalıdır. Normal şartlarda pozitif örneklerin yaklaşık %70'inde üreme olmaktadır.
- *Leishmania*'lar bakteriyel kontaminasyon olduğu zaman üreyemezler. Örnekleri alırken aseptiye ileri derecede dikkat edilmelidir.
- EDTA'lı kandan yayma, örneğin alındığı ilk saat içinde yapılmalıdır. Eğer daha uzun süre beklemiş EDTA'lı kan kullanılırsa, boyama sırasında lamdan dökülebilir veya parazit morfolojisi bozulabilir.
- Pozitif serolojik testler her zaman aktif enfeksiyonu göstermeyebilir.
- İmmünitesi baskılanmış hastalarda *Histoplasma capsulatum* ile karışma olasılığı vardır. Bunlar, belirgin nükleus ve kinetoplastı bulunmayan organizmalardır.

Ekler

Ek-1 NNN besiyerinin hazırlanması¹²

Malzemeler

- Kültür tüpleri, vida kapaklı, steril (16×125 mm)
- Antibiyotik stok solüsyonu - Penisilin (20.000 U/mL) ve Streptomisin (20.000 µg/mL) içeren (hazırlanışı için aşağıya bakınız).
- Tavşan kanı, defibrine, steril - Aseptik koşullarda, tavşandan yaklaşık olarak 35-40 mL kan alınır ve hemen steril, cam boncuklu bir şişeye konur; yavaş hareketlerle 5 dk karıştırılarak defibrine edilir.

Antibiyotik stok solüsyonunun hazırlanması

Sodyum penisilin G	1,000,000 U
Streptomisin sülfat	1,000,000 µg
Steril çift-distile su	50.0 mL

1. Maddeler suda karıştırılır. Konsantrasyonlar; penisilin 20,000 U/mL ve streptomisin 20,000 µg/mL olur.
2. Antibiyotik karışımı steril vida kapaklı derin dondurucu tüplerine 1 mL alikotlar halinde dağıtılır.
3. İçerik bilgisi ve hazırlama/son kullanma tarihi yazılarak -20°C derin dondurucuya kaldırılır. Raf ömrü 1 yıldır.

Besiyerinin hazırlanması

Agar	1.4 g
Sodyum klorür (NaCl)	0.6 g
Distile su	90 mL

1. 500 mL'lik bir erlen içinde NaCl ve agar suyla karıştırılır. 121°C'de 15 dk otoklavlanır.
2. Besiyeri 50-55°C'ye soğutulur; aseptik koşullarda içine 10 mL defibrine tavşan kanı ve 1 mL antibiyotik stok solüsyonu eklenir. Aseptik koşullarda tüplere 4'er mL dağıtılır. Tüpler hemen 10°'lik bir açı ile yatırılır. Katılaşır katılaşmaz, dip kısımda kondansasyon sıvısının oluşması için tüpler dik bir şekilde bir spora yerleştirilir ve buzdolabına kaldırılır. Hızlı soğutma kondansasyon sıvısı oluşumunu artıracaktır.
3. Tüpler besiyerinin adı, hazırlama/son kullanma tarihi yazılarak etiketlenir; raf ömrü 3 haftadır. Buzdolabında saklanır.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Kala-azarın Mikrobiyolojik Tanısı) aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

- UMS, P-ÖY-03 Kan ve kemik iliği örneklerinin parazitolojik incelemesi
- UMS, P-TP-01 Mikroskop kalibrasyonu
- UMS, P-TP-06 Giemsa boyama
- UMS, P-TP-07 Kalın damla ve ince yayma
- UMS, GEN-OY-01 Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 2 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 3 WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010.
http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf (son erişim tarihi: 30.01.2014)
- 4 Jeronimo SMB, Sousa QA, Pearson RD. *Leishmania* Species: Visceral (Kala-Azar), cutaneous, and mucocutaneous leishmaniasis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed., Churchill Livingstone, Chapter 273; 2005
- 5 Özcel MA. Leishmaniasis. In: Özcel MA, Özbel Y, Ak M. *Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları*. 1. baskı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, İzmir. 2007, p. 197-241
- 6 CDC. Parasites: Leishmaniasis. Resources for Health Professionals.
<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/healthprofessionals/index.html#dx> (son erişim tarihi: 05.01.2014)
- 7 HPA UK Standards for Microbiology Investigations: Investigation of Bone Marrow. Issued by the Standards Unit, Microbiology Services Division, HPA Bacteriology.
http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1317132858115 (son erişim tarihi: 05.01.2014)
- 8 Bullock-Iacullo S. Detection of blood parasites. In: Isenberg HD. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, Vol. I. ASM Press, Washington D.C. 1992, p. 7.8.1 and 7.9.4
- 9 Özbel Y, Töz SÖ. Parazitolojide Laboratuvar. In: Korkmaz M, Ok ÜZ (eds). *Leishmaniasis*. 1. Baskı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, İzmir. 2011, p.307-320
- 10 Cota GF, de Sousa MR, Demarqui FN, Rabello A. The diagnostic accuracy of serologic and molecular methods for detecting visceral leishmaniasis in HIV infected patients: meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6(5):e1665
- 11 Maia Z, Lirio M, Mistro S, Mendes CM, Mehta SR, Badaro R. Comparative study of rK39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6(1):e1484

- 12 Visvesvara GS. Parasite Culture: *Leishmania* spp and *Trypanosoma cruzi*. In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.9.5.1-6
- 13 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.2.1-4
- 14 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Şark Çıbanının Deri Leyişmanyazının (Derinin *Leishmania* spp enfeksiyonu) Mikrobiyolojik Tanısı

Hazırlayan Birim	Klinik Parazitoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Parazitoloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	P-MT-05
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
TEKNİK BİLGİLER	4
1 Hedef mikroorganizmalar	4
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	4
3 Şark çıbanı tanısında kullanılan teknikler	8
4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim	11
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	11
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	12
KAYNAKLAR	12

Kapsam ve Amaç

Leyişmanyaz, tatarcık (*Phlebotomus*; yakarca) adı da verilen kum sineklerinin sokması sonucu *Leishmania* spp'nin bulaşması ile gelişen bir enfeksiyondur.

Kutanöz leyişmanyaz (KL) Şark çıbanı olarak da adlandırılmaktadır ve genellikle vücudun giysi ile örtülmeyen açıkta kısımlarındaki deri bölgesinde bir veya birden fazla lezyonla karakterli bir hastalıktır. Tedavi edilmediğinde düzensiz bir skar bırakarak iyileşir. Şark çıbanı bildirim zorunlu bir hastalıktır (1,2). Ülkemizde bazı bölgeler Şark çıbanı için endemik olup, Sağlık Bakanlığı hastalığın eliminasyonu için bir program yürütmektedir (3).

Hastalığın tanısı başlıca şüpheli lezyon örneklerinin Giemsa boyalı preparatlarının mikroskopik incelemesine dayanmaktadır (3,4).

Bu UMS'nin amacı, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarına Şark çıbanı şüpheli vaka tanısında izleyebilecekleri inceleme yöntemleri için ve gerektiğinde *diğer* laboratuvara yönlendirmeye yardımcı bir rehber sunmaktır.

Kısaltmalar ve Tanımlar

- KL** Kutanöz leyişmanyaz
EDTA Etilen diamin tetra asetik asit
NNN Novy-MacNeal-Nicolle (besiyeri)

Genel Bilgi

Leyişmanyaz, *Leishmania* cinsi parazitler ile enfekte dişi kum sineklerinin (tatarcık; *Phlebotomus*) kan emerken insanlara bulaştırdığı bir hastalıktır. Kutanöz leyişmanyaz (KL) olarak da adlandırılan Şark çıbanı yaklaşık 70 ülkede endemiktir. Türkiye'de en çok görülen iller Şanlıurfa, Osmaniye, Adana, Hatay, Aydın olup, Afyon, Muğla, Kahramanmaraş ve Mersin illerimizde de endemiktir. Ülkemizde en sık görülen etken *Leishmania tropica* antropotik (insan-vektör-insan geçişli) özelliindedir. Son zamanlarda *Leishmania infantum*'un da kutanöz lezyonlar oluşturduğuna dair yayınlar bulunmaktadır (2,5).

Şark çıbanı, genellikle açıkta kalan deri bölgelerine lokalize bir veya birden fazla lezyonla karakterize bir hastalıktır. Eritemli bir papül olarak başlayıp uzun süre (en az 1 ay) iyileşmeyen, nodüle dönüşen, zamanla ülserleşen, üzerinde tabana sıkıca yapışık kabuğu ve merkezinde krateri olan, kenarları lastik silgi kıvamında endürasyon gösteren lezyon(lar), tedavisiz olgularda bir yıl gibi bir sürede düzensiz bir skar bırakarak iyileşir. KL lezyonu, sekonder olarak bakterilerle enfekte olmadıkça ağrısızdır (5,6).

Endemik olmayan bir bölgede bu özelliklere uyan lezyona sahip bir olgu ile karşılaşılması halinde, özellikle yaz aylarında endemik bölgeye (ör., Güneydoğu Anadolu ve Doğu Akdeniz) seyahat öyküsü sorgulanmalıdır.

Endemik bölgede yaşama veya seyahat öyküsü ile birlikte yüz, boyun, kol veya bacak derisinde tipik olarak nodül şeklinde başlayan ve zamanla ülserleşen bir veya birden fazla lezyonun gelişmesi Şark çıbanını düşündürse de kesin tanı laboratuvar incelemesi ile konur (7).

KL tanısı, deri kazıntılarında veya biyopsi örneklerinden hazırlanan Giemsa, Leishman veya benzeri bir boya ile boyanmış preparatlarda parazitin görülmesi ile doğrudan konabilir. Yeni ya da aktif lezyonlarda amastigotları bulmak kolaydır. Ülserli lezyon kazıntıları da pozitif olabilir. Örneklerden kültür yapılabilir. Bu amaçla visseral leishmaniyaz için önerilen besiyerleri kullanılabilir (7,8). Serolojik testlerin KL tanısında yeri yoktur.

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizmalar

Leishmania tropica, *Leishmania major* ve *Leishmania* spp.

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

Potansiyel enfeksiyöz organizmalar içerebileceği için parazitolojik inceleme örnekleri asgari BGD2 laboratuvar şartlarında incelenmeli ve daima "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi"nde belirtilen standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır. Bu prosedür uygulanırken daima **eldiven** giyilmelidir!

Lamlar, boyanmış olsun olmasın, **kesici-delici atık** kabul edilir ve kesinlikle kesici-delici atık kutusuna atılırlar! Diğer biyolojik kirlilerin bulunduğu torbalara atılmaları halinde torbayı deler ve ciddi enfeksiyöz risk oluştururlar!

Güvenlik uyarısı! Metanol yüksek düzeyde toksik ve parlayıcıdır. Eğer yutulacak olursa (herhangi bir miktarı) körlüğe ve hatta ölüme neden olabilir. Kullanım harici zamanlarda metanol şişesi kilitli bir dolapta tutulmalıdır!

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) tekniklerin uygulanmasından önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) tekniğe tüm yönleriyle aşina olmalı, ve (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

İnvaziv teknik kullanılarak alınmış örnekler en kısa sürede ve **mutlaka** Tıbbi Mikrobiyoloji/Tıbbi Parazitoloji Uzmanı tarafından bizzat incelenmeli, değerlendirilmeli ve sonuçlandırılmalıdır.

Leishmania kültürleri bakteri ya da mantar kontaminasyonuna son derece yatkındır ve eğer laboratuvar personeli besiyerlerinin hazırlanmasında ya da aspirat, biyopsi materyali gibi örneklerin inokülasyonunda deneyimli değilirse sonuçlar doğrudan etkilenir.

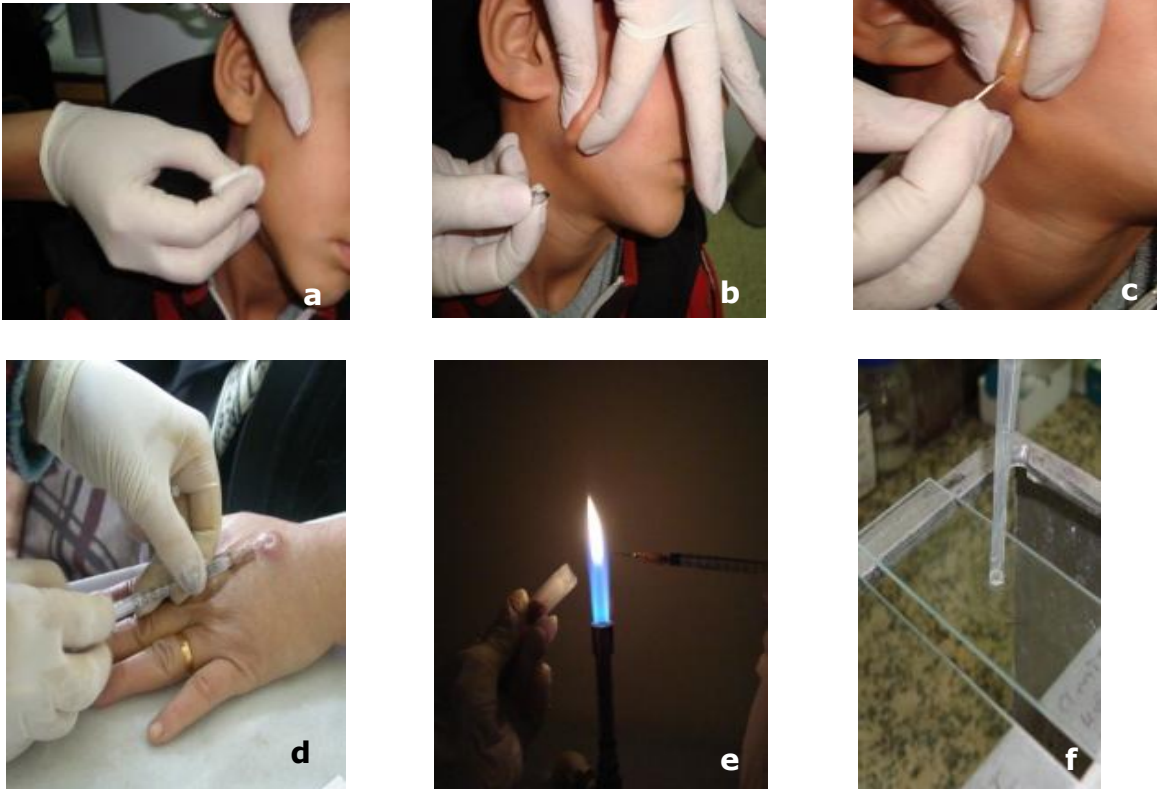
2.3. Örnek, Besiyeri, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

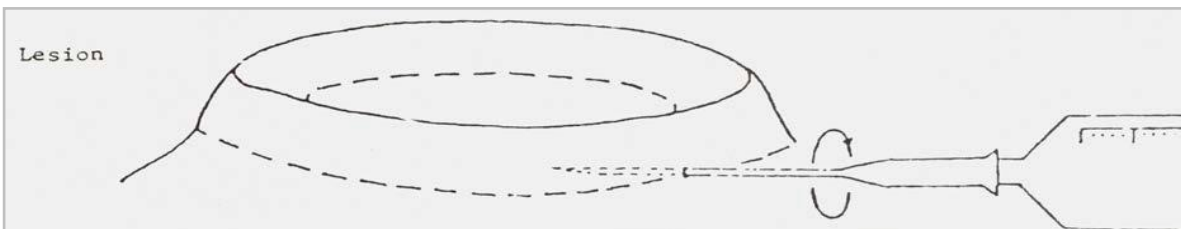
Örneklerinin alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden edinilebilir. Aşağıda bazı önemli noktalara tekrar dikkat çekilmektedir. Buna göre:

- KL tanısı için başlıca deri lezyonlarından kazıntı, aspirat veya biyopsi örnekleri alınabilir. Alınan örneklerin hemen işlenmesi gerektiği için örneği alan hekim laboratuvar ile yakın işbirliği içinde olmalıdır.
- Eğer laboratuvar uzak ise (vakanın başvurduğu sağlık kurumunun laboratuvarında Şark çıbanı tanısı için inceleme yapılamıyorsa), hekim, örnekleri almadan önce, bünyesinde Parazitoloji Birimi bulunan en yakın Üniversite veya Eğitim Araştırma Hastanesi laboratuvarı ya da THSK, Ulusal Parazitoloji Araştırma ve Referans Laboratuvarı ile iletişim kurmalıdır. Hastanın durumuna göre gerekiyorsa NNN besiyeri tüpleri laboratuvar tarafından hekime temin edilecektir. Buna göre örneklerin alınmasında aşağıdaki hususlara dikkat edilmelidir:
 - (a) Yayımlar hasta başında hazırlanmalı ve sabitlenmeli; her birinin rodajlı kısmına hastanın adı yazıldıktan sonra birbirine temas etmeyecek şekilde uygun bir lam kutusu için yerleştirilerek laboratuvara gönderilmelidir.
 - (b) Kültür için alınan örnekler laboratuvardan temin edilmiş NNN besiyerine konarak, **oda sıcaklığında** 24-48 saat içinde laboratuvara nakledilmelidir. Eğer besiyeri temin edilemiyor veya besiyeri gelene dek hasta bekletilemiyorsa örnekler bir steril, pH'ı nötral (~7-7.4) tamponlu solüsyona (tamponlu tuzlu su, %10 fetal dana serumu içeren RPMI, Eagle, Schneider veya Tobie vasatları) konarak, **oda sıcaklığında** 24-48 saat içinde gönderilmelidir.
- Eğer birden fazla lezyon varsa;
 - (a) sekonder enfeksiyonu olmayan bir lezyon seçilmelidir,
 - (b) en yeni/aktif lezyondan örnek alınmalıdır.
- Lezyonun orta kısımlarında nekrotik dokular bulunduğu için dolayı, örnek lezyon kenarından alınmalıdır. Kabuk varsa kaldırılarak kabuğun altından ve yaranın kenarından örnek alınır.
- Bakteriyel veya fungal kontaminasyon promastigotların üremesini inhibe edebileceğinden, kültür için örnekler alınırken aseptik koşulların sağlanmasına azami dikkat gösterilmelidir.
- Deri lezyonundan örnekler Dermatoloji uzmanı tarafından veya bu konuda eğitim almış bir hekim tarafından alınabilir. Kazıntı örnekleri için, hasta laboratuvara da gönderilebilir; örnek laboratuvarda alınır.
- Kazıntı veya lanset yöntemi ya da aspirasyon ile elde edilen materyal 3-4 adet lam üzerine nazikçe yayılır.
- Biyopsi parçalarından biri ile 2-3 adet lama bastırarak yaymalar ('impression smears') hazırlanır.
- Yayımlar havada kurutulur ve üzerine saf metanol konarak fikse edilir.

- Kazıntı yöntemi ile örnek alma işlemi ve yaymanın sabitlenmesi Şekil 1(a-d)'de, ince iğne aspirasyonu ile örnek alma yöntemi Şekil 2'de verilen çizimde tasvir edilmektedir.
- Lezyon kabuğu (varsa) bir kısmı veya tamamı alınabilir; steril tüpte kuru muhafaza edilir. Laboratuvara gönderilir.
- Moleküler teknikler için - biyopsi veya aspirasyon sıvısı örnekleri, boyanmamış preparatlar veya EDTA içeren tüplere alınmış örnekler alınıp gönderilebilir.



Şekil 1. KL tanısında; **(a-c)** deri lezyonundan kazıntı örneği alınması, **(d)** ince iğne aspirasyonu ile örnek alınması, **(e)** aspiratın, asepsiye dikkat edilerek (bek alevi başında) NNN besiyerine inoküle edilmesi, **(f)** hazırlanan yaymanın metanol eklenerek sabitlenmesi (Kaynak: Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Hatay, 2013)



Şekil 2. İnce iğne aspirasyonu ile örnek alınması: Sağlam deriden lezyon kenarına doğru 0.3 mL steril SF içeren enjektör ile girilir; deri içine 0.1-0.3 mL SF verilir ve iğne hafifçe öne arkaya ve içerde döndürerek ve pompalanarak hareket ettirilir ve aspire ederek en az 0.1mL örnek alınır (Kaynak: CDC) (6).

Besiyeri / Reaktif

- NNN besiyeri (bifazik kanlı besiyeri) – Leishmania kültürü için en çok kullanılan besiyeridir. Laboratuvarda hazırlanabilir. NNN besiyerinin hazırlanışı ve diğer alternatif besiyerleri için *bkz.* "UMS, P-MT-04 Kala azar'ın Mikrobiyolojik Tanısı".
- EDTA içeren steril vida kapaklı tüp – Aspirasyon örneği hemen ekim yapılmayacaksa EDTA'lı bir tüpe aktarılır.
- Steril SF
- Etil alkol, %70'lik - lezyonun etrafını temizlemek için
- Metanol, saf – boyama öncesi lamları tespit etmek için
- Giemsa boyası (*bkz.* UMS, P-TP-06)

Diğer gereç, donanım

- Mikroskop, binoküler (rutin) – 10× (düşük), 40× (yüksek kuru), 100× (immersiyon) objektifleri ve 10× oküleri olan tercih edilir.
NOT: 5× oküler daha az büyütme sağlar ve inceleme duyarlılığını düşürür; bu nedenle 10× oküler kullanılması önerilmektedir (9).
- Önceden temizlenmiş lamlar (25×75 mm), tercihen kenarı rodajlı
- Kurşun kalem, lamin rodajlı kenarına örnek numarası vb. yazmak için,
- 3 veya 4 şale, 100 mL'lik - yaymaları boyamak için
- Pastör pipetleri, 1 ve 10 mL pipetler
- Lanset ve/veya Bisturi (tercihen No:15) ve/veya 25-26 no'lu insülin iğnesi, gazlı bez
- Biyolojik atık kapları, kesici-delici atık kabı ve toksik boya atıklarını toplamak için kap (kimyasal atık kabı)
- Kültür ve PCR için gerekli gereç/donanım (*bkz.* UMS, P-MT-04)

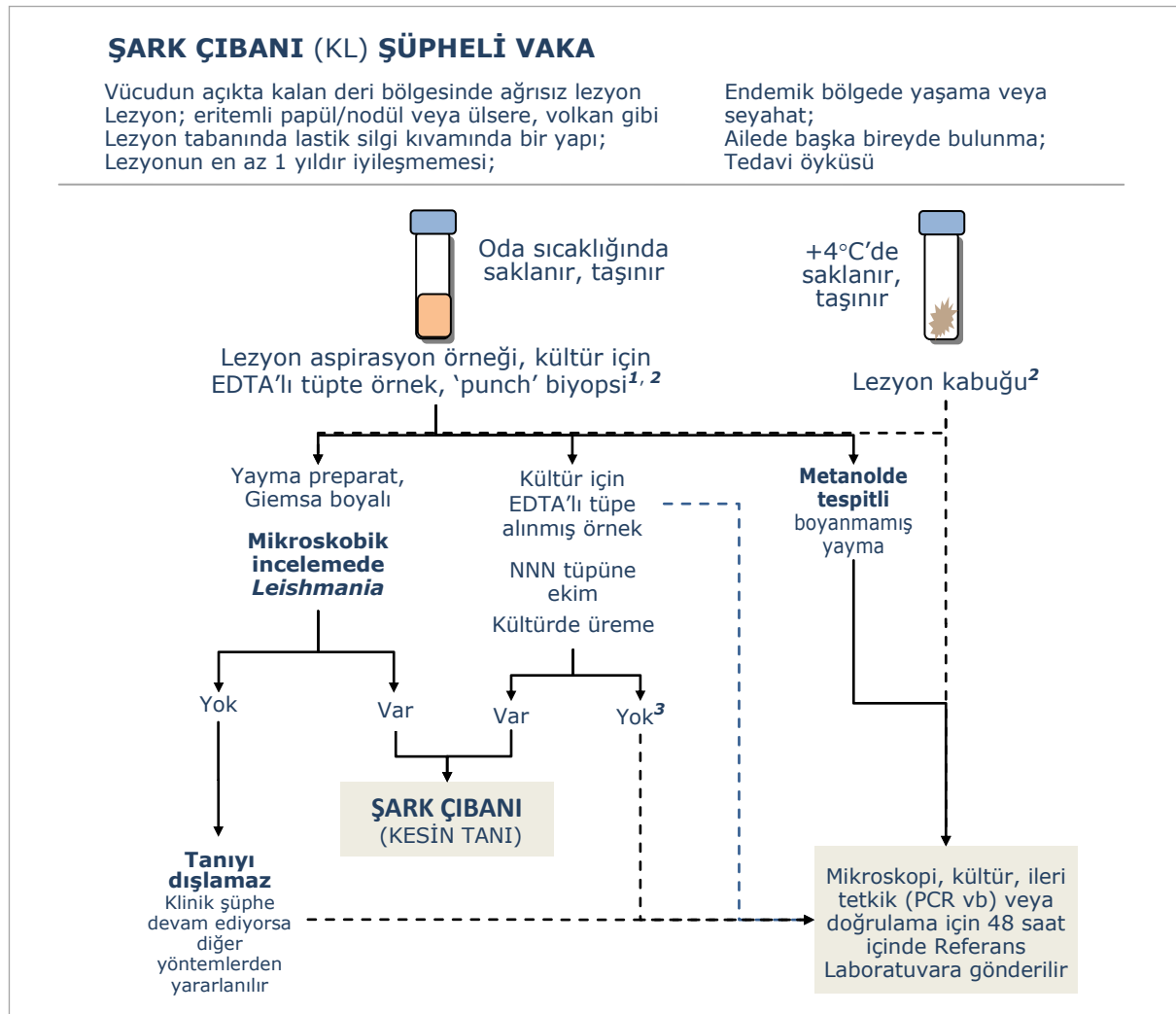
2.4. Kalite kontrol

- Tüm ekipmanın bakım ve kalibrasyonu yapılmış olmalıdır.
- Mikroskop belirli aralıklarla (yoğun kullanılıyorsa yılda en az bir kez) kalibre edilmelidir. Mikroskoba herhangi bir parça eklenmesi veya değiştirilmesi durumunda da kalibrasyon yapılmalıdır. Kalibrasyon için kullanılan optikler mikroskobun üzerinde olmalıdır. Tüm objektifler için kalibrasyon faktörleri göz önündeki bir panoda asılı olmalıdır (*bkz.* UMS, P-TP-01 Mikroskop Kalibrasyonu) (9).
- Kullanılan besiyeri/reaktif/kitlerin (moleküler testler dahil) son kullanma tarihlerine ve saklama koşullarına dikkat edilmelidir. Kontrol örnekleri kullanılarak malzemelerin etkinliği değerlendirilmelidir. Besiyerlerinin kalite kontrolü için ayrıca *bkz.* UMS, P-MT-04.
- Boyama sonuçlarının uygunluğundan emin olmak için, saklanmış pozitif örnekler veya referans suşlar teste dahil edilmelidir.
- Her kullanımdan önce SF ve diğer solüsyonlar bulanıklık ve renk değişimi yönünden kontrol edilmeli; bulanık veya renk değişikliği olmuş solüsyonlar değiştirilmelidir.
- Tüm kalite kontrol sonuçları kaydedilmelidir.

3 Şark çıbanı tanısında kullanılan teknikler

- Lezyondan yapılan yaymalarda *Leishmania* amastigotlarının görülmesi kesin tanı koydurucu olduğu için, Şark çıbanı şüpheli olgularda **öncelikli** tanı yöntemi Giemsa boyanmış yaymaların incelenmesidir. Diğer yöntemler daha çok yaymalarda amastigot görülmediğinde kullanılır.
- Laboratuvar incelemeleri için bir akış şeması Şekil 3'de verilmiştir.

3.1. Tanı akış şeması



Şekil 3. Şark çıbanının tanısında alınabilecek örnekler ve tanı yöntemleri için akış şeması.

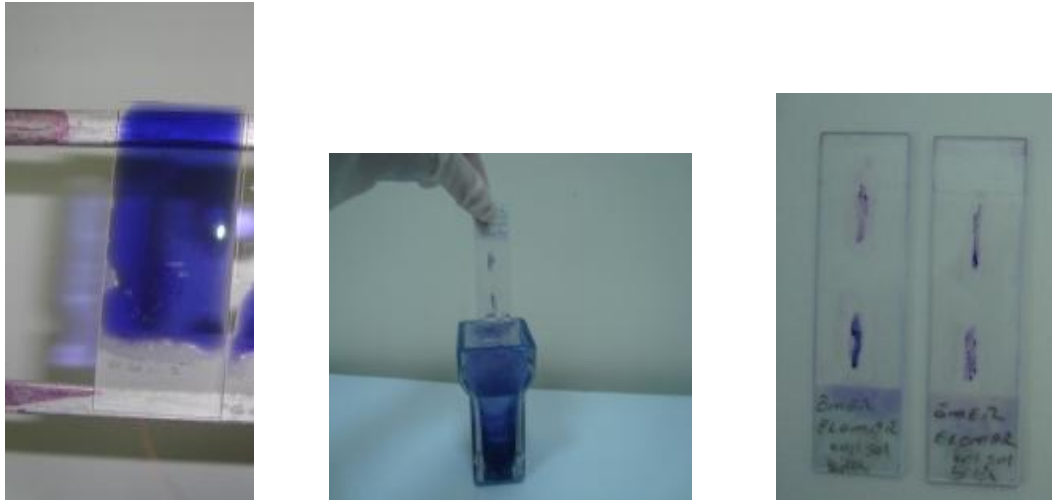
¹ Taze biyopsi hemen laboratuvara ulaştırılmayacaksa temiz lamlara bastırarak preparat yapılır. Biyopsi ya da aspirasyon örnekleri iki adet NNN tüpüne alınır. NNN tüpleri önceden laboratuvardan temin edilmiş olmalıdır. NNN yoksa biyopsi ya da aspirasyon örneği nötral pH'da, tamponlu steril bir ortama (tamponlu SF, RPMI, Eagle, Schneider, Tobie vb.) alınır ve oda sıcaklığında en fazla 48 saat içinde gönderilirler.

² Bu örnekler, lezyonun ve ilgili merkez/laboratuvarın koşulları uygun ise alınmalıdır.

³ Klinik şüphe devam ediyorsa yeni örnek alınıp incelenir veya diğer yöntemlerden yararlanılır.

3.2. Örneklerin incelemeye hazırlanması

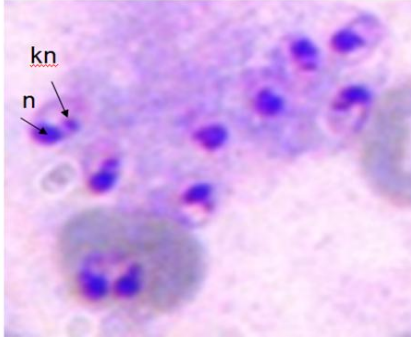
- Aspirat veya biyopsi örneği mümkünse iki kısma ayrılmalı; önce kültür besiyerlerine inoküle edilmeli sonra mikroskopi için preparat hazırlanmalıdır.
- KL örnekleri aseptik şartlarda biyogüvenlik kabini içerisinde ya da bek alevi başında NNN veya tercih edilen bir başka besiyerine ekilir (bkz. UMS P-MT-04, Kala azar'ın Mikrobiyolojik Tanısı). Tüpler inokülasyon öncesinde oda sıcaklığına getirilmiş olmalıdır.
- KL incelemesi için deri lezyonundan hazırlanmış ve metanolde fikse edilmiş yaymalar Giemsa ile boyanır (Şekil 4)
- Giemsa boyasının hazırlanması ve Giemsa boya uygulaması için "UMS, P-TP-06 Giemsa Boyama" UMS belgesinden yararlanılabilir.



Şekil 4. Lezyondan yapılmış yaymaların Giemsa yöntemi ile boyanması (Kaynak: Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Hatay, 2013)

3.3. Mikroskobik inceleme

- Boyanmış örnekler ışık mikroskopunda 100× objektif ile incelenir.
- *Leishmania* spp amastigotları retiküloendotelyal sistem fagositik hücrelerinin (makrofajlar) içinde veya dışında, 3-5 µm boyutlarında yuvarlak veya oval organizmalar şeklinde görülürler.
- Bir amastigotta Giemsa ile kırmızı-mor boyanan nükleus, oldukça küçük daha koyu kırmızı-mor boyanmış kinetoplast ve açık mavi sitoplazma ayırt edilir. Diğer kan hücreleri (trombositler) ve boya artıkları ile karıştırılabilirler. Hücre sınırları belli, nükleus ve kinetoplastı ayırt edilebilen parazitler aranmalıdır (bkz. Şekil 5).
- 100× objektif ile yapılan incelemede negatif sonuç vermeden önce, tercihen preparatın kenarlarını kapsayacak şekilde 300 mikroskop alanı taranmalıdır.



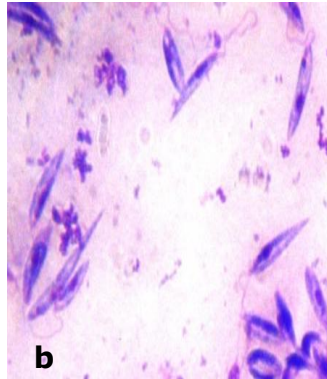
Şekil 5. KL tanısında deri lezyonundan hazırlanmış ve Giemsa ile boyanmış *Leishmania* amastigotlarının 100x immersiyon objektifinde görünümü.

kn, kinetoplast; n, nükleus.

(Kaynak: Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Hatay, 2013)

3.4. Kültür

- Kültürlerden genellikle 3-7 gün içerisinde pozitif sonuç alınır. Normal şartlarda pozitif örneklerin yaklaşık %70'inde üreme olmaktadır.
- Üremenin olup olmadığına, NNN besiyerinin sıvı fazından alınan örneklerin lam-lamel arası mikroskopik incelemesi veya Giemsa boyalı preparatının incelenmesi ile karar verilir. Üreme varsa *Leishmania* spp'nin yapay besiyerinde üreyen formu olan kamçıli promastigotların varlığı gözlenir (bkz. Şekil 6).
- Kültürler, negatif sonuç vermeden önce, 2-3 gün aralıklarla 4 hafta boyunca üreme varlığı açısından kontrol edilmelidir.
- Kültür ile tanının duyarlılığı, ekim sırasında aseptik koşullara dikkat edilmesi ve daha sonraki günlerde kültürlerin etken yönünden dikkatli incelenmesi ile arttırılabilir.



Şekil 6. Kültürde üremiş *Leishmania* promastigotlarının (a) boyanmamış ve (b) Giemsa ile boyanmış preparatlarının 100x immersiyon objektifinde görünümü (Kaynak: Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Hatay, 2013)

3.5. Moleküler tanı

- Örnekte *Leishmania* spp varlığını saptamak için, çeşitli *Leishmania* türlerinde ortak olan rRNA 'internal transcribed spacer 2' (ITS2) bölgesi kullanılır (5). Ayrıca kinetoplastik DNA, telomerik sekanslar, gp63, minieksonlar, β -tubulin gibi hedefler de kullanılmıştır.
- Piyasada gerçek zamanlı PCR kitleri de bulunmaktadır.

3.6. Saklama, Referans merkeze gönderme

- Biyopsi ve aspirasyon örnekleri taze materyal olarak saklan(a)maz, uzak laboratuvara nakledilemez! 15-20 dk içinde kurumadan uygun besiyerine ekim yapılmalı ya da yayma hazırlanmalıdır.
- Klinik örneklerden hazırlanan yaymalar havada kurutulup, saf metanol ile tespit edildikten sonra boyalı ya da boyasız olarak oda sıcaklığında bir süre (ör., taşıma süresince, birkaç gün) saklanabilirler. Tespit edilmiş boyalı veya boyasız preparatlar ve NNN kültür tüpleri oda sıcaklığında ileri testler için referans laboratuvara gönderilebilir.
- Eğer ileri tanı veya moleküler testler için örnekler başka bir şehirdeki laboratuvara gönderilecekse, *paketlenme* ve *taşıma* biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (10) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).
- Laboratuvar pozitif yaymaları eğitim materyali olarak saklamalıdır.
- Pozitif örneklerden yapılmış fazla yaymalar gelecek boyama kontrolleri olarak, uygun bir kabın içinde, lamlar birbirine yapışmayacak ve çizmeyecek şekilde yerleştirilerek, derin dondurucuda saklanmalıdır.

4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim

- Deri lezyonundan kazıntı veya lanset ile alınan örneklerin yaymaları aynı gün içinde incelenip raporlanmalıdır.
- Giemsa boyanmış yaymalarda *Leishmania* spp amastigot formlarının saptanması ile **kesin tanı** konur; "*Leishmania* spp amastigotları görüldü" şeklinde rapor edilir.
- Kültürde promastigot formların saptanması **kesin tanı** bulgusudur ve "*Leishmania* spp üredi" şeklinde rapor verilir.
- Moleküler testler oldukça duyarlı ve özgüdür. *Leishmania* DNA'sının saptanması **kesin tanı** kriteridir.
- KL bildiri zorunlu bir hastalıktır. Tanı koyulması halinde olguların kayıt ve bildiri için Sağlık Bakanlığının "Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi" izlenmelidir (1,2,3).

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- KL tanısı için örneklerin alınmasında invaziv yöntemler kullanılır. Bu nedenle örnek alma işi deneyimli uzmanlaşmış personel gerektirir. Sonucun güvenilirliği, hastaya sıkıntı veren bu işlem sırasında hiç hata yapılmamasına bağlıdır.
- Örnekler usulüne uygun alınmamış veya boyama düzgün yapılmamış ise testlerin tanı duyarlılığı düşer.
- Örnekler mümkünse hastaya tedavi başlanmadan önce alınmalıdır.

- Kültür yöntemleri ile etkeni üretebilmek en az 3-7 gün alabilmektedir. İlk izolasyon için iki tüpe ekim yapılmalıdır.
- *Leishmania*'lar bakteriyel kontaminasyon olduğu zaman üreyemezler. Örnekleri alırken lezyonun temizlenmesine ve asepsiye ileri derecede dikkat edilmelidir.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Şark Çıbanının Mikrobiyolojik Tanısı) aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

UMS, P-TP-01	Mikroskop kalibrasyonu
UMS, P-TP-06	Giemsa boyama
UMS, P-MT-04	Kala azarın mikrobiyolojik tanısı
UMS, GEN-OY-01	Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 2 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurveLaBReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 3 Kutanöz Leyişmanyaz Genelgesi (2003/126). Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, 24/10/2003 tarih ve 16130 sayılı
- 4 WHO. Manual on Visceral Leishmaniasis Control. World Health Organization, Division of Control of Tropical Diseases, Overseas Development Administration. Geneva. WHO/LEISH/96.40; 1996
- 5 Özbel Y, Özensoy Töz S. Leishmaniasis. In: Özcel MA (ed). *Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları*. 1. baskı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, İzmir. 2007, p.197-241
- 6 CDC's Parasitic Diseases Branch. Practical Guide for Laboratory Diagnosis of Leishmaniasis.
http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/resources/pdf/cdc_diagnosis_guide_leishmaniasis.pdf (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 7 Jeronimo SMB, Sousa QA, Pearson RD. *Leishmania* Species: Visceral (Kala-Azar), cutaneous, and mucocutaneous leishmaniasis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed., Churchill Livingstone, Chapter 273; 2005
- 8 Bullock-Iacullo S. Detection of blood parasites. In: Isenberg HD. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, ASM Press, Washington D.C. 1992, p. 7.8.1 and 7.9.4
- 9 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.2.1-4
- 10 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Sıtmanın Mikrobiyolojik Tanısı

Hazırlayan Birim	Klinik Parazitolojik Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Parazitoloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	P-MT-06
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	4
TEKNİK BİLGİLER	5
1 Hedef mikroorganizmalar	5
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	5
3 Sıtma tanısında kullanılan teknikler	7
4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim	11
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	12
6 Referans Laboratuvar	12
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	13
KAYNAKLAR.....	13

Kapsam ve Amaç

Sıtma, *Plasmodium* türlerinin neden olduğu, tedavisiz olgularda ölümlerle sonuçlanabilen ciddi protozoal bir sistemik enfeksiyondur. Sıtma, günümüzde halen dünya nüfusunun yarısını tehdit etmekte ve her yıl yaklaşık 1 milyon kişinin ölümüne yol açmaktadır. Erken tanı konması ve hemen etkili bir tedavinin başlanabilmesi sıtmada vaka yönetiminin temelini oluşturduğu kadar, hastalık ve ölüm oranının düşürülmesinin de anahtarıdır (1,2).

Klinik bulgular temelinde tanı konulması ve tedavinin buna göre verilmesi bugün kabul edilen bir yaklaşım olmadığından, sıtmada tanı mikrobiyolojik incelemeye dayalıdır (2).

Sıtma ülkemizde bildirim zorunlu bir hastalıktır ve bir eliminasyon programı yürütülmektedir (3,4). 2000'ler boyunca vaka sayıları çok azaldığı veya hatta bazı yıllarda hiç yerli vaka rastlanmadığı için klinik laboratuvarlara örnek başvurusunun çok azalmış olduğu varsayılabilir. Vaka sayılarının düşmesinde etkili kontrol programlarının rolü olduğu düşünülmektedir, ancak, yakın tarihte dünyada da örnekleri olduğu üzere, değişik faktörlerin etkisi (iklim şartları, vektör direnci vb.) ile hastalığın yeniden sorun olarak gündeme gelme olasılığı ortadan kalkmış değildir. Sıtma, dünyada çok büyük bir nüfusu tehdit eden bir hastalık olarak, ülkemizde de halk sağlığı açısından önemini korumaktadır ve her zaman yeterli bir tanı kapasitesine ihtiyaç vardır.

Hastalığın görülüşünde azalma ile birlikte, ülkemizde sıtma tanısı koyabilen laboratuvar kapasitesinin sayıca azaldığı ve/veya bu alandaki tecrübe ve yetişmiş insan gücü bakımından olumsuz etkilendiği tahmin edilmektedir.

Sağlık Bakanlığı tarafından 2012 yılında ülke genelinde yürütülen kapasite araştırmasına göre incelenen klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının (n=510) dörtte biri sıtma için inceleme yapabildiklerini beyan etmişlerdir. Bunların ise yaklaşık %20'sinde sonucun ince yayma veya kalın damla preparatlardan sadece birine dayalı olarak verildiği anlaşılmaktadır. Bir diğer ifade ile bu laboratuvarların sıtma için *standart vaka tanımına* göre geçersiz ya da yetersiz bir tanı prosedürü kullanarak sonuç verdikleri söylenebilir (5).

Kısacası, sıtma tanısında doğru ve güvenilir sonuç için belli bir laboratuvar kapasitesinin hazırda tutulması ve/veya geliştirilmesi önemli görünmektedir.

Bu UMS'nin amacı, sıtmanın tanısı için standart işlem adımlarını tanımlamak ve klinik mikrobiyoloji ve parazitoloji laboratuvarlarına doğru ve güvenilir tanıya yardımcı bir Rehber sunmaktır.

Kısaltmalar ve Tanımlar

buffy-coat	Santrifüj edilmiş antikoagülanlı kanın eritrosit tabakası ve plazması arasında kalan ve beyaz kan hücrelerini içeren (bulutsu) katman.
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
QBC	Quantitative (kantitatif) buffy coat

Genel Bilgi

Sıtma, tüm dünyada en sık görülen paraziter enfeksiyondur. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre dünya nüfusunun yarısı sıtma riski altında olup bu hastalık nedeniyle çoğu Afrika ve Uzak Asya ülkelerinde olmak üzere yılda yaklaşık 1 milyon kişi hayatını kaybetmektedir (1,2,6).

Sıtma ülkemizde tarihi çağlardan bu yana büyük salgınlarla uygarlıkları etkilemiş ve binlerce kişinin ölümüne yol açmış bir hastalıktır. Geçtiğimiz yüzyıl boyunca da sıtma önemli bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmiş ve ciddi bir mücadele yürütülmüştür. Son yıllarda etkili olan kontrol programları sayesinde yerli olgu sayılarının ileri derecede azaltıldığı, tanı konulan sıtma olgularının ise hemen hemen tamamının ya yabancı uyruklu hastalar ya da sıtmanın endemik olduğu ülkelere çalışmaya giden, seyahat eden kişiler olduğu kaydedilmektedir (7).

İnsanlarda sıtmaya *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malaria*, *Plasmodium ovale* ve *Plasmodium falciparum* türleri neden olur. Uzakdoğu ülkelerinde gözlemlendiği üzere, *Plasmodium knowlesi* gibi bazı maymun parazitlerinin de insanlarda enfeksiyon yapabildiği son yıllarda moleküler yöntemlerle gösterilmiştir (8,9). Tüm dünyada ve ülkemizde *P. vivax* en yaygın görülen türdür. Ölümle sonuçlanan olguların büyük çoğunluğu ise *P. falciparum*'a aittir (7,8).

Sıtma *Plasmodium* cinsi tek hücreli parazitlerin neden olduğu kırmızı kan hücrelerinin bir enfeksiyonudur. Parazitler dişi anofel sivrisineğin beslenmek için sokması sonucu insan konakçıya bulaşır.

Sıtma ile enfekte kişilerde, üşüme, titreme, ateş yükselmesi ve terleme döngüsü şeklinde görülen *sıtma nöbetleri* hastalığın karakteristik özelliğidir (7,8,11). Nöbetler *P. vivax*'da 48 saatte bir, *P. falciparum*'da 72 saatte bir görülürse de *falciparum* sıtmasında genelde düzensizdir. *P. vivax* ve *P. ovale* enfeksiyonları çok daha iyi tanımlanan nöbetlerle birlikte. Çok sayıda sıtma atağı geçiren kişilerde klinik çok belirgin değildir; hatta genellikle herhangi bir bulgu ve semptom göstermezler. Sıtma bazen de diğer ateşli hastalıklar ile karıştırılabilir ve ayırıcı tanı önem kazanır (2).

Sıtma şüphesi **acil** bir durumdur ve kesin tanısı hızlı bir şekilde konulmalı, tedavisi en kısa sürede başlatılmalıdır (7). DSÖ, sıtma savaşına başlayabilmek için önce **kesin tanı** konmasını ve sıtma hastalarının bulunmasını önermektedir (2,9). Sıtmanın kesin tanısı mikrobiyolojik inceleme ile konur. Sıtmanın mikrobiyolojik tanısında tüm dünyada en yaygın kullanılan yöntem, hastanın parmak ucundan alınan kanın lama yayılıp boyanmasıyla hazırlanan preparatların mikroskopik incelemesidir; "kalın damla ve ince yayma" olarak tanımlanan bu incelemede *Plasmodium*'lar görülerek tanı konulmaktadır (1,10,11).

Sıtma tanısında hastanın periferik kan örneğinin mikroskopik incelemesi günümüzde halen 'altın standart' olarak kabul edilmektedir. Bir diğer ifade ile, boyanmış kan yaymalarının mikroskopik incelemesi ile laboratuvar tanısı, sıtmada vaka yönetimi ve epidemiyolojik çalışmalar için yaygın olarak tercih edilen ya da referans yöntem olmaya devam etmektedir (10,11).

Öte yandan, mikroskopik incelemede tanı duyarlılığı alınan örneğin ve hazırlanan yaymaların kalitesi, boyamanın kalitesi, personelin eğitimi, tecrübesi gibi pek çok faktörden etkilenebilir. Tanı duyarlılığının artırılması büyük ölçüde örneğin doğru alınmasına ve doğru bir şekilde preparat hazırlanmasına bağlıdır (1,10).

P. knowlesi ile *P. malaria* mikroskopik incelemede birbirlerinden ayırt edilemez; tanı ancak DNA dizi analizi ile mümkündür. Son yıllarda, özellikle saha çalışmalarında kullanılmak üzere sadece *Plasmodium* türlerini de ayırt edebilen hızlı tanı kitleri geliştirilmiştir. Bunların dışında serolojik testler ve PCR ile de sıtma tanısı konulması mümkündür (7,8,9,11).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizmalar

Plasmodium vivax, *Plasmodium falciparum* ve insanda enfeksiyona yol açan diğer *Plasmodium* türleri

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

Kan ve benzeri klinik örnekler ile çalışılırken **en ciddi risk** personele kan-kaynaklı patojenlerin (hepatit virüsleri, HIV) bulaşma riskidir. Kan ve serum ile çalışılırken daima **eldiven** giyilmelidir.

Bu UMS'de bahsi geçen organizmalar ile ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmeli ve daima "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi"nde belirtilen standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır.

Boyanmış olsun veya olmasın bütün lamlar **kesici-delici atık** kabul edilir ve kesinlikle kesici-delici atık kutusuna atılırlar! Diğer biyolojik kirlilerin konduğu torbalara atılmaları halinde torbayı deler ve ciddi enfeksiyöz risk oluştururlar!

Güvenlik uyarısı! Metanol yüksek düzeyde toksik ve parlayıcıdır. Eğer yutulacak olursa (herhangi bir miktarı) körlüğe ve hatta ölüme neden olabilir. Kullanım harici zamanlarda metanol şişesi kilitli bir dolapta tutulmalıdır!

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) teknikleri uygulamadan önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) tekniklere tüm yönleriyle aşina olmalı, ve (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Bu UMS'nin uygulanmasından analist; tekniklerin prosedüre uygun yapılmasını sağlamaktan ve denetimi, değerlendirilmesi ve onaylanmasından (sonucun doğru ve güvenilir olmasından) Tıbbi Mikrobiyoloji/Parazitoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, Reaktif, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

Örneklerin alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden ve ilgili diğer UMS belgelerinden edinilebilir.

Aşağıda bazı önemli noktalara tekrar dikkat çekilmektedir. Buna göre:

- Mikroskopik inceleme için periferik kan, EDTA'lı venöz kan, kemik iliği veya kanın 'buffy-coat' kısmı kullanılabilir.
- Sıtma tanısında yaygın olarak tercih edilen örnek parmak ucundan alınan kandan hazırlanan "kalın damla ve ince yayma" preparatlarıdır (periferik kan yaymaları). Mümkünse örnek deneyimli bir kişi tarafından alınmalı ya da hasta gönderilerek laboratuvar tarafından örnek alınması tercih edilmelidir.
- Venöz kan da yayma hazırlanmasında kullanılabilir. Bunun için kan örneği EDTA (0.02g/10mL kan) içeren tüpe alınır ve gönderilir. Venöz kan kullanılacaksa, kan alındıktan sonraki 1 saat içinde preparat yapılmış ve sabitlenmiş olmalıdır.
- Serolojik tanı için antikoagülan içermeyen tüplere alınmış kan örnekleri (~5 mL) tercih edilmelidir. Kan 15-20 dk bekletildikten sonra santrifüj edilir; serum kısmı steril bir tüpe ayrılır ve laboratuvara gönderilir.
- Moleküler teknikler için EDTA'lı tüplerde tam kan/kapiller kan/buffy-coat; biyopsi veya aspirasyon sıvısı örnekleri; boyanmamış preparatlar, filtre kağıdına emdirilmiş tam kan/kapiller kan kullanılabilir.
- Tüm örnekler antiparaziter tedaviye başlamadan önce alınmalıdır.

Besiyeri / Reaktif

- Giemsa boyası reaktifleri ve donanımı (bkz. UMS, P-TP-06).
- Metanol, saf (%100'lük; aseton içermeyen) – Nem (su) çekmesini önlemek için metanol ağzı sıkıca kapalı bir şişede saklanmalıdır!
- Hızlı tanı testi (immünokromatografik temelde 'dipstick test') – *P.falciparum* veya diğer türler için çeşitli kitler piyasada mevcuttur.
- Floresan boyama için akridin-oranj veya QBC kapiller tüpleri
- ELISA veya IFA kitleri – Serolojik inceleme veya araştırmalar için kullanılabilir; piyasada mevcuttur veya laboratuvarda da hazırlanabilir.

Diğer gereç, donanım

Mikroskopik inceleme için;

- Mikroskop, binoküler (rutin) – 10× düşük, 40× yüksek kuru, 100× immersiyon objektifleri ve 10× oküleri olan mikroskop tercih edilir (12).
- Floresan mikroskop – opsiyonel; akridin-oranj boyalı mikroskopi için.
NOT: Mikroskoplarda okülerler 10× olmalıdır!
- Yaymaları hazırlamak için gerekli gereç, donanım (Lanset, lamlar, vb.)
- Giemsa boyama için gerekli gereç, donanım
- Santrifüj (tercihen soğutmalı) veya hematokrit santrifüjü
- Kesici-delici atık kabı

Seroloji için;

- ELISA yıkayıcı, ELISA okuyucu
- Ayarlanabilir otomatik mikropipetler (5-1000 µL) ve pipet uçları
- Laboratuvar saati

PCR ve diğer moleküler testler için;

- En az üç ayrı oda - Nükleik asit ekstraksiyonu, PCR karışımı hazırlama, amplifikasyon ve sonuç gözetimi için ayrı odalar. İdeal olarak PCR karışımı hazırlama odası (temiz) pozitif basınçlı, agaroz jel elektroforezi yapılan oda (kirli) negatif basınçlı havalandırmaya sahip olmalıdır.
- Donanım – BGK, soğutmalı mikrosantrifüj, hassas terazi, vorteks, su banyosu, PCR ısı döngü cihazı (gerçek zamanlı veya geleneksel), mikrodalga fırın, jel görüntüleme sistemi, elektroforez ünitesi vb

2.4. Kalite kontrol

- Yaymaların düzgün olarak hazırlanması tanının doğru ve güvenilir olması için son derece önemlidir. Bu nedenle yaymalar hazırlanırken azami özen gösterilmelidir.
- Lamların önceden temizlenmiş olması yayma kalitesini etkilemektedir.
- Hazırlanan preparat arkasından gazete kağıdı okunabilecek kalınlıkta olmalıdır.
- Boyama için kullanılacak Giemsa solüsyonu, her boyama için stok solüsyondan hazırlanmalı ve 1 saat içinde boyama yapılmalıdır.
- Mikroskop belirli aralıklarla (yoğun kullanılıyorsa yılda en az bir kez) kalibre edilmelidir. Mikroskoba herhangi bir parça eklenmesi veya değiştirilmesi durumunda da kalibrasyon yapılmalıdır. Kalibrasyon için kullanılmış optikler mikroskobun üzerinde olmalıdır. Tüm objektifler için kalibrasyon faktörleri göz önündeki bir panoda asılı olmalıdır (*bkz. UMS, P-TP-01 Mikroskop Kalibrasyonu*).
- Kullanılan reaktif/kitlerin (moleküler testler dahil) son kullanma tarihlerine ve saklama koşullarına dikkat edilmelidir. Kontrol örnekleri kullanılarak malzemelerin etkinliği değerlendirilmelidir.
- Boyama sonuçlarının uygunluğundan emin olmak için, saklanmış pozitif örnekler veya referans suşlar teste dahil edilmelidir.
- Bütün solüsyonlar en az haftada bir kontrol edilmeli, bulanıklık ya da kontaminasyon bulgusu olan solüsyonlar değiştirilmelidir.
- Tüm donanımın bakım ve kalibrasyonu yapılmış olmalıdır.
- Tüm kalite kontrol sonuçları kaydedilmelidir.

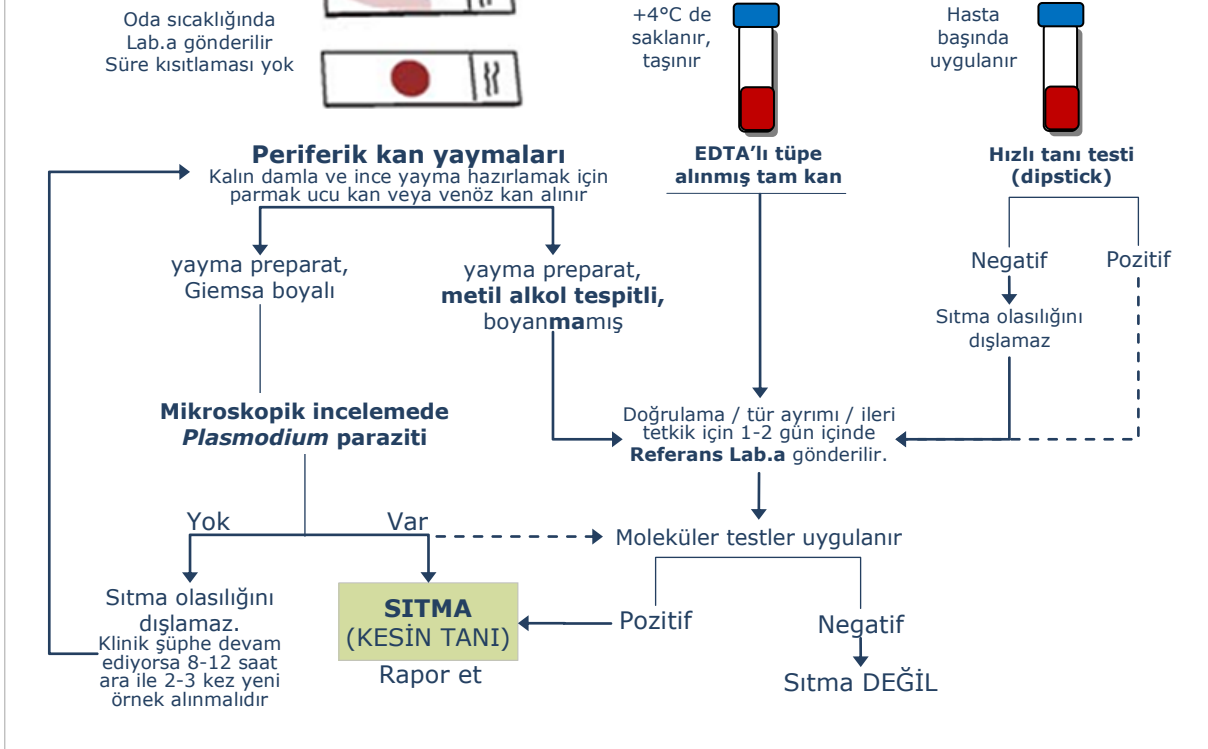
3 Sıtma tanısında kullanılan teknikler

3.1. Tanı akış şeması

- Sıtmanın tanısında mikroskopik inceleme, hızlı tanı testleri, seroloji ve moleküler yöntemler (PCR) kullanılabilir. En yaygın ve referans tanı yöntemi periferik kan yaymalarının Giemsa boyalı mikroskopisidir.
- Sıtmanın tanısında kullanılacak örnekler ve tanı adımları için bir akış şeması Şekil 1’de özetlenmiştir.

SITMA ŞÜPHELİ VAKA

- Ateş, üşüme-titrete, terleme,
- Anemi, splenomegali, trombositopeni
- Endemik bölgede yaşama veya seyahat
- Uygulanan farklı tedavilere rağmen bulguların devamı veya kötüleşmesi



Şekil 1. Sıtma şüpheli bir vakanın tanısında kullanılabilir yöntemler için akış şeması

3.2. Mikroskopi

- En yaygın kullanılan yöntem "kalın damla ve ince yayma" preparatların Giemsa ile boyanması ve mikroskopik olarak incelenmesidir; referans yöntem olarak kabul edilmektedir.
- Kalın damla ve ince yayma preparatların hazırlanması ve bunların Giemsa ile boyanması ilgili UMS belgelerinde ayrıntılarıyla ele alınmıştır (bkz. sırasıyla, UMS, P-TP-07 ve P-TP-06).
- Kalın damla incelemesi organizmanın saptanmasında kayda değer miktarda (~10 µL) örnek incelemesine imkan veren bir tekniktir ve 'altın standart' olarak tanımlanmaktadır. Kalın damla preparatında, Giemsa ile boyanırken eritrositlerin hipoozmotik lizise uğratılması ile parazitler serbestleştirilmekte; kan hücreleri artıklarından oluşan zeminde boyanmış parazitler ayırt edilmektedir. Bir ×1000 büyütme alanında, ince yaymaya göre en az 20 kat örneğin değerlendirilmesi mümkün olmaktadır (13).
- Her ne kadar artık eritrosit içinde konumlanmadığından kalın damlada parazitleri tanımak daha fazla eğitim ve tecrübe gerektiriyor olsa da kalın damlanın duyarlılığı ince yaymadan daha yüksektir.

- Tür tayininde ise ince yayma altın standarttır. Kalın damlada da parazitin türü ayırt edilebilir ancak kalın damladan türün anlaşılamadığı durumlarda ince yaymanın kesinlikle incelenmesi gerekir.
- Kalın damla ve ince yayma en yaygın olarak parmak ucundan alınan (periferik) kan ile hazırlanmaktadır. Kan örneğinin yoğunlaştırılması, böylece parazit yoğunluğunun artırılması ve mikroskopi duyarlılığının yükseltilmesi mümkündür ve bu amaçla konsantrasyon teknikleri geliştirilmiştir (7,8,9,11). Uygulamada aşağıdaki teknikler kullanılabilir:
 - (a) Bir antikoagülanlı (heparinize) tüp içine alınmış kan santrifüj edildiğinde olgun trofozoitler, şizont, gametositler kanın 'buffy-coat' olarak tanımlanan katmanında toplanırlar. Bu katmandan Pastör pipeti yardımıyla alınan örnekten yapılan yaymalar Giemsa ile boyanır ve mikroskopta incelenir. Yöntem özellikle *P. vivax*, *P. malariae* veya *P. ovale* tanısında çok düşük parazitelerde yararlıdır ancak *P. falciparum* için yararlı değildir.
 - (b) Yöntem heparinize kapiller tüp içine alınmış kana da uygulanabilir. Ancak kapiller tüpteki 'buffy-coat' katmanından yayma yapabilmek için tüpün o hizadan kırılması ve katmanın lam üzerine aktarılması gerekmektedir. Kesici-delici yaralanması olasılığı yüksek olduğu için (laboratuvar güvenliği gereğiyle) daha az tercih edilir.
- Quantitative Buffy Coat (QBC®; Becton Dickinson) yöntemi olarak tanımlanan uygulamada ise, kan örnekleri **akridin-oranj** ve antikoagülan içeren özel bir tüpe alınıp hematokrit santrifüjünde çevrilir. Santrifüj sonrası, tüp özel bir tutucuya yerleştirilerek floresan mikroskopta veya floresan özelliği eklenmiş ışık mikroskobunda incelenir. Sıtma etkenleri tüpteki granülosit tabakasının altında birikir. QBC yönteminin sıtma etkenlerinin saptanmasında duyarlılığının yüksek olduğu belirtilmektedir (7,9,13).
- Periferik kandan hazırlanmış yaymalar da akridin-oranj ile doğrudan boyanarak floresan mikroskopta incelenebilirler (13).

3.3. Hızlı tanı testleri

- Sıtma tanısı için kandaki parazit antijenlerinin saptanmasına yönelik immuno-kromatografik temele dayalı çalışan hızlı tanı kitleri de geliştirilmiştir. Piyasada *P. falciparum* ve diğer türler için geliştirilmiş çeşitli kitler mevcuttur (9,13).
- Endemik bölgelerde, özellikle laboratuvar imkanlarının olmadığı saha şartlarında hızlı tanı kitlerinden yararlanılmaktadır.
- Bu kitlerin çoğunda, kan örneğindeki sıtma antijenlerini saptayan monoklonal antikorlar kullanılır.
- Histidinden zengin protein II (histidine-rich protein II; HRP-II), parazit laktat dehidrogenaz (pLDH) veya her iki antijeni birden saptayabilen testler mevcuttur.
- Bu testler 15 dk içinde sonuçlanır ve deneyimli personel gerektirmez, ancak duyarlılıkları paraziteminin düşük olduğu enfeksiyonlarda zayıf olduğundan sonuçların bir başka yöntemle doğrulanarak değerlendirilmesi önerilmektedir (Şekil 1) (7,9,13).

3.4. Seroloji

- Rutin tanıda tercih edilmemekle birlikte, sıtmanın serolojik yöntemlerle tanısı da mümkündür ve özellikle transfüzyona bağlı sıtma incelemesi ve geriye dönük bilimsel araştırmalarda veya epidemiyolojik saha çalışmalarında yararlanılmaktadır (13).
- Serolojik testlerden IFA ve ELISA en çok tercih edilenlerdir. Bu testlerin pozitif bulunması kişinin enfeksiyonunun eski ya da yeni bir enfeksiyon olup olmadığını ayırt edememektedir (6,8,11).

3.5. Moleküler yöntemler (PCR)

- Sıtma tanısında PCR yöntemi son yıllarda yaygın olarak kullanılmakta, PCR ile sadece enfeksiyonun tanısı değil, etken parazitin türünün saptanması da mümkün olmaktadır (6,11,13).
- PCR için, antiparaziter tedavi başlamadan önce EDTA'lı tüpe alınmış venöz kan kullanılır. Filtre kağıdına (Whatman, 3M vb.) damlatılmış parmak ucu veya tam kan örneği de PCR için referans laboratuvara gönderilebilir.
NOT: Filtre kağıdına EDTA'lı kan alınmaz!
- Boyanmış kan yaymalarının incelenmesinde tür tayini yapılamadığı durumlarda da, PCR yöntemi tercih edilmektedir (Şekil 1).
- Moleküler yöntemlerde hedef, venöz kandan veya filtre kağıdına emdirilmiş kan örneğinden DNA ekstraksiyonu, geleneksel ya da gerçek zamanlı PCR ile sıtma tanısının konulması ve sonraki basamakta *Plasmodium* tür tayininin yapılmasıdır. Çoklu (multipleks) PCR yöntemi ile aynı anda birden fazla *Plasmodium* türünün saptanması mümkündür. PCR yöntemi sadece tanı için değil hastaya uygulanan tedaviye yanıtın izlenmesinde ve direncin saptanmasında değerlidir (7,13).
- PCR yöntemi tür tayininin yanı sıra tedaviye yanıtın izlenmesinde ve direncin saptanmasında değerlidir. Küçük alt-ünite 18S rRNA ve sirkumsporozoit genler *Plasmodium* türlerinin ayırımında en çok kullanılır. Büyük alt-ünite rRNA geni daha çok cinse özgü bölge olarak uygundur.
- PCR son derece duyarlı bir tanı yöntemidir; mikrolitrede sadece 4 parazit olduğunda dahi tanı konulabilmektedir ki bu, %0.0015 parazitemiye karşılık gelmektedir. Donmuş örneklerin 3 yıla kadar çoğaltılıp PCR ile tanımlanması mümkün olabilmektedir (6,).

3.6. Saklama, Referans merkeze gönderme

- Hazırlanan yaymalar havada kurutulup, saf metanol ile tespit edildikten sonra boyalı ya da boyasız olarak oda sıcaklığında bir süre (ör., taşıma süresince, birkaç gün) saklanabilirler veya ileri testler için referans laboratuvara gönderilebilirler (ayrıntılı bilgi için bkz. UMS, P-TP-07).
- Sıtma, ülkemizde neredeyse elimine edildiği için tanıda belirsizlik veya şüphede kalınan her durumun mutlaka Referans laboratuvar tarafından doğrulanması gerekir (iletişim için bkz. "6 Referans Laboratuvar").

- Örnekler başka bir şehirdeki laboratuvara veya Referans laboratuvara gönderilecekse, *paketlenme* ve *taşıma* biyolojik materyal taşıma düzenlemelerine uygun olmalıdır (14). Buna göre; sabitlenmiş kan yaymaları ve filtre kağıdına emdirilmiş örneklerin "Muaf" şeklinde, tüpte kan ve diğer klinik örneklerin de "Biyolojik madde, Kategori B" şeklinde sınıflanmış olduklarına dikkat edilmeli ve paketlenme şartları bu kategoriler için önerildiği gibi yerine getirilmelidir. Kategorilerin her biri için gerekli açıklamalar "UMS GEN-ÖY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi"nde verilmiş olup incelenmesi önerilir.

4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim

4.1. Mikroskopi sonuçları

- Örnek yaymaları aynı gün içinde incelenip raporlanmalıdır.
- Giemsa boyanmış yaymalarda *Plasmodium* spp formlarının saptanması ile **kesin tanı** konur; raporda mümkünse tür adı ve saptanan parazit formları belirtilir. Örneğin;
"Plasmodium vivax genç trofozoitleri ve gametositleri görüldü".
- Giemsa boyalı yaymaların mikroskopik incelemesinde parazitin görülmemesi **sıtma olasılığını dışlamaz**. Klinik şüphe devam ediyorsa 8-12 saat ara ile 2-3 kez yeni örnek alınıp gönderilmelidir!

4.2. Diğer test sonuçları

- Hızlı tanı testi ile pozitif sonuç, tanıyı destekler; ancak doğrulama için diğer inceleme yöntemlerine başvurulması gerektiği raporda belirtilmelidir.
- *Plasmodium* spp'ye ait DNA'nın gösterilmesi "kesin tanı" bulgusudur.
NOT: "Standart Vaka Tanımı"nda PCR yer almamasına rağmen, hem hızlı, hem de duyarlılığı yüksek bir yöntem olması nedeniyle kesin tanı için uygun bir seçenek olarak kabul edilmektedir.
- *Plasmodium* türleri arasındaki çapraz reaksiyonlar nedeniyle enfekte eden türün ayırt edilmesine izin vermediği için ve antikörlerin varlığı akut enfeksiyondan ziyade eski enfeksiyonu gösterdiği için seroloji sıtmanın klinik tanısında önerilmemektedir. Transfüzyon sıtmasının araştırılmasında, potansiyel donörlerin hangilerinin transfüzyona bağlı sıtma olgusundan sorumlu olabileceğinin saptanmasında ve epidemiyolojik çalışmalarda toplumda sıtma ile karşılaşma sıklığının belirlenmesinde serolojiden yararlanılır (13)

4.3. Bildirim

- Sıtma bildirimi zorunlu bir hastalıktır ve bir salgınla ilişkili olabilir. Tanı konması halinde olguların kayıt ve bildirimi için Sağlık Bakanlığının "Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi" izlenmelidir (3,4).

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Parazit mikroskopisi tanıda en öncelikle tercih edilen bir teknik olmakla birlikte, parazit formlarını iyi tanıyabilen iyi yetişmiş laboratuvar personeli gerektirmektedir. Ülkemizde vaka sayılarının son yıllarda belirgin azalmış olması laboratuvarları bu alandaki tecrübe ve yetişmiş insan gücü bakımından olumsuz etkilemiştir.
- Sıtmanın mikroskobik tanısında ince yayma preparatların incelenmesi sıtma parazitin türü ve yaşamsal evresi (genç trofozoit, gametosit vb.) hakkında bilgi verilebilir, ancak sınırlı bir miktar örnekte tarama yapılabilmesi bir dezavantajdır.
- Kalın damla preparatta incelenebilen örnek miktarı ise ince yaymaya göre hayli yüksektir ve parazit yakalama şansı yükselir; ancak kalın damlada da parazitin türü ayırt edilemeyebilir.
- Hızlı tanı kitleri düşük parazitemili olgularda yanlış-negatif sonuç verebilmektedir.
- Sıtma tanısı için seroloji yaygın kullanılmamaktadır. Sonucun pozitif olması yeni enfeksiyonu göstermeyebilir; eski enfeksiyonda da pozitiflik saptanabilir.
- PCR ile tanı için kan örneğinin uygun koşullarda saklanması ve EDTA ile mümkün olduğunca kısa süre beraber tutulması son derece önemlidir. Kontaminasyon riskinin yüksek oluşu nedeniyle 'nested' PCR yöntemi hatalı sonuç verebilir.

6 Referans Laboratuvar

Adres

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal Parazitoloji Referans Merkez Laboratuvarı
"Ulusal Sıtma Referans Laboratuvarı"
Refik Saydam Yerleşkesi,
Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55,
06100 - Sıhhiye/ANKARA

Tel: 0 312 565 5571

e-posta: parazitoloji@thsk.gov.tr

www.thsk.gov.tr

Görev çerçevesi

Kontrol programı kapsamında klinik örneklerden tanı, doğrulama veya moleküler tiplendirmelerin yapılması; surveyans çalışmaları yürütülmesi; bölgesel/yerel laboratuvarlara dış kalite örneklerinin hazırlanması; kalite kontrol programının yürütülmesi.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Sıtmanın Mikrobiyolojik Tanısı) ayrıca aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve ilave bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

UMS, P-ÖY-03	Kan ve kemik iliği örneklerinin parazitolojik incelemesi
UMS, P-TP-01	Mikroskop kalibrasyonu (oküler mikrometre ile)
UMS, P-TP-06	Giemsa boyama
UMS, P-TP-07	Kalın damla ve ince yayma
UMS, GEN-OY-01	Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 WHO. Malaria microscopy quality assurance manual. Version 1. February 2009.
- 2 WHO. Guidelines for the treatment of malaria. Global Malaria Programme, Switzerland. WHO/HTM/MAL/2006.1108, 2006.
- 3 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 4 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 5 T.C. Sağlık Bakanlığı (Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi TR0802.16-01 Avrupa Birliği ve Dünya Bankası desteği ile) (Akbaş E, Pr Danışmanı). Türkiye’de Bulaşıcı Hastalıkların Tanısında Mikrobiyoloji Laboratuvar Kapasitesi Mevcut Durum Değerlendirmesi: Anket - LabKap2012. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kuşadası, 4 Kasım 2012.
- 6 WHO. New Perspectives Malaria Diagnosis. WHO/CDS/RBM/2000.14
- 7 Özcel MA. Sıtma. In: Özcel MA, Özbel Y, Ak M. *Özcel’in Tıbbi Parazit Hastalıkları*. 1. baskı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, İzmir. 2007, p. 79-134
- 8 Özbilgin A, Östan İ, Kurt Ö, Balcioğlu C. Kan İncelemeleri. In: Ok ÜZ, Korkmaz M (eds). *Parazitolojide Laboratuvar*. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, İzmir. 2011, p. 63-79.
- 9 Ergüven S. A-16 Sıtma. Bildirimi Zorunlu Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısına Yönelik Standart Uygulama Prosedürleri. Laboratuvar Eğitim Kitabı. Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Ankara. 2008, p. 5-20
- 10 WHO. Basic Malaria Microscopy Part I. Learner’s Guide. Second edition, Switzerland, 2010.
http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547826_eng.pdf (son erişim tarihi:18.12.2013)
- 11 CDC. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Malaria.htm> (son erişim tarihi:18.12.2013)
- 12 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.2.1 - 4
- 13 Rogers WO. *Plasmodium and Babesia*. In: Versalovic J (ed in chief). *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 2091-2112
- 14 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Ekinokokkozun

(*Echinococcus granulosus* ve *Echinococcus multilocularis*)

Mikrobiyolojik Tanısı

Hazırlayan Birim	Klinik Parazitoloji Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Parazitoloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	P-MT-07
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
Epidemiyoloji ve hastalığın önemi.....	3
Klinik görünüşleri	4
Laboratuvar tanısı.....	5
TEKNİK BİLGİLER	6
1 Hedef mikroorganizmalar	6
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	6
3 Ekinokokkoz tanısında kullanılan teknikler	8
4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim	12
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	12
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	13
KAYNAKLAR.....	13

Kapsam ve Amaç

İnsanlar köpek ve benzeri türlerin tenyası olan *Echinococcus* spp ile enfekte olduklarında, parazit vücutta kist oluşumları ile seyreden ve ekinokokkoz adı verilen hastalık tablolarına neden olabilirler. Başlıca iki şekli görülür: *Echinococcus granulosus*'un neden olduğu **hidatik** veya uniloküler kist hastalığı (kistik ekinokokkoz); ve *Echinococcus multilocularis*'in neden olduğu **alveoler** kist hastalığı (alveoler ekinokokkozis) (1,2).

Kistik ekinokokkoz *E. granulosus*'un larva formunun neden olduğu dünyada yaygın görülen bir zoonozdur. Hidatidoz, kist hidatik, hidatik kist hastalığı gibi adlarla da anılmaktadır. Ülkemizde bildiri zorunlu hastalıklar arasında yer alan ve sürveyans kapsamında izlenen bir enfeksiyondur (3).

Hastalığın tanısı esasen görüntüleme yöntemlerine dayanmaktadır. Ancak serolojik yöntemlerle tanının desteklenmesine gereksinim duyulabilir. Bazı durumlarda da kist sıvısı aspiratlarından direkt tanıya gidilmesi gerekebilir.

Bu UMS'nin amacı, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarına ekinokokkozun tanısında kullanılan laboratuvar yöntemlerini ve bulguların yorumlanmasını kapsayan standart bir tanı yaklaşımı için bir rehber sunmaktır.

Kısaltmalar ve Tanımlar

- KE** Kistik ekinokokkoz
AE Alveoler ekinokokkoz
WB Western blot

Genel Bilgi

Epidemiyoloji ve hastalığın önemi

Kistik ekinokokkoz tüm dünyada yaygın olarak görülen bir zoonozdur. Ülkemizde Doğu Anadolu Bölgesi'nde daha sık olmak üzere tüm bölgelerimizde yaygın olarak görülmektedir. Etken *E. granulosus*, erişkin formu köpek ve köpekgillerin bağırsağında yaşayan bir cüce tenyadır (sestod) ve özellikle hayvancılıkla uğraşan bölgelerde evcil köpekler arasında sıktır. Bir köpeğin bağırsağında binlerce tenya oluşur ve bunlar büyük miktarlarda yumurta üretirler. Doğaya saçılan yumurtalar insanlar (özellikle çocuklar) dahil pek çok ara konak memeli türü (koyun, siğir, domuz, kemirgenler ve diğer otçul hayvanlar) tarafından alınırlar. İnsanlara kontamine eller veya gıdalarla ağız yoluyla bulaşır (4,5).

Başta karaciğer olmak üzere vücuttaki değişik organ ve dokulara yerleşen larvalar yavaş büyüyen kistler oluştururlar ve buldukları yere göre değişen semptomlara, nadiren ölüme neden olurlar (4,5). Kistik ekinokokkoz (KE) bir enfeksiyon hastalığı olmasına rağmen, tedavide ilk seçeneğin cerrahi yöntemler olması ciddi iş gücü kayıplarına sebep olmaktadır (5).

E. granulosus insanda enfeksiyon oluşturan en önemli türdür ve özellikle hayvancılıkla uğraşan ülkelerde, Orta-Doğu, Akdeniz'i çevreleyen ülkeler, bazı Sahra-altı ülkeleri, Rusya, Çin, Orta ve Güney Amerika'da yaygın görülmektedir. *E. granulosus*'un farklı kökenleri tanımlanmıştır ve bunlar özellikle insanda enfeksiyözite bakımından farklılık gösterirler. İnsan enfeksiyonu için en önemli kökenlerin koyun (G1) ve sığır (G5) ara konak suşları olduğu gözlenmiştir (6).

E. multilocularis (Avrupa'nın kuzey ormanlık alanlarında, Asya ve Kuzey Amerika ile Arktik bölgelerde) ve *E. vogeli* (Güney Amerika'nın dağlık bölgelerinde) enfeksiyonları vahşi köpekgiller aracılığı ile yayılır ve oldukça az görülürler (1,2).

Klinik görünüşleri

E. granulosus'un yumurtaları ağız yoluyla alınıp bağırsaklara ulaştığında açılırlar ve oluşan onkosferler mukozalara tutunup dolaşıma girerler. Onkosferler konağın iç organlarında olgun larvaları içeren bir kist oluştururlar. Kist berrak bir sıvı ile (kaya suyu tarzında) dolu olup kalın bir kapsüle sahiptir ve çok sayıda (bazen binlerce) protoskoleks içerir (1,2). Tek odacıklı (uniloküler) olan kistler çok yavaş büyürler (7).

Hidatik kist en sık karaciğerde (vakaların %50-70'inde) veya akciğerde (%20-30) yerleşim gösterir. Fakat hayli düşük sıklıkla da olsa (<%10) vücutta diğer herhangi bir organı da tutabilir.

Enfeksiyon çoğu zaman vakalarda semptomlar gelişmemişken, görüntüleme teknikleri kullanıldığında tesadüfen saptanır. Eğer semptomlar gelişmiş ise klinik belirtiler yerleştiği organ ve dokuya göre değişir ve bunlar genellikle kitle etkisine bağlı semptomlardır. En sık yerleştiği iki organa (karaciğer ve akciğer) göre belirti ve bulguları sağ üst kadranda ağrı, hepatomegali, öksürük ve hemoptizi olarak sayılabilir. Eğer kist safra yoluna veya bronşlara penetre olursa kist içeriği lümene boşalır ve tıkanıklıklara ya da tıkanıklık kaynaklı bakteriyel enfeksiyonlara neden olabilirler. Kistin delinmesi veya yırtılması (<%10 vakada) ise parazit antijenlerine bağlı anafilaksi ile seyredabilen ağır alerjik reaksiyonlara veya kız kistlerin yeni bölgelerde çok sayıda yeni kist meydana getirmelerine yol açabilir ki bunlar kist hidatiğin ölümlü sonuçlanabilen en ciddi komplikasyonlarıdır (1,2).

KE yaş ve cinsiyet ayrımı gözetmemesine rağmen 30-50 yaş aralığında ve kadınlarda daha siktir (8).

E. multilocularis'in neden olduğu alveoler ekinokokkoz (AE) ise agresif bir patolojidir. *E. multilocularis* kistleri organ içinde yanal tomurcuklanma ile çoğalırlar. Tümöre benzer şekilde komşu dokulara doğru yavaş, yavaş yayılma gösterirken, vücudun uzak bölümlerine de "metastaz" yapabilirler (1,3).

Semptomlar tutulan organa göre (ki en sık karaciğerdir) olmak üzere yavaş yavaş gelişir. Başlıca komplikasyonları safra yolu hastalığı, portal hipertansiyon ve Budd-Chiari sendromudur. Enfeksiyonun komplikasyonlarını önlemek için semptomatik kistlerin tedavi edilmesi ve asemptomatik kistlerin yıllarca dikkatli bir şekilde izlenmesi gerekir (1,3).

Albendazol ile medikal tedavi başarılarının halen sınırlı kaldığı hastalıkta cerrahi yaklaşımlar yüz güldürücüdür. Lokalizasyonu dolayısıyla ulaşılması mümkün olan lezyonlarda Ponksiyon Aspirasyon İnjektasyon Reaspirasyon (PAIR) uygulamaları da son derece başarılıdır (9).

Laboratuvar tanısı

Hastalığın tanısında görüntüleme yöntemleri (ultrasonografi, bilgisayarlı tomografi vb.) oldukça başarılıdır ve tanı esasen görüntüleme tekniklerinin kullanımına dayanır. Ancak kimi zaman görüntüleme ile elde edilen bulgular belirsizlik arz eder ve enfeksiyon yönünden şüpheli durumun aydınlatılması gerekir. Böyle durumlarda doğrulama için serolojik yöntemlerin kullanımı önem kazanmaktadır.

Serolojik tanı genellikle IHA ya da ELISA gibi bir tarama amaçlı testi takiben -bu test eğer pozitif ise- doğrulayıcı olarak 'Western blot' testinin kullanılması ile konur (7,10). Serolojik testlerin duyarlılığı vakanın özelliklerine göre değişmektedir; karaciğer kistlerinde duyarlılık %80 ile %100 arasında ve özgüllük %88 ile %96 arasında değişirken, akciğer enfeksiyonlarında (%50-56) ya da diğer organ tutulumlarında (%25-56) daha düşüktür. Sistiserkoz ile yanlış pozitif reaksiyonlar gözlenebilir (1,2).

AE tanısında serolojik testler kistik ekinokokkoza göre daha güvenilirdir. Saflaştırılmış *E.multilocularis* antijenleri ile duyarlılık %91-100 ve özgüllük %98-100'dür. Bu antijenler %95 güvenilirlik ile alveoler ve kistik formlar arasında ayırma izin verir (6).

Son yıllarda geliştirilmiş 'dipstick' testleri de kistik ekinokokkozun serolojik tanısında önemli bir gelişme olarak görülmektedir. Özel ekipman gerektirmeyen, uygulaması çok kolay ve 15 dakika içinde görsel olarak değerlendirilebilen, üstelik yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe (duyarlılık %100 ve özgüllük %91.4) sahip bu testler, kistik ekinokokkozun tanısında klinik laboratuvarlarda kullanım için kabul edilebilir bir alternatif olacak gibi gözükmemektedir (11).

Benzer şekilde, hidatik kist sıvısı ekstratlarından ham ve kısmen saflaştırılmış dört nativ antijen kullanılarak, insan KE ve AE serolojik tanısında bir yeni, hızlı 'dot immunogold filtration assay' (DIGFA) geliştirilmektedir. Benzer şekilde basitçe 3 dakikada gelişen renk değişikliğinin değerlendirilmesine dayanır ve KE tanısında %80.7, AE tanısında %92.9 duyarlılığa ulaştığı rapor edilmiştir (11). Bu hızlı testler KE ve AE için endemik alanlarda kitle taramalarında da ultrason ile birlikte kullanışlı olabilirler.

Tanı amacıyla protoskoleksleri görmek için kistten ponksiyon (iğne aspirasyonu) ile sıvı alınması anafilaktik reaksiyon, sekonder ekinokokkoz gibi ciddi komplikasyon olasılığı yüzünden tavsiye edilmez. Ancak, aspirasyon sitolojisi görüntüleme yöntemlerinin ve serolojinin yeterli tanısal destek sağlamadığı akciğer, böbrek ve diğer karaciğer dışı lezyonların saptanmasında özellikle yararlı gibi görünmektedir. Aspire protoskolekslerin canlılığı mikroskopik olarak alev hücre aktivitesi ve tripan mavisi alma durumuna bakılarak değerlendirilebilir (3).

Serolojik testler tanıda çok yararlı olabilirler ve invaziv metotlardan önce kullanılmalıdırlar. Bununla birlikte, diğer helmint enfeksiyonları, kanser ve kronik bağışıklık sistemi bozuklukları gibi parazite ve hastaya ilişkin faktörler yanlış pozitif sonuç olasılığı bakımından dikkate alınmalıdır. Bazı kist taşıyıcılarında tespit edilebilir antikorlar bulunmayabileceği için negatif test sonuçları da ekinokokkoz olasılığını dışlamamaktadır (6,11).

Hastada saptanabilir antikor olup olmaması, larval kistin fiziksel konumuna, bütünlüğüne ve canlılığına bağlıdır.

Karaciğer kistlerinde antikor yanıtının ortaya çıkması akciğer yerleşimli kistlere göre daha olasıdır ve kistin yerleşiminden bağımsız olarak bir 'intact' hyalin kisti olan hastalarda antikor saptayan yöntemler en az duyarlıdır.

Akciğer, beyin ve dalaktaki kistler düşük serodiagnostik reaktivite ile ilişkili iken kemikteki kistlerin daha düzenli olarak tespit edilebilir düzeylerde antikorları stimüle ettiği görülür (11).

Eğer kistin bütünlüğü bozulursa (kistin delinmesi, yırtılması) bu olayı antikorların bir ani uyarımı takip eder. Yaşlanmış, kalsifiye veya ölü kistleri olan hastalar ise genellikle seronegatiflerdir (12).

Serolojik tanıda en iyi yaklaşım testlerin kombine kullanılmasıdır; örneklerin önce ELISA veya IHA ile test edilmesini ve sonra pozitif bulunanların bir immüno blot veya jel difüzyon testi ile teyit edilmesini kapsar. Bu doğrulayıcı testlerin de nörosistiserkozda %5-25 oranında yanlış pozitif sonuç verme olasılığı varsa da, klinik ve epidemiyolojik görünüşleri ile nörosistiserkoz vakalarının KE ile nadiren karışabileceği kabul edilmektedir (12).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizmalar

Echinococcus granulosus, *Echinococcus multilocularis* (ve insanda hastalık etkeni olabilen diğer *Echinococcus spp*)

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

Potansiyel enfeksiyöz organizmalar içerebileceği için parazitolojik tanı örnekleri asgari BGD2 laboratuvar şartlarında incelenmeli ve daima "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi"nde belirtilen standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır.

Serolojik çalışmalar sırasında en ciddi risk kan-kaynaklı patojenlerin (özellikle HIV ve hepatit etkenleri) bulaşması riskidir. Serum ayırma vb. işlemler yapılırken daima **eldiven** giyilmelidir.

Lamlar, boyanmış olsun olmasın, **kesici-delici atık** kabul edilir ve kesinlikle kesici-delici atık kutusuna atılırlar! Diğer biyolojik kirlilerin bulunduğu torbalara atılmaları halinde torbayı deler ve ciddi enfeksiyöz risk oluştururlar!

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) tekniklerin uygulanmasından önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) tekniğe tüm yönleriyle aşina olmalı, ve (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Bu UMS'nin uygulanmasından analist; tekniklerin prosedüre uygun yapılmasını sağlamaktan ve denetimi, değerlendirilmesi ve onaylanmasından (sonucun doğru ve güvenilir olmasından) Tıbbi Mikrobiyoloji/Parazitoloji Uzmanı sorumludur.

İnvaziv teknik kullanılarak alınmış örnekler en kısa sürede ve **mutlaka** Tıbbi Mikrobiyoloji / Tıbbi Parazitoloji Uzmanı tarafından bizzat incelenmeli, değerlendirilmeli ve sonuçlandırılmalıdır.

2.3. Örnek, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

Örneklerin alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden edinilebilir. Aşağıda bazı önemli noktalara tekrar dikkat çekilmektedir. Buna göre:

- Serum – ekinokokkozun laboratuvar tanısında seroloji ön plandadır. Kronik bir enfeksiyon olduğu için serumun ne zaman alındığının önemi yoktur. Operasyon sonrası nüks takibi için serolojik inceleme yapılacak ise; ilk iki yıl süresince en az altı ayda bir, sonraki üç yıl ise yılda bir serum alınıp test edilmelidir.
- Kist aspirasyon sıvısı – endikasyon varsa aseptik koşullarda klinisyen tarafından alınır. 3-4 mL örnek yeterlidir.
- Operasyon ile çıkarılmış kist - incelenmek üzere patolojiye gönderilir.
- Doku örnekleri asla formol içermemelidir! Asla dondurulmaz!
NOT 1: Mikroskopi için taze preparat; histoloji için fikse edilmiş preparat; PCR için taze, donmuş ya da etanol ile fikse edilmiş örnek olmasına dikkat edilmelidir.
NOT 2: Klinisyen örneklerin hangi fiksatifle gönderilmesi gerektiği konusunda laboratuvarla iletişime geçmelidir.
- Balgam - tanıda öncelikli bir inceleme örneği değildir. Pulmoner kist rüptürü olmuş ise hemen rüptürü takiben balgam örneği alınmalıdır. Kist sıvısı ve membranlarını içeren değerli bir materyaldir.

Reaktif / Kit

- Serolojik inceleme için piyasada özgül antikoların saptanmasına yönelik IHA, ELISA, IFA veya Western Blot kitleri mevcuttur.
- Mikroskopik inceleme için; %5-10 formol, Streptokinaz veya sputolizin, %10'luk KOH
- Moleküler yöntemler – Piyasadan hazır temin edilebilen DNA izolasyon ve PCR kitleri kullanılabilir. Ayrıca reaktiflerin bir araya getirilmesi ile öz-yapım geleneksel PCR da kullanılabilir. PCR duyarlılığını artırmak amacıyla dokudan DNA izolasyonunda uygun modifikasyonların kullanılması gerekebilir.

Diğer gereç, donanım

ELISA için;

- ELISA yıkayıcı, ELISA okuyucu
- Ayarlanabilir otomatik mikropipetler (5-1000 µL) ve pipet uçları

Mikroskopi için;

- Mikroskop, binoküler (rutin) – 10× (düşük), 40× (yüksek kuru), 100× (immersiyon) objektifleri ve 10× oküleri olan tercih edilir.

NOT: 5× oküler önerilmez! Daha az büyütme sağladığı için inceleme duyarlılığı düşüktür. 10× oküler kullanılmalıdır (13).

- Lamlar (25×75 mm; tercihen kenarı rodajlı) ve lameller (22×22 mm)
- Pastör pipetleri, 1 ve 10 ml pipetler
- Santrifüj
- Biyolojik atık kapları, kesici-delici atık kabı

PCR ve diğer moleküler yöntemler için;

- En az üç ayrı oda - Nükleik asit ekstraksiyonu, PCR karışımı hazırlama, amplifikasyon ve sonuç gözetimi için ayrı odalar. İdeal olarak PCR karışımı hazırlama odası (temiz) pozitif basınçlı, agaroz jel elektroforezi yapılan oda (kirli) negatif basınçlı havalandırmaya sahip olmalıdır.
- Donanım – BGK, soğutmalı mikrosantrifüj, hassas terazi, vorteks, su banyosu, PCR ısı döngü cihazı (gerçek zamanlı veya geleneksel), mikrodalga fırın, jel görüntüleme sistemi, elektroforez ünitesi vb.

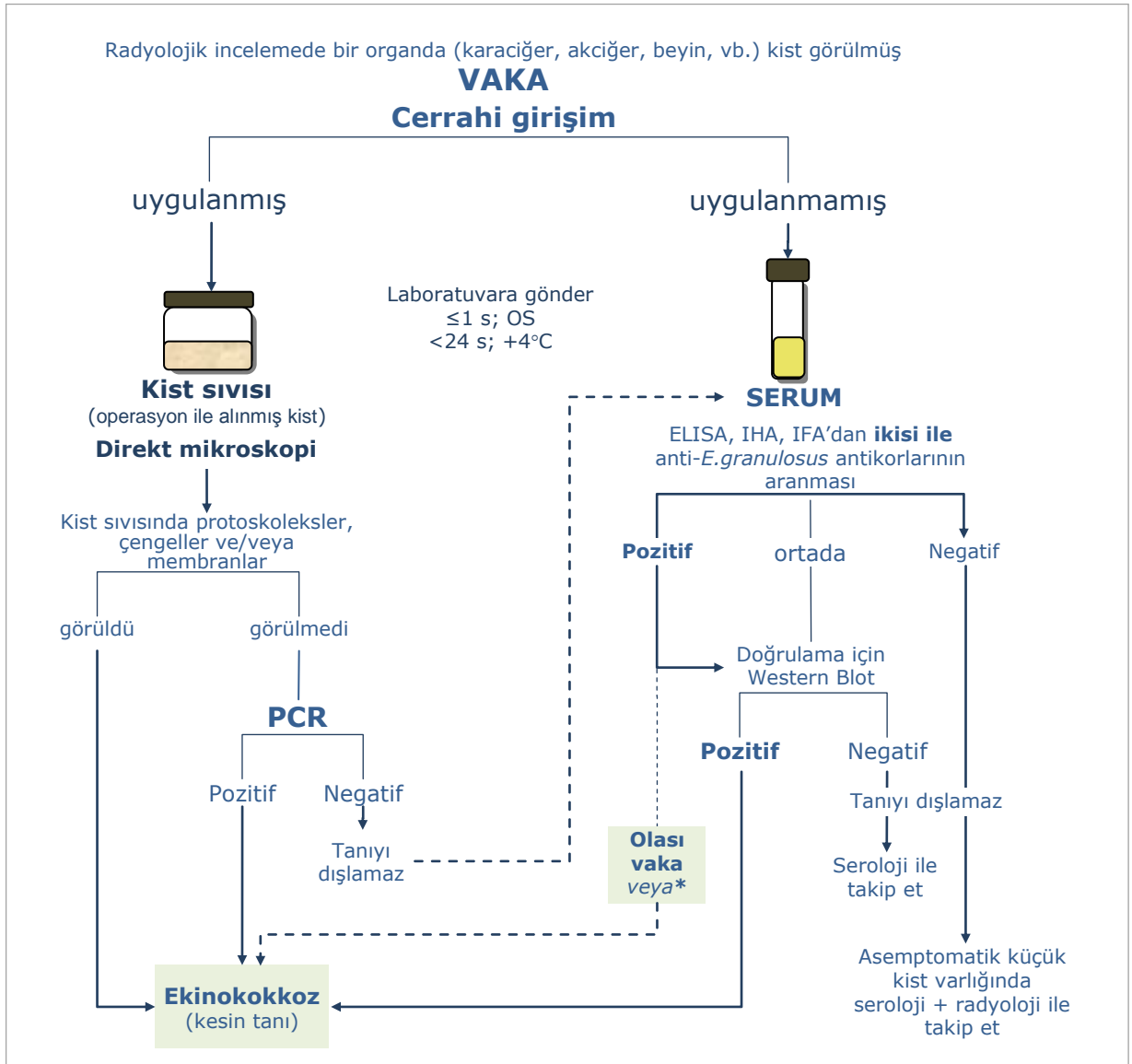
2.4. Kalite kontrol

- Kullanılan kitlerin (moleküler testler için olanlar dahil) son kullanma tarihleri ve saklama koşullarına dikkat edilmelidir. Kontrol örnekleri kullanılarak bu etkinlik değerlendirilebilir.
- Her yeni -hazırlanmış veya ticari- reaktif seti veya kit lotu, kullanıma sokulmadan önce pozitif kalite kontrol örnekleri ile test edilmelidir.
- Tüm ekipmanın bakım ve kalibrasyonu yapılmış olmalıdır.
- Mikroskop belirli aralıklarla (yoğun kullanılıyorsa yılda en az bir kez) kalibre edilmelidir. Mikroskoba herhangi bir parça eklenmesi veya değiştirilmesi durumunda da kalibrasyon yapılmalıdır. Kalibrasyon için kullanılmış optikler mikroskobun üzerinde olmalıdır. Tüm objektifler için kalibrasyon faktörleri göz önündeki bir panoda asılı olmalıdır (*bkz.* UMS, P-TP-01 Mikroskop Kalibrasyonu).
- Tüm kalite kontrol sonuçları kaydedilmelidir.

3 Ekinokokkoz tanısında kullanılan teknikler

- Ekinokokkoz şüpheli olgularda yapılacak testleri hastanın operasyon durumu belirler. Operasyon **öncesi** tanıyı kesinleştirmek için serum örneği ve eğer akciğer kist rüptürü olmuş ise balgam incelenebilirken, operasyon **sonrası** opere kistin incelenmesi ön plandadır.
- Kistik ekinokokkoz kuşkusunda tanı için operasyon sırasında çıkarılmış örnekler Patoloji Laboratuvarı'na da gönderilebilir ve preparatlar burada hazırlanabilir. Bu durumda mikroskopik inceleme ideal olarak Parazitoloji Uzmanının konsültasyonu ile yapılmalıdır.
- Kitlere dayalı testler laboratuvarında üreticinin talimatına göre çalışılır.
- Laboratuvar incelemeleri için bir akış şeması Şekil 1'de verilmiştir.

3.1. Tanı akış şeması



Şekil 1. Kistik ekinokokkozun laboratuvar tanısında vakanın özelliğine göre örnek tipleri, testlerin seçimi ve olası sonuçlar için akış şeması.

OS, oda sıcaklığı; IHA, indirekt hemaglutinasyon; IFA, indirekt floresan antikor (test);

* İki serolojik test (ör., IHA+ELISA çifti) pozitif bulunduğu anda, eğer görüntüleme yöntemlerinden biri de (bilgisayarlı tomografi, ultrasonografi vb.) pozitif ise vaka "ekinokokkoz" kabul edilir.

3.2. Seroloji

- Kistik ekinokokkozun laboratuvar tanısında en yaygın teknik serolojidir. Serolojik sonuçlar ile elde edilen pozitiflik bildirimine esas tanı kriterleri arasında yer almamakla birlikte seroloji klinik tanıya yardımcıdır.
- En sık kullanılan testler IHA, ELISA, IFA ve WB'dir. Tanı desteği için ideal olan; IHA, ELISA, IFA'dan ikisi ile elde edilen pozitif sonucun WB ile doğrulanmasıdır (Şekil 1). WB, tanıda ve tedavinin takibinde en değerli testtir.

- ELISA sonuçları kantitatifdir. Operasyon öncesi değerler mevcut ise, operasyon sonrası izlem mümkündür ve bu nedenle değerli bir testtir (IgG4-ELISA, özgül IgE-ELISA, IgM-ELISA).

3.3. Kist materyalinin incelenmesi (operasyon ile çıkarılmış veya diğer örnekler)

Makroskopik inceleme

- Tipik üç katmanlı yapı ve içerisindeki sıvı ve hidatik kum görüntüsünün izlenmesi ile kesin tanı konur.
- Pulmoner/alveoler ekinokokkozda ve kemikte yerleşen kistlerde tipik yapının görülmeyeceği hatırlanmalıdır!
- Makroskopik incelemede tipik yapıların görülmemesi, olumsuz rapor verilmesi için yeterli değildir. Mikroskopik incelemeye gidilmelidir.
- Kistler eski ve kuru ise kist duvarından alınan parça da patolojik incelemeye gönderilmelidir.

Mikroskopi için örneklerin hazırlanması

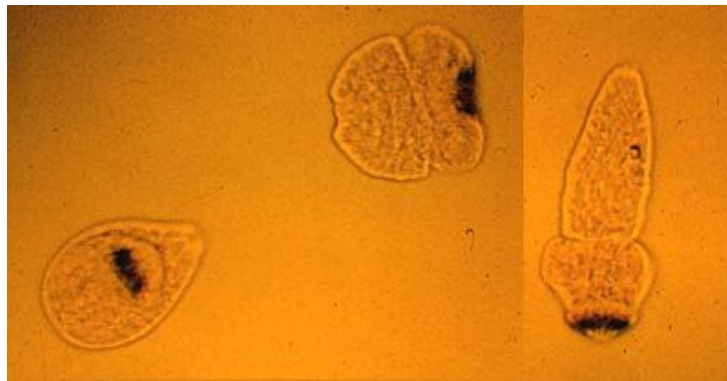
- Kist sıvısından (operasyon ile çıkarılmış ya da aspirat) mikroskopik inceleme yapılmalıdır. Bazen bir balgam örneğini de, balgam ile atılan materyalin patlamış bir akciğer kistine ait olup olmadığını değerlendirmek amacıyla incelemek gerekebilir.
NOT 1: Kist duvarından alınan parça histopatolojik açıdan incelenmek üzere patoloji laboratuvarına yönlendirilmelidir.
NOT 2: Uzun süreli antiparaziter tedavi kullanımı, PAIR uygulaması gibi klinik durumlarda istenen canlılık tayini için alev hücre aktivitesine bakılabilir ve/veya %0.1-1'lik eozinle vital boyama testi uygulanabilir.
- **Sıvı** örnekler 500 × g 'de 3 dk santrifüj edilir.
- **Kist sıvısı** visköz ise SF ile karıştırılır. Lam-lamel arası preparatlar hazırlanır. Bazı yaşlı kistlerde içerik peynirimsi bir hal alır ve çengelleri görmek zorlaşır. Bu durumda materyal %10'luk KOH ile işlenir.
- **Balgam** (mukolitik ajanla işlenmemiş) örneğinden doğrudan lamın iki tarafına birer damla damlatılır. Birinin üzerine bir damla SF katılarak lamelin ucuyla karıştırılır ve sonra her ikisinin de üzeri lamel ile kapatılarak preparat hazırlanır.
- **Balgam** visköz ise %3 KOH veya NaOH ile yarı yarıya karıştırılır; 500 x g'de 5 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrası üst kısım atılır ve çökeltiden nativ-Lugol preparatı hazırlanır (bkz. UMS P-TP-02).
NOT: Diğer parazitlerin (helmint yumurta ve larvaları, protozoonlar) varlığından da şüpheleniliyorsa, ancak hemen incelenemeyecekse balgam %10 formol ile ve protozoonlar yönünden yapılacak boyama için PVA ile fikse edilmelidir (bkz. UMS P-ÖY-01).
- **Mukus** içeren örnekler varsa ticari bir mukolitik ajan ile işlenir. Bunun için örnek kadar veya örneğin yarısı ile üçte ikisi hacminde mukolitik ajan eklenerek oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilir. 1000 x g'de 5 dk santrifüjlenir.

ÖNEMLİ: Sputolizin ve streptokinaz çalışma reaktifleri +4°C 'de saklanmalı, 48 saatten sonra taze hazırlanmalıdır.

- **Hücre artığı** ve **protein** içeren, sindirim gerektiren örneklerde organizmayı serbest bırakmak için proteolitik enzimlerin (Streptokinaz) kullanılması önerilir (5 birim örneğe 1 birim enzim solüsyonu olacak şekilde). 30 dk - 1 saat kadar 37°C 'de bekletilen karışım 15 dk'da bir çalkalanmalıdır. 1000 x g'de 5 dk santrifüjlenir.
- Anlamlı miktarda **kan** içeren örnekler, örnek hacmi kadar alyuvarları eritici bir ajanla oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmelidir. 1000 x g'de 5 dk santrifüjlenir.
- Santrifüj edilmiş örneklerde çökeltiden direkt mikroskopik inceleme için lam-lamel arası (gerekli durumlarda boyalı) preparatlar hazırlanır.

Mikroskopik inceleme

- Lam-lamel arası preparatlar 10× ve 40× objektiflerle mikroskopta incelenir. Protoskoleks, kız vezikül ve çengellerin görülmesi ile **kesin tanı** konur.
 - Kist sıvısı sıklıkla hidatid kum (sağlam ve dejenere skoleksler, çengeller ve kalsifiye duvar parçacıkları) içerir. Mikroskopta incelenen örneklerde tipik protoskoleks ya da çengeller görülmesi beklenir (Şekil 2).
 - %10 KOH ile işlemlenmiş örneklerde skoleks ve kız kistler parçalanmış olacağından sadece çengeller görülebilecektir (40× objektif ile).
- NOT: Mikroskopik incelemede tipik yapıların (skoleks ya da çengel) görülmemesi hastalığı ekarte ettirmez! Bazı kistler steril olabilir (yani hiç skoleks ve kız kist içermeyebilir). Mümkünse PCR ile araştırılmalıdır.
- Kist duvarının histolojik incelemesi de tanı kesin tanı koydurucudur.



Şekil 2.
Protoskolekslerin direkt mikroskopik incelemede görünümü

Moleküler tanı

- Kist sıvısı veya kist membranlarından PCR ile DNA analizi yapılır. Pozitif sonuç kesin tanı koydurur. Negatif sonuç tanıyı dışlamaz.
- NOT: Kist sıvısından DNA ekstrakte edebilmek için içinde protoskoleks bulunması gerekir. Protoskoleks yoksa kist membranlarından DNA ekstraksiyonu yapılmamalıdır.

3.4. Saklama, Referans merkeze gönderme

- Pozitif serum örnekleri ve kist sıvısı laboratuvarın eğitim ve kalite kontrol uygulamalarında kullanılmak üzere saklanmalıdır. Pozitif kist sıvısı sedimenti %10 formol içinde konulabilir.
- Serum veya kist örnekleri doğrulama amaçlı testler (ileri tanı veya moleküler testler) için başka bir merkeze gönderilecekse alındıktan sonraki 48 saat içinde +4°C'de taşınmalıdır. Örnekler kesinlikle sızdırmaz örnek kaplarına alınmış olmalıdır ve bu kaplarla taşınmalıdır.
- Eğer ileri tanı veya moleküler testler için örnekler başka bir şehirdeki laboratuvara gönderilecekse, öncelikle *paketlenme* ve *taşıma* biyolojik materyal taşıma şartlarına uygun olmalıdır (14) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).

4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim

- Mikroskopik incelemede protoskoleks ya da çengel gibi parazite ait morfolojik yapıların gözlenmesi "**kesin tanı**" bulgusudur (Şekil 2).
- Tek bir serolojik test ile elde edilen bulgu anlamlı kabul edilmez. İki serolojik test ile *anti-E. granulosus* antikorlarının pozitif bulunması "**olası tanı**" bulgusudur (bkz. Şekil 1). Ancak radyolojik olarak kist tanısı ile birlikte vaka "ekinokokkoz" olduğu yönünde değerlendirilir.
- Düşük titrelerdeki pozitiflikler, diğer helmint hastalıklarına karşı çapraz reaksiyonlardan kaynaklanan yalancı pozitiflikler olabilir!
- Özgül proteinlere karşı antikorların saptanabildiği WB, tanıda doğrulama ve çapraz reaksiyonların ekarte edilmesi açısından değerli bir testtir. Tek veya iki serolojik testin pozitif olduğu durumlarda WB ile özgül bantların görülmesi "**kesin tanı**" koydurur.
- Moleküler testler, oldukça duyarlı ve özgüldür. *Echinococcus* spp DNA'sının saptanması "**kesin tanı**" kriteridir.

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Mikroskopik incelemede tipik yapıların görülememesi hastalığı tanısını dışlamaz! Mümkünse PCR ile araştırılmalıdır.
- Güvenilirliği arttırmak amacıyla rutinde en az iki serolojik test birlikte kullanılmalıdır.
- Düşük titrelerdeki pozitiflikler diğer helmint hastalıklarına karşı çapraz reaksiyonlardan kaynaklanan "yalancı" pozitifliklere bağlı olabilir. Özgül proteinlere karşı antikorların saptanabildiği WB, tanıda doğrulama ve çapraz reaksiyonları ekarte etme açısından değerli bir testtir.
- Karaciğer, akciğer, dalak vb. organlardaki lezyonların (kistik ekinokok kisti ve amip apsesi) ponksiyonları, rüptür, kanama, pnömotoraks, inokülasyon gibi nedenlerle belirli oranda risk taşımaktadır.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Ekinokokkozun Mikrobiyolojik Tanısı) aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve gerekli bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

- UMS, P-TP-01 Mikroskop kalibrasyonu
- UMS, P-TP-02 Direkt mikroskopi
- UMS, P-ÖY-01 Dışkı örneklerinin parazitolojik incelemesi
- UMS, GEN-OY-01 Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 King CH. Cestodes (Tapeworms). *In: Mandell, Bennett, Dolin (eds.). Principles and Practice of Infectious Diseases*, 6th ed. Churchill Livingstone, Elsevier. Chapter 288; 2005.
- 2 Fritsche TR, Selvarangan R. Tissue Helminths: Hydatidosis. Medical Parasitology. *In: McPherson RA, Pincus MR (eds.). Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 22nd ed. Elsevier, Saunders, PA. 2011, p.1231-32
- 3 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 4 Altıntaş N, Yazar S. Kistik ekinokokkozisde tanı. *In: Altıntaş N, Tınar R, Çoker A (eds). 1. baskı. Hidatidoloji Derneği Yayınları, İzmir. 2004, p. 123-149*
- 5 Özbilgin A, Kilimcioğlu AA, Kistik Echinococcosis. *In: Özcel A, Özbel Y, Ak M (eds). Özcel'in Tıbbi Paraziter Hastalıkları*. 1. baskı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, İzmir. 2007, p.541-561
- 6 Gottstein B. Hydatid disease. Chapter 114: *In: Cohen J, Opal SM, Powderly WG (eds). Infectious diseases*. 3rd ed. Elsevier Ltd, 2010, p. 1182-7.
- 7 Garcia LS. Tissue cestodes: larval forms. *In: Garcia LS (ed). Diagnostic Medical Parasitology*. 4th ed., ASM Press, Washington D.C. 2001, p. 386-412
- 8 Altıntaş N, Doğanay A. Paraziter Zoonozlar: Kistik ekinokokkozis. *In: Doğanay M, Altıntaş N. (eds). Zoonozlar: Hayvanlardan İnsanlara Bulaşan Enfeksiyonlar*. 1. baskı. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara. 2009, p. 901-938
- 9 Nunnari G, Pinzone MR, Gruttadauria S, Celesia BM, Madeddu G, et all. Hepatic echinococcosis: clinical and therapeutic aspects. *World J Gastroenterol* 2012;7;18(13):1448-58
- 10 Giri S, Parija SC. A review on diagnostic and preventive aspects of cystic echinococcosis and human cysticercosis. *Trop Parasitol* 2012;2(2):99-108
- 11 Zhang W, Wen H, Li J, Lin R, McManus DP. Immunology and immunodiagnosis of cystic echinococcosis: An Update. *Clin Develop Immunol* Volume 2012;101895.
- 12 Echinococcosis: Diagnostic findings. Center for Disease Control and Prevention. Available at: http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/frames/a-f/echinococcosis/body_Echinococcosis_serol1.htm (son erişim tarihi: 03.05.2013)
- 13 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. *In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.2.1-4
- 14 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Toksoplazmozun (*Toxoplasma gondii* enfeksiyonunun) **Mikrobiyolojik Tanısı**

Hazırlayan Birim	Klinik Parazitolojik Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Parazitoloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	P-MT-08
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	4
Hastalığın önemi ve epidemiyolojisi	4
Parazitin özellikleri.....	4
Klinik görünüşleri	4
Laboratuvar tanısı.....	5
TEKNİK BİLGİLER	7
1 Hedef mikroorganizma	7
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	7
3 Toksoplazmoz tanısında kullanılan teknikler	9
4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim	16
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	17
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	18
KAYNAKLAR.....	18

Kapsam ve Amaç

Tokso plazmoz, *Toxoplasma gondii*'nin neden olduğu ve tüm dünyada yaygın görülen bir zoonozdur. *Toxoplasma gondii* bir zorunlu hücre içi protozoan parazit olup insan dahil bütün sıcakkanlı memelileri enfekte ederek tokso plazmoza sebep olmaktadır. Parazitin insana geçişinde iki majör yol oral ve konjenital yollardır. En sık, *Toxoplasma* doku kistlerini içeren çiğ ve az pişmiş etlerin yenmesi ile bulaşır. Gebelerde ve immün yetersizliği olanlarda klinik olarak önemli sonuçlar doğurur ve gebelik sırasında ilk enfeksiyon parazitin plasental yoldan bebeğe geçmesi ve konjenital enfeksiyon ile sonuçlanabilir (1,2).

Türkiye'de enfeksiyon prevalansı oldukça yüksektir. Konjenital enfeksiyon ve immün yetmezlikli bireylerde ağır enfeksiyon riski nedeniyle, etkili kontrol programlarının geliştirilebilmesi önem kazanmaktadır. Nitekim tokso plazmoz ülkemizde de bildirimi zorunlu bir hastalıktır (3,4)

Tokso plazmoz tanısı yaygın bir şekilde serolojik yöntemlere dayanmaktadır. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının bu tekniklerin kullanımı ile ilgili deneyiminin diğer pek çok enfeksiyonun tanısına nazaran hayli gelişmiş olduğu ileri sürülebilir. Ancak elde edilen bulguların hastanın durumuna göre değerlendirilmesi ve sonuçların yorumu bazen güçlük arz edebilmektedir.

Bu UMS belgesinde klinik laboratuvarlara tokso plazmoz tanısında kullanılan teknikler ve sonuçların yorumu ile ilgili bir rehber sunulması amaçlanmıştır.

Kısaltmalar ve Tanımlar

aköz hümör	Siliyer epitelden salgılanan şeffaf, plazmaya benzer bir sıvıdır; daha az protein içerir. Lens ile kornea arasında bulunur.
BGK	Biyogüvenlik kabini (sınıf IIA)
buffy-coat	Santrifüj edilmiş antikoagülanlı kanın eritrosit tabakası ve plazması arasında kalan ve beyaz kan hücrelerini içeren (bulutsu) katman.
capture	yakalama
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat karışımı
dUTP	dNTP'den farklı olarak urasil trifosfat (dUTP) içerir
HeLa	Human cervix epitheloid carcinoma; Henrietta Lacks (insan serviks epiteloid karsinomu)
Hep-2	İnsan larinks karsinomu hücreleri
HFF	Human foreskin fibroblast (sünnet derisi fibroblast hücreleri)
ISAGA	İmmunosorbent aglütinasyon testi
İFAT	İndirekt floresan antikor testi
Vero	Afrika Yeşil maymun (<i>Cercopithecus aethiops</i>) böbrek epiteli hücresi
WB	Western blot

Genel Bilgi

Hastalığın önemi ve epidemiyolojisi

Seroprevalans çalışmaları toksoplazmozun dünyada en yaygın enfeksiyonlardan biri olduğunu göstermektedir (6). İnsanlara en sık, *Toxoplasma* doku kistlerini içeren çiğ ve az pişmiş etlerin yenmesi ile bulaşır. Bunun dışında, enfekte kedilerin dışkılarıyla atılan ookistlerin kontamine eller, su ve gıdalarla ağız yoluyla alınması sonucu ya da organ nakli, kan nakli veya laboratuvar kazası ile canlı takizoitlerin kana karışması sonucu bulaşabilir. Gebelerde ve immün yetersizliği olanlarda enfeksiyon klinik olarak önemlidir. Anne, gebelik esnasında veya konsepsiyondan hemen önce ilk kez enfekte olursa, parazit plasental yoldan bebeğe geçebilir. *T. gondii* enfeksiyonu fetal anomalilerle karakterli konjenital toksoplazmoza, körlükle sonuçlanabilen retinokoroidite, immün sistem yetmezliği olanlarda ölümcül toksoplazmik ensefalite ve transplantasyon hastalarında organ reddine sebep olur. Günümüzde toksoplazmoz şizofreni ve diğer psikiyatrik bozukluklarla da ilişkilendirilmektedir (1,2).

Gebelik sırasında geçirilen akut toksoplazmozda konjenital toksoplazmoz gelişme riski %20 ile %50 arasında değişmektedir ve hastalığın hangi trimesterde geçirildiği ile yakından ilgilidir (5). Üçüncü trimesterde alınan enfeksiyonun bebeğe bulaşma riski en yüksektir (%60-65), ancak bu çocukların çoğunda hastalık belirtisi olmaz. Gebeliğin ilk trimesterinde enfeksiyonu alan kadınların bebeklerine geçiş daha az (%15-25) olmakla beraber düşüğü de içeren ciddi sonuçlar daha yüksektir. İkinci trimesterde ise geçiş %30-45 oranındadır. 2. trimesterde enfekte olan yeni doğanlarda doğumda toksoplazmoz bulguları %21-28 oranında görülürken, 3. trimesterde enfekte olanların %11'inden azında saptanır.

Parazitin özellikleri

Toxoplasma gondii bir zorunlu hücre içi protozoan parazittir. *T. gondii* için bilinen tek kesin konak evcil kediler ve kedigillerdir; ayrıca insan dahil bütün sıcakkanlı memelileri enfekte eder. Parazit, hızlı çoğalan *takizoit*, doku kistlerinin içinde bulunan *bradizoit* ve son konak kedilerin bağırsağında gelişen *ookist* formlarında olabilir. Her üç formu da insana enfeksiyonun geçişinde rol alabilir (6).

Klinik görünüşleri

Toksoplazmoz bağışıklık sistemi normal kişilerde %80-90 asemptomatiktir; %10-20 ise hafif, ağrısız servikal lenfadenopati, soğuk algınlığı benzeri tablo gibi kendini sınırlayan belirti ve bulgularla seyredebilir. Akut fazdan sonra parazit, dokularda (beyin, kas) bradizoitleri içeren kistler halinde latent kalabilir ve immün yetmezlik durumunda (organ transplantasyonu, AIDS, lenfoma ve lösemiler vb.) reaktivasyon göstererek ölümcül seyredebilir. İmmün yetmezlikte en sık SSS tutulumu (yaygın ensefalopati, meningoensefalit, beyinde yer tutan lezyon) ile ortaya çıkar. Steroid veya immün sistemi baskılayıcı tedavi gören hastalarda ise yaygın toksoplazmoz gelişme eğilimi vardır; akciğerler, kalp ve iskelet kasları tutulabilir.

Oküler tokso plazmoz, korioretinit ve körlüğün önemli bir sebebidir. İmmün sistemi normal bireylerde sıklıkla konjenital enfeksiyonun bir sonucudur ve semptomlar 20-30'lu yaşlara kadar ortaya çıkmaz. Konjenital tokso plazmozluların üçte ikisinde sonradan korioretinit geliştiği tahmin edilmektedir. Genellikle bilateraldir. Tedaviden sonra da %30 oranında nüks görülebilir.

Edinsel korioretinitler ise genellikle tek taraflı ortaya çıkar.

Konjenital tokso plazmoz, düşük, ölü doğum veya doğumsal anomali nedeni olabilir. Yeni doğanların yaklaşık %75'i doğumda asemptomatiktir; böyle subklinik hastalığı olan çocuklarda sonradan beyin ve göz hasarlarına bağlı olarak mental retardasyon ve körlüğe varan görme bozukluğu ortaya çıkabilmektedir. Gebelikte enfeksiyonun hemen tanınması ve tedavi edilmesi bu sekelleri azaltmaktadır.

Ciddi hastalık tablosu tokso plazmozlu doğanların %10'unda gözlenir. En ağır şekli mental retardasyon, epilepsi ve görme bozuklukları ile seyreden serebral kalsifikasyonlar hidrosefali ve korioretinit tablosudur.

Klinik görünüm ve evreler laboratuvar tanısı için elde edilen bulguların yorumu bakımından da önem taşımaktadır. Tokso plazmoz tanısının önemli olduğu dört klinik tablo şunlardır:

1. Hamilelik sırasında enfekte olan gebeler
2. Enfekte fetus ve yeni doğanlar (konjenital tokso plazmoz)
3. İmmün yetersizliği olan hastalar (ör., transplantasyon, AIDS vb.)
4. Retinokoroidit (oküler tokso plazmoz)

Gebelikte akut enfeksiyon tanısı alan annelerin bebeklerine amniyon sıvısında PCR gibi çeşitli yöntemlerle tanı konmaya çalışılsa da, bazen bu vakalar atlanabilmektedir. Bu nedenle riskli bebeklerin doğum sonrası takibi önemlidir.

Laboratuvar tanısı

Tokso plazmoz tanısında kullanılan başlıca tanı yöntemleri dört ana başlıkta toplanabilir. Bunlar serolojik yöntemler yanında etkeni saptamaya yönelik mikroskopik incelemeler, kültür ve moleküler yöntemlerdir.

Serolojik yöntemler

T. gondii'ye özgü antikorların serolojik yöntemlerle saptanması primer tanı metodudur. Seroloji özellikle hamileliği düşünen veya hamile kadınlar ile immün yetmezlikli hastalarda uygulanmalıdır. Gebelik öncesi veya erken gebelik döneminde IgG antikorunun bulunmaması, risk altındaki kadınların belirlenmesini sağlayacaktır. İmmün yetersizliği bulunan hastalarda IgG varlığı ise latent enfeksiyonun reaktivasyon riskini ortaya koyacaktır (1).

Serolojik tanı amaçları için çok çeşitli testler geliştirilmiştir. Bunlar başlıca Sabin-Feldman Dye test, IFAT, ELISA, 'capture' ELISA, ISAGA ve IgG avidite testleridir. Günümüzde birçok laboratuvar ELISA ile IgM ve IgG antikorlarını tararken diğer teknikler genelde referans merkezleri tarafından kullanılmaktadır (2).

Enfeksiyonun başlamasından 1-2 hafta sonra çıkan IgG antikorları kişinin hayatı boyunca pozitif kalır.

IgG antikor varlığı birçok serolojik testle saptanabilmektedir (ör., Sabin-Feldman Dye test, IFAT, ELISA). IgG antikorlarının aviditesini (fonksiyonel affinite) ölçen testler (IgG Avidite) ise akut ve kronik enfeksiyonları ayırt etmede faydalıdır. Yüksek avidite, 3-4 ay içindeki akut enfeksiyonu ekarte eder. Ancak düşük avidite antikorlarının üç aydan daha uzun süre bulunabileceği hatırlanmalıdır (1).

Enfeksiyonun ilk haftasında IgM antikorları yükselmeye başlar, hızla artar ve daha sonra azalarak değişen sürelerde yok olur. IgM antikorları birkaç yöntemle saptanabilir (ör., 'capture' IgM ELISA, IgM ISAGA). IgM saptayan testlerin en değerli sonucu, negatif bulunduğu durumda akut enfeksiyonun dışlanabilmesidir. Çünkü, yalancı pozitif sonuçlar ve bazen akut enfeksiyondan yıllar sonra saptanan pozitif IgM titreleri sonuçların yorumlanmasında güçlük kaynağıdır. IgM ISAGA testinin ise duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olup konjenital toksoplazmoz tanısında sıklıkla kullanılmaktadır (1,2).

Öte yandan fetus ve yeni doğanda IgA titrelerini araştıran testler IgM testlerine göre daha duyarlıdır. Yeni doğanın serumunda saptanan IgG antikorları bebeğin kendisine veya annesine ait olabilir. IgM ve IgA antikorlarının saptanması enfekte bebeklerin %75'inin enfeksiyon durumunu ortaya koymaktadır. Enfeksiyon şüphesi olan bebeklerde IgG pozitifliği varken IgM ve IgA negatif ise IgM/IgG WB uygulaması ile anne bebek bantları karşılaştırılarak tanıya katkı sağlanabilir. WB öncesi yeni doğanın kan transfüzyonu olup olmadığının sorgulanması da önemlidir. Anneden geçen IgG antikorları da genelde 6-12 ay içinde yok olurlar.

Erişkinlerde IgA antikorları bir yıl veya daha fazla süre ile pozitif kalabilir ve bu sebeple erken dönem enfeksiyonun ayırt edilmesinde önemi düşüktür. IgE antikorlarının araştırıldığı testler ise tek başına kullanılmamalıdır. Gözde lokal antikor oluşması oküler toksoplazmoz tanısında başarı ile kullanılmaktadır (Goldmann-Witmer katsayısı hesaplanır) (1).

Mikroskopik yöntemler

T. gondii takizoitleri steril vücut sıvılarından (BOS, vitreus hümör, perikard ve amniyon sıvısı) veya 'buffy-coat' yaymaların Giemsa ile boyanması sonucu saptanabilir. Ayrıca biyopsi materyalinden yapılan histolojik kesitlerin histolojik veya immünohistolojik boyamaları ile takizoitler ve doku kistleri saptanabilir. Parazitin saptanması kesin tanı koydurucudur. Takizoitlerin saptanması primer akut enfeksiyon veya latent enfeksiyonun reaktivasyonunda gözlenebilir (1).

Kültür yöntemleri

In-vitro (hücre kültürü) veya *in-vivo* (fareye inokülasyon) yöntemlerle kan, vücut sıvıları veya dokulardan *T. gondii* izolasyonu gerçekleştirilebilmektedir ve akut enfeksiyonun göstergesidir. İzolasyon parazitin canlı olmasını gerektirdiğinden duyarlılık düşüktür; *T. gondii* suşlarının genotiplendirilmesi için ise idealdir (1).

Moleküler yöntemler

Moleküler tanı amacıyla PCR özellikle konjenital, oküler, serebral ve yaygın toksoplazmoz tanısında başarı ile kullanılmaktadır. Prenatal enfeksiyonda (amniyotik sıvıdan), oküler toksoplazmozda ve immün yetmezlikli olgularda toksoplazma ensefaliti araştırmasında PCR pozitifliği kesin tanı sağlar. Farklı PCR yöntemleri ile parazitin farklı hedef gen bölgeleri çoğaltılmaktadır.

Öte yandan yöntemin yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü bulunmasına rağmen *T. gondii* DNA'sı saptanamaması toksoplazmoz varlığını dışlamaz. PCR'in duyarlılığı örneğin alınış ve laboratuvara gönderiliş şartlarından ve ayrıca kullanılan yöntem ve anti-*T. gondii* ilaç tedavisinin başlanmış olmasından etkilenmektedir (1).

Moleküler tanıda önceleri sadece *T. gondii* DNA'sının konvansiyonel PCR veya daha duyarlı 'nested' PCR gibi yöntemlerle saptanması amaçlanırken ilerleyen zaman ve teknolojik gelişmeler sayesinde DNA miktarı da saptanabilir hale gelmiştir. Son on yıl içinde 'end-point' PCR yöntemleri yerini 'gerçek-zamanlı' miktar ölçebilen yöntemlere bırakmıştır. Gerçek-zamanlı PCR yöntemlerinde etken DNA'sı kapalı bir sistemde araştırıldığından kontaminasyon riski en azdır indirgenmiştir ve en hızlı şekilde sonuç verilebilmektedir. *T. gondii* DNA miktarının bilinmesi, klinisyene konjenital toksoplazmoz ve toksoplazmik ensefalit tedavisi sürecinin iyi idare edilmesi yönünden yardımcı bulunur (7).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizma

Toxoplasma gondii

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

Potansiyel enfeksiyöz organizmalar içerebileceği için parazitolojik inceleme örnekleri asgari BGD2 laboratuvar şartlarında incelenmeli ve daima "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi"nde belirtilen standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır. Serolojik çalışmalarda en ciddi risk kan-kaynaklı patojenlerin (özellikle HIV ve hepatit etkenleri) bulaşması riskidir. Serum ayırma vb. işlemler yapılırken daima eldiven giyilmeli, standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır.

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) tekniklerin uygulanmasından önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) tekniğe tüm yönleriyle aşina olmalı, ve (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Bu UMS'nin uygulanmasından analist; tekniklerin prosedüre uygun yapılmasını sağlamaktan ve denetimi, değerlendirilmesi ve onaylanmasından (sonucun doğru ve güvenilir olmasından) Tıbbi Mikrobiyoloji/Parazitoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, Kit, Donanım

İnceleme örneği

Örneklerinin alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden edinilebilir. Aşağıda bazı önemli noktalara tekrar dikkat çekilmektedir:

- Serolojik inceleme için serum, tam kan (anne, fetus, bebek), BOS, aköz hümör veya vitreus hümör örnekleri kullanılabilir. Kordon kanı alınması planladığında önce laboratuvarla bağlantı kurulmalıdır.
 - Serum için; laboratuvara ulaşma süresi >48 saat ise (ya da jel içermeyen kan tüpü kullanılmış ise) kanın **serum** kısmı santrifüj sonrası hemen steril bir tüpe ayrılmalıdır.
 - İdeal olarak kadınların hamile kalmadan önce serolojik test uygulanması önerilir. Gebelerde *Toxoplasma* serolojisi 16. haftaya kadar yapılırsa erken tanıya yardımcı olur. Şüpheli olgularda serolojik inceleme için 2-4 hafta ara ile 2 kez serum örneği gönderilmelidir.
 - Mikroskopi, *T. gondii* izolasyonu (hücre kültürü, hayvan inokülasyon) veya PCR için lenf nodu biyopsisi, EDTA'lı kan, BOS, amniyon sıvısı, plasenta, fetus veya yeni doğan dokuları kullanılabilir. Bu tip örnekler *mümkünse* tedavi başlanmadan önce alınmalıdır.
 - Amniyon sıvısı gestasyonun 16. haftasından sonra ve maternal enfeksiyondan en az 4 hafta sonra alınmalıdır. PCR'in duyarlılığı, gebeliğin 17. haftasından sonra alınan amniyon sıvılarında artmaktadır.
- NOT: Mikroskopi için alınan BOS vb. örnekler **asla** buzdolabına konmaz! Dondurulmaz!

Reaktif / Kit / Besiyeri

- IFAT, ELISA, IgG avidite, ISAGA ve WB gibi serolojik yöntemlere ait kitler piyasadan temin edilebilir. Sabin-Feldman Dye test gibi canlı parazit gerektiren durumlarda test reaktifleri (alkali metilen mavisi, sodyum karbonat, sodyum tetraborat ve trisodyum sitrat solüsyonları, anti-*T. gondii* antikor negatif insan serumu) laboratuvarında hazırlanır.
- *T. gondii* mikroskopik olarak Giemsa boyalı yaymalarda (bkz. P-TP-06) ve ticari olarak temin edilebilen özgül antikorların kullanıldığı immuno-histokimyasal incelemeler ile saptanabilir.
- Hücre kültürüne ekim için ATCC kaynaklı HFF, HeLa, Vero, Hep-2 hücre serileri kullanılabilir. Hücre kültürü ortamı bazı solüsyonlar (ör., Earle'nin tuzlarını ve 2.2 g/L NaHCO₃ içeren Basal Medium Eagle; Earle'nin tuzlarını ve 25 mM HEPES içeren Minimum Essential Medium; L-glutamin, fetal sıçır serumu, penisilin/streptomisin, gentamisin, amfoterisin B, Hank'ın dengeli tuz solüsyonu) ve HEPES tampon karışımı ile oluşturulabilir (8,9). Hayvana inokülasyon için patojen içermeyen BALB/c, Swiss webster gibi 6-8 haftalık fareler kullanılmaktadır.
- Moleküler testler için ticari olarak hazır DNA izolasyon ve PCR kitleri kullanılabilir ya da bütün enzim, primerler ve diğer reaktiflerden *geleneksel* PCR uygulanabilir.

Diğer gereç, donanım

Serolojik yöntemler için;

- ELISA yıkayıcı, ELISA okuyucu, rotator (çalkalayıcı), santrifüj, ısı bloğu, floresan mikroskop, elektroforez sistemi gibi donanım yanında mikropalaklar, lam-lamel.

Hücre kültürü için;

- Işık mikroskobu, faz kontrast özellikli invert mikroskop, CO₂ inkübatör, sınıf IIA biyogüvenlik kabini, pipetör, hücre sayıcı, hemositometre gibi ekipmanlar yanında flasklar, Pastör pipeti, 2-5-10-25-50 ml pipetler.

Mikroskopik yöntemler için;

- Mikroskop, binoküler (rutin) – 10× (düşük), 40× (yüksek kuru), 100× (immersiyon) objektifleri ve 10× oküleri olan tercih edilir. İnceleme duyarlılığı düşük olduğu için 5× oküler önerilmez! (10).

PCR ve diğer moleküler yöntemler için;

- En az üç ayrı oda - Nükleik asit ekstraksiyonu, PCR karışımı hazırlama, amplifikasyon ve sonuç gözetimi için ayrı odalar. İdeal olarak PCR karışımı hazırlama odası (temiz) pozitif basınçlı, agaroz jel elektroforezi yapılan oda (kirli) negatif basınçlı havalandırmaya sahip olmalıdır.
- Donanım – BGK, soğutmalı mikrosantrifüj, hassas terazi, vorteks, su banyosu, PCR ısı döngü cihazı (gerçek zamanlı veya geleneksel), mikrodalga fırın, jel görüntüleme sistemi, elektroforez ünitesi vb.

2.4. Kalite kontrol

- Her yeni -hazırlanmış veya ticari- reaktif seti veya kit lotu (moleküler testler dahil), kullanıma sokulmadan önce pozitif kalite kontrol örnekleri ile test edilmelidir. Kitlerin ve antiserumların son kullanma tarihi ve saklanma koşullarına her zaman dikkat edilmelidir.
- Serolojik testlerin kalite kontrolünde uluslararası kontrol serumları kullanılabilir. Laboratuvar kendi sakladığı pozitif ve negatif kontrol serumlarını da testlere dahil etmelidir. Pozitif referans serumların beklenen dilüsyonlarda pozitiflik vermesi testin çalıştığını gösterirken, bu değer dışındaki pozitiflikler testin tekrarlanmasını gerektirir (11).
- Hücre kültürü uygulamalarında kullanılan besiyeri malzemeleri ve hücre serileri mikrobiyal kontaminasyon açısından kontrol edilmelidir.
- Mikroskop ve diğer tüm ekipmanın bakım ve kalibrasyonu yapılmış olmalıdır (mikroskop kalibrasyonu için bkz. UMS, P-TP-01).
- Tüm kalite kontrol sonuçları kaydedilmelidir.

3 Toksoplazmoz tanısında kullanılan teknikler

3.1. Toksoplazmozda genel tanı yaklaşımı

- Toksoplazmoz tanısının önemli olduğu hedef hasta grupları için tanı stratejileri Tablo 1’de verilmiştir (2). Toksoplazmoz tanısında serolojik ve etkenin saptanmasına yönelik tanı yöntemlerinin kullanım yerleri ve önemli özellikler de Tablo 2’de özetlenmiştir (1).
- Hamilelik sırasında enfekte olan gebelerin tanısında serolojik testlerin hangi aşamalarda kullanılabileceğini ve yorumlanmasını gösteren akış şeması Şekil 1’de verilmiştir (2).

Tablo 1. Hasta ve hastalık durumuna göre toksoplazmoz tanısında kullanılacak stratejiler. (Robert-Gangneux 2012'den alınmıştır) (2).

Hasta	Hastalık durumu	Tanısal yaklaşım	Teknik(ler)	Örnek(ler)
İmmun sistemi sağlam hasta, organ alıcısı veya hamile kadın	Primer enfeksiyon veya immün sistemin durumunun belirlenmesi	Serolojik yöntemler	Rutin olarak IgM/IgG saptanması ^a ; tamamlayıcı testler ^b , IgG avidite ^c , IgA saptanması, Sabin Feldman Dye test ^d , Western blot ^d ve ISAGA ^e	Serum
Fetüs	Maternal primer enfeksiyon	Parazitin tespitine yönelik prenatal tanı	PCR, fare inokülasyonu ^b	Amniyon sıvısı
Yeni doğan	Maternal primer enfeksiyon	Parazit saptanması	PCR, fare inokülasyonu ^b	Plasenta, kordon kanı
		Serolojik yöntemler	IgG/IgM ^e /IgA saptanması ^b	Kordon kanı serumu ve/veya yeni doğan serumu
			Karşılaştırmalı Western blot ^b	Yeni doğan ve anne serumu paralel çalışılır
İmmun yetersizlik durumu olan hasta	Serebral veya yaygın toksoplazmoz	Parazit saptanması ^b	PCR	Kan
			PCR, hücre kültürü, fare inokülasyonu ve mikroskopi	BOS, BAL, doku örnekleri
İmmun sistemi sağlam veya immün yetersizlik durumu olan hasta	Retinokoroidit	Serolojik yöntemler	Karşılaştırmalı Western blot ^b , Goldmann-Witmer katsayısı ^b	Aköz hümmör ve serum paralel çalışılır
		Parazit saptanması	PCR	Aköz hümmör

^a Rutin tanıda genelde ELISA yöntemleri kullanılır

^b Referans laboratuvarları tarafından uygulanmalıdır

^c IgM saptandıysa, enfeksiyonun gününü belirlemek için, özellikle hamile kadınlar ve organ donörlerinde

^d Düşük IgG titresinin doğrulanması gerektiğinde

^e ISAGA, IgM özgüllüğünü doğrulamak için kullanılan referans testtir ve konjenital enfekte yeni doğanlarda IgM saptanmasında kullanılır

3.2. Örneklerin incelemeye hazırlanması

- Laboratuvara gelen örnek BOS, aköz hümmör, vitreus hümmör, BAL, kordon kanı gibi invaziv yöntemlerle alınmış ise ve sadece bir tüp laboratuvara ulaştırıldıysa, öncelikle kültür yöntemleri ve moleküler yöntemler için steril şartlarda örnekten alikotlar yapılmalıdır.

3.3. Serolojik tanı

- Tokso plazmoz tanısında primer seçenek ve en yaygın başvuru olan tanı yöntemi serolojik testlerdir. Serolojik tanıda piyasada bulunan yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip kitlerin kullanılması önerilir.
- Testlerin hepsinde hasta serumu negatif ve pozitif kontrol serumlarına göre değerlendirilir.

Tablo 2. Toksoplazmoz tanısında serolojik ve etkenin saptanmasına yönelik tanı yöntemlerinin kullanım yerleri (Montoya ve Liesenfeld, 2004'den uyarlanmıştır) (1).

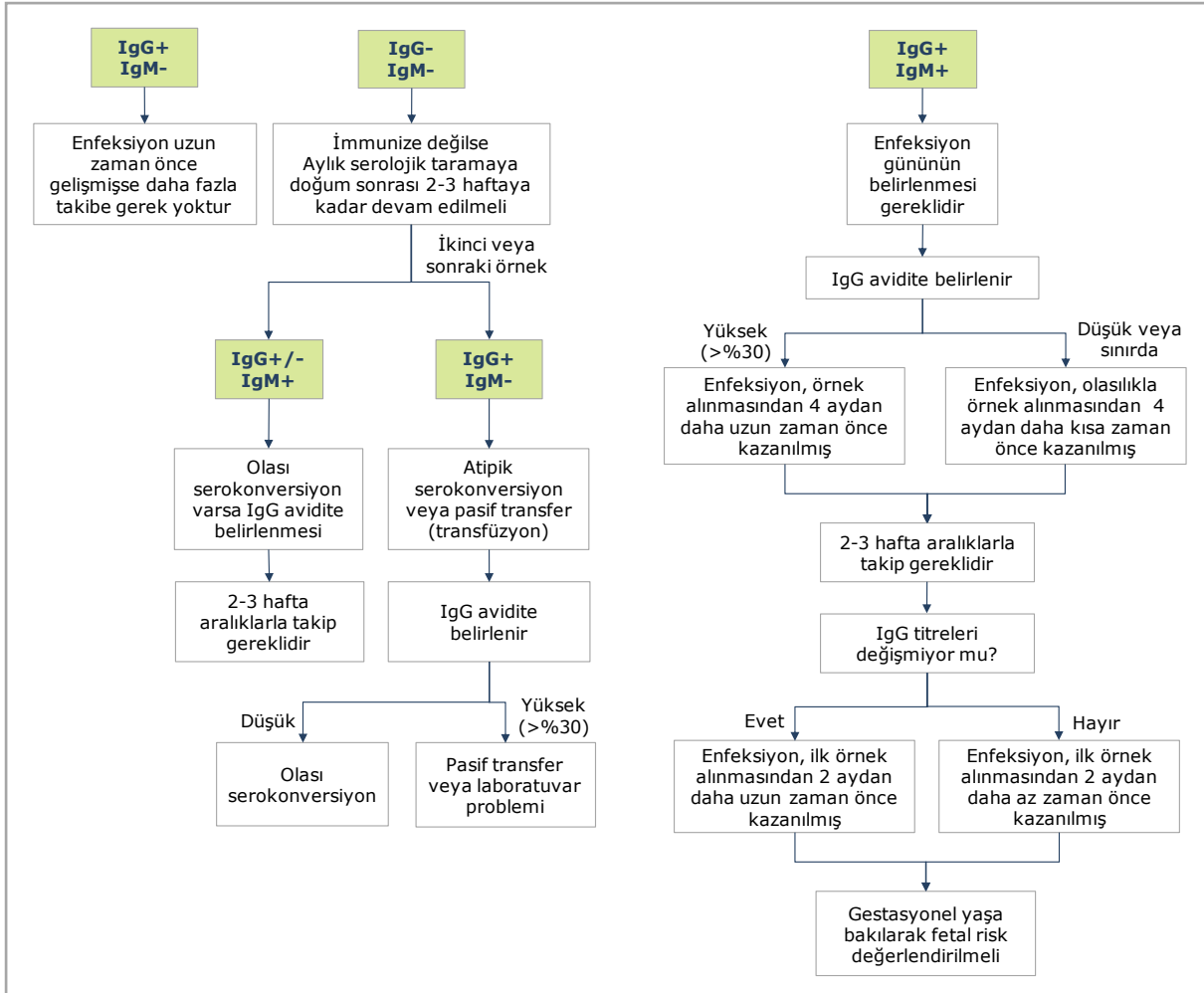
Antikor tipi/ test*	Tarama ¹	Gebelik ²	Yeni doğan ³	Göz tutuluşu ⁴	İmmün yetmezlik ⁵
Serolojik tanı					
IgG	+	risk altındaki kadınlar ve korunanlar	maternal antikorlar bebekte 12. aya kadar kalabilir; maternal veya fetal IgG ayrımının WB ile yapılması	düşük titrede pozitiflikler genelde konjenital enfeksiyonun reaktivasyonunda saptanır; göz içi antikor üretimi [göz ve kan antikor titresi oranı]	reaktivasyon riski olan hastaların tanısında; AIDS ve Kİ transplant hastaları
IgG avidite	-	yüksek avidite sonucu 3-4 ay öncesi enfeksiyon düşündürmez; düşük avidite antikorlar kalabilir	-	yüksek avidite sonucu 3-4 ay öncesi enfeksiyon düşündürmez; düşük avidite antikorlar kalabilir	-
IgM ⁶	- ⁷	IgM antikorları uzamış sürelerde kalabilir, negatif IgM hamile kadında ilk 2 trimesterde enfeksiyon olmadığını gösterir	ISAGA enzim immün assay'den daha sensitif; maternal veya fetal IgG ayrımının WB ile yapılması	yüksek titrede pozitiflik akut kazanılmış enfeksiyon, negatif sonuç konjenital enfeksiyonun reaktivasyonunda saptanır	IgM sonucunun değeri düşüktür; aktif veya latent hastalık olabilir veya olmayabilir
IgA	-	IgA antikorları uzun süre kalabilir	IgM testlerine göre daha değerlidir	-	-
IgE	-	yüksek özgüllük, düşük duyarlılık	-	-	-
Etkene yönelik tanı					
PCR	-	amniyon sıvısı	kan, idrar	vitreus sıvısı veya aköz hümör; vitreus sıvısı tercih edilir. Özellikle atipik retinal lezyonlu veya tedaviye suboptimum cevap veren hastalarda önemli	BOS, BAL, oküler sıvılar, asit, pleural sıvı, periton sıvısı, Kİ aspirasyonu, periferik kan ve/veya doku
Histoloji, ⁸ hücre kültürü veya hayvan inokülasyonu	-	fötal kayıp durumunda plasenta ve fötal dokularda	-	-	her hangi bir etkilenmiş doku

* Bu testlerin yapılış amaçları veya ilgili tavsiyeler:

- ¹ Seroprevalans / epidemiyolojik çalışmalar
- ² Erken gebelikte tarama için IgG ve IgM antikorlarının birlikte aranması
- ³ IgM ve IgA antikorların birlikte aranması duyarlılığı arttırır
- ⁴ Yeni kazanılmış ve konjenital hastalık arasında serolojik ayırım yapılabilir
- ⁵ Etkeni saptamaya yönelik tanı yöntemleri serolojik tanı yöntemlerinden daha duyarlıdır

Diğer notlar

- ⁶ Ticari kit sonuçları çok değişkendir.
- ⁷ IgM saptanması yeni doğan taraması için kullanılabilir.
- ⁸ İmmunohistokimyasal teknik kullanılır; *T. gondii*'ye özgü antikorlar ile uygulanır.



Şekil 1. Hamile kadınlarda *T. gondii* serolojisinin yorumlanması (2).

ELISA (12,13,14,15,16,17,18)

- Testte *T. gondii* takizoitlerinden elde edilen eriyik antijen ile kaplanmış mikroplak kuyucuklarına şüpheli hasta örneği eklenir. Oluşan antijen-antikor kompleksi, peroksidaz veya alkalin fosfataz gibi bir enzimle konjuge edilmiş anti-insan antikorlar ve özgün substratlarla görünür hale getirilip, oluşan absorbans değeri ELISA okuyucu ile belirlenir.
- Tokso plazmoz tanısında IgG, IgM, IgA ve IgE antikorlarının saptanmasında sık kullanılan duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir testtir.

'Capture' IgM ELISA (1,2,12,18)

- Bu testte mikroplakların kuyucukları anti-insan IgM antikorları ile kaplı olup şüpheli hasta örneği ile karşılaştırılma sonrası IgM antikorları bağlar. Buna antijen ve peroksidaz işaretli *T. gondii* antikor kompleksi eklenir. Bu kompleks anti-*Toxoplasma* IgM antikorlara bağlanır ve özgün substratlarla kompleksler görünür hale getirilip absorbans değeri ELISA okuyucu ile belirlenir.
- Tokso plazmoz tanısında başlıca IgM olmak üzere IgA ve IgE antikorlarının saptanmasında sık kullanılan duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir testtir.

IgG avidite (1,2,12,18,19)

- Bu testte şüpheli hasta serumu iki farklı (çift) çukurda çalışılmaktadır (A sırası ve B sırası). Antijen antikor kompleksi oluştuktan sonra A sırasına üre eklenirken, B sırasına eklenmemektedir.
- İnkübasyon sonrası antijen-antikor kompleksinin görünür hale getirilmesi normal ELISA'da olduğu gibidir.
- Avidite indeksinin hesaplanmasında şu formül kullanılır.

$$\text{Avidite indeksi} = \frac{\text{A sırası serumu absorbands değeri}}{\text{B sırası absorbands değeri}} \times 100$$

- Avidite indeksi <%20 ise "düşük avidite" olarak adlandırılır ve enfeksiyonun olasılıkla örnek alımından 4 aydan daha kısa zaman önce kazanıldığı düşünülür.
- Avidite indeksi >%30 ise "yüksek avidite" olarak adlandırılır ve enfeksiyonun olasılıkla örnek alımından 4 aydan daha uzun zaman önce kazanıldığı varsayılır.
- Avidite indeksi %20-30 arasında olanlar sınırda kabul edilir (Şekil 1).

Sabin Feldman Dye test (11,12,20,21,22,23,24)

- Anti-*Toxoplasma* antikorları varlığında, komplemanın klasik yoldan aktivasyonu sonrası parazit membranı ile reaksiyona girdiği ve tahrip ederek paraziti erittiği görülmüştür. Antikorlar bulunmadığında kompleman aktive olmadığı için takizoitler sağlam kalmaktadır.
- Sabin-Feldman Dye testi bu mekanizmaya dayanır; anti-*Toxoplasma* antikor ve kompleman varlığında canlı takizoitlerin erimesi saptanır. Özgül ve duyarlılığı yüksek bir testtir. Test sırasında canlı takizoitler, şüpheli hasta serumu ve kompleman ile muamele edilip inkübe edilir; metilen mavisi ilave edilerek eriyen takizoitlerin oranı belirlenir.
- **Pozitif** test - kompleman antikor birleşmesi sonucu takizoitler yıkıldığı için takizoitlerin ≥%50'si metilen mavisi ile boyanmamıştır.
- **Negatif** test - kompleman ve antikor birleşmesi gerçekleşmediği için takizoitlerin ≥%50'si metilen mavisi ile boyanmıştır.

IFAT (1,2,12,25)

- Bu testte -teflon kaplı lamaların çukurlarına fikse edilmiş- *T. gondii* takizoitleri şüpheli hasta örneği ile karşılaştırılır. Daha sonra antijen antikor kompleksi FITC ile konjuge edilmiş anti-insan antikorlarla karşılaştırılıp oluşan kompleksler floresan mikroskopta gözlenir.
- Toksoplazmoz tanısında başlıca IgG antikorların saptanmasında sık kullanılan duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir testtir.

ISAGA (1,2,12,23)

- Bu testte anti-insan IgM/IgA/IgE antikoru içeren plak çukurlarına şüpheli hastaya ait örnek eklenir ve inkübe edilir. Daha sonra formol ile işlemlenmiş takizoitler her çukura eklenir ve tekrar inkübe edilir.

- Ertesi gün çukurlarda oluşan aglütinasyon değerlendirilir.
- Eğer hasta serumu içinde anti-*Toxoplasma* IgM/IgA/IgE antikoru yoksa antijen-antikor kompleksi oluşmadığı için düğme şeklinde çökme oluşurken, anti-*Toxoplasma* IgM/IgA/IgE antikoru varlığında antijen-antikor kompleksi, çukurda bulutsu bir görünüm oluşturur.
- Tokso plazmoz tanısında IgM, IgA ve IgE antikorularının saptanmasında sık kullanılan duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir testtir.

Western blot (WB)(1,2,9)

- Tokso plazmoz tanısında IgG ve IgM antikorularının saptanmasında duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir testtir. Özellikle anne yeni doğan serumlarının karşılaştırılmasında sık kullanılır.
- Bu testte SDS-PAGE ile ayrıştırılmış ve nitrosellüloz membrana aktarılmış eriyik *T. gondii* antijeni şüpheli hasta örneği ile karşılaştırılır. Daha sonra antijen antikor kompleksi, uygun bir enzimle konjuge edilmiş anti-insan antikoru ve özgün substratlarla görünür hale getirilip oluşan bant paternleri incelenmektedir.

Goldmann-Witmer katsayısı (1,2,26)

- Oküler tokso plazmoz tanısı genelde fundoskopik muayene ile konulsa da etiyolojinin doğrulanması için laboratuvar tekniklerine ihtiyaç vardır.
- Bunlardan birisi Goldmann-Witmer katsayısının hesaplanması olup Aköz hümeör (AH) sıvısında özgül antikoruların, serumdaki özgül antikoru oranlanması ile hesaplanmaktadır.

$$\text{Goldmann-Witmer katsayısı} = \frac{\text{anti-Toxoplasma IgG (IU/mL) AH}}{\text{anti-Toxoplasma IgG (IU/mL) serum}} \times \frac{\text{serum total IgG (g/L)}}{\text{AH total IgG (g/L)}}$$

- Goldmann-Witmer katsayısı >2 olduğunda aktif enfeksiyon açısından önemli olarak kabul edilmektedir (Şekil 2).

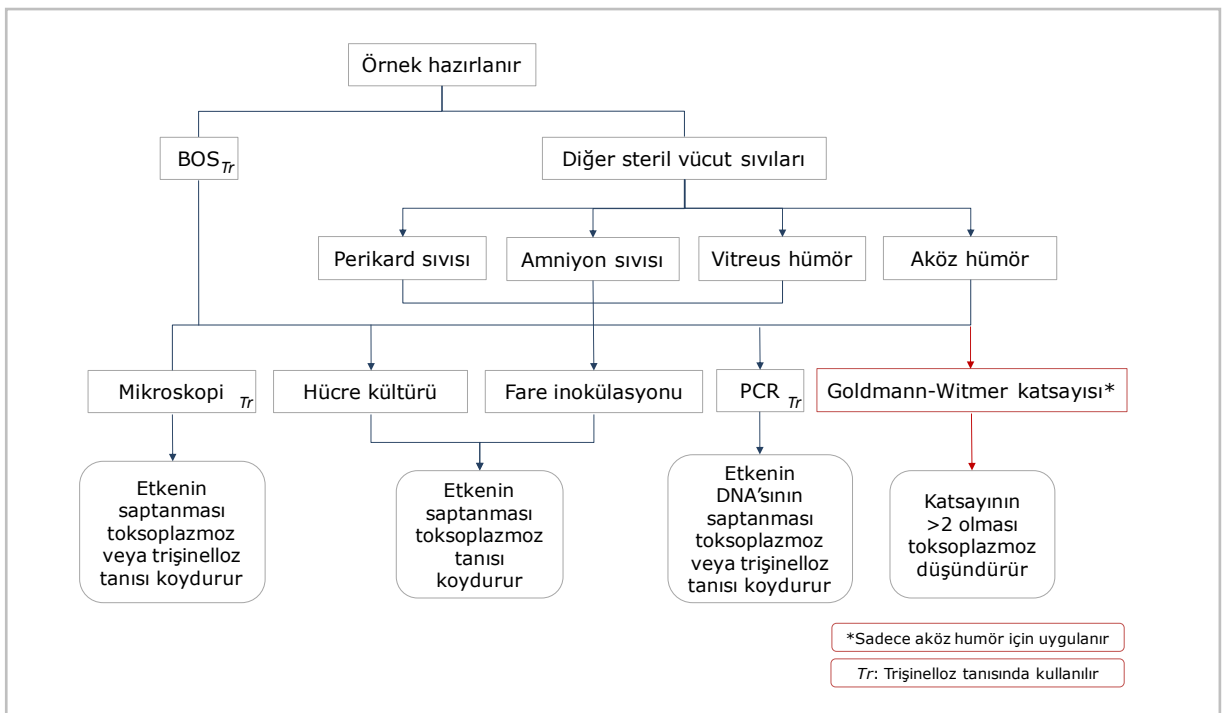
3.4. Mikroskopi

- *T. gondii* takizoitleri veya doku kistleri steril vücut sıvıları (BOS, idrar, solunum örnekleri, aköz hümeör, perikard, amniyon sıvısı vb.) ve tam kan 'buffy-coat' veya homojenize edilmiş doku örneklerinden yapılan yaymaların Giemsa boyaması ile saptanabilir (bkz. UMS, P-TP-03).
- Biyopsi materyalinden yapılan histolojik kesitlerin immunohistokimyasal boyanması ile de takizoit ve doku kisti görülebilir (Şekil 2).
- Mikroskopi genellikle belirli referans laboratuvarlarda veya patoloji laboratuvarlarında uygulanabilir. Rutin bir yöntem değildir (1,2).

3.5. Kültür

- Hücre kültürü veya fare inokülasyonu rutin yöntemler değildir; referans laboratuvarlarda uygulanabilir (Şekil 2).

- Hücre kültürü için; *T. gondii* içerdiği şüphelenilen aseptik şartlarda alınmış vücut sıvıları veya homojenize edilmiş dokular hücre kültürüne direk olarak ekim yapılabilir. ATCC kaynaklı HFF, HeLa, Vero, Hep-2 gibi hücre serilerinin ekim için sürekli hazır tutulması gereklidir. Ekim sonrası her gün *T. gondii* varlığı üstsıvı ve hücrelerde takip edilir (1,2).
- Fare inokülasyonu için; *T. gondii* içerdiği şüphelenilen aseptik şartlarda alınmış vücut sıvıları veya homojenize edilmiş dokular BALB/c, Swiss webster gibi 6-8 haftalık farelere (tercihen 3-5 fareye uygulanır) intraperitoneal yoldan insülin enjektörü ile uygulanır. Daha sonra fareler ilk 10 gün boyunca takizoit formunun gelişmesi açısından gözlenirken, sonraki 40 gün ise doku kisti oluşumu yönünden izlenir. Bu süreçler sırasında intraperitoneal sıvıda veya dokularda *T. gondii* varlığı gözlenir (1,2).



Şekil 2. Doku parazitlerinin tanısında BOS veya diğer steril vücut sıvılarına uygulanabilecek laboratuvar yöntemleri akış şeması.

3.6. Moleküler

- *T. gondii* DNA'sının saptanmasında kullanılan PCR yöntemlerinde duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olan gen bölgeleri [RE geni (Genbankası no: AF146527) veya B1 geni (Genbankası no: AF179871)] tercih edilir. Negatif, pozitif ve internal kontroller de değerlendirilmelidir.
- Yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip ticari kitler veya duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olduğu gösterilen metotların kullanılması önerilir (27).

DİKKAT! Rutin tanısal PCR uygulanmasına uygun laboratuvar şartları oluşmadan geçilmemelidir.

3.7. Saklama, Referans merkeze gönderme

- Pozitif serum örnekleri laboratuvarın kalite kontrol uygulamalarında pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere saklanmalıdır.
- Eğer ileri tanı veya moleküler testler için örnekler başka bir şehirdeki laboratuvara gönderilecekse; serum örnekleri alındıktan sonraki 48 saat içinde +4°C'de, BOS ve diğer steril vücut sıvıları ise 24 saat içinde oda sıcaklığında gönderilmelidir.
- Başka bir şehirdeki laboratuvara örnek gönderirken *paketleme* ve *taşıma* biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (28) (bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).

4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim

- Akut toksoplazmoz bildirim zorunlu bir hastalıktır ve bir salgınla ilişkili olabilir. Tanı koyulması halinde olguların kayıt ve bildirim için Sağlık Bakanlığının ilgili Rehberi" izlenmelidir (4).

4.1. Seroloji sonuçlarının yorumu

İmmün sistemi normal bir bireye ait

- Tek serum örneğinde Sabin-Feldman Dye test, IFAT veya ELISA (IgG, IgM, IgE veya IgA) ile antikor titresinin pozitif bulunması "olası tanı" bulgusudur. Tek serum örneğinde 'capture' IgM ELISA ile IgM'in pozitif bulunması "olası **akut** enfeksiyon" bulgusudur.
- Çift serum örneğinde serolojik sonucun negatif iken pozitifleşmesi veya antikor titresinin ≥ 4 kat artış göstermesi "kesin tanı" bulgusudur.

Gebelikte toksoplazmoz

- Gebelikte toksoplazmoz araştırılmasında serolojik izlem ve testlerin yorumu Şekil 1'de özetlenmiştir.

Transplant hastaları

- Transplant hastaları toksoplazmoz riskinin değerlendirilmesi amacıyla anti-*Toxoplasma* IgG antikorları için taranmalıdır. Akut edinsel toksoplazmoz bulunan bir kişi hem IgG hem de IgM antikorları için pozitif olabilirken, reaktivasyonu olan birinde normalde IgM cevabı oluşmaz ve IgG antikorlarında bir artış olması da kesin değildir.

Oküler toksoplazmoz

- Oküler toksoplazmoz genellikle konjenital toksoplazmoz sonucudur ve sıklıkla **serum anti-*Toxoplasma* IgG** düzeyinde bir artış meydana gelmediği gibi **serum IgM** antikorlarına da rastlanmaz. Bu nedenle seroloji, seropozitif kişilerde konjenital oküler toksoplazmoz dışlamak açısından faydalıdır.
- Aköz hümeorda anti-*Toxoplasma* antikorlarının; aköz ve vitreus hümeörden PCR ya da kültür ile parazitin tespiti ile tanıya gidilebilir.

- Aköz hümörda bulunan özgül antikorların, serum özgül antikorlarına oranlanması ile elde edilen Goldmann-Witmer katsayısının >2 olması aktif enfeksiyon açısından önemli olarak kabul edilmektedir.
- Eğer göz bulguları edinilmiş (akkiz) tokso plazmoza bağlı ise, hastanın hikayesinde influenzaya benzer bir hastalık veya lenfadenopati gibi bulgular bulunabilir ve serumda da IgM pozitifliği saptanabilir.

4.2. Diğer yöntemlere ait sonuçların yorumu

- Mikroskopik inceleme (Giemsa, histolojik ya da immünohistokimyasal boyama) ile örnekte *T. gondii* görülmesi **kesin tanı** bulgusudur.
- Parazitin izole edilmesi (hücre kültürü, fare inokülasyonu) **kesin tanı** bulgusudur.
- PCR ile (*özellikle* amniyotik sıvı, aköz hümör ve AIDS'de BOS örneğinden) elde edilen pozitiflik **kesin tanı** koydurur. Negatif PCR sonucu tokso plazmozu dışlamaz.

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Serolojik yöntemler için tanı amacı ile kullanılan piyasada çok çeşitli ürünler bulunmaktadır. Bunların duyarlılık ve özgüllük açısından iyi değerlendirildikten sonra rutin kullanıma geçilmesi önemlidir.
- Anti-*Toxoplasma* IgM'in enfeksiyonun başlangıcından yıllar sonra saptanması testlerin sonuçlarının yanlış yorumlanmasına yol açabilir. IgG avidite testinde düşük aviditeli antikorların üç aydan fazla süreyle bulunması, test sonuçlarının yanlış yorumlanmasına yol açabilir.
- Erişkinlerde IgA antikorları bir yıl veya daha fazla süre ile pozitif kalabilir; bu nedenle erken dönem enfeksiyonun ayırt edilmesinde çok az önemi bulunmaktadır.
- IgE'nin araştırıldığı testler tek başına kullanılmamalıdır.
- Oküler tokso plazmozda Goldmann-Witmer katsayısının hesaplanması için alınan örneğin özellikle aköz hümör olmasına dikkat edilmelidir.
- Biyopsi incelemelerinde örnek alınan bölgeye bağlı olarak mikroskopide yalancı negatiflik görülebilir ve bu nedenle işlemin tekrarlanması gerekebilir. Giemsa boyalı yaymaların mikroskopik incelemesi hızlı sonuç vermesine rağmen duyarlılığı çok düşüktür.
- *T. gondii* izolasyonu için gönderilen her örnekte kültür yöntemleri ile parazit saptanamayabilir. Fare inokülasyonunun duyarlılığı maternal enfeksiyonun gestasyonun 3. trimesterinde olması durumunda yüksektir. Hamile kadının primetamin ve sülfonamid ile tedavi edilmesinin fare inokülasyon duyarlılığını azaltmaktadır. Hücre kültürü yönteminin fare inokülasyonuna göre daha az duyarlı olduğu gösterilmiştir (2,27).
- Yanlış PCR pozitif sonuçların kaynakları sıklıkla kontaminasyon veya özgül olmayan primer prob seçimi sonucu hastanın DNA'sına özgül olmayan bağlanmalardır (2).

- Yanlış PCR negatif sonuçların kaynakları ise şunlar olabilir: (i) parazitin plasentadan gecikmiş geçişi, (ii) amniyon sıvısının içinde çok az parazit yükü olması ve amniyosentez sırasında bu amniyon sıvısının çok az bir kısmının kullanılması, (iii) örneklerin (amniyon sıvısı, aköz hümör) uygun zamanda ve şekilde alınmaması, (iv) teknik problemler (hedef gen bölgesi ve primer prob seçimi, inhibisyon, malzeme sorunları, teknisyen manipülasyonu, vb.).
- PCR ile negatif sonuç alınması toksoplazmozu dışlamaz.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Toksoplazmozun Mikrobiyolojik Tanısı) ayrıca aşağıda verilen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve ek bilgi için bu belgelere bakılması önerilir:

UMS, P-TP-01	Mikroskop kalibrasyonu
UMS, P-TP-06	Giemsa boyama
UMS, P-TP-07	Kalın damla ve ince yayma
UMS, P-ÖY-03	Kan ve kemik iliği örneklerinin parazitolojik incelemesi
UMS, GEN-OY-01	Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet* 2004;363(9425):1965-76
- 2 Robert-Gangneux F, Dardé ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev* 2012;25(2):264-96
- 3 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 4 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 5 Leber AL, Novak-Weekley S. Intestinal and urogenital amebae, flagellates, and ciliates. *In: Versalovic J (ed in chief). Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 2149 - 2171.
- 6 CDC. Toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*). DPDx - Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern. <http://www.cdc.gov/dpdx/toxoplasmosis/index.html> (son erişim tarihi: 11.03.2014)
- 7 Costa JM, Bretagne S. Variation of B1 gene and AF146527 repeat element copy numbers according to *Toxoplasma gondii* strains assessed using real-time quantitative PCR. *Clin Microbiol* 2012;50(4):1452-4
- 8 Döskaya M, Degirmenci A, Çiçek C, Ak M, Korkmaz M, Gürüz Y, Uner A. Behaviour of *Toxoplasma gondii* RH Ankara strain tachyzoites during continuous production in various cell lines. *Parasitology* 2006;132(Pt 3):315-9
- 9 Değirmenci A, Döskaya M, Caner A, Cicek C, Korkmaz M, Gürüz Y, Uner A. *Toxoplasma gondii* RH Ankara: production of evolving tachyzoites using a novel cell culture method. *Exp Parasitol* 2011;128(1):1-8

- 10 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. *In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.2.1-4*
- 11 NPHS Wales *Toxoplasma* reference laboratory. SOPs, Swansea-U.K. 2003
- 12 Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 2004;42(3):941-5
- 13 Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971;8(9):871-4
- 14 Francis JM, Payne RA, Joynson DH. Rapid indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting antitoxoplasma IgG: comparison with dye test. *J Clin Pathol.* 1988;41(7):802-5
- 15 Payne RA, Joynson DH, Balfour AH, Harford JP, Fleck DG, Mythen M, Saunders RJ. Public Health Laboratory Service enzyme linked immunosorbent assay for detecting *Toxoplasma* specific IgM antibody. *J Clin Pathol* 1987;40(3):276-81
- 16 Voller A, Bidwell DE, Bartlett A, Fleck DG, Perkins M, Oladehin B. A microplate enzyme-immunoassay for *toxoplasma* antibody. *J Clin Pathol* 1976;29(2):150-3
- 17 van Loon AM, van der Logt JT, Heessen FW, van der Veen J. Enzyme-linked immunosorbent assay that uses labeled antigen for detection of immunoglobulin M and A antibodies in toxoplasmosis: comparison with indirect immunofluorescence and double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1983;17(6):997-1004
- 18 Liang L, Döşkaya M, Juarez S, Caner A, Jasinskas A, Tan X, Hajagos BE, Bradley PJ, Korkmaz M, Gürüz Y, Felgner PL, Davies DH. Identification of potential serodiagnostic and subunit vaccine antigens by antibody profiling of toxoplasmosis cases in Turkey. *Mol Cell Proteomics* 2011;10(7):M110.006916
- 19 Joynson DHM, Payne RA, Rawal BK. Potential role of IgG avidity for diagnosing toxoplasmosis. *J Clin Pathol* 1990;43(12):1032-3
- 20 Sabin AB, Feldman HA. Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoan Parasite (*Toxoplasma*). *Science* 1948;108(2815):660-3
- 21 Joynson DHM, Wreghitt TG. Toxoplasmosis. Cambridge, England: Cambridge University Press; 2005
- 22 Ho-Yen DO, Joss AWL. Human Toxoplasmosis. New York, NY: Oxford University Press; 1992
- 23 Caner A, Döşkaya M, Karasu Z, Değirmenci A, Guy E, Kiliç M, Zeytunlu M, Francis J, Bozoklar A, Gürüz Y. Incidence and diagnosis of active *toxoplasma* infection among liver transplant recipients in Western Turkey. *Liver Transpl* 2008;14(10):1526-32
- 24 Toksoplazmoz Tanısı için Sabin-Feldman Dye testi ve ELISA Testinin Standart Uygulama Prosedürü. Bildirimi Zorunlu Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısına Yönelik Standart Uygulama Prosedürleri. Refik Saydam Hıfzısıssıhha Merkezi Başkanlığı Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Ankara. 2008, p.279-80
- 25 Fulton, JD, Voller A. Evaluation of immunofluorescent and direct agglutination methods for detection of specific *Toxoplasma* antibodies. *Br Med J* 1964;2(5418):1173-5
- 26 Robert-Gangneux F, Binisti P, Antonetti D, Brezin A, Yera H, Dupouy-Camet J. Usefulness of immunoblotting and Goldmann-Witmer coefficient for biological diagnosis of toxoplasmic retinochoroiditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23(1):34-8
- 27 Fricker-Hidalgo H, Pelloux H, Racinet C, Grefenstette I, Bost-Bru C, Goullier-Fleuret A, Ambroise-Thomas P. Detection of *Toxoplasma gondii* in 94 placentae from infected women by polymerase chain reaction, in vivo, and in vitro cultures. *Placenta* 1998;19(7):545-9
- 28 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Trişinellozun (*Trichinella* spp enfeksiyonunun) **Mikrobiyolojik Tanısı**

Hazırlayan Birim	Klinik Parazitoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Parazitoloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	P-MT-09
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik
----------	-------	------------

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
TEKNİK BİLGİLER	4
1 Hedef mikroorganizmalar	4
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	4
3 Trişinelloz tanısında kullanılan teknikler.....	6
4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim	8
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	8
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	9
KAYNAKLAR.....	10

Kapsam ve Amaç

Trişinelloz (trişinoz), *Trichinella* spp larvaları ile enfekte etlerin çiğ veya az pişmiş olarak tüketilmesi ile gelişen bir enfeksiyondur. İnsanlara enfekte domuz etlerinin çiğ veya az pişmiş olarak tüketilmesi ile bulaşır. Sorumlu etlerin en başında evcil ya da yabani domuzlar gelmekteyse de bunlardan başka at, ayı, diğer memeli hayvanlar ile tropikal bölgelerde sürüngenler, hatta kuşlar bile *Trichinella* türlerini kasları içinde barındırabilmektedir.

Trişinelloz bildirim zorunlu bir hastalıktır (1,2). Ülkemizde zaman zaman çoğu kaçak et kesimi ile ilişkili salgınları bildirilmiştir. İzmir’de, Aralık 2003’de çıkan ve *Trichinella britovi*’nin etken olduğu bilinen en büyük salgında 600’den fazla kişinin etkilendiği rapor edilmiştir (3,4,5).

Semptomatik bireylerde, eozinofili, ateş, kas ağrıları ve periorbital ödem sık görülen belirti ve semptomlardır. Tanısı, enfeksiyon düşünülen kişilerden alınan kas biyopsisi, dışkı, BOS, kan gibi örneklerin incelenmesi ile konulur. Rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarının trişinelloz tanısı talebi ile karşılaşma olasılığı düşük görünüyorsa da bu UMS’de laboratuvarların gerektiğinde tanı koyabilmeleri veya ilgili diğer laboratuvara yönlendirebilecek bilgiye sahip olabilmeleri için trişinelloz tanısında kullanılan yöntemlere dair bir rehber sunulmaktadır.

Kısaltmalar ve Tanımlar

Aköz hümeör Siliyer epitelden salgılanan şeffaf, plazmaya benzer bir sıvıdır; daha az protein içerir. Lens ile kornea arasında bulunur.

WB Western blot

Genel Bilgi

Trichinella türleri *Trichinelloidea* ailesinde yer alan nematodlardır (yuvarlak solucanlar). İnsanda hastalık yapan en önemli tür *Trichinella spiralis*’tir. Fakat *Trichinella pseudospiralis* ve *Trichinella britovi* de insanda hastalık etkeni olarak sık görülen diğer türlerdir.

Trişinelloz, *Trichinella* spp larvaları bulunan domuz veya diğer bir hayvan (sıklıkla at) etinin çiğ veya az pişmiş yenmesini takiben, parazitin konağın çizgili kaslarına yerleşmesi sonucu meydana gelen bir enfeksiyondur. Dünyada oldukça yaygındır.

Trichinella spp’nin yaşam döngüsü oldukça basittir; enfekte memeli hayvan hem erişkin formları bulunduran kesin konak, hem de kaslarında enfektif larval formları bulunduran ara konak olarak işlev görür. Evcil domuzlar bu yuvarlak solucanın insanlara bulaşmasında en önemli konak vazifesini görmektedirler. Parazitik döngünün domuz ve kemirgenler arasında ahırlarda sürdüğü tahmin edilmektedir (6).

Trichinella spp larvalarını içeren çiğ veya iyi pişmemiş etler yenildiğinde larva bağırsakta kistten çıkar ve 24-48 saatte olgunlaşır. Dişiler bağırsak mukozasında derinlere göç ederek burada larvalarını doğurur.

Larvalar kan ve lenf damarlarına girerek kan dolaşımına karışırlar. Vücudun değişik doku ve boşluklarına geçerler. Genellikle iskelet kaslarına yerleşir, gelişimlerini sürdürürler (6).

Larvaların kaslarda yol açtığı klinik tablo erişkinlerin bağırsaklarda neden olduğu semptomlardan daha ciddidir. Bağırsakta çok sayıda parazit bulunduğunda şiddetli bir kataral yangı ile ishal ve sindirim kanalındaki kanamaya bağlı olarak koyu renkte dışkı görülür (3,5).

Bu hastalıkta saptanabilen klinik belirtiler gastrointestinal yakınmalara ek olarak ateş, yüz ve göz kapaklarında ödem, kornea çevresinde, konjonktivada, retinada kanamalar, deri döküntüleri, kas ağrıları, solunum şikayetleri, göğüs ağrıları, larvaların beyin tutulumu yapması sonucu gelişen baş ağrıları, baş dönmesi, kulak çınlaması gibi sinir sistemi belirtileri, aşırı zayıflık, miyokard yetmezliği olarak sayılabilir (7,8).

Trişinellozun tanısı kas biyopsisi, dışkı, BOS, kan gibi örneklerden yapılan laboratuvar incelemeleri ile konulmaktadır. Bu amaçla mikroskopik inceleme, serolojik yöntemler ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır (4,5,6).

Dünyada 11 milyon insanın *Trichinella* spp ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir. Türkiye’de 2003 yılında çıkan trişinelloz salgınında 600’den fazla vaka saptanmıştır. Parazitin, denetimsiz hayvan kesimi ve tüketimine bağlı olarak gıda kaynaklı salgın yapabilme potansiyeli vardır (4,5).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizmalar

Trichinella spiralis ve diğer *Trichinella* spp

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

Potansiyel enfeksiyöz organizmalar içerebileceği için parazitolojik inceleme örnekleri asgari BGD2 laboratuvar şartlarında incelenmeli ve daima “Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi”nde belirtilen standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır.

Serolojik çalışmalarda en ciddi risk kan-kaynaklı patojenlerin (özellikle HIV ve hepatit etkenleri) bulaşması riskidir. Serum ayırma işlemi sırasında ve testler yapılırken daima eldiven giyilmelidir.

Lamlar, boyanmış olsun olmasın, **kesici-delici atık** kabul edilir ve kesinlikle kesici-delici atık kutusuna atılırlar! Diğer biyolojik kirlilerin bulunduğu torbalara atılmaları halinde torbayı deler ve ciddi enfeksiyöz risk oluştururlar!

Güvenlik uyarısı! *Trichinella* spp larvaları oldukça **enfektiftir!** Bu prosedür uygulanırken **daima** eldiven giyilmelidir.

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) tekniklerin uygulanmasından önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) tekniğe tüm yönleriyle aşina olmalı, ve (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

İnvaziv bir teknik kullanılarak alınmış örnekler en kısa sürede ve **mutlaka** Tıbbi Mikrobiyoloji /Tıbbi Parazitoloji Uzmanı tarafından bizzat incelenmeli, değerlendirilmeli ve sonuçlandırılmalıdır.

2.3. Örnek, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

Şüpheli gıda tüketimi öyküsü olan ve eozinofili, ateş, kas ağrıları ve periorbital ödem şikayetleri ile başvuran bireylerde trişinelloz tanısı için serum, kas biyopsi örneği, BOS ve dışkı örneği incelenebilir.

Örneklerinin alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden edinilebilir. Aşağıda bazı önemli noktalara tekrar dikkat çekilmektedir. Buna göre:

- Serum (ve gerekiyorsa BOS) enfeksiyondan en erken 10 gün sonra alınmalıdır. Serum örneği 2-4 hafta sonra tekrar alınmalı ve antikor titrelerinde artış olup olmadığı takip edilmelidir.
- NOT: Parazitolojik (mikroskobik) inceleme için alınan BOS örneği asla buzdolabına konmaz, asla dondurulmaz!
- Kas biyopsisi enfeksiyondan en erken 10 gün sonra, ideal olarak ise 2-3 hafta sonra örnek alınmalıdır. Örnek aseptik koşullarda, hekim tarafından alınır. Kültür yapılacaksa her bir dokudan en az 2 parça 2-3 g örnek alınmalıdır. Formol eklenmemelidir!
 - Dışkı - trişinelloz tanısında öncelikli bir inceleme örneği olmamakla birlikte incelenebilir. Örneklerinin alınması ve incelenmesinde izlenecek prosedür için ayrıca *bkz.* UMS P-ÖY-01.

Reaktif /Kit

- Serolojik inceleme için piyasada özgül antikorların saptanmasına yönelik IHA, IFA, ELISA veya WB kitleri mevcuttur.
- Moleküler testler için ticari olarak hazır DNA izolasyon ve PCR kitleri kullanılabilir ya da bütün enzim, primerler ve diğer reaktiflerden *geleneksel* PCR uygulanabilir.

Diğer gereç, donanım

Serolojik yöntemler için;

- Floresan mikroskobu (IFA testi kullanılıyorsa)
- ELISA yıkayıcı, ELISA okuyucu, mikropipetler
- Ayarlanabilir otomatik mikropipetler (5-1000 µL) ve pipet uçları
- Santrifüj

Mikroskobik yöntemler için;

- Mikroskop, binoküler (rutin) – 10× (düşük), 40× (yüksek kuru), 100× (immersiyon) objektifleri ve 10× oküleri olan tercih edilir.

NOT: İnceleme duyarlılığı düşük olduğu için 5× oküler önerilmez! (9).

- Lamlar (25×75 mm; tercihen kenarı rodajlı) ve lameller (22×22 mm)
- Pastör pipetleri, 1 ve 10 mL pipetler, mikropipetler ve pipet uçları
- Biyolojik atık kapları, kesici-delici atık kabı

PCR ve diğer moleküler yöntemler için;

- En az üç ayrı oda - Nükleik asit ekstraksiyonu, PCR karışımı hazırlama, amplifikasyon ve sonuç gözetimi için ayrı odalar. İdeal olarak PCR karışımı hazırlama odası (temiz) pozitif basınçlı, agaroz jel elektroforezi yapılan oda (kirli) negatif basınçlı havalandırmaya sahip olmalıdır.
- Donanım – BGK, soğutmalı mikrosantrifüj, hassas terazi, vorteks, su banyosu, PCR ısı döngü cihazı (gerçek zamanlı veya geleneksel), mikrodalga fırın, jel görüntüleme sistemi, elektroforez ünitesi vb.

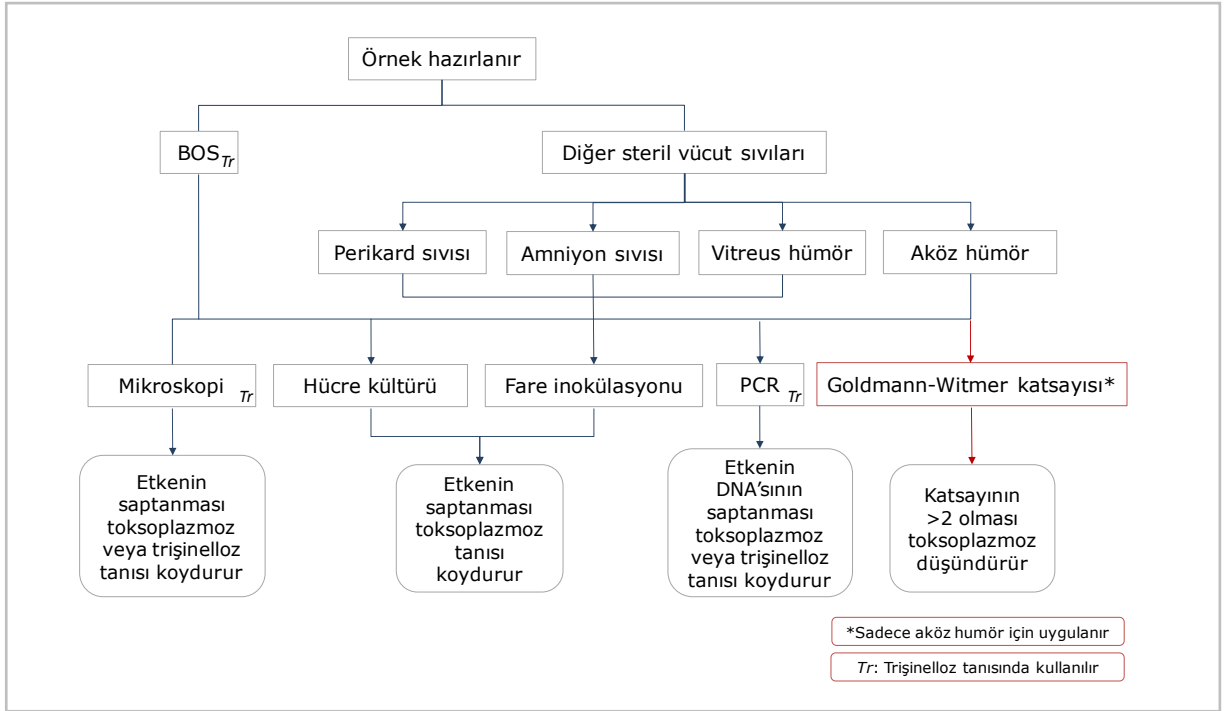
2.4. Kalite kontrol

- Tüm ekipmanın bakım ve kalibrasyonu yapılmış olmalıdır.
- Mikroskop belirli aralıklarla (yoğun kullanılıyorsa yılda en az bir kez) kalibre edilmelidir. Mikroskoba herhangi bir parça eklenmesi veya değiştirilmesi durumunda da kalibrasyon yapılmalıdır. Kalibrasyon için kullanılmış optikler mikroskobun üzerinde olmalıdır. Tüm objektifler için kalibrasyon faktörleri göz önündeki bir panoda asılı olmalıdır (bkz. UMS, P-TP-01 Mikroskop kalibrasyonu) (9).
- Her yeni -hazırlanmış veya ticari- reaktif seti veya kit lotu, kullanıma sokulmadan önce pozitif kalite kontrol örnekleri ile test edilmelidir. Kullanılan kitlerin (moleküler testler için olanlar dâhil) son kullanım tarihleri ve saklama koşullarına dikkat edilmelidir. Kontrol örnekleri kullanarak bu etkinlik değerlendirilebilir.
- Tüm kalite kontrol sonuçları kaydedilmelidir.

3 Trişinelloz tanısında kullanılan teknikler

3.1. Serolojik tanı

- Trişinelloz tanısında en yaygın başvurulan yöntem serolojik testlerdir. Serolojik inceleme için piyasada özgül antikörlerin saptanmasına yönelik IHA, IFA, ELISA kitleri mevcuttur. Yüksek duyarlılığa ve genellikle %100'e yakın özgüllüğe sahiptirler (6).
- *T. spiralis* IgG antikor yanıtı hastaların çoğunda (%80-100) enfeksiyondan 3 ila 5 hafta sonra gelişir. Bu nedenle akut hastalık esnasında IgG antikor titreleri negatif bulunabilir. Ancak 2-4 hafta sonra test tekrarlanmalıdır. En sık ELISA-IgG kullanılmaktadır.
- *Trichinella* antikörlerinin düşük olasılıkla da olsa diğer parazitlerle çapraz reaksiyon verebiliyor olması, ELISA testi ile zayıf pozitiflik elde edildiğinde belirsizliğe yol açabilir. Böyle durumlarda Western blot (WB) yöntemi ile özgül bantların görülmesi serolojik sonucu destekleyicidir.
- Tipik klinik bulgular ve öykü dikkate alınarak karar verilmelidir.



Şekil 2. Doku parazitlerinin tanısında BOS veya diğer steril vücut sıvılarına uygulanabilecek laboratuvar yöntemleri akış şeması.

3.2. Kas biyopsisinde larvaların görülmesi

- Kas biyopsisi örneklerinden mikroskopik inceleme için preparatlar basitçe iki lam arasında kas parçasının sıkıştırılarak ezilmesi ile hazırlanabilir. Böyle hazırlanmış preparatların direkt mikroskopta incelenmesi ile larvalar gözlenebilir (6).
- Histopatolojik incelemeler ile de kas dokusunda larvalar gözlenebilir.
- BOS'un mikroskopik incelemesinde nadir de olsa (direkt yayma veya rutin santrifüj sonrası) parazitin larvası görülebilir.

3.3. Dışkı incelemesi

- Dışkı trişinelloz tanısında öncelikli bir inceleme örneği değildir. Nitekim, çoğu zaman parazit, başka bir amaçla yapılan dışkı incelemeleri sırasında tesadüfen saptanabilir. Bununla birlikte, enfekte et yenildikten sonraki 5-15 gün içerisinde dışkıda erişkin formlar veya larvalar görülebilmektedir (8).

3.4. Moleküler tanı

- Kas biyopsisinden PCR yapılabilir.
- *T. spiralis* için türe özgü bir 'rapid-cycle' PCR geliştirilmiştir. Ancak bu ve benzeri metotların gerek potansiyel enfekte hayvan kaynaklı gıdaların taranmasında, gerekse şüpheli insan vakalarının tanısında nasıl kullanılabileceği henüz tam olarak netleşmemiştir (6).

3.5. Saklama, Referans merkeze gönderme

- Pozitif kas örneği %10 formol içinde eğitim ve kalite kontrol uygulamalarında kullanılmak üzere saklanmalıdır. Gerekli bilgiler lam üzerine yazılmalı ve bir arşivleme sistemi kurulmalıdır.
- Serum veya kas biyopsi örnekleri doğrulama amaçlı testler (ileri tanı veya moleküler testler) için başka bir merkeze gönderilecekse alındıktan sonraki 48 saat içinde +4°C'de taşınmalıdır. BOS ise oda sıcaklığında gönderilir. Örnekler kesinlikle sızdırmaz örnek kaplarına alınmış olmalıdır ve bu kaplarla taşınmalıdır.
- Eğer ileri tanı veya moleküler testler için örnekler başka bir şehirdeki laboratuvara gönderilecekse, öncelikle *paketlenme* ve *taşıma* biyolojik materyal taşıma şartlarına uygun olmalıdır (10) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).

4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim

- Serolojik incelemede IgG antikorları için 2-4 hafta ara ile alınan örneklerde serokonversiyonun gösterilmesi (antikor titrelerinin negatif iken pozitifleşmesi) veya ≥ 4 kat titre artışının gösterilmesi ve "kesin tanı" koydurur.
- Serolojik incelemelerde çapraz reaksiyondan şüphelenildiğinde western blotting yapılabilir. Özgül bantların görülmesi tanıyı destekler.
- Kas biyopsisinin (ve nadiren BOS'un) mikroskopik incelemesinde larvaların görülmesi "kesin tanı" bulgusudur.
- Dışkı incelemesinde erişkin *Trichinella* spp veya larvasının görülmesi "kesin tanı" bulgusudur.
- Eğer larva (dışkıda erişkinleri de) görülmüş ise sonuç cins adı ve tür adı yazılarak rapor edilmelidir. Örnek rapor aşağıdaki gibi olabilir:
 - "Kas biyopsisinden yapılan mikroskopik incelemede *Trichinella spiralis* larvaları görülmüştür."
 - "Dışkının mikroskopik incelemesinde *Trichinella* spp erişkin ve larvaları görülmüştür."
- Trişinelloz bildirim zorunlu bir hastalıktır ve bir salgınla ilişkili olabilir. Pozitif sonuç vakit geçirmeden ilgili birime haber verilmelidir ve olguların kayıt ve bildirimi için Sağlık Bakanlığının "Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi" izlenmelidir (1,2).

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Antikor yanıtı hastaların çoğunda enfeksiyondan 3-5 hafta sonra başlar. Bu nedenle akut hastalık esnasında *Trichinella*-IgG antikor titreleri negatif bulunabilir. Bir haç hafta sonra tekrarlanan testin pozitive dönüşmesi (antikor yanıtının gelişmesi) hastalığın güçlü kanıtıdır.

- BOS'un mikroskopisinde akut dönemde parazitin larvası görülmeyebilir.
- Kas biyopsisi incelemesinde örnek alınan bölgeye bağlı olarak yalancı negatiflik görülebilir. Bu nedenle işlemin tekrarlanması gerekebilir.
- Dışkının mikroskopik incelemesinde 1-2 gün ara ile 2. ve gerekirse 3. örnek incelenmelidir. Kronik dönemde dışkı örneklerinde parazit larvası ve erişkinine rastlanmayabilir.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Trişinellozun Mikrobiyolojik Tanısı) ayrıca aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve gerekli bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

UMS, P-ÖY-01 Dışkı örneklerinin parazitolojik incelemesi

UMS, P-TP-01 Mikroskop kalibrasyonu

UMS, GEN-OY-01 Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 2 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurveLa bReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 3 Trişineloz. Genelge 2004 / 28. T.C. Sağlık Bakanlığı. Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü. Bulaşıcı ve Salgın Hastalıklar Kontrolü Daire Başkanlığı, Zoonoz ve Paraziter Hastalıklar Şube Müdürlüğü, Ankara. Yazı No: 03557, 05.03.2004
- 4 Bayram Delibaş S, Usluca S, Arcak S, Özkoça S, Akısü Ç. Evaluation of specific antibody responses in early stage human trichinellosis. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2013;33(1): 159-163
- 5 Akar S, Gurler O, Pozio E, Onen F, Sari I, Gerceker E, Gunes AJ, Akinci B, Birlik M, Akkoc N. Frequency and severity of musculoskeletal symptoms in humans during an outbreak of trichinellosis caused by *Trichinella britovi*. *J Parasitol* 2007;93:341-344
- 6 Procop GW, Neafie RC. Less common helminths: *Trichinella* species. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p.2245
- 7 CDC. Trichinellosis (also known as Trichinosis).
<http://www.cdc.gov/parasites/trichinellosis/epi.html> (son erişim tarihi: 27.01.2014)
- 8 Garcia LS. Tissue nematodes. In: Garcia LS (ed). *Diagnostic Medical Parasitology*. 4th ed., ASM Press, Washington D.C. 2001, p.296-328
- 9 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.2.1-4
- 10 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Üriner Şistozomiyazın (*Schistosoma haematobium* enfeksiyonunun) Mikrobiyolojik Tanısı

Hazırlayan Birim	Klinik Parazitoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Parazitoloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	P-MT-10
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
GENEL BİLGİ	3
TEKNİK BİLGİLER	4
1 Hedef mikroorganizma	4
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	4
3 Üriner şistozomiyaz tanısında kullanılan teknikler.....	6
4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim	10
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	10
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	10
KAYNAKLAR	11

Kapsam ve Amaç

Şistozomiyaz (bilharyaz) dünyada sıtmadan sonra ikinci en yaygın tropikal hastalıktır. Hastalığın iki formu vardır: bağırsak formu ve üriner form. Epidemiyolojik olarak ülkemizi ilgilendiren üriner şistozomiyazdır. Doğrusu, hepsi yurt dışı kaynaklı olan çok az sayıda vaka kaydedilmiş olmakla birlikte, üriner şistozomiyaz ülkemizde bildirim zorunlu hastalıklar arasında yer alır (1,2).

Ülkemizde GAP (Güneydoğu Anadolu Projesi) ile önemli hale gelen bu parazit, sınırlarımıza yakın bölgelerde endemik olarak görülmektedir. Özellikle Proje sonrasında bölgede iklimin değişmesi parazitin ara konakçısı *Bulinus*'ların popülasyonunda artışa, bu da hastalığın bölgede bir anda ortaya çıkmasına neden olabilecektir. Bundan dolayı mikrobiyoloji laboratuvarlarının bu hastalığın tanı yöntemleri üzerine bilgi ve becerilerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Çünkü hastalığın tanısında oluşabilecek bir gecikme etkenin daha büyük bir popülasyona yayılmasına neden olacak, problemin çözümü zorlaşacaktır.

Bu UMS'de de laboratuvarların gerektiğinde tanı koyabilmeleri veya ilgili diğer laboratuvara yönlendirebilecek bilgiye sahip olabilmeleri için üriner şistozomiyaz tanısında kullanılan yöntemlere dair bir rehber sunulmaktadır.

Genel Bilgi

Şistozomiyaz digenetik kan trematodları tarafından meydana getirilen bir hastalıktır. Şistozomiyaz sıtmayı takiben dünyada en yaygın ikinci tropikal hastalıktır ve Afrika, Asya ve Güney Amerika'nın büyük bir kesiminde ağır morbidite nedenidir. 600 milyon kişi risk altındadır; 200 milyon kişi enfektedir ve bunun 20 milyon kadarı ağır hasta dır. DSÖ'nün ana hedefi hastalığı kontrol altına almak, güçlü sürveyans ve kontrol programları ile hastalığı azaltmak ve hatta bazı ülkelerde şistozomiyazı elimine etmektir (3,4).

Klinik hastalığın üriner ve bağırsak şistozomiyazı olmak üzere iki formu vardır. Üriner formda etken *Schistosoma haematobium*'dur. Bağırsak formunda ise *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma intercalatum* ve *Schistosoma mekongi* etken olabilir (3,4).

Şistozomiyaz kronik bir hastalıktır. Parazitin vücuda girmesinden sonraki birkaç gün içinde deride kızarıklık ve kaşıntı gelişebilir. 1-2 ay içinde ateş, titreme, öksürük, kas ağrıları başlayabilir. Çoğu kişi bu erken dönemde asemptomatiktir.

Bağırsak şistozomiyazı karın ağrısı, dizanteri tablosuna benzer ishal, dışkıda mukus, iştahsızlık, kilo kaybı, bulantı, karın ağrısı ve anemi ile seyreder. Üriner şistozomiyazda ise en belirgin semptomlar dizüri, hematüri, idrar yapma güçlüğü, perianal ve pubik bölgeye vuran ağrılardır. Genelde hastalık kişilerde güç kaybına bağlı çalışmama, çocuklarda bedensel ve zihinsel gerilik, zayıflama ve halsizliğe neden olur. Ayrıca, ilerleyen enfeksiyonlarda tutulan organlarda granülomatöz reaksiyonlara ve fibrozise yol açar. Portal hipertansiyon ve splenomegali (*S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. mansoni*); pulmoner hipertansiyon (*S. mansoni*, *S. japonicum*, daha nadiren *S. haematobium*); glomerülonefrit ve merkezi sinir sistemi lezyonlarına bağlı belirtiler ortaya çıkabilir (3,4,5).

Enfeksiyon döngüsü şu şekildedir: *Schistosoma* yumurtaları enfekte kişilerin idrar veya dışkıları ile tatlı suya geçer ve suda belirli salyangoz türlerinin içinde çoğalmaya başlar. Yaşamının belli bir evresinde salyangozu terk ederek suya geçen parazit suda yaklaşık 48 saat canlı kalır. Parazit bu dönemde suya giren, yüzen, yıkanan bireylerin derisini delerek vücuda girer. *Schistosoma* vücutta en sık bağırsak veya mesane derin venlerine yerleşir; haftalar içinde erişkin forma döner ve dişi parazit yumurta üretmeye başlar (6).

Dışkı ve idrarda yumurtaların mikroskopik tespiti tanı için en pratik metottur. *S. mansoni* veya *S. japonicum* şüpheli enfeksiyonlarda dışkı ve *S. haematobium*'dan şüphelenildiğinde idrar incelemesi yapılmalıdır. İdrar örnekleri santrifüj edilir ve elde edilen çökeltinin mikroskopik incelenmesi yapılır. İdrar örnekleri membran filrasyon ile süzülerek de incelenebilir (5,7). Dışkı ve idrar incelemeleri negatif olduğunda yumurtalar doku biyopsisi (bütün türler için rektal biyopsi ve *S. haematobium* için idrar kesesi biyopsisi) ile görülebilir (6,8).

Örneklerden mirasidyumları yumurtadan çıkarma metodu kullanılarak da tanıya gidilebilir. Bu yöntemle çalışırken çok dikkatli olunmalıdır. Çünkü çıkan mirasidyumlar enfektiftir (8).

Antikor tespiti, şistozomiyazın endemik olduğu bölgelere seyahat eden ve dışkı veya idrar örneklerinde yumurtaların gösterilemediği kişilerde kullanılabilir. Şistozomiyazın serolojik tanısında kullanılan testler arasında duyarlılık ve özgüllük açısından farklılıklar bulunmaktadır. Bu durum hem kullanılan antijen tipinden (ham, pürifiye, erişkin, yumurta, serkaryal) hem de test prosedüründen kaynaklanmaktadır (5,6). Ayrıca şistozomiyazda kan globulinleri arttığından "formol-jel reaksiyonu" %75 oranında pozitif sonuç verir. Ancak günümüzde hastalığa özgü olmayan formol-jel testi artık kullanılmamaktadır (3,4).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizma

Schistosoma haematobium

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

Potansiyel enfeksiyöz organizmalar içerebileceği için parazitolojik inceleme örnekleri asgari BGD2 laboratuvar şartlarında incelenmeli ve daima "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi"nde belirtilen standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır.

Güvenlik uyarısı! *Schistosoma* spp mirasidyumları oldukça enfektiftir. Bu prosedür uygulanırken **daima** eldiven giyilmelidir.

Lamlar, boyanmış olsun olmasın, **kesici-delici atık** kabul edilir ve kesinlikle kesici-delici atık kutusuna atılırlar! Diğer biyolojik kirlilerin bulunduğu torbalara atılmaları halinde torbayı deler ve ciddi enfeksiyöz risk oluştururlar!

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) tekniklerin uygulanmasından önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) tekniğe tüm yönleriyle aşina olmalı, ve (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Bu UMS'nin uygulanmasından analist; tekniklerin prosedüre uygun yapılmasını sağlamaktan ve denetimi, değerlendirilmesi ve onaylanmasından (sonucun doğru ve güvenilir olmasından) Tıbbi Mikrobiyoloji/Parazitoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

Epidemiyolojik olarak riskli bölgeden bir birey, başka bir nedenle açıklanamayan makroskopik veya mikroskopik hematüri varlığında, üriner şistozomiyaz yönünden incelenmelidir.

Örneklerinin alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden edinilebilir. Aşağıda bazı önemli noktalara tekrar dikkat çekilmektedir. Buna göre:

- Koruyucu içermeyen kapta toplanan **günlük idrar** (24 saatlik) veya öğle vakti toplanan **gündüz idrarı** (tam idrar niteliğinde) tavsiye edilir. İdrarda yumurtaların en yüksek seviyeye ulaşması saat 12:00 -15:00 arasındadır. Hematürili hastalarda yumurtalar idrar örneğinin son kısmında mukus ve kanla çevrelenmiş bulunabilir. Örnek alımı en az üç kez (üç gün üst üste) tekrarlanmalıdır.

ÖNEMLİ NOT: İdrar örnekleri oda sıcaklığında laboratuvara iletilir. Buzdolabına konmaz. Laboratuvara >48 saatte ulaşmış günlük idrar, ya da >24 saatte ulaşmış gündüz idrarı **ret edilir.**

- Ayrıca patolojik inceleme için **mesane dokusundan biyopsi** örneği alınıp gönderilebilir. Biyopsi örneği iki tüpe ayrılmalı; birine 1 mL steril SF (taze doku örneği), diğerine %10'luk formol eklenip laboratuvara birlikte gönderilmelidir.
- Serum - Serolojik tanının değeri sınırlıdır; yumurta atılımı olmayan hastalarda veya endemik bölgeye seyahat etmiş şüpheli vakalarda serolojik testlerin pozitif olması tanı koydurucu olabilir (5).
- Dışkı- üriner şistozomiyazda öncelikli bir inceleme örneği değildir. Parazit, başka bir amaçla yapılan dışkı incelemeleri sırasında tesadüfen saptanabilir. Örneklerinin alınması ve incelenmesinde izlenecek prosedür için "UMS P-ÖY-01 Dışkı örneklerinin parazitolojik incelemesi" belgesine bakılmalıdır.

Reaktif/Kit

- Serolojik inceleme için piyasada özgül antikörlerin saptanmasına yönelik IHA, IFA, ELISA veya Western blotting (WB) kitleri mevcuttur.

Diğer gereç, donanım

Mikroskopik yöntemler için;

- Mikroskop, binoküler (rutin) – 10× (düşük), 40× (yüksek kuru), 100× (immersiyon) objektifleri ve 10× oküleri olan tercih edilir.

NOT: İnceleme duyarlılığı düşük olduğu için 5× oküler önerilmez! (9).

- Lamlar (25×75 mm; tercihen kenarı rodajlı) ve lameller (22×22 mm)
- Membran filtrasyon yöntemi için (opsiyonel); enjektör ataçmanlı membran filtre (8.0 µm por çaplı) ve 10-20 mL'lik enjektör
- Pastör pipetleri, 1 ve 10 mL pipetler, mikropipetler ve pipet uçları
- Santrifüj, büyük hacimli santrifüj
- Santrifüj tüpleri, büyük ebatlarda
- Biyolojik atık kapları, kesici-delici atık kabı

ELISA için;

- ELISA yıkayıcı, ELISA okuyucu, mikroplaklar
- Ayarlanabilir otomatik mikropipetler (5-1000 µL) ve pipet uçları

PCR ve diğer moleküler yöntemler için;

- En az üç ayrı oda - Nükleik asit ekstraksiyonu, PCR karışımı hazırlama, amplifikasyon ve sonuç gözetimi için ayrı odalar. İdeal olarak PCR karışımı hazırlama odası (temiz) pozitif basınçlı, agaroz jel elektroforezi yapılan oda (kirli) negatif basınçlı havalandırmaya sahip olmalıdır.
- Donanım – BGK, soğutmalı mikrosantrifüj, hassas terazi, vorteks, su banyosu, PCR ısı döngü cihazı (gerçek zamanlı veya geleneksel), mikrodalga fırın, jel görüntüleme sistemi, elektroforez ünitesi vb.

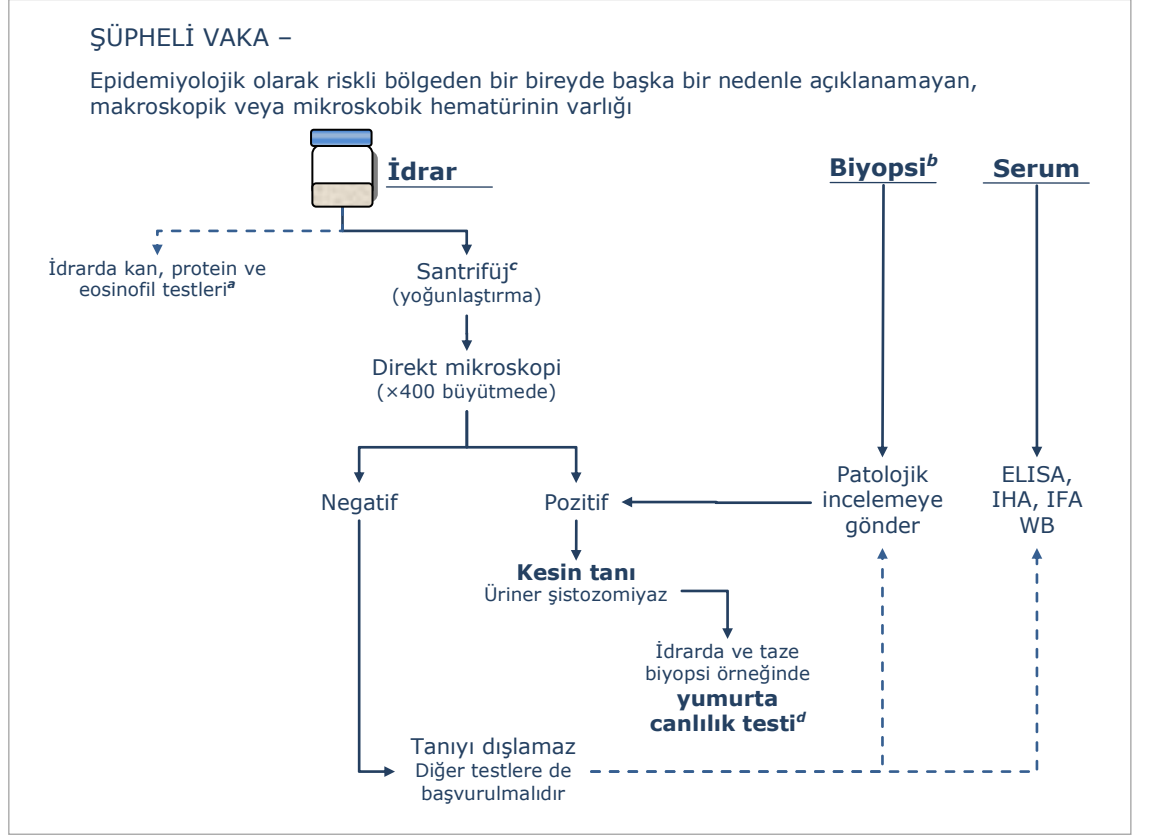
2.4. Kalite kontrol

- Santrifüjün başta olmak üzere tüm donanımın bakım ve kalibrasyonu uygun aralıklarla yapılmış olmalıdır.
- Mikroskop belirli aralıklarla (yoğun kullanılıyorsa yılda en az bir kez) kalibre edilmelidir. Mikroskoba herhangi bir parça eklenmesi veya değiştirilmesi durumunda da kalibrasyon yapılmalıdır. Kalibrasyon için kullanılmış optikler mikroskobun üzerinde olmalıdır. Tüm objektifler için kalibrasyon faktörleri göz önündeki bir panoda asılı olmalıdır (*bkz.* UMS, P-TP-01 Mikroskop Kalibrasyonu) (9).
- Her yeni -hazırlanmış veya ticari- reaktif seti veya kit lotu, kullanıma sokulmadan önce pozitif kalite kontrol örnekleri ile test edilmelidir.
- Kullanılan kitlerin son kullanım tarihleri ve saklama koşullarına dikkat edilmelidir. Kontrol örnekleri kullanılarak bu etkinlik değerlendirilebilir.
- Tüm kalite kontrol sonuçları kaydedilmelidir.

3 Üriner şistozomiyaz tanısında kullanılan teknikler

3.1. Tanı akış şeması

- Tanı basamakları için bir akış şeması Şekil 1'de verilmektedir.



Şekil 1. Üriner şistozomiyaz tanısı için şüpheli vakanın incelenmesinde önerilen inceleme örnekleri ve akış şeması. WB, Western blot; IHA, indirekt hemaglütinasyon

- İdrarda kan, protein ve eosinofil testleri spesifik olmamakla birlikte enfeksiyona işaret eden testlerdir.
- Eğer idrar incelemesi negatif bulunmuş ise ve enfeksiyon şüphesi devam ediyorsa mesane biyopsisinden patolojik inceleme yapılması önerilir.
- Yoğunlaştırma için membran filtrasyon da kullanılabilir.
- Tedavi için yumurtanın canlılığı önemli olduğundan dolayı "yumurta canlılık testi" de yapılmalıdır. Bunun için laboratuvara taze doku örneği de gönderilmiş olmalıdır.



(a)



(b)

Şekil 2. Santrifüj edilmiş idrardan yapılmış ıslak preparatta *S. haematobium* yumurtaları: (a) CDC (10); (b) GATA Tıbbi Parazitoloji BD (7).

3.2. İdrarda yoğunlaştırma yöntemi ile parazit aranması

Santrifüj ile yoğunlaştırma

- Hastadan alınan örnek **günlük idrar** ise, 2 saat bekletilerek yumurtaların dibe çökmesi sağlanır.
 - Üst sıvı sarsmadan ve dipte yaklaşık 50 -100 mL kalacak şekilde, içinde dezenfektan bulunan bir kaba dökülür. Kalan idrar dipteki çökelti karışacak şekilde çalkalanarak, santrifüj tüplerine boşaltılır.
 - Hastadan alınan örnek **gündüz idrarı** ise hafifçe çalkalanarak, doğrudan santrifüj tüplerine boşaltılır.
 - 500×g'de 5 dk santrifüj edilir. Tüplerin kapakları santrifüj sonrasında 2-3 dk bekledikten sonra açılır.
 - Tüpler santrifüjden sarsmadan çıkartılır, üst kısımdaki sıvı dikkatle pipet yardımıyla alınarak dezenfektan bulunan bir kaba dökülür.
 - Dipte kalan çökelti pipetle karıştırılarak homojenize edilir ve temiz bir lam üzerine bir damla damlatılarak lam-lamel arası preparat yapılır.
 - Preparatlar, ışık mikroskopunda 10× ve 40× objektiflerle (×100 ve ×400 büyütme) incelenir.
 - Mirasidyum içeren, alttan çentikli, oval, yaklaşık 150×60 µm ebatlarında yumurtaların görülmesiyle kesin tanı konur (Şekil 2) (5,10).
- NOT: İdrarda kan, protein ve eozinofil varlığı özgül olmamakla birlikte enfeksiyona işaret eden testlerdir.

Membran filtrasyon ile yoğunlaştırma

- **İdrar 24 saatlik** ise 2 saat örneğin çökmesine izin verilir ve üst sıvının büyük kısmı atılır. Kalan sediment 50-100 mL olabilir.
- **Gündüz idrarı** ise (öğle vakti alınmış idrar) direkt işleme konur.
- İdrar örneği iyice karıştırılır. Enjektöre 10 mL idrar çekilir. İdrar aşırı bulanık ya da tortuluysa daha azı kullanılabilir.
- Enjektöre membran filtre (*S.haematobium* için 8.0 µm por çaplı) içeren filtre tutucu takılır. İdrar filtreden geçirilir.
- Filtre tutucu enjektörden çıkarılır ve SF ile membran yıkanır.
- Enjektöre 10 mL SF çekilir; filtre tutucu tekrar takılır ve SF filtreden geçirilir.
- İşlem son kez enjektöre hava çekilerek tekrarlanır.
- Filtre tutucu çıkarılır enjektörden çıkarılır. Filtre tutucu sökülerek filtre açığa çıkarılır.
- Filtre, pens yardımı ile tutucudan alınır, mikroskop lamı üzerine yerleştirilir. Pastör pipeti ile filtre 1 damla SF eklenerek nemlendirilir.
- ×100 ve ×400 büyütme filtre üzerinde yumurtalar aranır. Eğer yumurta görülüyorsa canlı mirasidyum içerip içermediğine bakılır. Eğer siliyal hareket ('flame cell activity') gözleniyorsa mirasidyum canlı demektir. Ayrıca yumurta canlılık testinin yapılması önerilir.

3.3. Biyopsi materyalinin incelenmesi

- Mesane dokusunun patolojik incelemesi sonucu *S. haematobium* yumurtalarının görülmesi "kesin tanı" bulgusudur.

3.4. Yumurta canlılık testi

- Yumurta canlılık testi mikroskopik incelemesinde *S. haematobium* yumurtaları görülmüş olan vakalarda tamamlayıcı bir test olarak yapılır.
- Tedavi etkinliğinin değerlendirilmesi açısından önemlidir.
- Bunun için laboratuvara taze doku örneği de gönderilmiş olmalıdır. İdrar ve/veya şüpheli dokudaki yumurtalardan mirasidyumların çıktığının gösterilmesi rapor edilmiş ise tedavi için yönlendiricidir.
- İdrar 24 saatlik ise 2 saat örneğin çökmesine izin verilir ve üst sıvının büyük kısmı atılır. Kalan sediment 50-100 mL olabilir. Gündüz idrarı ise (öğle vakti alınmış idrar) 500×g'de 5 dk santrifüj edilir. Üst sıvı atılır.
- Çökelti bir silindire aktarılır. Çökeltinin üzerine 100-200 mL SF konur, yarım saat bekletilir; üst sıvı dikkatle dökülür. Sonra bunun yerine 35-40°C'de ılık çeşme suyu konur.
- Silindir güneşli bir pencere veya kuvvetli bir elektrik lambası önüne getirilir, bu durumda mirasidyumlar kabuklarından dışarı çıkarlar.
- Bir lupla (×6) siyah bir zemin üzerine konan silindirdeki sıvı incelenir, yukarıdan ışık verildikçe sağa sola koşuşan açık renkli mirasidyumlar görülür. Durum ½, 1 ve 6 saat sonra kontrol edilir.

3.5. Seroloji

- Yumurta atılımı olmayan hastalar için serolojik testlerin (IHA, IFA, ELISA veya Western blotting) pozitif olması tanı koydurucu olabilir.
- Konakta enfeksiyon sonucu gelişen antikolar tedaviden sonra uzun zaman kalıcı olur. Antikolar ayrıca diğer bazı parazit antijenleri ile de çapraz reaksiyon verebilirler. Bu özellikler, serolojik tanının değerini sınırlamaktadır. Seroloji en fazla endemik bölgeye seyahat etmiş (endemik bölgede yaşamayan) kişilerde tanıda değerli olabilir (5).

3.6. Saklama, Referans merkeze gönderme

- Pozitif idrar örneği sedimenti %5-10 formol eklenerek eğitim ve kalite kontrol amaçları için saklanabilir.
- İdrar incelemesinde negatif sonuç tanıyı dışlamaz. Böyle örnekler diğer testlerin de yapılabileceği bir merkeze gönderilmelidir.
- Eğer ileri tanı testleri için örnekler başka bir şehirdeki laboratuvara gönderilecekse, öncelikle *paketleme* ve *taşıma* biyolojik materyal taşıma şartlarına uygun olmalıdır (11) (ayrıca *bkz.* UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).

4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim

- İdrar sedimentinin mikroskopik incelemesi sonucu *S.haematobium* yumurtalarının görülmesi "kesin tanı" bulgusudur.
- Eğer yumurta görülmüş ise sonuç cins ve tür adı açık bir şekilde yazılarak ve canlı mirasidyum görülüp görülmediği belirtilerek rapor edilmelidir. Örnek rapor aşağıdaki gibi olabilir:
 - "*Schistosoma haematobium* yumurtaları mevcuttur (canlı yumurta)"
 - "*Schistosoma haematobium* yumurtaları mevcuttur (cansız yumurta, sadece yumurta kabuğu)"
- Üriner şistozomiyaz bildirimi zorunlu bir hastalıktır. Pozitif sonuç vakit geçirmeden ilgili birime haber verilmelidir ve olguların kayıt ve bildirim için Sağlık Bakanlığının "Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi" izlenmelidir (1,2).

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- İdrar örnekleri kesinlikle koruyucu içermemelidir. Çünkü klinik açıdan yumurta içinde canlı mirasidyum bulunup bulunmadığı önemlidir ve ıslak preparatın mikroskopik incelemesi ile canlılık tanımlanabilir.
- Filtre ile çalışırken eğer yanlışlıkla filtrenin yumurtaları içermesi gereken yüzü alta gelecek şekilde konduysa SF damlası eklenmemelidir. Çünkü bu organizmaların filtreden ayrılmasına ve lam üzerinde yüzmesine neden olabilir.
- Hastalığın başlangıcında ve kronik dönemlerinde parazit sayısı düşük olabilir. Örnekler antiparaziter bir tedavi başlanmadan önce alınmalıdır.
- Eğer ilk örnek negatif bulunmuş ise en az 2 kez daha (üst üste) idrar örneği verilmelidir.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Üriner Şistozomiyazın Mikrobiyolojik Tanısı) ayrıca aşağıdaki UMS belgeleriyle de ilgilidir ve gereken bilgi için bu belgelere bakılması önerilir:

UMS, P-ÖY-01 Dışkı örneklerinin parazitolojik incelemesi

UMS, P-TP-01 Mikroskop kalibrasyonu

UMS, GEN-OY-01 Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 2 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 3 John DT, Petri WA. The Trematodes. *In: John DT, Petri WA (eds). Markell and Voge's Medical Parasitology. 9th ed, Saunders Elsevier, Philadelphia. 2006, p.181-197*
- 4 Garcia LS, Bruckner DA. Blood Trematodes: Schistosomes *In: Garcia LS, Bruckner DA (eds). Diagnostic Medical Parasitology. 3rd ed., ASM Press, Washington D.C. 1997, p.371-387*
- 5 Jones MK, Keiser J, McManus DP. Trematodes. *In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds). Manual of Clinical Microbiology. 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 2230-2243*
- 6 Bruckner DA. Urine Concentration: Centrifugation. *In: Garcia LS (ed). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 3rd ed., ASM Press, Washington D.C. 2010, 9.6.8.*
- 7 Tanyüksel M, Araz E, Güçlü Kılbaş Z. Şistozomiyaz (Üriner). Bildirimi Zorunlu Paraziter Hastalıkların Laboratuvar Tanısı Eğitim Kitabı. Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, Ankara. 2008, p.59-66
- 8 Töz SÖ. Aspirasyon, vücut sıvıları ve idrar incelemeleri. *In: Korkmaz M, Ok ÜZ (eds). Parazitolojide Laboratuvar Yöntem, Yorum, Akreditasyon, 1. baskı. Meta Basım, İzmir. 2011, p. 55-63*
- 9 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. *In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.2.1-4*
- 10 CDC. Schistosomiasis Infection. DPDx - Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern <http://www.cdc.gov/dpdx/schistosomiasis/index.html> (son erişim tarihi: 28.01.2014)
- 11 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Mikroskop Kalibrasyonu (Oküler ölçek ile)

Hazırlayan Birim	Klinik Parazitoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Parazitoloji
Bölüm	Test prosedürleri
Standart No	P-TP-01
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
GENEL BİLGİ	3
TEKNİK BİLGİLER	4
1 Asgari laboratuvar koşulları.....	4
2 Mikroskop kalibrasyonunun yapılması	5
3 Sonuçların hesaplanması	7
4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar	7
EKLER.....	8
Ek-1 Mikroskop bakımı ve temizliği.....	8
Ek-2 Köhler aydınlatması	9
KAYNAKLAR	11

Kapsam ve Amaç

Organizmaların tanım ve sınıflandırmasında pek çok kriter kullanılır; bunlardan biri de ölçü/büyüküktür. Ölçümler mikroskobun okülerine yerleştirilmiş ölçekli bir disk (oküler ölçek / oküler mikrometre) ve üzerinde hassas ölçümlerle çizilmiş cetvel bulunan özel bir lam kullanılarak yapılır.

Parazitolojide (ve genel olarak mikrobiyolojide) tanı koyma işi yapan her laboratuvarın hassas ölçümler için kalibre edilmiş en az bir mikroskoba sahip olması ve mikroskoplarını yılda en az bir kez kalibre etmesi önerilmektedir.

Bu UMS'nin amacı mikroskoptaki cisimlerin boyutlarının doğru ölçümü için, laboratuvarlara, oküler ölçek ve mikrometrelili lam kullanılarak mikroskop kalibrasyonunun nasıl yapılacağına yönelik bir prosedür vermektir.

Genel Bilgi

Parazitler için alınan numunelerin incelenmesinde iyi bir mikroskop ve ışık kaynağı şarttır. Organizma tanımlamaları morfolojik özelliklerine göre yapılır ve çoğunda da normal ışık mikroskopları kullanılır (1,2).

Mikroskop kullanırken zaman zaman incelenen numunelerde ölçüm yapılması gerekebilir. Bu kadar küçük organizmaların boyutlarını ölçmek yani mikroskopla ölçüm yapmak için okülere yerleştirilen "oküler ölçeği" kullanılmaktadır. Oküler ölçeği; yuvarlak, ince ve üzerinde birden yüze kadar sayılarla belirlenmiş bölüntüleri bulunan okülerin içerisindeki sabit halka diyaframına yerleştirilebilen bir cam ya da plastik bir disk. Ölçekteki aralıkların ne kadar olduğunu bulabilmek için kalibrasyon işlemi yapılması amacıyla üzerinde hassas ölçümlerle çizilmiş bir cetvel bulunan "mikrometrelili lam" kullanılır (2,3,4).

Kalibrasyon işlemi, kullanılacak objektife göre yapılmalıdır. Çünkü kalibrasyon işlemi, oküler ölçeğindeki bir aralığın, o anda kullanılan objektifin büyütme derecesine göre kaç mikrona karşılık olduğunu bulmasıdır (4).

Teknik Bilgiler

1 Asgari laboratuvar koşulları

1.1. Laboratuvar güvenliği

"Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi"nde belirtilen evrensel güvenlik önlemleri uygulanmalıdır. Mikroskop ile çalışırken **elektrik** kaynaklı tehlikelere dikkat edilmelidir.

1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) uygulamadan önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) yapılan işe tüm yönleriyle aşina olmalı, ve (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

1.3. Örnek, Donanım

Donanım

- Mikroskop - 10×, 40× ve 100× objektiflere sahip binoküler normal ışık mikroskobu (diğer objektif büyütme oranları da kullanılabilir) (2).
 - (a) Stereo mikroskoplar (total büyütme oranı $\leq \times 50$) veya
 - (b) Normal ışık mikroskopları (kuru olanlar; düşük, $\leq \times 100$ ve yüksek $\leq \times 400$, yağlı olan; $\times 1000$)
- Oküler 10× - Parazitolojik incelemede 10× oküler kullanılmalıdır. Bazıları 5× oküler tercih ediyorsa da, 5× oküler daha az büyütme sağlar ve inceleme duyarlılığını düşürür (2).

NOT: Bir adet 10× oküler laboratuvardaki bütün mikroskopların kalibrasyonunu yapmak için kullanılabilir (herhangi bir organizma ölçüleceği zaman kullanılmak üzere).

Diğer gereçler, standart örnek

- Oküler ölçek (Oküler mikrometresi) - Yuvarlak ince ve üzerinde birden yüze kadar sayılarla belirlenmiş bölüntüleri bulunan okülerin içerisindeki sabit halka diyaframına yerleştirilebilen bir cam veya plastik ölçek (çizgi 50 üniteye bölünmüş olarak) (herhangi bir laboratuvar tedarik distribütöründen; Fisher, Baxter, Scientific Products, VWR, vb. gibi)
- Mikrometrelili lam (Objektif/Stage mikrometresi), 0.1-0.01 mm bölümlü (herhangi bir laboratuvar tedarik distribütöründen; Fisher, Baxter, Scientific Products, VWR, vb. gibi)
- Mercek veya lens kağıdı
- İmmersiyon yağı
- Lateks veya polistren boncuklar veya Giemsa boyalı periferik yayma

1.4. Kalite kontrol

- Mikroskopunuzu periyodik olarak kalibre edin. Yoğun kullanımda yılda bir kez önerilir.
- Üç büyütmenin ($\times 100$, $\times 400$, $\times 1000$) kalibrasyonunda da en sık eritrosit ölçümü ($\sim 7.5 \mu\text{m}$) kullanılır. Lateks veya polistren boncuklar da kalibrasyonda kullanılabilir. $10 \mu\text{m}$ ve $90 \mu\text{m}$ boncuklar önerilir.
- Nihai çarpım katsayısı ancak ve ancak sizin oküler "0" ve mikrometrelili lam "0" çizgisini kesiştirmedeki görsel kabiliyetiniz kadar iyi olacaktır.
- Hesaplamalarda aşağıdaki kurallar geçerlidir:
 - (a) Yüksek büyütmeli kuru objektif ($40\times$) katsayısı, yağlı ($100\times$) objektif katsayısının 2.5 katı olmalıdır.
 - (b) Düşük büyütmeli objektif ($10\times$) katsayısı ise, yağlı objektif ($100\times$) katsayısının yaklaşık 10 katı olmalıdır.
- Tüm hesaplamalar kalite kontrol raporlarına işlenmelidir.

2 Mikroskop kalibrasyonunun yapılması

- Oküler ölçeğinizi hazırlayın.
- Mikrometrelili lamınızı hazırlayın.
- Okülerin göz lensinin vidasını çıkarın ve oküler ölçeğini (kazınmış/işaretli kısım aşağıda kalacak şekilde) okülere yerleştirin.
- Diski tutmak için birkaç katlı lens kağıdı kullanın; tüm yüzeyleri toz ve pamuk / bez-parçalarından koruyun.



3 Sonuçların hesaplanması

- Bu formül ile her objektif büyütme oranı için bir katsayı (faktör) hesaplanır (1 oküler ünite = ... μm , şeklinde).
- Örneğin;

$$\text{Düşük objektif (10\times) için: } \frac{0.8 \text{ mm}}{100 \text{ Unite}} \times \frac{1000 \mu\text{m}}{1 \text{ mm}} = 8.0 \mu\text{m (faktör)}$$

$$\text{Yüksek kuru objektif (40\times) için: } \frac{0.1 \text{ mm}}{50 \text{ Unite}} \times \frac{1000 \mu\text{m}}{1 \text{ mm}} = 2.0 \mu\text{m (faktör)}$$

$$\text{İmmersiyon objektifi (100\times) için: } \frac{0.05 \text{ mm}}{62 \text{ Unite}} \times \frac{1000 \mu\text{m}}{1 \text{ mm}} = 0.8 \mu\text{m (faktör)}$$

- Organizmanın boyu ve eni oküler ölçekteki ünite sayısı ile belirlendikten sonra bakılan objektifin büyütme oranı katsayısı kullanılarak organizmanın gerçek boyutları hesaplanır. Bu boyutlar referans ölçümlerle karşılaştırılarak organizmanın tanımlanması doğrulanmalıdır.
- Örneğin; eğer bir helmint yumurtası 40 \times objektif ile 15 oküler ünite (boy) ve 7 oküler ünite (en) ölçülmüş ise, o objektif için bulunan faktör olan 2.0 μm ile çarpılarak boy ve en sırasıyla 30 ve 14 hesaplanır ve muhtemelen *Chlonorchis sinensis* olduğu söylenebilir.
- Standart bir nesne (lateks veya polistren boncuklar, eritrositler) farklı objektiflerle ölçülse de, nesnenin boyutları (bakılan objektifin büyütmesinden bağımsız olarak) aynı veya birbirine çok yakın olmalıdır.
- Her objektif için hesaplanan büyütme oranı katsayısı, diğer kullanıcıların da bilmesi için, mikroskobun tabanına veya yakın bir duvar/pano gibi bir yere yazılmalıdır.

4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Kalibre edilen mikroskop bir bütün olarak düşünülmelidir. Oküler ölçeğin kullanılacağı her bir objektif için kalibrasyonun ayrı ayrı yapılması çok önemlidir.
- Oküler ölçek içeren okülerler ve/veya objektifler başka bir mikroskoptaki karşılık gelen objektif veya okülerlerle değiştirilmemeli, dönüşümlü kullanılmamalıdır.
- Mikroskopların bakımı ve temizliği (*bkz.* Ek-1) ile Köhler aydınlatması kontrolü (*bkz.* Ek-2) düzenli olarak yapılmalıdır.

Ekler

Ek-1 Mikroskop bakımı ve temizliđi⁵

Tozdan koruyun

- Mikroskoplar sıcak ve kuru iklimlerde tozdan, nemli iklimlerde ise mantar üremesinden etkilenirler. Rutin bakım sayesinde her iki durumun yol açabileceği hasar azaltılabilir. Mikroskopun kullanılmadığı zamanlarda plastik örtü altında tutulması tozlanmasını önleyecektir. Hava geçirmez bir kutu içinde, silika jel (kurutucu, nem alıcı) ile birlikte saklanması da mantar kolonizasyonunu azaltacaktır.
- Optik yüzeyler (kondansatör, objektifler, oküler) yumuşak bir deve tüyü fırçayla ya da hava üfleyici yardımıyla tozdan temizlenmelidir. Okülerin içine toz girmişse üst merceği çevirerek açın ve yumuşak bir fırça ya da üfleyici ile iç kısmı temizleyin.

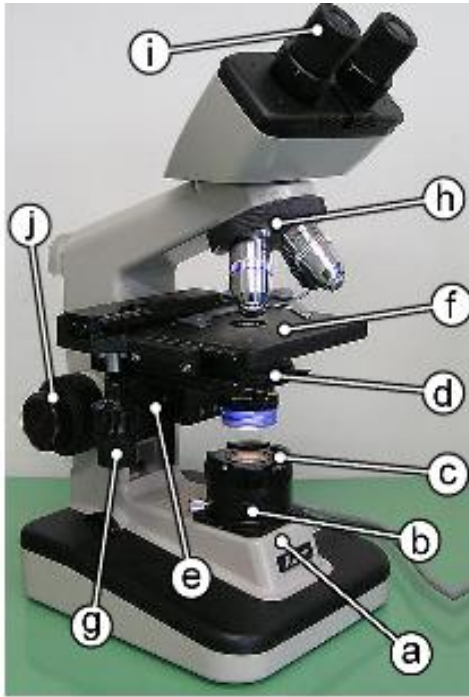
Yağlı bırakmayın

- Mikroskop asla objektiflerin üzerinde yağ ile terk edilmemeli; günün sonunda mercekler mutlaka temizlenmelidir. Merceklerin üzerindeki yağ mercek temizleme kağıdı ya da tıbbi pamuk ile giderilmelidir. Normal kağıt peçete ve mendilleri kullanmayın!
- Merceklerin temizlenmesinde **asla** etanol (%70 ve üzeri) ya da ksilen kullanılmamalıdır. Çünkü bunlar merceğin yapıştırıcı maddesini eritebilir.
- Optik parçalar, hazır optik temizlik solüsyonu ya da %40 petrol eteri, %40 etanol ve %20 eter ile temizlenebilir. Ancak bu solüsyon son derece yanıcıdır; kullanımı sırasında aşırı dikkat gösterilmelidir!
- Optik olmayan parçalar hafif deterjan ya da sabunlu su kullanarak temizlenebilir. Gres ve yağ, petrol eteri ile giderildikten sonra 50/50 distile su ve etanol karışımı ile temizlenmelidir (optik parçalar hariç).
- Merceklerin yüzeyinde ve vida oyuklarının düzenli şekilde kontrol edilip temizlenmesi mantar kolonizasyonunu önler.
- Mekanik parçalar (kaba ayar, ince ayar, kondansatör odaklama, mekanik raf) makine yağıyla yağlanmalıdır.

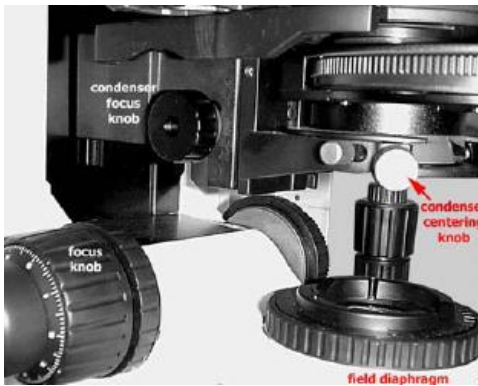
Ek-2 Köhler aydınlatması⁶

Genel Bilgi

August Köhler tarafından 1893'te geliştirilmiş optik mikroskopide, açıklık diyaframının ayarı ne olursa olsun, nesneyi düzgün biçimde aydınlatmaya yarayan bir sistemdir. Mikroskopta en kaliteli görüntünün elde edilebilmesi için ışığın düzgün ayarlanması tekniği olan bu işlem **kullanıcının mikroskop başına her oturduğunda** yapılmalıdır.



- a. Işık kaynağı
- b. Açıklık diyaframı
- c. Açıklık lensi
- d. Kondansatör diyaframı
- e. Kondansatör odaklama
- f. Şaryo
- g. X-Y eksen kontrolü
- h. Objektifler
- i. Oküler
- j. Makro ve mikro ayar



Işık ayarında mikroskobun bazı bölümleri özel önem arz etmektedir.

Kondansatör, tablanın altında yer alır. Işık kaynağından gelen ışınları kırarak cisim üzerinde odaklayan merceklerden oluşur. Aşağı yukarı hareket ettirilerek ışığın istenilen yere odaklanması ve ortamın yeterince aydınlanmasını sağlar. Objektifin büyütme gücü ile ilişkili olarak ışığın şiddetini ayarlar.

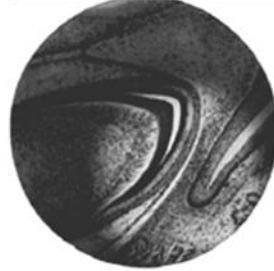
Diyafram, ışık kaynağından gelen ışık demetinin çapını kontrol etmek için kullanılır. Işık kaynağının üstüne veya kondansatörün altına yerleşir. Işık çapı aracılığı ile en iyi kontrast ve rezolüsyonu elde etmeyi sağlar.

Ayarlanabilir bir kondansatör merceği bulunmayan mikroskoplarda ve 1×, 5× gibi düşük büyütme lensler kullanıldığında uygulanamaz. Bu durumda kondansatör diyaframı tam olarak açılır ve aydınlatma, açıklık diyaframı ile yapılır.

Uygulama

- Tablaya preparat yerleştirilir. 10× büyütme ile preparat objektife yaklaştırılır.
- Sadece tek bir gözle okülerden bakılarak makro/mikro vidalarla preparat odaklanır.
- Kondansatör (iris) diyaframı tamamen açılır, açıklık diyaframı tamamen kapatılır.
- Tam ortada çok küçük bir ışık halkası görülmelidir.
- Dikey kondansatör ayar vidası ile aşağı yukarı hareket ettirilerek ışık halkasının mümkün olduğunca küçük olması sağlanır. Işık halkasının kenara itilmemesi için çok dikkatli yapılmalıdır.
- Açıklık diyaframı, alanın bir kenarına ışık gelene kadar açılır. Işık mükemmel şekilde merkezde toplanmışsa alanda tam bir halka şeklinde görülür.
- Işık halkasının merkezi, kondansatörün önündeki iki küçük vida ile ayarlanır. Yeterli bulduğunuzda alan genişletilerek ışığın tamamen dolması sağlanır. Ancak açıklık diyaframı tamamen açılmaz.
- Bu işlem 20× ve 40× objektifle tekrarlanır. 100× ile yapmak zordur.
- 20×-100× objektifle çalışırken kondansatör diyaframının ayarlanması çok önemlidir (özellikle yarı saydam yapılarda). Diyaframın kapatılması kontrastı artırır.
- Okülerlerden biri çıkarılarak tüpün içerisindeki ışık alanına çıplak gözle bakılır. Kondansatör diyaframı, alanın 1/4-1/3'ünü kapatacak şekilde kapatılır. Bu şekilde en iyi kontrast sağlanır. Kondansatör diyaframının ayarlanmasından önce ve sonra preparat incelenir.
- Bu işlemin her bir objektif için tekrarlanması önemlidir. Pratikte preparatın incelenmesi sırasında oküler çıkarılmadan da ayarlama yapılabilir.

Unfocused & Uncentered Condenser



Focused Condenser - Uncentered



Condenser Focused & Centered



Field Iris Diaphragm Expanded just Beyond the Field of View





- Üstte- Diyafram tam açıkken detaylar çok az seçilmekte.
- Ortada- Diyafram tam olarak kapatıldığında kontrast artmakta, ancak küçük delikler olduğundan daha geniş görülmekte.
- Altta- Diyafram %25-30 oranında kapatıldığında kontrast artar ve ışık sapsması daha az görülür
- En iyi görüntü kalitesini elde ettiğinizi düşündüğünüz kondansatör diyaframında oküler çıkarılarak ne kadarlık bir alanın kapalı olduğuna bakılabilir.
- Taze kesit preparatlar büyük büyütme için kalın olmakla birlikte kondansatör diyaframının ayarlanmasında çok yararlıdır.

Kaynaklar

- 1 Basic Laboratory Methods in Medical Parasitology. Geneva: World Health Organization (WHO), 1991.
- 2 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.2.1-4
- 3 Çulha G, Miman Ö. Mikroskop. In: Korkmaz M, Ok UZ (eds). *Parazitolojide Laboratuvar*. 1. baskı. Parazitoloji Derneği Yayınları, 2011.
- 4 Garcia LS. Equipment, supplies, safety and quality system recommendations for a diagnostic parasitology. Laboratory: Factors influencing future laboratory practice. In: Garcia LS (ed). *Diagnostic Medical Parasitology*. 4th ed., ASM Press, Washington D.C. 2001, p.894-897
- 5 Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı. Temel Laboratuvar Yönetimi Eğitimi, Modül 5 Ekipman Yönetimi Eğitim Notları (Türkiye'de Bulaşıcı Hastalıkların Epidemiyolojik Sürveyansı ve Kontrolünün Güçlendirilmesi Projesi; TR 0403.06). 2007
- 6 <http://www.microscopyu.com/tutorials/java/kohler/index.html> (son erişim tarihi: 06.01.2014)



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Direkt Mikroskopisi

(Dışkı Örneklerinin Parazitolojik İncelemesi için)

Hazırlayan Birim	Klinik Parazitoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Parazitoloji
Bölüm	Test prosedürleri
Standart No	P-TP-02
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
TEKNİK BİLGİLER	4
1 Test için asgari laboratuvar koşulları	4
2 Direkt mikroskopinin uygulanması	6
3 Sonuçların değerlendirilmesi / yorumlanması ve raporlama .	8
4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	9
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	10
KAYNAKLAR.....	10

Kapsam ve Amaç

Gastrointestinal sistemi tutan parazitolojik enfeksiyonların tanısı esas itibariyle dışkı örneklerinin incelenmesine dayanır. Dışkının **direkt mikroskopik inceleme**si parazitolojik tanı sürecinin bir parçasıdır ve başlıca şu amaçlara hizmet eder: hastanın parazit yükünü değerlendirmek, hareketli bir parazit bulunup bulunmadığını görmek, yoğun enfeksiyon durumunda tanıyı hızla koyabilmek ve yoğunlaştırma teknikleri kullanıldığında belki kaybolacağı için görülemeyecek olan parazitleri tespit etmek (1).

Genel olarak klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında `parazitolojik tanı'nın en büyük kısmını dışkı örneklerinin incelenmesi oluşturur. Dışkı incelemesinin **doğru** ve **güvenilir** bir tanı aracı olabilmesi için *tam* uygulanması, bir diğer ifade ile "direkt mikroskopi", "boyama" ve "yoğunlaştırma" tekniklerinin bir arada kullanılması gereklidir. Ülkemiz genelindeki laboratuvarların çoğunda ise dışkı incelemesi `direkt mikroskopik inceleme'den ibarettir (2). Boyama ve yoğunlaştırma tekniklerinin kullanılmayışı tanı duyarlılığını ileri düzeyde düşürdüğünden hasta yararının ve hastalık kontrolü ile ilgili çalışmaların bu durumdan önemli ölçüde etkilendiği söylenebilir.

Dolayısı ile bu UMS'de; hem dışkıdan `direkt mikroskopik inceleme' için ülke genelinde uygulanabilecek standart bir prosedürün verilmesi, hem de laboratuvarlara `direkt mikroskopik inceleme'nin tanındaki yeri, sınırlılıkları, elde edilen sonuçların yorumlanması ve raporlanmasında dikkat edecekleri hususlar ile ilgili yaklaşımların iletilmesi hedeflenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

MİF Mertyolat-iyot-formol (fiksatif)

PVA Polivinil alkol (fiksatif)

SAF Sodyum asetat-asetik asit- formol (fiksatif)

Genel Bilgi

Bağırsak parazitlerinin oluşturduğu enfeksiyonlar gelişmekte olan ülkelerde hala önemli bir sağlık sorunudur ve bu enfeksiyonların uygun tedavisi ancak doğru tanı ile mümkün olabilir. Enfeksiyonlarının seyri benzer olduğu ve klinik bulgular ayırt ettirici olmadığı için hemen hepsinde tanı parazitolojik incelemeye dayanır.

İnsanlarda bulunan bağırsak parazitlerinin tanısı temel olarak dışkı, daha seyrek olarak da duodenal sıvı ve biyopsi örneklerinin incelenmesi ile konmaktadır. Duodenal sıvı aspirasyonu ve biyopsi invaziv girişimler ile elde edilebilen örnekler olarak özellikle çocuklarda uygun değildir ve nadiren başvurulur (3,4,5).

Dışkının direkt mikroskopik incelemesi kısa sürede sonuçlanması ve uygulama kolaylığı gibi nedenlerle en yaygın kullanılan tanı yöntemidir. Dışkı örneklerinin doğru biçimde toplanması ve saklanması tanının doğruluğu ve güvenilirliğinde büyük önem taşır (3,6,7).

Bu yöntemin başlıca amaçları: hastanın parazit yükünü değerlendirmek, hareketli bir parazit bulunup bulunmadığını görmek, yoğun enfeksiyon durumunda tanıyı hızla koyabilmek, yoğunlaştırma teknikleri kullanıldığında belki kaybolacağı için görülemeyecek olan parazitleri tespit etmek ve invazyon ya da inflamasyon olup olmadığına (eritrosit, lökosit varlığı) karar vermek şeklinde sıralanabilir (1).

Direkt mikroskopik inceleme için öncelikle dışkı taze (laboratuvara zamanında teslim edilmiş ve buzdolabında bekletilmemiş) olmalıdır. Ancak daha da önemlisi bu yöntem şekilli dışkıdan ziyade sıvı veya yumuşak dışkının incelenmesi için uygundur. Hareketli protozoon trofozoitleri en büyük olasılıkla sıvı ya da yumuşak dışkıda bulunur (8). Şekilli dışkı örneklerinde trofozoit formlarına rastlanmayacağı için, ve ayrıca parazit yükü düşük ise parazit elemanları direkt incelemede gözlenemeyeceği için yoğunlaştırma yöntemleri de kullanılmalıdır (5).

Hareketli trofozoitlerin görülebilmesi amacıyla direkt inceleme preparatı dışkının SF içinde karıştırılması ile hazırlanır. Dışkı süspansiyonu bir iyotlu boya (ya da Nair'in tamponlanmış metilen mavisi, eozin ve MIF solüsyonları vb.) içinde de hazırlanabilir. Boya organizmaları öldüreceğinden dolayı hareket kaybolur, ancak parazit elemanlarının ve içyapılarının boyalı süspansiyonun mikroskopisinde daha iyi ayırt edildiği bilinmektedir (5). Bu nedenle hem hareketli trofozoitleri görmek için, hem de kist vb. yapıları daha iyi ayırt etmek için, bir lam üzerinde SF ile ve boyalı çözelti ile olmak üzere iki preparat hazırlanması önerilir (1,5).

Direkt mikroskopik incelemenin sonuçları çoğu durum için 'ön tanı' niteliğindedir. Ancak bazı organizmalar (*Giardia intestinalis* kistleri ve trofozoitleri, *Entamoeba coli* kistleri, *Iodamoeba bütschlii* kistleri, *Cystoisospora (Isospora) belli* ookistleri ile helmint yumurta ve larvaları) eğer direkt mikroskopide görülürlerse 'kesin' olarak tanımlanabilirler (1,8).

Dışkı koruyucu içinde laboratuvara gelmiş ise direkt mikroskopik inceleme çok anlamlı değildir; doğrudan yoğunlaştırma ve kalıcı boyamaya geçilebilir (8).

Dışkının parazitolojik incelemesi, kalıcı boyalı yaymanın ve yoğunlaştırma sonrası ıslak preparatın incelenmesi ile tamamlanmış kabul edildiğinden dolayı direkt mikroskopiye dayalı sonuç raporu da esas itibarıyla bir 'ön rapor'dur (8).

Teknik Bilgiler

1 Test için asgari laboratuvar koşulları

1.1. Laboratuvar güvenliği

Potansiyel enfeksiyöz organizmalar içerebileceğinden dolayı dışkı örnekleri ile ilgili incelemeler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmeli; bütün örnekler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi"nde belirtilen standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır.

Dışkı örnekleri koruyucu maddelerle fikse edilmiş olsalar bile bu önlemler alınmalıdır; çünkü hala enfeksiyöz olabilirler. Bazı parazit ookist ve kistleri formol solüsyonu ile fikse edildikten günler, haftalar sonra canlılıklarını yitirirler. Örneğin, *Ascaris lumbricoides* yumurtaları formolde saklandığında bile gelişmeye devam edebilir ve enfeksiyözdür.

Bu prosedür uygulanırken daima **eldiven** giyilmelidir!

Lamlar **kesici-delici atık** kabul edilir ve kesinlikle kesici-delici atık kutusuna atılırlar! Diğer biyolojik kirlilerin bulunduğu torbalara atılmaları halinde torbayı deler ve ciddi infeksiyöz risk oluştururlar.

1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) tekniğin uygulanmasından önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) tekniğe tüm yönleriyle aşina olmalı, ve (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Bu UMS'nin uygulanmasından analist; tekniklerin prosedüre uygun yapılmasını sağlamaktan ve denetimi, değerlendirilmesi ve onaylanmasından (sonucun doğru ve güvenilir olmasından) Tıbbi Mikrobiyoloji/Parazitoloji Uzmanı sorumludur.

1.3. Örnek, Reaktif, Donanım

İnceleme örneği

- Dışkı – taze olmalıdır; çünkü direkt mikroskopik incelemenin en önemli amaçlarından biri hareketli trofozoitleri görmektir. Özellikle sulu veya yumuşak dışkılar hemen incelenmelidir.

NOT 1: Dışkı hemen incelenemeyecekse PVA, SAF gibi bir fiksatif içinde saklanabilir ancak bu örneklerin direkt incelemesine pratik anlamda gerek yoktur. Şekilli dışkılar hemen incelenemediği durumda 2 saate kadar buzdolabında saklanabilir (Fiksatifler için bkz. UMS P-ÖY-01).

NOT 2: Parazit elemanları dışkı ile her zaman aynı yoğunlukta atılmadığı için, farklı günlerde alınmış en az üç ayrı örneğin incelenmesi ile tanı şansının yükseldiği kabul edilmektedir. Buna göre; eğer incelenen ilk örnek negatif bulunmuş ise 2-3 gün aralıkla alınmış ikinci ve yine gerekiyorsa üçüncü örneğin de incelenmesi önerilmektedir.

Reaktifler

- Lugol'un iyot solüsyonu - Piyasadan hazır temin edilebilir veya laboratuvarında hazırlanabilir:
 - (a) Stok Lugol için; önce 10 g potasyum iyodür (KI) 100 mL distile/deiyonize suda eritilir. Solüsyon doyuncaya kadar 5 g iyot kristali (I₂) eklenir (bir miktar iyot kristali çözünmemiş olarak kalacaktır). Solüsyon bir kahverengi, vida kapaklı cam şişeye filtre ile süzülüp, gereksinim duyulana dek saklanır.
 - (b) Çalışma solüsyonu bir birim stok Lugol solüsyonuna, 5 birim distile su eklenerek hazırlanır. Haftada bir taze hazırlanmalıdır.
- Serum fizyolojik (SF) - Piyasadan hazır temin edilebilir veya laboratuvarında hazırlanabilir:
 - (a) 0.85 g NaCl 100 mL distile/deiyonize su içinde eritilir. 121°C'de 15 dk otoklavlanarak sterilize edilir.
 - (b) Etiketlenir ve +4°C'de saklanır; raf ömrü 1 yıldır.

Diğer gereç, donanım

- Mikroskop, binoküler (rutin) – 10× (düşük), 40× (yüksek kuru), 100× (immersiyon) objektifleri ve 10× oküleri olan tercih edilir.
NOT: Bazı mikroskopistler 5× oküler tercih etmektedir. Ancak 5× oküler daha az büyütme sağlar ve inceleme duyarlılığını düşürür; bu nedenle 10× oküler kullanılması önerilmektedir (9).
- Önceden temizlenmiş lamalar (25×75 mm) – tercihen kenarı rodajlı
- Kurşun kalem - lamın rodajlı kenarına örnek numarası vb. yazmak için
- Lamel (22×22mm)
- Tahta veya plastik örnek alma çubuğu
- Filtre kağıdı, Whatman no. 1 – boya süzmek için
- Pastör pipetleri
- Kesici-delici atık kabı

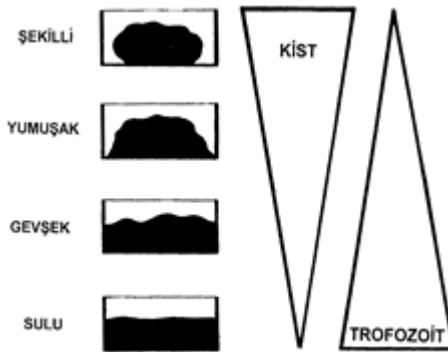
1.4. Kalite kontrol

- Hazırlanan preparat arkasından gazete kağıdı okunabilecek kalınlıkta olmalıdır.
- Solüsyonların güvenilir olup olmadığı pozitif dışkı örnekleri ile test edilmelidir. Laboratuvarda fiksatif içerisinde saklanmakta olan pozitif bir dışkı örneği bu amaçla kullanılabilir.
- Her kullanımdan önce Lugol'un iyot solüsyonu ve SF bulanıklık ve renk değişimi olup olmadığı yönünden kontrol edilmeli; bulanık veya renk değişikliği olmuş solüsyonlar değiştirilmelidir.
- Pozitif olduğu bilinen boyalı preparatlar, fotoğraflar ve kaynak kitaplar çalışma yerinde mevcut olmalıdır.
- Mikroskop belirli aralıklarla (yoğun kullanılıyorsa yılda en az bir kez) kalibre edilmelidir. Mikroskoba herhangi bir parça eklenmesi veya değiştirilmesi durumunda da kalibrasyon yapılmalıdır. Kalibrasyon için kullanılmış optikler mikroskopun üzerinde olmalıdır. Tüm objektifler için kalibrasyon faktörleri göz önündeki bir panoda asılı olmalıdır (bkz. UMS, P-TP-01 Mikroskop Kalibrasyonu).

2 Direkt mikroskopinin uygulanması

Makroskobik inceleme

- Dışkı örneği önce mutlaka makroskobik olarak incelenir.
- Dışkının kıvamı, şekilli, yumuşak ve sulu olarak sınıflandırılır. Gevşek ve sıvı örneklerde trofozoitlere sık, kist şekillerine ise daha nadir rastlanır (Şekil 1) (10).



Şekil 1. Dışkı örneğinin kıvamına göre kist ve trofozoit dağılımı (10).

- Makroskopik gözlem bulguları kaydedilmelidir.
- Dışkıda erişkin parazit (*A. lumbricoides*, *Enterobius vermicularis* gibi) ya da halkalarının (*Taenia* spp gibi) bulunup bulunmadığına bakılır.
- Sarı ve kötü kokulu dışkı örnekleri emilim bozukluğunu gösterir ve *G.intestinalis* enfeksiyonu için bir gösterge olabilir.
- Dışkı örneğinde kan ve/veya mukus varlığına da bakılmalıdır.
- Dışkıda **kanın** varlığı her zaman bildirilmelidir. Koyu renkte olan kan genellikle kanamanın gastrointestinal sistemin üst seviyelerinde olduğunu, açık renkli-taze kanama ise, kanamanın alt seviyelerinde veya rektum civarında olduğunu gösterir.
- Taze dışkı örneklerinde benek tarzında kan ve/veya mukus görüldüğünde dışkının trofozoit açısından dikkatlice incelenmesi gerekir.

Direkt mikroskopik inceleme

ÖNEMLİ: Trofozoitlerin gözlenebilmesi için dışkının taze olması ve preparat hazırlanıp inceleninceye kadar ısısının muhafaza edilmesi gereklidir.

NOT: Direkt mikroskopik incelemede (varsa) trofozoitlerin hareketleri dışkının SF süspansiyonunda gözlenebilir. Protozoonların kist yapıları ve içerikleri ise dışkının Lugol süspansiyonunda daha belirgin olarak gözlenebilir. Bu nedenle direkt mikroskopik incelemede her iki solüsyonun birden kullanılması gerekir!

*Sıvı dışkılar
dışkılamadan
sonraki ilk
30 dk içinde
incelenmelidir!*

- Temiz bir lam alınarak sol tarafına bir damla SF ve sağ tarafına bir damla Lugol solüsyonu damlatılır.
 - Örnek alma çubuğu ile küçük bir parça dışkı (kullanılan çubuğun örnek içine batırılıp çekildiğinde ucundaki miktar kadar) alınır.
 - Alınan örnek önce lam üzerindeki SF ile homojenize edilir. Aynı işlem Lugol içinde tekrarlanır.
 - Her süspansiyonun üzeri lamelle kapatılır.
 - Hazırlanan örnekler kurumadan ışık mikroskopunda önce 10× objektif ile tüm lamel alanı taranacak şekilde incelenir.
 - Sonra 40× objektif ile lamel alanının en az üçte biri incelenmelidir.
- NOT: Yoğunlaştırma yöntemi uygulanmış ve/veya MIF, PVA ve SAF gibi saklama solüsyonunda bulunan dışkı örneklerini hazırlarken SF kullanılmadan preparat direkt olarak hazırlanır. Ancak bu durumda trofozoitlerin hareketleri saptanamaz.
- Bir çok organizma parlak ışıkta gözden kaçacağı için düşük büyütmele incelemelerde mikroskobun ışığı kısılmalıdır.



Şekil 1. Dışkının direkt mikroskopik incelemesi için SF ve Lugol ile hazırlanan preparatın şematik görünümü

3 Sonuçların değerlendirilmesi / yorumlanması ve raporlama

- Değerlendirmelerin doğru olmasını sağlamak için mikroskopi sonuçlarını 'gözden geçirme sistemi' kurulmalıdır. Gözden geçirme sisteminin bir gereği olarak her gün Tıbbi Mikrobiyoloji / Tıbbi Parazitoloji Uzmanı da bazı preparatlara bakmalıdır. Bu, hem uygulayıcı personelin eğitim ihtiyaçlarını belirlemeye hem de sonuçların klinik bilgi ile ilişkilendirilmesine yardımcı olur.
- Tüm sonuçlar tanı konulduktan sonra en kısa sürede Uzman tarafından değerlendirilmeli ve onaylanmalıdır.
- Rapor klinisyene yönelik hazırlanmalıdır.
- Raporda öncelikle dışkı örneğinin makroskopik değerlendirme bulguları (kıvam, renk, mukus/kan varlığı vb.) yazılmalıdır. Dışkıda **kanın** varlığı her zaman bildirilmelidir.
- Raporda inceleme için hangi tekniğin kullanıldığı mutlaka yer almalıdır!
Örnek: "direkt mikroskopik inceleme; SF ve Lugol süspansiyonlarında"
- Raporun bir 'ön-rapor' niteliğinde olduğu; boyama ve yoğunlaştırma yöntemleri uygulandığında 'kesin-rapor' verileceği belirtilmelidir. Çünkü direkt mikroskopik inceleme;
 - (a) Bazı protozoonların, özellikle *Entamoeba histolytica/dispar* trofozoitlerinin ve kistlerinin ayırt edilmesine ve *Cryptosporidium* spp, ookistlerinin tanımlanmasına uygun değildir. Bu patojenler için asgari geçerli tanı kriteri **kalıcı boyama**dır; direkt mikroskopi raporunda bu parazitler belirtilemez;
 - (b) Parazit yükü düşük olduğunda hazırlanmış preparatta parazit elemanına rastlanma şansı da düşük olduğundan bir **yoğunlaştırma** yöntemi kullanmadan örneğin parazit içermediği sonucuna varılamaz.
- İncelenen preparat açısından sonucun negatif olduğunu söyleyebilmek için ise; 22×22 mm'lik lamel için düşük büyütmede (×100) bütün lamel alanının, yüksek kuru büyütmede (×400) ise lamel alanının en az üçte birinin incelenmiş olması gerekir (8).
- Bazı parazitler (*G. intestinalis* kistleri ve trofozoitleri, *Entamoeba coli* kistleri, *Iodamoeba bütschlii* kistleri, *Isospora belli* ookistleri ile helmint yumurta ve larvaları) eğer direkt mikroskopide görülürlerse 'kesin' olarak tanımlanabilirler (morfolojik netliklerine de bağlı olarak) (1,8).

Direkt mikroskopik inceleme sonucu 'ön-rapor' niteliğindedir! Kesin rapor boyama ve yoğunlaştırma yöntemleri uygulandığında verilir.

Kesin tanısı konulamayacağı için Entamoeba histolytica/dispar kist veya trofozoitleri direkt mikroskopik inceleme sonucunda rapor edilemez!

- Bu parazitlere ait sonuçlar aşağıdaki örneklerde verildiği gibi raporlanabilir (mutlaka saptanan parazitin adı ve formu kısaltma kullanılmadan açık olarak yazılmalıdır):
Örnek (pozitif rapor): "Giardia intestinalis trofozoitleri görüldü"
"Giardia intestinalis kistleri görüldü"
"Ascariis lumbricoides yumurtaları görüldü"
"Strongyloides stercoralis larvaları görüldü"
- Ayrıca görülmüş ise Charcot-Leyden kristalleri ve kanın şekilli elemanları (eritrosit, lökosit vb.) da raporda belirtilir.
- *Giardia intestinalis* ülkemizde **laboratuvar**dan bildirim zorunlu bir etkidir (11). Direkt mikroskopi ile tanı konması halinde olguların kayıt ve bildirim için Sağlık Bakanlığının "Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi" izlenmelidir (12).

4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Diğer klinik laboratuvarların aksine, klinik parazitolojide birçok test el işçiliğine dayalıdır ('manuel'). Bu nedenle sonuçların doğruluğunu ve güvenilirliğini sağlamak için kullanılacak kalite kontrol sistemleri büyük önem taşımaktadır. Ayrıca test prosedürleri ve uygulayıcılar arasındaki farklılıklar nedeniyle bu tür sistemlerin değerlendirilmesinde de zorluklar yaşanmaktadır (3). Modern tanı laboratuvarlarının tek sorunu bağırsak parazitlerinin rutin tanısında kullanılan yöntemin mikroskopik incelenmesi değil, aynı zamanda bu testin doğruluğunun da yeterince değerlendirilememesidir.
- Geleneksel tanı yöntemlerinde deneyimli personel ve zaman önemli bir faktördür. Mikroskopi tekniklerinin uygulayana bağlı oluşu önemli bir dezavantajdır. Dışkının rutin parazitolojik incelemesi ciddi düzeyde eğitilmiş ve deneyimli personel gerektirmektedir.
- Dışkının **hemen** incelenmesi zorunludur. Trofozoitlerin gözlenebilmesi için dışkının taze olması ve preparat hazırlanıp inceleninceye kadar ısısının muhafaza edilmesi gereklidir. Mukuslu dışkılar trofozoitin hareketlerini engelleyebildiği için bu formlar rahatlıkla gözden kaçabilmektedir.
- Lugol solüsyonu her hafta taze olarak hazırlanmalıdır.
- Yalancı parazitliğin (*Fasciola hepatica*, *Dicrocoelium dendriticum* yumurtaları) olup olmadığını belirlemek için hastada karaciğer yeme öyküsü sorgulanmalıdır.
- En yüksek duyarlılık için en az üç örnek gerekir. Örnek kalitesi de sonucu etkiler. Florayı etkileyen antibiyotikler ve klorokin gibi antimalaryal ilaçlar, bağırsak protozoonlarının yakalanma olasılığını azaltır. Dışkıya idrar karışmamış olmalıdır. Ayrıca dışkı örneklerinin parazitolojik inceleme için alınmasından önce hastaya baryum, kaolin, magnezi kalsine, antiasitler, bizmut, hint yağı, mineral yağı verilmemiş olmalıdır. Baryum verilmesinden sonra en az bir hafta geçmelidir.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Direkt Mikroskopi) ayrıca aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir. Özellikle, inceleme örneklerine yoğunlaştırma ve boyama yöntemlerinin uygulanması ve kesin tanı için gereken diğer kriterler hakkında yeterli bilgi için bu belgelere bakılması önerilir:

- UMS, P-ÖY-01 Dışkı örneklerinin parazitolojik incelemesi
- UMS, P-TP-01 Mikroskop kalibrasyonu
- UMS, P-TP-03 Yoğunlaştırma yöntemleri
- UMS P-MT-01 Amibiyazın mikrobiyolojik tanısı
- UMS P-MT-02 *Giardia intestinalis*'in tanımlanması

Kaynaklar

- 1 Crede P. Microscopic examination of fecal specimens: direct smears: *In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.3.1-3*
- 2 T.C. Sağlık Bakanlığı (Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi TR0802.16-01 Avrupa Birliği ve Dünya Bankası desteği ile) (Akbaş E, Pr Danışmanı). Türkiye'de Bulaşıcı Hastalıkların Tanısında Mikrobiyoloji Laboratuvar Kapasitesi Mevcut Durum Değerlendirmesi: Anket - LabKap2012. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kuşadası, 4 Kasım 2012.
- 3 Doğan N, Öz Y, Koçman NÜ, Nursal AF. Bağırsak parazitlerinin tanısında direkt mikroskopik incelemedeki bireysel farklılıkların karşılaştırılması. *T Parazitol Derg.* 2012;36(4):211-4
- 4 Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Laboratory methods for diagnosis of parasitic infections. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology.* 11th ed. Mosby. 2002, p. 604-709
- 5 Kilimcioğlu AA, Ok ÜZ. Yoğunlaştırma yöntemleri. *In: Korkmaz M, Ok ÜZ (eds). Parazitolojide Laboratuvar.* 1. baskı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, 2012, p.23-29
- 6 Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA (eds). Laboratory diagnosis of parasitic diseases. *In: Medical Microbiology.* 4th ed. Mosby, Philadelphia. 2002, p. 687-697
- 7 Ok ÜZ, Girginkardeşler N, Kilimcioğlu A, Limoncu E. Dışkı inceleme yöntemleri. *In: Özcel MA, Altıntaş N (eds). Parazit Hastalıklarında Tanı.* 1. baskı. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir. 1997, p. 1-61
- 8 Garcia LS, Shimizu RY, Paltridge GP. General approaches for detection and identification of parasites. *In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds). Manual of Clinical Microbiology.* 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 2047-2063
- 9 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. *In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.2.1-4*
- 10 Ash LR, Orihel TC (eds). Parasites: A Guide to laboratory procedures and identification. ASCP Press, Chicago. 1987, p. 7-52
- 11 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 12 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhbs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Yoğunlaştırma Yöntemleri (Dışkı Örneklerinin Parazitolojik İncelemesi için)

Hazırlayan Birim	Klinik Parazitoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Parazitoloji
Bölüm	Test prosedürleri
Standart No	P-TP-03
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
Çöktürme Yöntemi	4
Yüzdürme Yöntemi.....	4
TEKNİK BİLGİLER	4
1 Test için asgari laboratuvar koşulları	4
2 Yoğunlaştırma yöntemlerinin uygulanması	7
3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması	11
4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	11
EKLER.....	12
Ek-1 Yoğunlaştırma solüsyonlarının hazırlanması	12
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	13
KAYNAKLAR	13

Kapsam ve Amaç

Gastrointestinal sistemi tutan parazitolojik enfeksiyonların tanısı esas itibariyle dışkı örneklerinin incelenmesine dayanır. Genel olarak klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında 'parazitolojik tanı'nın en büyük kısmını dışkı örneklerinin incelenmesi oluşturmaktadır. Dışkı incelemesinin **doğru** ve **güvenilir** bir tanı aracı olabilmesi için *tam* uygulanması, bir diğer ifade ile "direkt mikroskopi", "boyama" ve "yoğunlaştırma" tekniklerinin bir arada kullanılması gereklidir. Ne var ki, ülkemiz genelinde laboratuvarların çoğunda dışkı incelemesi 'direkt mikroskobik inceleme' ile sınırlıdır (1).

Yoğunlaştırma teknikleri dışkı incelemesinin rutin bir parçasıdır ve dışkıda parazitlerin -direkt mikroskopi ile saptanamayacak denli- az olduğu durumlarda tanıya imkan verdiği için *tam* bir dışkı incelemesinin vazgeçilmezidir (2). Laboratuvarlarda yoğunlaştırma yöntemlerinin yaygın bir şekilde kullanılması bu nedenle dışkının parazitolojik incelemesinde tanı kalitesinin artması ve doğru ve güvenilir tanının yaygınlaşması ile eşdeğerdir.

Bu UMS'de de; dışkının parazitolojik incelemesinde 'yoğunlaştırma yöntemleri' için ülke genelinde uygulanabilecek standart bir prosedürün verilmesi, hem de laboratuvarlara 'yoğunlaştırma'nın tanıdaki yeri, önemi, sınırlılıkları, elde edilen sonuçların yorumlanması ve raporlanmasında dikkat edecekleri hususlar ile ilgili temel bilgilerin iletilmesi hedeflenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

PVA Polivinil alkol (fiksatif)

SAF Sodyum asetat-asetik asit- formol (fiksatif)

Genel Bilgi

Dışkının parazitolojik incelemesi ülkemizde yaygın bir şekilde dışkının direkt mikroskobik incelemesine dayanır. Dışkıda parazit yoğunluğunun az olduğu durumlarda direkt mikroskobik inceleme ile tanı konamayacağından dolayı tek başına direkt incelemeye dayalı bir tanı kapasitesi enfeksiyonların büyük kısmının atlandığı anlamında yorumlanabilir.

Dışkı bir yoğunlaştırma yöntemi uygulandıktan sonra incelendiğinde helmintlerin yumurta ve larvaları ile protozoonların kist ve ookistlerinin saptanma olasılığı belirgin olarak yükselmektedir. Trofozoitler ise yoğunlaştırma yöntemlerinden (uygulama sırasında kullanılan reaktiflerden veya santrifüj işlemlerinden) olumsuz etkilenebilirler; yapılarında bozulma olabilir veya parçalanabilirler (3).

İyi bir yoğunlaştırma metodunun özelliği bir yandan parazitleri yoğunlaştırırken bir yandan da onları fekal debrisden ayırıp kolay tanınmalarına imkan sağlamaktır. Yoğunlaştırma yöntemleri çöktürme (sedimentasyon) ve yüzdürme (flotasyon) olmak üzere iki bölümde incelenir (2,3).

Çöktürme Yöntemi

Santrifüj veya basit yerçekimi etkisiyle sağlanabilir. Bu yöntemin avantajı dışkıdaki bütün parazitleri çöktürmesi; en büyük dezavantajı ise çöken aşırı dışkı artığının parazitlerin görülmesini maskeleyebilmesidir. Yüzdürme yöntemine kıyasla debris çok fazladır.

En sık kullanılan formol-etil asetat yöntemidir. Etil-asetat debris ve yağları çökeltiden uzaklaştırma işlevi görür. Formol-etil asetat yöntemi daha fazla çeşitlilikte parazitin yakalanmasına uygun olması ve hata olasılığının düşük olması nedeniyle öncelikle önerilen bir yöntemdir (2). Ayrıca elde edilecek fekal sediment mikrosporidiya ve koksidiyaların *sırasıyla* modifiye trikrom ve modifiye asit-fast boyamaları için de kullanılabilir. Ancak, zaman alıcı olduğundan bazı laboratuvarlar bu yöntemin modifiye edilmiş halini kullanmayı tercih ederler.

Çöktürme yöntemleri hem taze dışkıya hem de fiksatifler içinde saklanmış örneklerle uygulanabilir (2,4).

Yüzdürme Yöntemi

Temel prensibi yüksek özgül ağırlıklı solüsyonların protozoon kistlerini ve bazı helmint yumurtalarını dışkı artıklarından bağımsız olarak yüzdürmesine dayanır. Yöntemin **avantajı** elde edilen materyalin dışkı artıklarından arınmış olmasıdır ve parazitler daha kolay ayırt edilir. Yöntemin **dezavantajı** ise parazitlerden daha fazla yoğunluğa sahip kimyasal maddelerin kullanılması nedeniyle parazit şekillerinin bozulmasına bağlı olarak tanının güçleşmesidir. Diğer bir dezavantajı da birçok sestod ve trematod yumurtasının ağırlığından veya kapaklı olmasından dolayı dibe çökmesidir (2,5).

Laboratuvarda rutin olarak çinko-sülfat yüzdürme yöntemi kullanılır. Bu metot kullanıldığında, eğer yüzdürme katmanı negatif bulunduysa sonuç negatif olarak rapor edilmeden önce çökeltinin de incelenmesi önerilir (6).

Teknik Bilgiler

1 Test için asgari laboratuvar koşulları

1.1. Laboratuvar güvenliği

Potansiyel enfeksiyöz organizmalar içerebileceği için parazitolojik inceleme için dışkı örnekleri asgari BGD2 laboratuvar şartlarında incelenmeli ve daima "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi"nde belirtilen standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır. Dışkı örnekleri koruyucu maddelerle fikse edilmiş olsalar bile bu önlemler alınmalıdır; çünkü hala enfeksiyöz olabilirler. Bazı parazit ookist ve kistleri formol solüsyonu ile fikse edildikten günler, haftalar sonra canlılıklarını yitirirler. Örneğin, *Ascaris lumbricoides* yumurtaları formolde saklandığında bile gelişmeye devam edebilir ve enfeksiyözdür.

Bu prosedür uygulanırken daima **eldiven** giyilmelidir!

Lamlar, boyanmış olsun olmasın, **kesici-delici atık** kabul edilir ve kesinlikle kesici-delici atık kutusuna atılırlar! Diğer biyolojik kirlilerin bulunduğu torbalara atılmaları halinde torbayı deler ve ciddi infeksiyöz risk oluştururlar.

Güvenlik uyarısı! Yoğunlaştırma yöntemlerinde kullanılan **eter** anestezik, **formol** ise toksik bir maddedir. Bu tür uçucu kimyasallar ile her zaman çeker ocak içinde çalışılmalıdır.

1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) tekniğin uygulanmasından önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) tekniğe tüm yönleriyle aşina olmalı, ve (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Bu UMS'nin uygulanmasından analist; tekniklerin prosedüre uygun yapılmasını sağlamaktan ve denetimi, değerlendirilmesi ve onaylanmasından (sonucun doğru ve güvenilir olmasından) Tıbbi Mikrobiyoloji/Parazitoloji Uzmanı sorumludur.

1.1. Örnek, Reaktif, Donanım

İnceleme örneği

- Dışkı – Laboratuvara taze veya fiksatif içinde gelmiş olabilir.
NOT 1: Dışkı taze gelmiş ancak hemen incelenemeyecekse PVA veya SAF gibi bir fiksatif içine konmalıdır (fiksatifler için bkz. UMS P-ÖY-01). Şekilli dışkıları hemen incelenemediği durumda 2 saate kadar buzdolabında saklanabilir.
NOT 2: Sulu veya yumuşak dışkıların hemen direkt mikroskopik incelemeleri yapılmalıdır; sulu dışkı, dışkılamadan sonraki yarım saat içinde, yumuşak dışkı da en geç 1 saat içinde mutlaka incelenmiş olmalıdır. Takiben bu örnekler de yoğunlaştırma işlemine alınmalı; yoğunlaştırma işlemi hemen başlayamayacak ise fiksatif içine konmalıdır
NOT 3: Parazit elemanları dışkı ile her zaman aynı yoğunlukta atılmadığı için, farklı günlerde alınmış en az üç ayrı örneğin incelenmesi ile tanı şansının yükseldiği kabul edilmektedir. Buna göre; eğer incelenen ilk örnek negatif bulunmuş ise 2-3 gün aralıkla alınmış ikinci ve yine gerekiyorsa üçüncü örneğin de incelenmesi önerilmektedir.

Reaktifler

Kullanılacak konsantrasyon yöntemine göre aşağıdaki solüsyonlardan bir veya bir kaç gerekebilir. Piyasadan hazır temin edilebilirler veya laboratuvarında hazırlanabilirler (bkz. Ek-1):

- Serum fizyolojik (SF)
- Lugol veya D'Antoni'nin iyot solüsyonu
- Formol-etil asetat veya formol-eter
- Çinko sülfat
- Doymuş tuzlu su
- Sheather'in şekerli solüsyonu

Diğer gereç, donanım

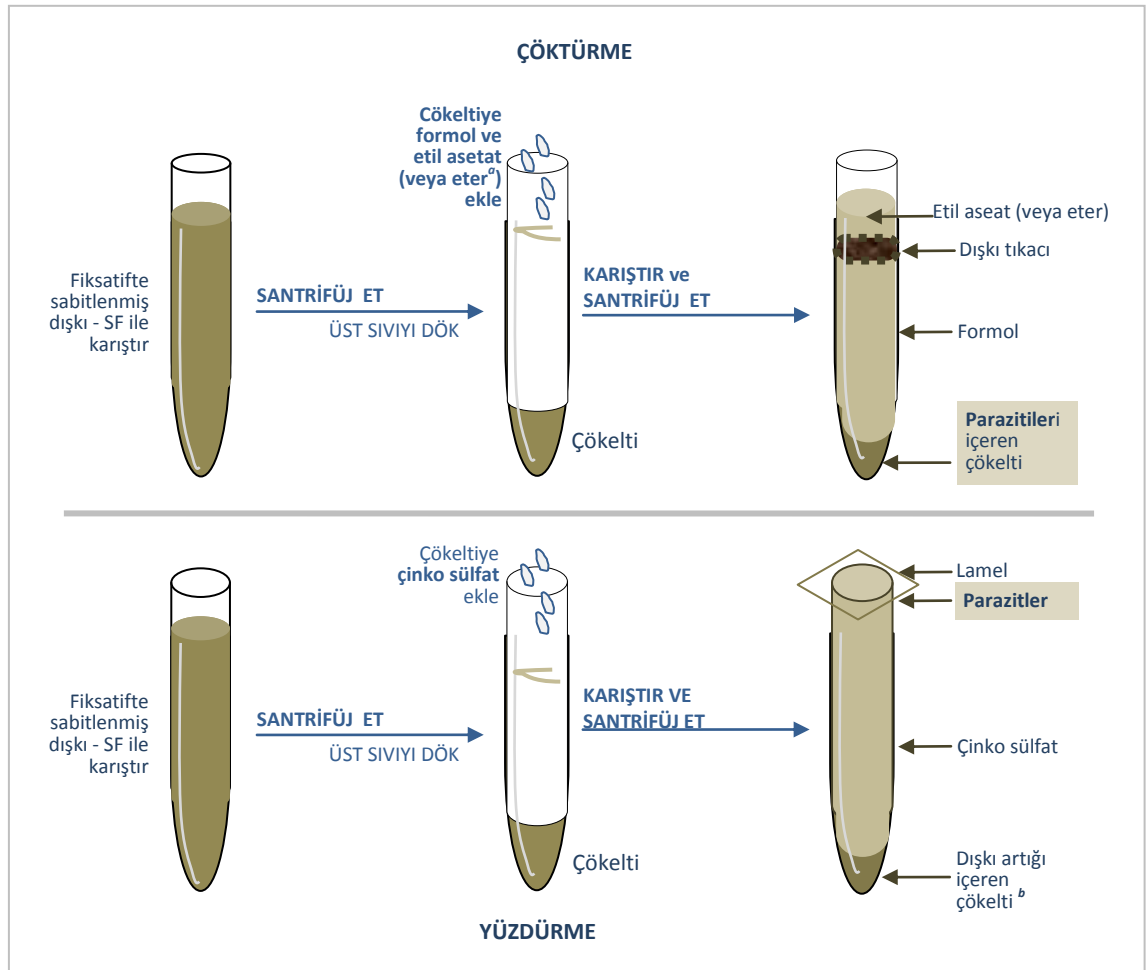
- Mikroskop, binoküler (rutin) – 10× (düşük), 40× (yüksek kuru), 100× (immersiyon) objektifleri ve 10× oküleri olan tercih edilir.
NOT: Bazı mikroskopistler 5× oküler tercih etmektedir. Ancak 5× oküler daha az büyütme sağlar ve inceleme duyarlılığını düşürür; bu nedenle 10× oküler kullanılması önerilmektedir (7).
- Faz-kontrast mikroskobu (opsiyonel)
- Santrifüj
- Hidrometre (1.18 - 1.20 aralığını içeren)
- Önceden temizlenmiş lamalar (25×75 mm) – tercihen kenarı rodajlı
- Kurşun kalem - lamenin rodajlı kenarına örnek numarası vb. yazmak için,
- Tahta veya plastik örnek alma çubuğu
- Mezür, erlen, pipetler, vidalı kapaklı şişeler (50 mL'den 1 L'ye)
- Plastik kap, süzgeç, lamel, öze, gazlı bez, santrifüj tüpü
- Filtre kağıdı, Whatman no. 1 – boya süzmek için
- Biyolojik atık kapları, kesici-delici atık kabı ve toksik boya atıklarını toplamak için kap (kimyasal atık kabı)

1.3. Kalite kontrol

- Solüsyonların güvenilir olup olmadığı pozitif dışkı örnekleri ile test edilmelidir. Laboratuvarda fiksatif içerisinde saklanmakta olan pozitif dışkı örnekleri bu amaçla kullanılabilir.
- Yüzdürme yönteminde kullanılan solüsyonların özgül ağırlığı her test öncesi kontrol edilmelidir.
- Kullanılan eter ve formol berrak olmalıdır; çökelti veya bulanıklık olmamasına dikkat edilir. Bulanık veya renk değişikliği olmuş solüsyonlar değiştirilmelidir.
- Hazırlanan %10'luk formol iki hafta kullanılabilir; stok formolün son kullanma tarihi kontrol edilmelidir.
- Yöntem uygulandığında parazitin elde edilip edilemediğini doğrulamak amacıyla bilinen pozitif örnekten en az üç ayda bir ve özellikle santrifüj kalibre edildikten sonra yoğunlaştırma yapılmalıdır.
- Mikroskop belirli aralıklarla (yoğun kullanılıyorsa yılda en az bir kez) kalibre edilmelidir. Mikroskoba herhangi bir parça eklenmesi veya değiştirilmesi durumunda da kalibrasyon yapılmalıdır. Kalibrasyon için kullanılmış optikler mikroskobun üzerinde olmalıdır. Tüm objektifler için kalibrasyon faktörleri göz önündeki bir panoda asılı olmalıdır (*bkz.* UMS, P-TP-01 Mikroskop Kalibrasyonu).
- Hazırlanan preparat arkasından gazete kağıdı okunabilecek kalınlıkta olmalıdır.
- Pozitif olduğu bilinen boyalı preparatlar, fotoğraflar ve kaynak kitaplar çalışma yerinde mevcut olmalıdır.

2 Yoğunlaştırma yöntemlerinin uygulanması

2.1. Yoğunlaştırma yöntemleri için basit uygulama şeması



Şekil 1. Çöktürme (üstte) ve yüzdürme (altta) yöntemlerinin uygulama adımları (8).

^{a.} etil asetat eterden daha güvenli olduğu için öncelikle tercih edilmektedir.

^{b.} çökelti halen bazı parazit yumurtalarını içerebilir. İdeal olarak bu çökelti de incelenmelidir.

2.2. Formol-etil asetat çöktürme yöntemi

NOT: Aşağıda verilen yöntemde "etil asetat" yerine "eter" de kullanılabilir (Formol-Eter Çöktürme Yöntemi). Etil asetat eterden daha güvenli bir kimyasal olarak tercih edilmektedir.

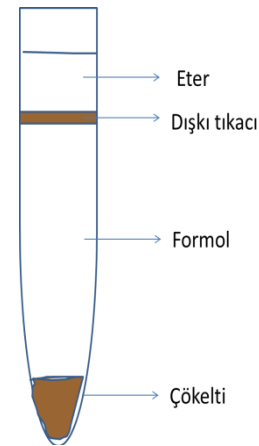
Temel işlem adımları Şekil 1'de verilmiştir.

- 1 Taze dışkıdan 1-1.5 g, 10 mL %10'luk formol bulunan uygun bir cam veya plastik kap içinde tamamen ezilir.
- 2 Tam bir fiksasyon olması için 30 dk veya daha fazla beklenir.
- 3 Süspansiyon iki tabaka gazlı bezden (veya bir çay süzgecinden) diğer bir kap içine süzülür, buradan da 15 mL'lik konik santrifüj tüpüne aktarılır (ticari olarak kendinden filtreli özel tüpler de mevcuttur).

- 4 Üzerine SF eklenir (tüp çok fazla doldurulmamalıdır, aksi takdirde santrifüj işlemi sırasında çevreye sıçrayabilir).
- 5 Solüsyon $500 \times g$ 'de 2-3 dk santrifüj edilir. Yaklaşık 0.5-1 mL çökelti elde edilmelidir. Eğer üstteki sıvı hala bulanıksa, bu kısım atılır ve çökelti 10-12 mL SF ile sulandırılarak tekrar santrifüj edilir; bu yıkama işlemi üst sıvı berraklaşmaya başlayana dek tekrarlanır.
- 6 Çökeltiye birkaç mL %10 formol eklenir, tüp iyice çalkalandıktan sonra toplam hacim 10 mL olana kadar %10 formol eklenir.
- 7 Süspansiyona 3 mL etil asetat (veya eter) eklenir, tüpün ağzı tıpa ile kapatılarak 30 saniye kuvvetlice çalkalanır

ÖNEMLİ: Eğer etil asetatın yerine aynı miktar eter kullanılırsa kapalı tüp yüz mesafesinden uzak tutulmalıdır; çünkü formol-eter karışımı çalkalanırken tüpün tıpası atabilir. Tüpü çalkaladıktan sonra basıncı azaltmak için tıpa yavaşça gevşetilerek gaz çıkışına izin verilmelidir.

ÖNEMLİ NOT: Sulu veya bol mukus ihtiva eden dışkı örneklerinde etil-asetat kullanılmaması gerektiği hatırlanmalıdır. Etil asetat sıvı/mukus örnek içeriğini debris katmanına (dışkı tıkaçı içine) çekebilir ve atılmasına neden olur. Aslında bu tür örneklerin çoklaştırılmasında basit santrifüj işlemi daha başarılıdır ve önerilmektedir (6).



Şekil 2. Çöktürme işlemi sonucunda oluşan tabakalar

- 8 Süspansiyon $400-500 \times g$ 'de 2-3 dk santrifüj edilir. Tüp santrifüjden çıkarıldığında 4 tabaka görülür (Şekil 2):
 - a. En üstte etil asetat (veya eter) tabakası,
 - b. Tüpün duvarlarına yapışmış bir dışkı artığı tabakası (dışkı tıkaçı),
 - c. Formol tabakası,
 - d. Çökelti
- 9 Dışkı tıkaçını uzaklaştırmak için bir çubuk yardımı ile tıkaç tüpün kenarlarından sıyrılır ve üstteki 3 tabaka ani bir hareketle tüp ters çevrilerek dökülür.
- 10 Çökelti tabakası birkaç damla SF eklenerek karıştırılır.
- 11 Nativ-Lugol yöntemiyle direkt mikroskopik inceleme preparatları hazırlanır (bkz. UMS, P-TP-02).

2.3. Modifiye formol-etil asetat çöktürme yöntemi

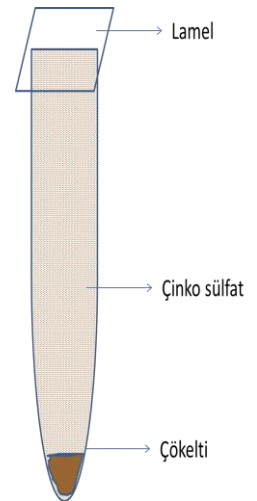
NOT 1: Modifiye yöntemde de "etil asetat" yerine "eter" kullanılabilir (Modifiye Formol-Eter Çöktürme Yöntemi).

NOT 2: Modifiye yöntemin yukarıda 2.1'de verilen yöntemden **farkı** SF ile yıkama adımlarının olmaması, böylece toplam uygulama süresinin kısalmış olmasıdır.

- 1 Modifiye yöntemde de dışkının hazırlanması ile ilgili işlemler aynıdır ve 2.1'de verilen prosedürün ilk 3 basamağı (formol ile karıştırma, fiksasyon ve süzme) uygulanır. Daha sonra aşağıdaki adımlar izlenir.
- 2 Süzülen dışkı deney tüpüne alınarak üzerine 3 mL etil asetat (veya eter) eklenir.
- 3 Karışım deney tüpünün ağzı tıpa ile kapatılarak biraz kuvvetlice sallanır. Tüpün ağzı açılırken dikkatli olunmalı, uzakta tutulmalıdır. Çünkü tüpün içinde çalkalamadan dolayı gaz oluşur.
- 4 Süspansiyon 1000×g'de 3 dk santrifüj edilir. Tüp santrifüjden çıkarıldığında aynı şekilde 4 tabaka görülür (bkz. Şekil 2):
 - a. En üstte etil asetat (veya eter) tabakası,
 - b. Tüpün duvarlarına yapışmış bir dışkı artığı tabakası (dışkı tıkaçı),
 - c. Formol tabakası,
 - d. Çökelti
- 5 Çökelti tabakası birkaç damla SF eklenerek karıştırılır.
- 6 Nativ-Lugol yöntemiyle direkt mikroskopik inceleme preparatları hazırlanır (bkz. UMS, P-TP-02).

2.4. Çinko sülfat yüzdürme yöntemi

- 1 Bir dışkı kabı içinde birkaç mL suyla 1-1.5 gr dışkı tamamen ezilir, süspansiyon 15 mL'lik konik santrifüj tüpüne dökülür. Tüpün üst kısmına distile su eklenir.
- 2 Süspansiyon 400-500×g'de 1-2 dk santrifüj edilip, üst sıvı atılır.
- 3 Çökeltiye 1-2 mL çinko sülfat solüsyonu eklenir ve tüp sert hareketlerle sarsılarak çökeltinin iyice karışması sağlanır. Tüpün üst kısmında santrifüj sırasında dışarıya dökülmeyecek şekilde boşluk bırakana dek çinko sülfat solüsyonu eklenir.
- 4 Süspansiyon iki tabaka gazlı bezden (veya bir çay süzgecinden) (Ticari olarak kendinden filtreli özel tüpler de bulunmaktadır), diğer bir tüp içine süzülür. Tüpün üst kısmına çinko sülfat solüsyonu eklenir ve tüp hafifçe çalkalanır.
- 5 500×g'de 2 dk santrifüj edilir. Tüp santrifüjden çıkarılmadan alevden geçirilmiş 5-7 mm çapında tel bir öze yüzey filmin ortasına değdirilir, bu sırada özenin dibe dalmamasına özen gösterilmelidir.
- 6 Özenin ortasında oluşan film tabakası bir lamın üzerine aktarılır. Bu işlemi birkaç kez tekrarlayarak birkaç damla sıvı elde edilir.
- 7 Lam üzerine aktarılan damlalarla Nativ-Lugol yöntemiyle direkt mikroskopik inceleme preparatları hazırlanır (bkz. UMS, P-TP-02).



Şekil 3. Çinko-sülfat yüzdürme işlemi sonucunda oluşan tabakalar

ÖNEMLİ NOT: Bütün trematod yumurtaları, bazı sestod yumurtaları ve döllenenmiş *Ascaris lumbricoides* yumurtaları 1.18 özgül ağırlıkta tüpün dibine batar. Eğer preparat incelenmeden önce uzun bir süre bırakılırsa protozoon kistleri ve ince kabuklu helmint yumurtaları büzüşür ve yapıları bozulur. Bu nedenle santrifüj durduktan sonra 5 dk içinde inceleme yapılmalıdır. Genel olarak diğer yüzdürme yöntemlerinde de mümkün olan en kısa süre içinde preparatlar incelenmelidir.

2.5. Modifiye çinko sülfat yüzdürme yöntemi

- 1 Yaklaşık 5 cm uzunluğunda ve 1.8 cm çapında bir cam tüpteki çinko sülfat solüsyonuna 1 mL kadar dışkı ekleyerek karıştırılır.
- 2 Dikkatli bir şekilde uygun miktarda çinko sülfat solüsyonu ekleyerek, sıvı seviyesinin tüpün tam tepesine ulaşması sağlanır.
- 3 Tüpün üzerine solüsyonla temas edecek şekilde lamel yerleştirilir (bkz. Şekil 3).
- 4 Yaklaşık 30 dk sonra lamel yavaşça kaldırılır ve bir lamın üzerine bırakılır.

2.6. Sheather'in şekerli yüzdürme yöntemi

- 1 7-8 mL şeker solüsyonu içeren santrifüj tüpüne 0.5-1 g şekilli dışkı (veya 1-2 mL sulu dışkı) eklenir. İyice karıştırdıktan sonra tüpün üst kısmına şeker solüsyonu ilave edilir.
- 2 Süspansiyon 500×g'de 5 dk santrifüj edilir.
- 3 Tüp santrifüjden çıkarılmadan alevden geçirilmiş 5-7 mm çapında tel bir öze yüzey filmin ortasına değdirilir, bu sırada özenin dibe dalmamasına özen gösterilmelidir.
- 4 Özenin ortasında oluşan film tabakası bir lamın üzerine aktarılır.
- 5 Bu işlem birkaç kez tekrarlanarak birkaç damla sıvı elde edilir ve üzeri lamelle kapatılarak mikroskopta ile incelenir.

2.7. Doymuş tuzlu suda yüzdürme yöntemi

- 1 Geniş ağızlı bir dışkı kabına doymuş tuzlu sudan bir parmak boşluk kalana kadar eklenir. Üzerine konan süzgecin suya değmesi gerekir.
- 2 İncelenecek dışkıdan ceviz büyüklüğünde bir parça alınır ve süzgecin içine konur.
- 3 Bir baget yardımıyla dışkı, suya değen süzgecin içinde ezilir. Bu esnada dışkı su içinde dağılmış olur. Süzgeç atılır.
- 4 Dışkı kabının üzerine yüzecek şekilde iki lamel atılır ve 15 dk bekletilir.
- 5 Sürenin sonunda bir pens yardımıyla lamelin altındaki su damlası düşürülmeden lamın üzerine alınır ve mikroskopta incelenir.

3 Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması

- Yoğunlaştırma yöntemlerinden sonra hazırlanan preparatlar hemen ışık mikroskopunda 10× ve 40× objektifler kullanılarak incelenir.
- Ayrıca Sheather'in şekerli yüzdürme yöntemi ile hazırlanmış örnek faz-kontrast mikroskopunda *Cryptosporidium* spp varlığı açısından da incelenebilir.
- Yüzdürme yöntemlerinde, yüzeydeki tabakadan alınan örnek mikroskopisi negatif bulunduysa, sonuç negatif olarak rapor edilmeden önce çökeltinin de incelenmesi önerilir (6).
- Sonuçlar raporlanırken mutlaka saptanan parazitin adı ve formu kısaltma kullanılmadan açık olarak yazılmalıdır. Sonuçların raporlanması ile ilgili ayrıntılı bilgi için ayrıca bkz. "UMS, P-ÖY-01 Dışkı örneklerinin parazitolojik incelemesi".

4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Çöktürme yöntemlerinde 0.5-1 mL çökelti elde edilmelidir; daha az veya daha fazla çökelti yöntemin başarısız olmasına neden olabilir (2).
- Çöktürme yöntemlerinde santrifüj süresini tutmak için önce santrifüjün önerilen hıza çıkması beklenmelidir. Eğer önerilen hızdaki santrifüj süresi gerekenden daha kısa olursa parazit elemanları sedimentten elde edilemezler. Özellikle eğer örnekte mevcut iseler *Cryptosporidium* ookistleri, mikrosporidial sporlar ve *Coccidia*'ların yakalanabilmesi için bugün önerilen, örneğin 500×g'de en az 10 dk santrifüj edilmesidir (2).
- Bazı protozoon kistleri, ookistleri ve sporlarının ıslak preparatlardan tanımlanması mümkün olmadığından kalıcı boyamalar yapılmalıdır.
- Parazit kist ve yumurtalarını dışkı artıklarından ayırarak serbest olarak yüzdüren tuz, şeker ve magnezyum sülfatın doymuş solüsyonları gibi başka kimyasal maddeler de yüzdürmek için kullanılmaktadır. Bu solüsyonların birçoğunun özgül ağırlığı 1.20-1.26 arasında değişir. Bu yüksek özgül ağırlığa 10-15 dakikadan fazla maruz kalan protozoon kistleri ve ince duvarlı nematod yumurtaları büzüşür. Bu solüsyonlarda *Clonorchis* ve *Heterophyes* gibi kapaklı küçük trematod yumurtaları yüzerken, *Fasciola* ve *Fasciolopsis* gibi büyük ve ağır trematod yumurtaları ve *Schistosoma* yumurtaları sıklıkla batar.
- Bütün trematod yumurtaları, bazı sestod yumurtaları ve döllenmemiş *A.lumbricoides* yumurtaları 1.18 özgül ağırlıkta tüpün dibine batar. Eğer preparat incelenmeden önce uzun bir süre bırakılırsa protozoon kistleri ve ince kabuklu helmint yumurtaları büzüşür ve yapıları bozulur. Bu nedenle santrifüj durduktan sonra 5 dk içinde inceleme yapılmalıdır.
- Sheather'in şekerli yüzdürme yöntemi *Cryptosporidium* tanısı için kullanılır. Diğer parazitlerin çoklaştırılmasında yetersiz kalabilir.
- Formolle çoklaştırılmış örneklerden trikrom boyama yapılamaz; tavsiye edilmez, kaliteli sonuç vermez.

Ekler

Ek-1 Yoğunlaştırma solüsyonlarının hazırlanması

SF (Nativ solüsyonu)

NaCl	0.85 g
Distile/deiyonize su	100 mL

NaCl distile su içinde eritilir. 121°C'de 15 dk otoklavlanarak sterilize edilir. Etiketlenir ve +4°C'de saklanır. Raf ömrü 1 yıldır.

Lugol'ün İyot Solüsyonu (Stok)

Potasyum iyodür (KI)	10 g
Toz iyot kristalleri (I ₂)	5 g
Distile/deiyonize su	100 mL

Potasyum iyodür distile suda eritilir. Solüsyon doyuncaya kadar (5 g) iyot kristali eklenir (bir miktar iyot kristali çözünmemiş olarak kalacaktır). Solüsyon kahverengi, cam kapaklı şişeye süzülüp, gereksinim duyulana dek saklanır.

NOT: Kullanmadan önce bir birim stok Lugol, 5 birim distile su ile sulandırılır. 3-4 haftada bir taze solüsyon hazırlanmalıdır.

%10'luk Formol

Formaldehit	100 mL
Distile/deiyonize su	900 mL

Formaldehit distile su ile karıştırılır. Kullanıncaya kadar saklanır.

Çinko sülfat solüsyonu

Çinko sülfat (ZnSO ₄)	330 g
Distile/deiyonize su	670 mL

Çinko sülfat kristali suda çözdürülür. Her kullanımdan önce su veya çinko sülfat kristalleri ekleyerek hidrometre ile özgül ağırlık 1.18'e ayarlanır.

Sheather'in Şeker Solüsyonu

Sukroz	500 g
Fenol kristali	6.5 g
Distile/deiyonize su	320 mL

Distile suda, sukroz ve fenol kristali çözülür. Gereksinim duyana dek saklanır.

Doymuş tuzlu su solüsyonu

Sofra/kaya tuzu (NaCl)	350 g
Distile/deiyonize su	1000 mL

Su ısıtılır ve 350 g sofra tuzu konur; eriyene kadar karıştırılarak kaynatılır. Soğuyana kadar bekletilir; filtre kağıdından süzülürken kullanıma hazırdır.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Yoğunlaştırma Yöntemleri) ayrıca aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir. Özellikle, mikroskopi sonuçlarının değerlendirilmesi hakkında yeterli bilgi için bu belgelere bakılması önerilir:

UMSP-ÖY-01	Dışkı örneklerinin parazitolojik incelemesi
UMS P-TP-01	Mikroskop kalibrasyonu
UMS P-TP-02	Direkt mikroskopi
UMS P-MT-01	Amibiyazın mikrobiyolojik tanısı
UMS P-MT-02	<i>Giardia intestinalis</i> 'in tanımlanması
UMS P-MT-03	<i>Cryptosporidium</i> türlerinin tanımlanması
UMS P-MT-09	Trişinozun mikrobiyolojik tanısı
UMS P-MT-10	Şistozomiyazın mikrobiyolojik tanısı

Kaynaklar

- 1 T.C. Sağlık Bakanlığı (Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi TR0802.16-01 Avrupa Birliği ve Dünya Bankası desteği ile) (Akbaş E, Pr Danışmanı). Türkiye'de Bulaşıcı Hastalıkların Tanısında Mikrobiyoloji Laboratuvar Kapasitesi Mevcut Durum Değerlendirmesi: Anket - LabKap2012. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kuşadası, 4 Kasım 2012.
- 2 Crede P. Microscopic examination of fecal specimens: Concentration by formalin-ethyl acetate sedimentation: *In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.4.1-5*
- 3 Ok ÜZ, Girginkardeşler N, Kilimcioğlu A, Limoncu E. Dışkı inceleme yöntemleri. *In: Özcel MA, Altıntaş N (eds). Parazit Hastalıklarında Tanı. 1. baskı. Ege Üniversitesi Basımevi, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, İzmir. 1997, p. 1-61*
- 4 Kilimcioğlu AA, Ok ÜZ. Yoğunlaştırma yöntemleri. *In: Korkmaz M, Ok ÜZ (eds). Parazitolojide Laboratuvar. 1. baskı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, İzmir. 2011, p.23-29*
- 5 Crede P. Microscopic examination of fecal specimens: concentration by zinc sulfate flotation. *In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). Clinical Microbiology Procedures Handbook. ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.5.1-4*
- 6 Garcia LS, Shimizu RY, Paltridge GP. General approaches for detection and identification of parasites. *In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds). Manual of Clinical Microbiology. 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p.2047-2063*
- 7 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. *In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. update, ASM, Washington D.C. 2007, p. 9.3.2.1-4*
- 8 Estridge BH, Reynolds AP, Walters NJ (eds). Basic Parasitology: Microscopic methods for detecting intestinal parasites. *In: Basic Medical Laboratory Techniques. 4th ed., Thomson Learning, Delmar, U.S. 2000, p. 565-572*



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Trikrom Boyama

(Dışkı Örneklerinin Parazitolojik İncelemesi için)

Hazırlayan Birim	Klinik Parazitoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Parazitoloji
Bölüm	Test prosedürleri
Standart No	P-TP-04
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
TEKNİK BİLGİLER	4
1 Test için asgari laboratuvar koşulları	4
2 Trikrom boyamanın yapılması	7
3 Preparatların değerlendirilmesi/yorumlanması	9
4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	9
EKLER.....	11
Ek-1 Trikrom boya reaktiflerinin hazırlanması	11
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	12
KAYNAKLAR.....	12

Kapsam ve Amaç

Boyalı dışkı yaymaları bağırsak protozoonlarının tanımlanması için en önemli yöntemlerden biri olarak kabul edilir. Boyalı yaymalar kistlerin ve trofozoitlerin tespiti ve tanımlanmasını kolaylaştırır. Ayrıca karşılaşılan protozoonların kalıcı preparatları elde edilebilir. Bu nedenlerle rutin parazitolojik inceleme için gelen bütün örnekler kalıcı boyama uygulanması önerilmektedir (1).

Kalıcı boyama yöntemleri arasında trikrom boyama bilhassa *Entamoeba histolytica*'nin tanımlanmasında laboratuvarlarda kullanılması gereken asgari teknik olarak da ayrı bir yere sahiptir. *E. histolytica* bildirim zorunlu bir etkidir (2), ancak sürveyans kapsamında toplanan verilerin gerçek durumu yansıttığı tartışmalıdır. Çünkü ülkemizdeki klinik laboratuvarların oldukça azı (%11.3) geçerli teknikleri* kullanarak sonuç verebilmektedir (3). Vakaların önemli bir kısmının bu nedenle hatalı tanı aldığı düşünülürse hem hasta yönetiminin hem de enfeksiyonun kontrolüne yönelik çabaların olumsuz yönde etkilendiği tahmin edilebilir. Dolayısı ile uygun bir prosedürün el altında olması doğru tanının yaygınlaşmasını teşvik edeceği için önemli görünmektedir.

Bu UMS'nin amacı başta *E. histolytica*'nin tanısı olmak üzere direkt bakıda atlanabilen protozoonların boyalı preparatlarda görülme olasılığını artırmak ve tür ayırımını yapabilmek için kullanılan trikrom boyama yönteminin verilmesidir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

buffy-coat	Santrifüj edilmiş antikoagülanlı kanın eritrosit tabakası ve plazması arasında kalan ve beyaz kan hücrelerini içeren (bulutsu) katmanı.
PVA	Polivinil alkol (fiksatif)
SAF	Sodyum asetat - asetik asit - formol (fiksatif)

Genel Bilgi

Protozoon kistleri, trofozoitleri ve bazı helmint yumurtalarının kırılma indeksleri suya yakın olduğundan, bunların içyapılarını daha ayrıntılı görmek için boyama teknikleri gereklidir. Ayrıca boyanmış örnekler sonuçların saklanabilmesini sağlar. Trikrom boyama Gomori'nin boyama tekniğinin bir modifikasyonudur ve Gomori-Wheatley boyaması olarak da adlandırılır. Gomori'nin boyama metodu histolojik doku kesitlerinde özellikle fosfataz ve lipaz enzimlerinin yanı sıra bağ dokusu fibrillerini ve sekretuar granülleri göstermek için kullanılır (1,4,5).

Trikrom boyama yöntemi, bağırsak protozoonlarının tanınmasında parazitlerin artefaktlar, konak hücreleri ve maya hücrelerinden ayırt edilmesinde kullanılan bir kalıcı boyama yöntemidir. Konsantrasyon işlemi uygulanmış dışkı örneklerine uygulanabileceği gibi taze dışkı örneklerine de uygulanabilmektedir (4,5).

* Standart vaka tanımına göre **asgari** geçerli teknik **trikrom boyama**dır. Araştırma, laboratuvarların büyük kısmının (%88.7) *E.histolytica* tanısında sadece direkt mikroskopik incelemeye dayalı sonuç verdiklerini ortaya çıkarmıştır.

Trikrom boyama yönteminin en önemli **avantajları**; iyi boyanan organizmaların yapılarını ayrıntılı olarak göstermesi, direkt incelemede gözden kaçabilecek protozoonların daha kolay tanınabilmesi, preparatın bozulmadan uzun süre saklanabilmesi ve pozitif örneklerin eğitim amaçlı kullanılabilmesidir. Ayrıca incelemenin ertelenebilmesi, pozitif preparatların referans olarak kullanılabilmesi ve kuşkulu tanılarda preparatların gönderilerek konsültasyon istenebilmesi gibi başka önemli avantajları da vardır (1,5).

Trikrom boyama yönteminin **dezavantajı** ise tanının morfolojik esaslara göre yapılması nedeniyle, *E. histolytica* gibi patojenliği ispat edilmiş türlerin *Entamoeba dispar*'dan ayrımını yapmada yetersiz kalmasıdır. Fiksasyonu iyi yapılmamış yaymalarda boyamanın sonucu protozoonların morfolojik farklılıklarını yeterli ölçüde sergileyememektedir. Bazı araştırmacılar trikrom boyama yönteminde fiksatif olarak hazırlanması kolay ve ucuz olan SAF'ı önermektedirler; çünkü bu fiksatifte saklanmış dışkı örneklerine uygulanan trikrom boyasıyla daha başarılı sonuçlar elde edildiği gözlenmiştir (1,5).

Her dışkı örneğinde hazırlanması önerilen kalıcı boyaların en yaygın kullanılanları trikrom ve demir hemotoksilen boyalarıdır. Demir hematoksilene oranla daha kolay ve daha az zaman alıcı olan trikrom boyası, özellikle *Blastocystis* spp ve *Dientamoeba fragilis* gibi direk taze bakı ile ayırt edilmesi güç organizmaların tanısında da çok yararlıdır (1,4,5).

Teknik Bilgiler

1 Test için asgari laboratuvar koşulları

1.1. Laboratuvar güvenliği

Potansiyel enfeksiyöz organizmalar içerebileceği için parazitolojik inceleme örnekleri ile ilgili testler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmeli ve daima "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi"nde belirtilen standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır.

Örnekler koruyucu maddelerle fikse edilmiş olsalar bile bu önlemler alınmalıdır; çünkü hala enfeksiyöz olabilirler. Bazı parazit ookist ve kistleri formol solüsyonu ile fikse edildikten günler, hatta haftalar sonra canlılıklarını yitirirler; örneğin, *Ascaris lumbricoides* yumurtaları formolde saklandığında bile gelişmeye devam edebilir ve enfeksiyözdür.

Boyanmış lamlar **kesici-delici atık** kabul edilir ve kesinlikle kesici-delici atık kutusuna atılırlar! Diğer biyolojik kirlilerin bulunduğu torbalara atılmaları halinde torbayı deler ve ciddi enfeksiyöz risk oluştururlar.

Kullanılan bazı fiksatiflerde bulunan cıva kanserojendir! İlgili kimyasal güvenlik tedbirleri alınarak kullanılmalıdır.

1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) tekniğin uygulanmasından önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) tekniğe tüm yönleriyle aşina olmalı, ve (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Bu UMS'nin uygulanmasından analist; tekniğin prosedüre uygun yapılmasını sağlamaktan ve denetimi, değerlendirilmesi ve onaylanmasından (sonucun doğru ve güvenilir olmasından) Tıbbi Mikrobiyoloji/Parazitoloji Uzmanı sorumludur.

Laboratuvara **amibiyaz** ön tanısı ile gelmiş örnekler veya bütün **kanlı/mukuslu** dışkı örnekleri ya da **invaziv** bir teknik kullanılarak alınmış örnekler en kısa sürede ve **mutlaka** Tıbbi Mikrobiyoloji/Tıbbi Parazitoloji Uzmanı tarafından bizzat incelenmeli, değerlendirilmeli ve sonuçlandırılmalıdır.

1.3. Örnek, Reaktif, Donanım

İnceleme örnekleri

- Dışkı, sigmoidoskopik ve duodenal örnekler trikrom boyanabilir.
- Trikrom boyama pratikte en çok dışkı örneklerinin boyanması için kullanılır. Dışkı örnekleri taze olarak incelenmelidir; hemen incelenemeyecekse fiksatifler içinde saklanabilir (fiksatiflerle ilgili ayrıntılı bilgi için *bkz.* UMS P-ÖY-01). Şekilli dışkılar ise, hemen incelenemediği durumlarda 1-2 saat için buzdolabında saklanabilir.
- Dışkı örneği genellikle aşağıdaki gibi olabilir:
 - (a) Taze dışkı örneğinden lam üzerine yayılmış ve hemen Schaudinn fiksatifi ile sabitlenmiş yayma; veya
 - (b) PVA'da korunmuş (PVA içinde gelmiş) dışkıdan bir lam üzerine hazırlanmış ve kurutulmuş yayma.
 - (c) SAF içinde veya piyasadan hazır temin edilmiş herhangi bir tek-tüp fiksatif içinde gelmiş örnek de kullanılabilir.

Reaktifler

- Trikrom boyası - Piyasadan hazır temin edilebilir veya laboratuvarında hazırlanabilir (*bkz.* Ek-1).
- %90'lık etil alkol (*bkz.* Ek-1).
- D'Antoni'nin iyot solüsyonu - piyasadan hazır temin edilebilir veya laboratuvarında hazırlanabilir (*bkz.* Ek-1).
- Ksilen ya da tolüen
- Schaudin, PVA veya SAF fiksatifi - Piyasadan hazır temin edilebilir veya laboratuvarında hazırlanabilir (*bkz.* UMS P-ÖY-01).

Diğer materyal, ekipman

- Mikroskop, binoküler (ışık mikroskopi) – 10× (düşük), 40× (yüksek kuru), 100× (immersiyon) objektifleri ve 10× oküleri olan tercih edilir.
NOT: Bazı mikroskopistler 5× oküler tercih etmektedir. Ancak 5× oküler daha az büyütme sağlar ve inceleme duyarlılığını düşürür; bu nedenle 10× oküler kullanılması önerilmektedir (6).
- Önceden temizlenmiş lamlar (25×75 mm) – tercihen, kenarı rodajlı
- Kurşun kalem, lamin rodajlı kenarına örnek numarası vb. yazmak için
- Mezür, erlen, pipetler; vidalı kapaklı şişeler (50 mL'den 1 L'ye)
- 12 adet kapaklı dik cam şale - lam boyamak için 100 mL kapasiteli

- Filtre kağıdı, Whatman no. 1
- Pastör pipetleri, cam veya plastik, tek kullanımlık
- Plastik kap, süzgeç, öze, gazlı bez, zaman alarmı (timer), pens
- Entellan veya muadili kaplama solüsyonu, lamel
- Biyolojik atık kapları, kesici-delici atık kabı ve toksik boya atıklarını toplamak için kap (kimyasal atık kabı)

1.4. Kalite kontrol

- Her yeni hazırlanan boya seti/kit lotu veya ticari reaktifler, kullanıma sokulmadan önce pozitif kalite kontrol örnekleri ile test edilmelidir.
- Pozitif kalite kontrol lamaları PVA ile saklanmış *E. histolytica* içeren dışkı örneklerinden hazırlanır.
- Yaymaların kalınlığı makroskobik olarak kontrol edilmelidir. İdeal bir yaymada kurumadan önce ıslakken bakıldığında arkayı görmek mümkün olmalıdır.
- İyi bir trikrom boyama yapabilmek için kullanılan solüsyonların belli aralıklarla yenilenmesi gerekir. Önerilen değişim aralıkları Tablo 1'de verilmektedir.

Tablo 1. Trikrom boyama solüsyonlarını değiştirme sıklığı

Solüsyonlar	Değişim zamanı			Özel hususlar
	Gün	Hafta	Ay	
Alkol, %95 (1+2)	+			
Schaudinn fiksatif		+		Stok solüsyondan taze olarak hazırlanır
Alkol, %70 (1+2+3)		+		
Asit-alkol %90		+		
İyodin-alkol		+		Renk açılırsa stoktan hazırlanmalıdır.
Alkol, %100		+		
Ksilen			+	Dipte çökelti varsa değiştirilmelidir.
Trikrom boya			2 ay	Değiştirme süresinden önce azaldıkça üstüne eklenir.

- Pozitif olduğu bilinen boyalı preparatlar, fotoğraflar ve kaynak kitaplar çalışma yerinde mevcut olmalıdır.
- Mikroskop belirli aralıklarla (yoğun kullanılıyorsa yılda en az bir kez) kalibre edilmelidir. Mikroskoba herhangi bir parça eklenmesi veya değiştirilmesi durumunda da kalibrasyon yapılmalıdır. Kalibrasyon için kullanılmış optikler mikroskobun üzerinde olmalıdır. Tüm objektifler için kalibrasyon faktörleri göz önündeki bir panoda asılı olmalıdır (*bkz.* UMS P-TP-01 Mikroskop Kalibrasyonu).
- Tüm kalite kontrol sonuçları kaydedilmelidir.

2 Trikrom boyamanın yapılması

2.1. Örneklerin boyama için hazırlanması

ÖNEMLİ: Dışkı santrifüj edilmemelidir!

- Taze dışkı örneği
 - (a) Taze örnek gelir gelmez bir aplikatör çubuk veya öze ile dışkıdan alınarak 2 adet temiz lam üzerine yayma yapılır. Yaymanın kalınlığı makroskopik olarak kontrol edilmelidir.
 - (b) İdeal bir yayma kurumadan önce ıslakken bakıldığında arkasında duran bir gazete yazısını okumak mümkün olmalıdır.
 - (c) Yayma kurumadan Schaudinn fiksatifine içine daldırılır. En az 30 dk bu şekilde tutularak yayma sabitlenir. Durum gerektiriyorsa 1 gece fiksatifin içinde bırakılabilir. Daha sonra yayma aşağıda (bkz. 2.2) tarif edildiği gibi trikrom boyanır.
 - (d) Taze dışkı örneği sulu ise, lamlara önce 3-4 damla PVA damlatılır; birkaç damla dışkı PVA'nın üzerine konur ve karıştırılır; karışım lamların üzerine yayılır ve oda sıcaklığında bir gece veya 37°C inkübatörde birkaç saat kurutulur. Lamlar iyot-alkol içine alınır ve trikrom boyama yöntemi izlenir (bkz. 2.2).
- PVA içinde laboratuvara gönderilmiş dışkı örnekleri (cıva klorür temelli)
 - (a) Dışkı örneğinin sabitlenmesi için PVA içinde en az 30 dk beklemiş olmalıdır. Eğer bu süre dolmuş ise, iki adet aplikatör çubuk yardımı ile şişedeki fiksatifli örnek iyice karıştırılır.
 - (b) Bir kağıt havlu üzerine bir miktar PVA-dışkı karışımından aktarılır ve 3 dk PVA'nın emilmesi için beklenir. *Bu basamağı atlamayınız!*
 - (c) Aplikatör çubuk yardımı ile kağıt havlu üzerinden bir miktar dışkı örneği alınıp lama yayılır ve oda sıcaklığında bir gece veya 37°C inkübatörde birkaç saat kurutulur.
 - (d) Kuruyan lam iyot-alkol içine alınır ve trikrom boyama yöntem adımları izlenir (bkz. 2.2).

NOT: Eğer gelen dışkı örneği PVA ile düzgün bir şekilde karışmamış ise endişe edilmemelidir; biraz dışkı örneği hemen iki lama yayılır ve hemen Schaudinn fiksatifine aktarılır; en az 30 dk bekledikten sonra trikrom boyama yöntemine geçilir
- Modifiye PVA içinde laboratuvara gönderilmiş dışkı örnekleri (bakır veya çinko temelli, tek şişelik sistemler)
 - (a) Dışkı örneği, sabitlenmesi için, modifiye PVA içinde (veya diğer bir fiksatifte) en az 30 dk beklemiş olmalıdır. Eğer bu süre dolmuş ise, iki adet aplikatör çubuk yardımı ile fiksatifli örnek iyice karıştırılır.
 - (b) Bir kağıt havlu üzerine bir miktar fiksatif-dışkı karışımı aktarılır ve 3 dk PVA'nın emilmesi için beklenir.

NOT: Eğer fiksatif PVA içeriyor ise *bu basamağı atlamayınız!*

- (c) Kağıt havlu üzerinden bir miktar dışkı örneği alınıp lama yayılır ve oda sıcaklığında bir gece veya 37°C'de birkaç saat kurutulur.
- (d) Kuruyan lam iyot-alkol içine alınır ve trikrom boyama yöntemi izlenir (*bkz. 2.2*).
- SAF içinde laboratuvara gönderilmiş dışkı örnekleri
 - (a) SAF-dışkı karışımı tamamen karıştırılır ve gazlı bezden 15 mL'lik santrifüj tüpüne süzülür.
 - (b) Santrifüj sonrası (500 × g'de 10 dk) üst sıvı atılır. Son çökelti yaklaşık 0.5-1 ml olmalıdır. Gerekli ise çökeltiye SF eklenir.
 - (c) Çökeltiden bir damlalık ile lamların üzerine yayma hazırlanır.
 - (d) Kuruduktan sonra, yayma trikrom boyama için %70'lik alkole konur (iyot-alkol basamağı atlanabilir) (*bkz. 2.2*).

2.2. Trikrom boyama yöntemi

- Boyamayı yapmak için önceden 12 adet cam şaleye -set halinde- sıralı bir şekilde reaktifler konmuş hazır olmalıdır. Adımlar aşağıdaki gibidir:
ÖNEMLİ: Aşağıdaki adımlarda lamlar bir reaktiften diğerine aktarılırken, öncekinin damlaları bir kurutma kağıdına emdirilerek bir sonraki reaktifin kirlenmemesi sağlanır; böylece boyama kalitesi arttırılabilir.
 - 1 Preparat %70'lik alkol solüsyonunda 5 dk bekletilir
 - 2 D'Antoni'nin iyot solüsyonunda 3-5 dk bekletilir*
 - 3 %70'lik alkol solüsyonunda 2-5 dk bekletilir
 - 4 Tekrar %70'lik alkol solüsyonunda 2-5 dk bekletilir
 - 5 Schaudinn fiksatif ile tespit edilmiş lamlar 5-8 dk, PVA fiksatif ile tespit edilmiş lamlar ise 8-10 dk trikrom boyasında bekletilir
 - 6 Lamların fazla boyası dik biçimde kağıt havlular üzerine yerleştirilerek süzülür
 - 7 Lamlar 2-3 sn %90 asit alkole batırılır
 - 8 Lamlar kağıt havluya değdirildikten sonra %100 alkolde çalkalanır
 - 9 %100 alkolde 2-5 dk bekletilir
 - 10 Tekrar %100 alkolde 2-5 dk bekletilir
 - 11 Tolüen veya ksilende 2-5 dk bekletilir
 - 12 Tekrar tolüen veya ksilende 2-5 dk bekletilirÖNEMLİ: Yukarıdaki adımlarda verilen boyama süreleri dışkının taze olmasına veya bulunduğu fiksatife göre ve ayrıca solüsyonların kalitesine göre değişebilir. Her laboratuvar kalite kontrol örnekleri ile deneyerek uygun zamanları saptamalıdır.
* Cıva içermeyen fiksatifte saklanan dışkılarda bu basamak atlanabilir.
- Lamların üzerine entellan veya diğer bir kaplama solüsyonu damlatılarak lamelle kapatılır.

3 Preparatların değerlendirilmesi/yorumlanması

- Boyanan lamaların üzerine bir damla immersiyon yağı damlatılarak ışık mikroskopunda 100× objektifle incelenir.
- İyi tespit edilmiş ve boyanmış dışkı örneklerindeki trofozoit ve kistlerin sitoplazmaları morumsu mavi-yeşil renktedir. Nükleer kromatin, kromatoid cisimcikler ve sindirilmiş eritrositler genellikle kırmızı veya kırmızı-mor görülür. Zemin genellikle yeşil renktedir.
- Sindirilmeyen besinler, maya ve mantarlar genellikle yeşil boyanır.
- Boyanmamış veya kırmızı boyanmış kistler yetersiz veya geç tespit yapıldığını gösterir.
- *Entamoeba coli* kistleri genellikle diğer amiplerden daha koyu mor renkte görülür.
- *Cryptosporidium* spp ookistlerinin boyanma özellikleri maya mantarlarına benzer. Bu nedenle trikrom boyamada kolaylıkla gözden kaçırılabilirler.
- Sonuçlar raporlanırken mutlaka saptanan parazitin adı ve formu kısaltma kullanılmadan açık olarak yazılmalıdır.

4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Büyük büyütme ($\times 1000$) mikroskopik inceleme protozoonların değerlendirilmesi için uygundur; helmint yumurtaları veya larvalarının incelenmesi için uygun değildir. Bu tür parazit elemanları trikrom boyalı preparatta görülebilirse de bu daha ziyade şans eserdir; helmint yumurtaları, larvaları ve *Cystoisospora (Isospora) belli* ookistleri en iyi ıslak preparatlarda gözlenir (bkz. UMS P-TP-03).
- *Cryptosporidium* spp ve benzer şekilde aside dirençli parazitlerin (*Cyclospora* spp, *Cystoisospora* spp) ookistleri ile mikrosporidiya sporları trikrom-boyalı yaymalarda tanımlanamaz. Kinyoun asit-fast boyama yapılmalıdır!
- Helmint yumurta ve larvalarının da bu yöntemle tanımlanması önerilmez.
- Fiksasyonu iyi yapılmamış yaymalarda boyamanın sonucu protozoonların morfolojik farklılıklarını yeterli ölçüde sergileyemez.
- Zeminin yeşile boyanması iyot alkol aşamasında cıvanın yeterince uzaklaştırılmamasına bağlıdır. Süre uzatılmalı veya solüsyon yenilenmelidir.
- Trikrom boyanın içine karışan alkolün uzaklaşması için zaman zaman bulunduğu kabın kapağı birkaç saat veya gece açık bırakılmalıdır.
- Ksilen solüsyonunun bulanık olması içinde su bulunduğunu gösterir. Bu durumda lamalar derhal bir önceki solüsyona geri alınıp taze ksilen solüsyonu kullanılmalıdır.

- Boya kalitesi direkt kan örneği veya dışkıya karıştırılmış 'buffy-coat' kullanılarak değerlendirilebilir.
- Örnek kalitesi de sonucu etkiler. Florayı etkileyen antibiyotikler ve klorokin gibi antimalaryal ilaçlar, bağırsak protozoonlarının yakalanma olasılığını azaltır. Dışkıya idrar karışmamış olmalıdır. Ayrıca dışkı örneklerinin parazitolojik inceleme için alınmasından önce hastaya baryum, kaolin, magnezi kalsine, antiasitler, bizmut, hint yağı, mineral yağı verilmemiş olmalıdır. Baryum verilmesinden sonra en az bir hafta geçmelidir.

Ekler

Ek-1 Trikrom boya reaktiflerinin hazırlanması

Trikrom boyası

Chromotrope 2R	3.0 g
Lightgreen SF	1.5 g
Fosfotungustik asit	3.5 g
Glasiyal asetik asit	5 mL
Distile/deiyonize su	500 mL

1. Karıştırılır ve 30 dk bekletilir.
2. Karışımın üzerine 500 mL distile su ekleyip iyice karıştırılır.
3. Koyu mor renk alan boya cam kapaklı bir şişede ışık görmeyen bir ortamda, oda sıcaklığında 1 yıl saklanabilir.

%90'lık asit alkol

Glasiyal asetik asit	4.5 mL
%90 etil alkol	995.5 mL

1. %90 etil alkole glasiyal asetik asit eklenir.
2. Kullanıncaya kadar oda sıcaklığında saklanır.

D'Antoni iyot solüsyonu

Potasyum iyodür	1.0 g
İyot kristalleri	1.5 g
Distile/deiyonize su	100 mL

1. Solüsyon kırmızımsı kahverengi olana kadar karıştırılır ve filtre kağıdından süzülür. Bu solüsyon iki ay kadar stok olarak kullanılabilir.
2. %70'lik etil alkole (70 mL etil alkol + 30 mL distile su) demli çay renginde olana kadar D'Antoni iyot solüsyonu eklenir ve renkli şişelerde saklanır. Haftada bir solüsyon değiştirilir.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Trikrom Boyama) ayrıca aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir. Özellikle, uygun inceleme örneklerinin temini ve boyama işlemine hazırlanması hakkında yeterli bilgi için bu belgelere bakılması önerilir:

- UMS, P-ÖY-01 Dışkı örneklerinin parazitolojik incelemesi
- UMS, P-ÖY-02 Diğer intestinal örneklerin parazitolojik incelemesi
- UMS, P-TP-01 Mikroskop kalibrasyonu (oküler mikrometre ile)
- UMS, P-TP-02 Dışkı örneklerinin direkt mikroskopik incelemesi
- UMS, P-TP-03 Dışkı örneklerinin konsantrasyon yöntemleri
- UMS, P-MT-01 Amibiyazın mikrobiyolojik tanısı
- UMS, P-MT-02 *Giardia intestinalis*'in tanımlanması

Kaynaklar

- 1 Kaplan RL. Microscopic examination of fecal specimens: Permanent stained smear (Trichrome). *In: Isenberg HD (ed). Clinical Microbiology Procedures Handbook*. ASM Press, Washington D.C. 1992, p. 7.3.6.1
- 2 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 3 T.C. Sağlık Bakanlığı (Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi TR0802.16-01 Avrupa Birliği ve Dünya Bankası desteği ile) (Akbaş E, Pr Danışmanı). Türkiye’de Bulaşıcı Hastalıkların Tanısında Mikrobiyoloji Laboratuvar Kapasitesi Mevcut Durum Değerlendirmesi: Anket - LabKap2012. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kuşadası, 4 Kasım 2012.
- 4 Girginkardeşler N, Ok ÜZ. Kalıcı boyalı yaymalar. *In: Korkmaz M, Ok ÜZ (eds). Parazitolojide Laboratuvar*. 1. baskı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, İzmir. 2011, p.23-29
- 5 Ok ÜZ, Girginkardeşler N, Kilimcioğlu A, Limoncu E. Dışkı inceleme yöntemleri. *In: Özcel MA, Altıntaş N (eds). Parazit Hastalıklarında Tanı*. 1. baskı. Ege Üniversitesi Basımevi, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, İzmir. 1997, p. 1-61
- 6 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. *In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.2.1-4



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Modifiye Kinyoun Asit-Fast Boyama (Dışkı Örneklerinin Parazitolojik İncelemesi için)

Hazırlayan Birim	Klinik Parazitoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Parazitoloji
Bölüm	Test prosedürleri
Standart No	P-TP-05
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik
----------	-------	------------

--	--	--

--	--	--

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
TEKNİK BİLGİLER	4
1 Test için asgari laboratuvar koşulları	4
2 Kinyoun asit-fast boyamanın yapılması	7
3 Preparatların değerlendirilmesi/yorumlanması	8
4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	9
EKLER.....	10
Ek-1 Boya solüsyonlarının hazırlanması.....	10
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	11
KAYNAKLAR.....	11

Kapsam ve Amaç

Klasik asit-fast boyama teknikleri mikobakteri saptanmasında sıklıkla kullanılır. Modifiye (soğuk) Kinyoun asit-fast boyama yöntemi ise bu tekniklerin dışındaki koksidiyan parazit ookistlerinin (*Cryptosporidium* spp, *Cyclospora cayetanensis* ve *Cystoisospora* [*Isospora*] *belli*) saptanması amacıyla farklılaştırılmış halidir. Sayılan parazitlerden özellikle *Cryptosporidium* spp su kaynaklı kitlesel salgınlar yapabilen, halk sağlığı önemine sahip bir etkidir ve laboratuvarından bildirim zorunludur (1,2,3). Ancak, ülkemizde klinik laboratuvarların çok azı (%4) bu etkenin tanısı ile ilgili inceleme yapabilmektedir (4). Vakaların önemli bir kısmının bu nedenle tanı alamadığı düşünülürse, uygun bir prosedürün el altında olması tanının yaygınlaşmasını teşvik edeceğinden dolayı önemli görünmektedir.

Bu UMS belgesinin amacı klinik laboratuvarlarda dışkıda koksidiyan parazitlerin saptanmasında modifiye Kinyoun asit-fast boyama yönteminin özellikleri, doğru uygulanması ve yorumlanmasına dair bir prosedür vermektir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

- ERCP** Endoskopik retrograt kolanjio-pankreatografi
KOH Potasyum hidroksit
PVA Polivinil alkol (fiksatif)
SAF Sodyum asetat - asetik asit - formol (fiksatif)

Genel Bilgi

Koksidiyan parazitler olarak adlandırılan *Cryptosporidium* spp, *C. cayetanensis* ve *C. belli*, insanlarda ishalleri hastalıklara yol açan protozoonlardır. Bu etkenler, özellikle immün sistemi baskılanmış kişilerde fırsatçı patojen olarak ishal başta olmak üzere değişik klinik tablolarla ölüme yol açabilirler (5,6). Bağışıklığı sağlam kişilerde semptom vermeden bulunabilecekleri gibi değişen derecede sulu ishal ile seyredebilirler (3,7,8).

Bu parazitlerin ookistleri dışkının rutin parazitolojik incelemelerinde saptanamaz (bkz. UMS P-TP-02). Bu nedenle tanı için aside dirençli özel boyama yöntemleri uygulanması gerekmektedir. En sık kullanılan teknik, modifiye Kinyoun asit-fast boyama yöntemidir (6,9). Bu yöntem, mikobakteri saptanmasında kullanılan klasik Kinyoun asit-fast boyama tekniğinin değiştirilmiş halidir. Buradaki değişiklik, mikobakteri boyamada uygulanandan daha az sertlikteki bir renk giderici maddenin kullanımı şeklindedir. Modifiye Kinyoun asit-fast boyama yönteminde, klasik Kinyoun boyama işlemindeki %3'lük sülfürik asit solüsyonu yerine %1'lik solüsyon kullanılır (5,6).

Koksidiyan parazitlerin boyanmasında kullanılan bir diğer aside dirençli boyama yöntemi olan modifiye Ziehl-Neelsen boyama (sıcak) tekniğinde karbol-fuksin boyasının ookistin içine girerek pembe-kırmızı renkte boyanmasını sağlamak ve rengi hafif açmak için kullanılan reaktifler ısıtılmaktadır. Modifiye Kinyoun asit-fast boyama yönteminde ise ısının yerini fenol almıştır (5).

Dışkı örneklerine bu boyama yönteminin uygulanması sırasında şu noktalara çok dikkat edilmelidir;

- 1 Koksidiyan parazit ookistlerinin dışkıdaki sayısı değişken olabildiğinden mutlaka modifiye formol-etil asetat tekniği başta olmak üzere yoğunlaştırma yöntemlerinden biri uygulanmalıdır (10,11). (Yoğunlaştırma tekniği için bkz. UMS P-TP-03)
- 2 Kaliteli bir boyama elde edebilmek için taze dışkı kullanılması önerilmektedir. Hemen boyanamayacak dışkı örneklerinin korunmasında SAF en uygun fiksatifdir. Saklamada %10 formol de kullanılabilir ancak süre uzadıkça aside dirençli boyamalarda ookistlerin kaybolduğuna dair tartışmalar vardır. PVA'da korunmuş örnekler ise aside dirençli boyama için uygun değildir (6,11).

Modifiye Kinyoun asit-fast boyama yönteminin en önemli **avantajları**; uygulama kolaylığı, ekonomik olması ve tüm koksidiyan parazitleri saptayabilmesidir. Bu yöntemin en önemli **dezavantajları** ise; mikroskopik değerlendirme için tecrübeli personel gerektirmesi, zaman alıcı olması ve parazitler homojen olarak boyanmadığından, bazı ookistlerin boya almaması nedeniyle özellikle az sayıda ookist içeren dışkılarda yanlış negatif sonuçlar alınabilmesidir (11).

Teknik Bilgiler

1 Test için asgari laboratuvar koşulları

1.1. Laboratuvar güvenliği

Bu UMS'de bahsi geçen tüm organizmalar ile ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmeli ve bütün örnekler enfeksiyöz kabul edilmeli ve "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi"nde belirtilen evrensel güvenlik önlemleri daima uygulanmalıdır. Bu önlemler, dışkı örnekleri koruyucu maddelerle fikse edilmiş olsa bile alınmalıdır, çünkü hala enfeksiyöz olabilirler. Örneğin, kalın cidarlı bazı parazit ookistleri ve kistleri formol solüsyonu ile fikse edildikten haftalar sonra ölürler. *Ascaris lumbricoides* yumurtaları formolde saklandığında bile gelişmeye devam edebilir ve enfeksiyözdür.

Güvenlik uyarısı! *Cryptosporidium* spp ookistleri oldukça enfektiftir; kalın cidarlı ookistler %2.5'lük potasyum dikromat koruyucu içinde bir yıla kadar canlılıklarını koruyabilirler. Bu prosedür uygulanırken **maske** takılmalı, **daima** eldiven giyilmelidir.

Boyanmış lamalar **kesici-delici atık** kabul edilir ve kesinlikle kesici-delici atık kutusuna atılırlar! Diğer biyolojik kirlilerin konduğu torbalara atılmaları halinde torbayı deler ve ciddi enfeksiyöz risk oluştururlar.

Güvenlik uyarısı! Metanol yüksek düzeyde toksik ve parlayıcıdır. Eğer yutulacak olursa (herhangi bir miktarı) körlüğe ve hatta ölüme neden olabilir. Kullanım harici zamanlarda metanol şişesi kilitli bir dolapta tutulmalıdır!

Kullanılan reaktifler veya fiksatiflerde bulunabilen fenol, formol, eter, cıva gibi maddeler toksik, koroziv ve/veya kanserojendir! Solunmasından ve/veya direkt temastan kaçınılmalı, bu kimyasallarla çeker ocak içinde ve ilgili kimyasal güvenlik tedbirleri alınarak çalışılmalıdır.

1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) tekniğin uygulanmasından önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) tekniğe tüm yönleriyle aşina olmalı, ve (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Bu UMS'nin uygulanmasından analist; tekniğin prosedüre uygun yapılmasını sağlamaktan ve denetimi, değerlendirilmesi ve onaylanmasından (sonucun doğru ve güvenilir olmasından) Tıbbi Mikrobiyoloji/Parazitoloji Uzmanı sorumludur.

1.3. Örnek, Reaktif, Donanım

İnceleme örnekleri

Örneklerin alınması ve laboratuvara gönderilmesinde izlenecek yol için ilgili UMS'lerin bir listesi bu belgenin sonunda verilmiştir.

- Dışkı (taze veya formolle korunmuş yoğunlaştırılmış) - En sık incelenen örnektir. PVA'da korunmuş örnekler asit-fast boyama için uygun değildir! Hemen boyanamayacak örnekler için SAF en uygun fiksatifdir.
- İnce bağırsak aspirasyon sıvısı (santrifüj edilerek yoğunlaştırılmış) veya ince bağırsak biyopsi örneği - Açıklanamayan gastrointestinal şikayeti olan immün sistemi baskılanmış hastalarda.
- Safra (ERCP ile alınmış ve santrifüj edilerek yoğunlaştırılmış) - Dışkı örneğinde *Cryptosporidium* spp saptanamamış ve kolanjit bulgusu olan immün sistemi baskılanmış hastalarda.
- Karaciğer biyopsi örneği (tercihen SF içinde) - Karaciğer hastalığı olan immün sistemi baskılanmış hastalarda.
- Solunum sistemi örnekleri (santrifüj edilerek yoğunlaştırılmış) - Açıklanamayan solunum sistemi şikayeti olan immün sistemi baskılanmış hastalarda.
- Mide yıkama suyu (santrifüj edilerek yoğunlaştırılmış) - Açıklanamayan sinüziti olan immün sistemi baskılanmış hastalarda (12).

Reaktifler

- *Cryptosporidium* spp boya kiti (Kinyoun karbol fuksin) - Piyasadan kullanıma hazır temin edilebilir veya aşağıda listelenen maddelerden laboratuvarında hazırlanabilir (bkz. Ek-1).
 - (a) Metanol, saf (%100, aseton içermeyen) - Nem çekmesini önlemek için ağzı sıkı kapalı bir şişede saklanmalıdır.
 - (b) Etil alkol, saf
 - (c) Sülfürik asit (H₂SO₄), konsantre
 - (d) Fuksin
 - (e) Fenol kristali
- Loeffler'in alkali metilen mavisi - Piyasadan hazır temin edilebilir veya laboratuvarında hazırlanabilir (bkz. UMS-B-TP-14).
- İmmersiyon yağı
- Potasyum hidroksit (KOH)

Diğer gereç, donanım

- Mikroskop, binoküler (ışık mikroskobu) – 10× (düşük), 40× (yüksek kuru), 100× (immersiyon) objektifleri ve 10× oküleri olan tercih edilir.
NOT: Bazı mikroskopistler 5× oküler tercih etmektedir. Ancak 5× oküler daha az büyütme sağlar ve inceleme duyarlılığını düşürür; bu nedenle 10× oküler kullanılması önerilmektedir (13).
- Santrifüj
- Önceden temizlenmiş lamlar (25×75 mm) – tercihen, kenarı rodajlı
- 4 adet kapaklı dik cam şale - Lam boyamak için 100 mL kapasiteli
- Benmari (56°C sıcaklığa ayarlanmış su banyosu)
- Seramik havan ve havaneli
- Filtre kağıdı, Whatman no. 1
- Pastör pipetleri, cam veya plastik, tek kullanımlık; pens
- Mezür, erlen, pipetler; vidalı kapaklı şişeler (50 mL'den 1 L'ye)
- Entellan veya muadili kaplama solüsyonu, lamel (22×22 mm)
- Biyolojik atık kapları, kesici-delici atık kabı ve toksik boya atıklarını toplamak için kap (kimyasal atık kabı)

1.4. Kalite kontrol

- Her yeni hazırlanan boya seti/kit lotu veya ticari reaktifler, kullanıma sokulmadan önce pozitif kalite kontrol örnekleri ile test edilmelidir; formol (%10'luk) veya SAF ile saklanmış *Cryptosporidium* spp içeren dışkı örneklerinden hazırlanan kontrol preparatları bu amaçla kullanılabilir. Eğer *Cryptosporidium* spp ookistleri iyi boyanırsa *C. belli* ve *C. cayetanensis* ookistleri de boyanacaktır.
- 4-6 µm çapında ve içinde dört sporozoit gözlenebilen *Cryptosporidium* spp ookistleri pembe-kırmızıya boyanır. Arka zemin mavi boyanır.
- Yaymaların kalınlığı makroskopik olarak kontrol edilmelidir. İdeal bir yaymada kurumadan önce ıslakken bakıldığında altına konmuş bir gazete yazısını okumak mümkün olmalıdır.
- Kinyoun karbol fuksin boyası ilk hazırlandığında ve/veya şalenin dibinde çökelti olduğunda süzülmalıdır.
- İyi bir boyama için kullanılan solüsyonların yenilenmesi gerekir;
 - (a) Kinyoun karbol fuksin ve Loeffler'in alkali metilen mavisi boyaları kullanım sıklığına bağlı olarak 15 günde bir yenilenmelidir (şalede azaldıkça üzerine stok solüsyondan süzülerek ekleme yapılabilir).
 - (b) %50 etil alkol her gün, %1 H₂SO₄ ise haftada bir yenilenmelidir.
- Pozitif olduğu bilinen boyalı preparatlar, fotoğraflar ve kaynak kitaplar çalışma yerinde mevcut olmalıdır.
- Mikroskop belirli aralıklarla (yoğun kullanılıyorsa yılda en az bir kez) kalibre edilmelidir. Mikroskoba herhangi bir parça eklenmesi veya değiştirilmesi durumunda da kalibrasyon yapılmalıdır. Kalibrasyon için kullanılmış optikler mikroskobun üzerinde olmalıdır. Tüm objektifler için kalibrasyon faktörleri göz önündeki bir panoda asılı olmalıdır (bkz. UMS, P-TP-01 Mikroskop Kalibrasyonu).

2 Kinyoun asit-fast boyamanın yapılması

2.1. Örneklerin boyama için hazırlanması

- Dışkı örneği tercihen önceden modifiye etil-asetat çöktürme yöntemiyle hazırlanmış olmalıdır (bkz. UMS P-TP-03).
- *Cryptosporidium* spp enfeksiyonunda tipik olarak gözlenen sulu dışkının varlığında ookistlerin çoğu mukus kısımlar içinde kalabilir ve incelenen örnekte bulunamayabilir. Mukuslu örnekler %10'luk KOH işleminin uygulanması önerilir. Bu amaçla dışkı örneği makroskopik olarak mukuslu kısımların varlığı yönünden iyi değerlendirilmelidir.
 - (a) Örnek mukuslu ise; örneğe 10 damla %10'luk KOH eklenip, şiddetli karıştırılarak (vortekslenerek) homojenize edilir. Ardından %10'luk formol eklenip, 500 × g'de 10 dk santrifüj edilir. Üst sıvı atılıp, dipteki çökeltiden yayma hazırlanır.
 - (b) İyi bir yaymada, kurumadan önce ıslakken bakıldığında altına konmuş bir gazete yazısını okumak mümkün olmalıdır.

2.2. Modifiye Kinyoun asit-fast boyama yöntemi

- Örnek çökeltisinden Pastör pipeti yardımıyla 1-2 damla lam üzerine konur. 1 cm çapında bir daire oluşturacak şekilde yayma yapılır ve havada kurumaya bırakılır.

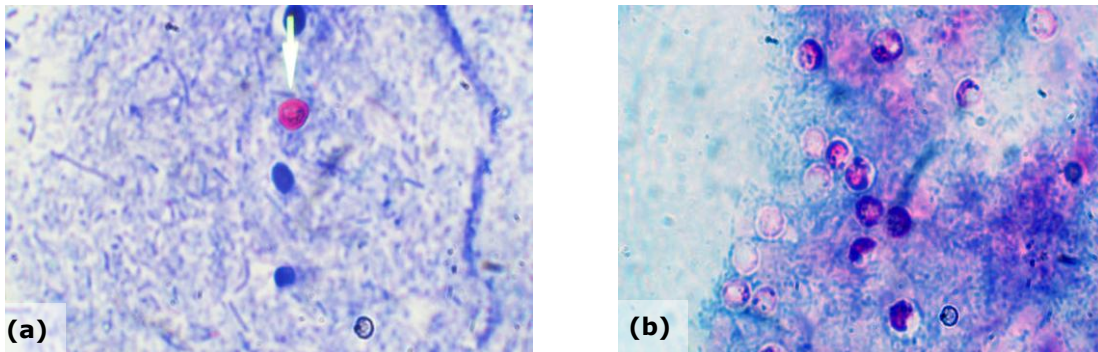
NOT 1: Yedek olarak en az iki yayma hazırlanması boyama ve değerlendirmede hataların azaltılmasını sağlar.

NOT 2: Boyama öncesinde yaymalar tamamen kurumuş olmalıdır.
- Yaymalar boya köprüsü üzerine alınır; üzerini tamamen kaplayacak şekilde saf metanol dökülerek 1 dk fikse edilir. Süre sonunda alkolün fazlası dökülerek havada kurumaya bırakılır.

ÖNEMLİ: Aşağıdaki adımlarda lamlar bir reaktiften diğerine aktarılırken, öncekinin damlaları bir kurutma kağıdına emdirilerek bir sonraki reaktifin kirlenmemesi sağlanır; böylece boyama kalitesi artırılabilir.
- Lamlar Kinyoun karbol-fuksin içeren şaleye daldırılır; 5 dk bekletilir.
- Boyadan çıkarılan lamlar %50 etil alkol içeren şalede 3-5 sn çalkalanır. Hemen musluk suyunda iyice yıkanır.
- Lamlar %1 sülfürik asit (renk giderici) içeren şalede 2 dk (veya renk açılana kadar) bekletilir.
- Musluk suyunda yıkanır ve lamların ucu kurutma kağıdına değdirilerek üzerindeki fazla su alınır.
- Lamlar Loeffler'in alkali metilen mavisini içeren şalede 1 dk bekletilir. Metilen mavisi karşıt boya olarak kullanılmaktadır; zemini boyar.
- Lamlar musluk suyunda yıkanır ve havada kurumaya bırakılır.
- İstenirse lamların üzerine entellan veya diğer bir kaplama solüsyonu damlatılarak lamelle kapatılır.

3 Preparatların değerlendirilmesi/yorumlanması

- Boyanan lamaların üzerine bir damla immersiyon yağı damlatılarak ışık mikroskopunda 100× objektifle incelenir.
- İyi tespit edilmiş ve boyanmış örneklerde *C. cayetanensis*, *C. belli* ve *Cryptosporidium* spp ookistleri mavi bir zemin üzerinde kırmızı, pembe, koyu mor boyanacaktır. Bu organizmalar arasında genellikle renk yoğunluğu yönünden farklılık vardır.
 - (a) *Cryptosporidium* spp ookistleri 4-6 µm boyutlarındadır ve içinde dört sporozoit görülebilir. Bazı ookistlerin boya almadığı veya kısmen boyandığı gözlenebilir (bkz. Şekil 1).
 - (b) Bazı olgunlaşmamış *C. belli* ookistleri olgun kist haline gelirken, ookist duvarı içinde iki sporozoit arada belirgin bir alan olacak şekilde pembe veya mor boyanacaktır.
 - (c) *C. cayetanensis* ookistleri, *Cryptosporidium* spp ookistlerine benzer ama daha büyüktür (8-10 µm), içyapıları belirgin değildir ve bazen hiç boya almazken (şeffaf), açık pembeden koyu kırmızıya değişebilen renklerde boyanabilir. Ayrıca bazı ookistler granüllü veya "buruşuk selafon"a benzer şekilde kabarcıklıdır.
- Sonuçlar raporlanırken mutlaka incelemenin hangi teknik/boya kullanılarak yapıldığı rapora yazılmalıdır.
- Sonuçlar raporlanırken mutlaka saptanan parazitin adı ve formu kısaltma kullanılmadan açık olarak yazılmalıdır;
 - (a) "*Cryptosporidium* spp ookistleri görüldü"
 - (b) "*Cystoisospora belli* ookistleri görüldü"
 - (c) "*Cyclospora cayetanensis* ookistleri görüldü"
- *Cryptosporidium* spp ülkemizde **laboratuvardan** bildirimini zorunlu bir etkidir (2). Tanı koyulması halinde olguların kayıt ve bildirim için Sağlık Bakanlığının "Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi" izlenmelidir (14).



Şekil 1. Dışkıda modifiye Kinyoun asit-fast boyama yöntemiyle boyanmış *Cryptosporidium* spp ookistleri (11).

4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Az sayıda ookist bulunan hafif enfeksiyonlar atlanabilir. Özellikle *Cryptosporidium* spp için immünolojik yöntemler daha hassastır.
- Dışkıda ookist atılımı günden güne değişebileceği için farklı günlerde en az üç örneğin incelenmesi önerilmektedir.
- Dışkıların gazlı bezden süzülmemesi, süzülecekse de en fazla iki katman kullanılması önerilmektedir.
- Yaymalar kalın olursa ookistler yeterince boya alamaz.
- Koksidiyan parazit ookistlerinin dışkıdaki sayısı değişken olabildiğinden mutlaka konsantrasyon yöntemi (tercihen formol-etil asetat) uygulanmalıdır.
- Sülfürik asit (H₂SO₄) solüsyonu düşük konsantrasyonda (%1-3) kullanılmalıdır. Yüksek konsantrasyon boyanın kalkmasına neden olabilir.
- Bu boyama yöntemiyle aside dirençli bakteriler ve bazı *Nocardia* spp gibi etkenlerin de boyanabileceği unutulmamalıdır.
- Aside dirençli boyama öncesi örnekler uzun süre %10'luk formolde saklanırsa organizmaların kaybolduğu konusunda tartışmalar vardır. Bu sorunun ortadan kaldırması için sıcak modifiye aside dirençli boyama yönteminin uygulanması önerilmektedir.
- *Cryptosporidium* spp enfeksiyonunda tipik olarak gözlenen sulu dışkının varlığında ookistlerin çoğu mukus kısımlar içinde kalabilir ve incelenen örnekte bulunamayabilir. Makroskobik incelemeye gereken önem verilmeli, mukuslu örneklerde KOH işlemi yapılmalıdır.
- Örnek kalitesi de sonucu etkiler. Bağırsak florasını etkileyen antibiyotikler ve klorokin gibi antimalaryal ilaçlar, bağırsak protozoonlarının yakalanma olasılığını azaltır. Dışkıya idrar karışmamış olmalıdır. Ayrıca dışkı örneklerinin parazitolojik inceleme için alınmasından önce hastaya baryum, kaolin, magnezi kalsine, antiasitler, bizmut, hint yağı ve mineral yağı verilmemiş olmalıdır. Baryum verilmesinden sonra en az bir hafta geçmelidir.

Ekler

Ek-1 Boya solüsyonlarının hazırlanması

%50'lik Etil Alkol Solüsyonu

Saf etil alkol	50 mL
Distile/deiyonize su	50 mL

Burgu kapaklı şişede 50 mL distile suya 50 mL saf etil alkol eklenir. Etiketlenir ve oda ısısında saklanır. 1 yıl saklanabilir.

Kinyoun Karbol Fuksin Boyası

Fuksin	4 g
%95 etil alkol	20 mL
Fenol (sıvı)*	8 mL
Distile/deiyonize su	100 mL'ye tamamlanır.

* NOT: Fenol kristalleri 56°C su banyosunda eritilerek sıvı fenol elde edilir.

- 1 Fuksin tartılır; seramik havaneliyle dövülerek toz haline getirildikten sonra, 20 mL etil alkol yavaş yavaş eklenerek fuksin-alkol solüsyonu hazırlanır.
- 2 Erimiş fenol (sıvı, 8 mL), hazırlanan fuksin-alkol solüsyonu üzerine eklenir ve distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.
- 3 Solüsyon 2 gün bekletildikten sonra filtre kağıdından süzülerek kullanılır.
- 4 Oda ısısında tutulur. Bir yıl saklanabilir.

%1'lik Sülfürik Asit Solüsyonun Hazırlanması

Konsantre sülfürik asit	1 mL
Distile/deiyonize su	99 mL

- 1 99 mL distile suya 1 mL konsantre sülfürik asit dikkatli ve yavaşça eklenir.
- 2 Oda ısısında tutulur. Bir yıl saklanabilir.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Modifiye Kinyoun Asit-Fast Boyama) ayrıca aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir. Özellikle, uygun inceleme örneklerinin temini ve boyama işlemine hazırlanması hakkında yeterli bilgi için bu belgelere bakılması önerilir:

- UMS-P-ÖY-01 Dışkı örneklerinin parazitolojik incelemesi
- UMS-P-ÖY-02 Diğer intestinal örneklerin (sigmoidoskopi materyali, duodenal aspirat v.b.) parazitolojik incelemesi
- UMS-P-TP-01 Mikroskop kalibrasyonu (oküler mikrometre ile)
- UMS-P-TP-02 Dışkı örneklerinin direkt mikroskopik incelemesi
- UMS-P-TP-03 Dışkı örneklerinin konsantrasyon yöntemleri
- UMS-B-TP-14 Metilen mavisi boyama (Loeffler'in)
- UMS P-MT-03 *Cryptosporidium* türlerinin tanımlanması

Kaynaklar

- 1 Aksoy U, Akisu C, Sahin S, Usluca S, Yalcin G, Kuralay F, Oral AM. First reported waterborne outbreak of cryptosporidiosis with *Cyclospora* co-infection in Turkey. *Euro Surveill* 2007;12(2):E070215.4. <http://www.eurosurveillance.org/ew/2007/070215.asp#4> (son erişim tarihi: 15.05.2012)
- 2 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 3 Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. Cryptosporidiosis <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Cryptosporidiosis.htm> (access date: 08.02.2013)
- 4 T.C. Sağlık Bakanlığı (Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi TR0802.16-01 Avrupa Birliği ve Dünya Bankası desteği ile) (Akbaş E, Pr Danışmanı). Türkiye'de Bulaşıcı Hastalıkların Tanısında Mikrobiyoloji Laboratuvar Kapasitesi Mevcut Durum Değerlendirmesi: Anket - LabKap2012. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kuşadası, 4 Kasım 2012.
- 5 Sharp ES. Reaktifler, boyalar ve besiyerleri: Parazitoloji. (In: Murray PR, Baron EJ, Longerson JH, Landry mL, Pfaller MA (eds). *Manual of Clinical Microbiology*.) Başustaoğlu A (çeviri ed.). *Klinik Mikrobiyoloji*. 9. baskı. Atlas Kitapçılık, Ankara. 2009, p. 2013-2019
- 6 Shimizu RY. Koksidiya için özel boyama: Modifiye Kinyoun'un aside dirençli boyama (soğuk). (In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*) Başustaoğlu A, Yıldırım ŞT (çeviri eds). *Klinik Mikrobiyoloji Yöntemleri El Kitabı*, 3. baskı. Atlas Kitapçılık, Ankara 2013, s. 9.4.1.1-9.4.1.4
- 7 Prescott LM, Harley JP, Klein DA (eds). Human diseases caused by fungi and protozoa: Giardiasis. Chapter 40.2. In: *Microbiology*. 5th ed., The McGraw-Hill Companies, USA. 2002, p.953-4
- 8 Eckert J. Protozoa. In: Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM (eds). *Medical Microbiology*. Thieme New York, USA, ISBN 1-58890-245-5 (TNY). 2005, p. 476-542
- 9 *Cryptosporidium* sp. Tanısı için Uygulanan Testlerin Standart Uygulama Prosedürü. Bildirimi Zorunlu Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısına Yönelik Standart Uygulama Prosedürleri. Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Ankara. 2008, p. 253-255
- 10 Turgay N. Özel Boyama Yöntemleri. In: Korkmaz M, Ok ÜZ (eds). *Parazitolojide Laboratuvar*. 1. baskı. Türkiye Parazitolojisi Derneği Yayınları, Meta Basım, İzmir. 2011, p. 37-41

- 11 Dirim Erdoğan D. İnsanlarda cryptosporidiosis tanısında dışkı örneklerinde polimeraz zincir reaksiyonu yönteminin yeri (Uzmanlık Tezi). Ege Üniversitesi, İzmir. 2003, p. 116
- 12 Chalmers RM, Katzer F. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends in Parasitology* 2013;29(5):237-251
- 13 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. *In*: Garcia LS, Isenberg HD (eds). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.2.1-4
- 14 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Giemsa Boyama

(Klinik Örneklerin Mikroskopik İncelemesi)

Hazırlayan Birim	Klinik Parazitoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Parazitoloji
Bölüm	Test prosedürleri
Standart No	P-TP-06
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
TEKNİK BİLGİLER	4
1 Test için asgari laboratuvar koşulları	4
2 Giemsa boyamanın yapılması	7
3 Preparatların değerlendirilmesi/yorumlanması	8
4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	9
EKLER.....	10
Ek-1 Giemsa boyasının hazırlanması ⁴	10
Ek-2 pH düzeltme solüsyonları (%2'lik) ⁴	11
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	12
KAYNAKLAR.....	12

Kapsam ve Amaç

Giemsa boyama öncelikle bir eukaryot hücre boyasıdır ve klinik mikrobiyolojide özellikle kanda bulunan enfeksiyöz ajanların ya da dokulara invazyon gösteren enfeksiyonların incelenmesinde kullanılır. Bu UMS'nin amacı Giemsa boyasının özelliklerini özetlemek ve en sık kullanıldığı durumları (*Plasmodium* spp ve diğer protozoon parazitler için kan yaymaları ve klamidyal inklüzyon cisimcikleri için sürüntü preparatları) esas alan bir prosedür vermektir.

Preparatların yapılması ve sabitlenmesi amaca göre çeşitlenebildiği için, ilgili detaylara bu UMS'de yer verilmemiştir. Bu detaylar için *etken tanısı* veya *örnek yönetimi* grubundaki ye ilgili UMS'ye başvurulması önerilir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

EDTA Etilen diamin tetra asetik asit

Ökaryot Bir hücre çekirdeği (nükleus) ve organelleri olan hücrelerin genel adı. Memeli hücreleri ve parazit hücreleri 'ökaryot'tur.

Genel Bilgi

Kan ve kemik iliği yaymalarının klasik boyası olan Giemsa, alkol-bazlı bir Romanowsky boyasıdır. Vücut sıvılarından ya da dokulardan hazırlanan yaymalarda en başarılı boyalardan biridir. Özellikle lökositlerin, eritrositlerin, trombosit ve parazitlerin nükleus ve sitoplazma morfolojilerini ayırt etmek için kullanılır. Ana kullanım alanlarından biri sıtma şüphesinde *Plasmodium* spp aranması amacıyla kan yaymalarının boyanmasıdır. Ayrıca, yine parazitolojide diğer kan protozoonlarının (özellikle hemoflajellatların), mikroflaryaların tanısında, *Chlamydia* spp şüpheli örneklerde inklüzyon cisimciklerinin aranmasında da yararlanır. Diğer bazı bakteriyel, viral, fungal ajanların doku invazyonlarında gelişen patolojilerin incelenmesi dahil klinik mikrobiyolojide pek çok durumda Giemsa boyası önemli bir tanı aracıdır (1,2).

Bir eosin ve metilen mavisi karışımı olan azure B içeriyor olması nedeniyle Giemsa, özellikle kan parazitleri için en güvenilir boyadır. Eosin parazit kromatinini kırmızı; metilen mavisi ise parazit sitoplazmasını maviye boyar. Beyaz kan hücreleri de genel olarak sitoplazmaları mavi ve nükleusları eflatundan siyaha değişen koyu renklerde ayırt edilirler. Eritrositler ise soluk kırmızı-gri görünürler. Dolayısı ile -canlı pembe-kırmızı boyanmış parazit kromatinleri özellikle eritrositlerde küçük noktalanmalar şeklinde (Schüffner granülleri) kolayca ayırt edilebildiklerinden- *Plasmodium* spp enfeksiyonlarında Giemsa boya ile tanı duyarlılığı en yüksek sonuçlar elde edilir (1,3).

Hematolojide kullanılan bir boya olan Wright boyası (Wright-Giemsa) kan parazitleri için yeterince uygun değildir. Wright rutin laboratuvarlarda yaygın, görece kolay hazırlanabilen bir boyadır ve eğer hızlı sonuç elde etmek isteniyorsa kullanılabilir; ancak -Schüffner granülleri bu boya ile gösterilemeyeceğinden dolayı- daha sonra mümkün olduğunda Giemsa boyama ile doğrulama yapılmalıdır (4).

Suyun oksijeni boyama reaksiyonunu başlatıcı işlev görmektedir. Bu nedenle stabilitesini sağlamak için stok boya nemden tam anlamıyla korunmalıdır. Giemsa stok solüsyonu ideal saklama koşullarında (nemden, sudan korunarak) yıllarca dayanır. Yine aynı nedenle boyama yapılırken stok Giemsa'dan fosfat tamponlu suda taze hazırlanmış Giemsa boyasının kullanılması kuraldır; üzerinden bir saat geçmiş ise ya da gün içinde takip eden boyamalar yapılacaksa yeni boya hazırlanması önerilir (1,3,4).

Bir zorunluluk değilse de, tamponlu suya Triton X-100 de katılabilir. Triton X-100 bir iyonik olmayan yüzey-aktif ajandır ve Giemsa boyanma özelliklerini arttırdığı, parazitlerin bir lamdan diğerine taşınma olasılığını da ortadan kaldırdığı kabul edilmektedir (5).

İyi bir boyama reaksiyonu belli bir pH'da gerçekleşir; kan yaymalarının incelenmesinde pH 7.2 olmalıdır (özellikle Schüffner yapılarının gözlenmesini sağlayacak kalitede bir boyama için) (3). *Chlamydia* spp incelemesi için Giemsa boyamada ise nötral pH (7.0) önerilmektedir (6). Genel olarak Giemsa boyamada pH hafif asit – hafif alkali (6.8-7.2 aralığında) olsa da ideali laboratuvarın, kendi uygulamasında, yapacağı incelemeye göre en iyi sonucu alacak şekilde tamponlu su pH'ını test ederek bulmasıdır (1,2).

İyi bir boyama ve doğru bir tanımlama için preparatların hazırlanması da çok önemlidir. Genel bir kural olarak yaymalar örnek alındıktan sonraki en kısa sürede boyanmalıdır; çünkü gecikmiş boyamalarda hatalı sonuçlar alınabilir. Gerek kan yaymalarının, gerekse diğer vücut sıvılarından veya dokulardan preparatların tecrübeli personel tarafından hazırlanması sonuçların güvenilirliğini yakından etkileyen bir faktördür. Başarılı sonuç için ayrıca yaymaların tam kurumuş olması gereklidir.

Teknik Bilgiler

1 Test için asgari laboratuvar koşulları

1.1. Laboratuvar güvenliği

Bu UMS'de bahsi geçen organizmalar ile ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün örnekler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima standart önlemler uygulanmalı, önlemler risk değerlendirmesi ile de desteklenmelidir. En ciddi risk kan alma işlemi esnasında personele kan-kaynaklı patojenlerin (HIV, hepatit) bulaşma riskidir (ayrıca bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

Bu prosedür uygulanırken daima **eldiven** giyilmelidir.

Boyanmış olsun, olmasın bütün lamlar **kesici-delici atık** kabul edilir ve kesinlikle kesici-delici atık kutusuna atılırlar! Diğer biyolojik kirlilerin bulunduğu torbalara atılmaları halinde torbayı deler ve ciddi enfeksiyöz risk oluştururlar.

Güvenlik uyarısı! Metanol yüksek düzeyde toksik ve parlayıcıdır. Eğer yutulacak olursa (herhangi bir miktarı) körlüğe ve hatta ölüme neden olabilir. Kullanım harici zamanlarda metanol şişesi kilitli bir dolapta tutulmalıdır!

1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) tekniğin uygulanmasından önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) tekniğe tüm yönleriyle aşina olmalı, ve (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Bu UMS'nin uygulanmasından analist; tekniğin prosedüre uygun yapılmasını sağlamak ve denetimi, değerlendirilmesi ve onaylanmasından (sonucun doğru ve güvenilir olmasından) Tıbbi Mikrobiyoloji/Parazitoloji Uzmanı sorumludur.

1.3. Örnek, Reaktif, Donanım

İnceleme örnekleri

- Parmak ucundan alınmış tam kan ile hazırlanmış preparatlar:
 - (a) ince yayma; havada iyi kurutulmuş ve saf metanol ile sabitlenmiş,
 - (b) kalın damla; havada iyi kurutulmuş, ancak sabitlenmemiş, veya
 - (c) hem ince yayma hem de kalın damla bir lamda olacak şekilde hazırlanmış (iyice kurutulmuş) ve ince yayma kısmı sabitlenmiş preparat.

Kalın damla ve ince yayma hazırlanması için bkz. UMS, P-TP-07.

- Venöz kan - Kan örneği EDTA (0.02g/10mL kan) içeren tüpe de alınabilir ve preparatlar bu tüpteki kandan hazırlanmış olabilir. Eğer mikrofilarya veya tripanozomiyaz şüphesi varsa heparin (2mg/10mL kan) veya sodyum sitrat (0.05g/10mL kan) içeren tüplere kan alınmalıdır (7).

ÖNEMLİ: Antikoagülanlı kan kullanılacaksa, kan alındıktan sonraki 1 saat içinde preparat yapılmış ve sabitlenmiş olmalıdır.

- *Chlamydia trachomatis* için göz ve genital (üretal, servikal) sürüntü örneklerinden yapılmış preparatlar – havada kurutulduktan sonra saf metanol ile en az 5 dk sabitlenmiş, sonra yine kurutulmuş olmalı.
- Kemik iliği, biyopsi ve diğer doku örneklerinden yapılmış yaymalar Kala-azar, Şark çıbanı ve toksoplazmoz tanısında Giemsa ile boyanır (bkz. UMS, P-MT-04; 05 ve 08).
- 'Buffy-coat' - tam kandan hazırlanan 'buffy-coat' yaymaları Kala azar ve toksoplazmoz tanısı için Giemsa ile boyanır.

Reaktifler

- Stok Giemsa boyası - Piyasadan hazır temin edilebileceği gibi laboratuvarda da hazırlanabilir. Özellikle "sıtma programı" kapsamında stok boyanın merkez (referans) laboratuvarda tecrübeli personel tarafından hazırlanıp sahadaki laboratuvarlara dağıtılması standardizasyon açısından idealdir (4). (Hazırlamak için bkz. Ek-1).

NOT: Ek-1'de verilen formül, ticari formüllere göre daha tutarlı sonuçlar verdiği sınıanmış bir formül olup son kullanma tarihi yoktur.

- Stok tamponlar (tamponlu su hazırlamak için)
- Tamponlu su (boyayı sulandırmak ve preparat yıkamak için), pH 7.2

ÖNEMLİ: pH kan yaymaları için 7.2, *Chlamydia* incelemesi için ise 7.0 olarak önerilmektedir (3,6).

Laboratuvar, kendi uygulamasında, incelemeye göre en iyi sonucu alacak şekilde tamponlu su pH'ını test ederek bulmalıdır.

- %5'lik Triton X-100 (stok); Triton tamponlu su (isteğe bağlı)
- Metanol, saf (%100'lük; aseton içermeyen) – metanol nem (su) çekmesini önlemek için ağzı sıkı kapalı bir şişede saklanmalıdır!
- İmmersiyon yağı

Diğer gereç, donanım

- Mikroskop, binoküler (rutin ışık mikroskobu) – 10× düşük, 40× yüksek kuru, 100× immersiyon objektifleri ve 10× oküleri olan tercih edilir.
NOT: Bazı mikroskopistler 5× oküler tercih etmektedir. Ancak 5× oküler daha az büyütme sağlar ve inceleme duyarlılığını düşürür; bu nedenle 10× oküler kullanılması önerilmektedir (8).
- Önceden temizlenmiş lamalar (25×75 mm) – tercihen, kenarı rodajlı
- Kurşun kalem, lamın rodajlı kenarına örnek no vb. yazmak için,
- 3 veya 4 şale (Coplin jar), 50 mL (lam boyamak için)
- Mezür, erlen, pipetler; vidalı kapaklı şişeler (50 mL'den 1 L'ye)
- Cam veya plastik Pastör pipetleri, tek kullanımlık; pens
- pH metre
- Zaman alarmı (timer)
- Filtre kağıdı, Whatman no. 1
- Biyolojik atık kapları, kesici-delici atık kabı ve toksik boya atıklarını toplamak için kap (kimyasal atık kabı)

1.4. Kalite kontrol

- Boyama sonuçlarının uygunluğundan emin olmak için, eğer elde (fazla) pozitif yayma örnekleri varsa, her Giemsa çalışma solüsyonu partisi hazırlandığında bir kontrol yayması da boyanmalıdır. Boyanacak olan vaka yaymasındaki organizmalar ve/veya lökositler de dahili kalite kontrol olarak kabul edilebilirler.
- İyi kalite kontrol yaymaları (ticari olarak temin edilemeyeceği için) bilinen bir hastanın kanından aşağıda tarif edildiği gibi hazırlanabilir ve ileride kullanmak üzere saklanabilir (4):
 - (a) Yeterli parazit yoğunluğuna sahip (her iki-üç inceleme alanında en az bir parazit olan) bir hasta seçilir ve kan örneği EDTA'lı tüpe alınır.
 - (b) Bu kandan, alındıktan sonraki *tercihen* 1 saat içinde ve yapılabilecek en fazla sayıda ince yayma preparat yapılır.
 - (c) Yaymaların -oda sıcaklığında ve bir fan (sıcak olmamalıdır!) kullanarak- hızla kurumaları sağlanır.
 - (d) Saf metanolde sabitlenirler ve kurumaya bırakılırlar.

- (e) İyice kurumuş olan lamalar kağıt havlulara sarılarak bir kutuya yerleştirilir. Kutunun üzeri türün adı, hazırlama tarihi ve "Giemsa kontrol lamaları" yazarak etiketlenir.
- (f) Amaç kalite kontrol lamaları veya eğitim lamaları yapmak olduğu için kutu $\leq -70^{\circ}\text{C}$ 'ye kaldırılır.
- (g) Kalite kontrol yapılmak istendiğinde kutudan bir yayma çıkarılır ve üzerindeki nemin kuruması beklenir; lam "Plasmodium spp (+)" ve tarih yazarak etiketlenir. Yayma, daha önceden sabitlenmiş olduğundan, şimdi artık boyanmaya hazırdır.
- Stok tampon çözeltiler ve tamponlu su berrak olmalı, görünür bir kirlilik olmamalıdır. pH belirtilen sınırlar içinde olduğu sürece tamponlu su testte kullanılabilir. Her kullanımdan önce, tamponlu suyun pH'ı kontrol edilmelidir. Eğer gerekiyorsa düzeltilmelidir (bkz. Ek-2).
- pH'ın belirtilen sınırlar içinde olup olmadığını değerlendirmek için ayrıca "normal" kandan yaymalar hazırlanıp, boyanabilir ve hücreler mikroskopta incelenerek yorum yapılabilir:
 - (a) Makroskobik olarak kan yayması morumsu görünür. Eğer mavi ise tamponlu su alkaliye kaymış; pembe-kırmızı ise tamponlu su asite kaymış demektir.
 - (b) Mikroskobik olarak, eritrositler pembemsi gri, trombositler koyu pembe ve lökositler mor-mavi çekirdekler ile açık renk sitoplazmaya sahip görünür. Eozinofilik granüller parlak mor-kırmızı ve nötrofilik granüller mordur. Enfekte olmayan eritrositler içinde bazofilik noktalanma mavi gözlenir.
 - (c) Bu tarif edilen renklerde kullanılan boya serisine ve kanın karakterine bağlı olarak küçük farklılıklar görülebilir, ancak morfolojik özellikler ayırt edilebiliyorsa boya tatmin edicidir.
- Mikroskop belirli aralıklarla (yoğun kullanılıyorsa yılda en az bir kez) kalibre edilmelidir. Mikroskoba herhangi bir parça eklenmesi veya değiştirilmesi durumunda da kalibrasyon yapılmalıdır. Kalibrasyon için kullanılmış optikler mikroskobun üzerinde olmalıdır. Tüm objektifler için kalibrasyon faktörleri göz önündeki bir panoda asılı olmalıdır (bkz. UMS, P-TP-01 Mikroskop Kalibrasyonu).
- Tüm kalite kontrol sonuçları kaydedilmelidir.

2 Giemsa boyamanın yapılması

NOT: Prosedür sıtma şüphesinde ince yayma ve kalın damla preparatlarının boyanması ön plana alınarak anlatılmıştır. Bununla birlikte yeri geldikçe diğer organizmalar (*Chlamydia* sp vb.) için farklı uygulama hususları da not şeklinde verilmektedir.

- Bir boyama şalesine koymak üzere 40 mL Giemsa çalışma solüsyonu (%2.5'lük) hazırlanır (hazırlanışı için bkz. Ek-1).

ÖNEMLİ: Çalışma solüsyonu günlük hazırlanır. Eğer aynı gün çok sayıda boyama yapılacaksa boyanın değiştirilmesi gerekebilir.

NOT: Standart bir şale 40 mL boya alır. Farklı büyüklükte bir şale kullanılacaksa volüm, oranlar aynı kalacak şekilde, ayarlanmalıdır.

- İkinci bir şalenin içine de 40 mL tamponlu su konur; 20 µL Triton X-100 eklenir (*mikroflarya* incelemesinde 200 µL Triton X-100 eklenir).
- Yaymalar Giemsa çalışma solüsyonu içeren şalenin içine konur ve 45-60 dk tutulur.

NOT: Lamlar daha yüksek yoğunlukta (ör., %10'luk) Giemsa çalışma boyası kullanılarak daha kısa sürede (10 dk) boyanabilir. Ancak daha fazla boya harcanmasına karşın sonuç kalitesi yeterince iyi olmayabilir.

- İnce yayma lamı şaleden çıkarılır ve tamponlu su içine batırılır; 3-4 kez batırıp çıkarılarak yıkanır. Kalın damla preparatı ise tampon içinde 5 dk kadar tutulmalıdır.

NOT 1: Aşırı yıkama yaymaların fazla renksizleşmesine neden olabilir. Süreler aşılmamalıdır.

NOT 2: Eğer ince yayma ve kalın damla aynı lamın üzerinde ise önce ince yayma kısmı tamponlu su içine 3-4 kez batırıp çıkarılarak yıkanır. Sonra lamın sadece kalın damla kısmı tampon solüsyona girecek şekilde şaleyeye yerleştirilir ve 5 dk tutulur. Bu işlem sırasında kalın damlanın tamamen tampon içinde olduğundan, ancak ince yaymanın hiçbir parçasının ise kesinlikle tampon içinde olmadığından emin olunmalıdır.

NOT 3: *Chlamydia* spp'nin bazofilik intrasitoplazmik inklüzyon cisimciklerinin görülmesi amacıyla göz veya genital sistem sürüntü örneklerine Giemsa boyama uygulanırken kullanılan reaktifler ve adımlar yıkama aşamasına kadar aynıdır. Yıkama ise %95'lik etanolde yapılır; preparat hızla etanol içine sokulup çıkarılarak fazla boya uzaklaştırılır.

- Lamlar düşey pozisyonda dizilir ve havada kurutulur.

NOT: Eğer ince yayma ve kalın damla aynı lamın üzerinde ise kurutulurken kalın damla kısmı aşağıda tutulmalıdır.

- Mikroskopta incelenir.

3 Preparatların değerlendirilmesi/yorumlanması

- Preparatlar önce küçük objektif altında (10×) genel boyanma özellikleri ve yaymalarda hücrelerin dağılımını görmek için değerlendirilmelidir. Mikrofilaryaların varlığı da bu büyütmeye kolay ayırt edilir.
- Daha sonra immersiyon objektifi (100×) ile esas inceleme yapılmalıdır.
- İnce yayma preparatlar en az 25-30 dk incelenmeli ve en az 300 alan gözden geçirilmelidir. İncelemeye yaymanın uç bölgesinden, eritrositlerin tek tek düştüğü bir alandan başlanır.
- Kalın damla preparatlar en az 10 dk ve her biri en az 10-20 lökosit içeren 100 alan gözden geçirilecek şekilde incelenmelidir.

- Eğer *Plasmodium*'lar mevcutsa sitoplazmaları mavi, nükleer materyal kırmızı, mor-kırmızı boyanmış olacaktır. *Plasmodium*'ların enfekte ettiği eritrositlerdeki Schüffner granülleri ve diğer inklüzyonlar kırmızı boyanır.
- Sıtma parazitleri için ayırt edilen nükleer ve sitoplazmik renkler tripanozomada ve hücre içi yerleşim göstermiş *Leishmania*'larda da gözlenir.
- *Leishmania* amastigotları makrofajların içinde veya dışında çok küçük (3 ila 5 µm) yuvarlak veya oval organizmalar şeklinde görülürler. Bir amastigotta kırmızı-mor nükleus, oldukça küçük daha koyu kırmızı-mor boyanmış kinetoplast ve açık mavi sitoplazma ayırt edilir.

NOT: Preparatların incelenmesinde daha ayrıntılı bilgi için ayrıca şu ilgili UMS'lere bakılmalıdır:

- i) Sıtmanın Mikrobiyolojik Tanısı (UMS, P-MT-06);
- ii) Kala-azar'ın Mikrobiyolojik Tanısı (UMS, P-MT-04);
- iii) Şark çıbanının Mikrobiyolojik Tanısı (UMS, P-MT-05).

- Mikrofilaryalar genellikle mavi-mor görünürken, kılıfları boyanmayabilir.
- Göz veya ürogenital örneklerden yapılmış yaymaların Giemsa boyamasında, hücreler eğer enfekte iseler, *Chlamydia* spp inklüzyon cisimcikleri bazofilik boyanmış (koyu mavi-mor) olarak görülürler.

4 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Kan yaymalarının kalitesi teknisyenin tecrübesi ve boyanın kalitesiyle doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle hatalı yaymalardan kaçınılmalı ve kullanılacak Giemsa boyasının taze olmasına önem verilmelidir.
- Çalışma solüsyonunda pH ayarlamasına gereken dikkat gösterilmez ise sonuçların doğruluğu ve güvenilirliği etkilenebilir.
- Stok Giemsa boyasına çok küçük miktarlarda bile su karışması boyanın stabilitesini bozacaktır. Saklama koşullarına özen gösterilmelidir.

Ekler

Ek-1 Giemsa boyasının hazırlanması⁴

100x Stok Tampon 0.67 M

Na ₂ HPO ₄	59.24 g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	36.38 g
Deiyonize su	1000 mL

Karıştırılır ve 121°C'de 15 dk otoklavlanır ya da filtrasyon ile (filtre por çapı 0.2 µm) sterilize edilir. Etiketlenir ve oda ısısında saklanır. Raf ömrü 1 yıldır.

Çalışma Tamponu 0.0067M, pH 7.2

Stok Tampon	10 mL
Deiyonize su	990 mL

Kullanmadan önce pH kontrol edilir. pH7.2 olmalıdır. Etiketlenir ve oda ısısında saklanır. Raf ömrü 1 aydır.

Triton X-100, %5'lik

Deiyonize su (56°C'ye ısıtılmış)	95 mL
Triton X-100	5 mL

Deiyonize su önceden ısıtılır ve Triton X-100 yavaşça eklenir; yavaş çevrilerek karıştırılır.

Giemsa Stok Boya

Cam boncuklar, 3.0 mm	30 mL
Metanol, saf, asetonsuz	270 mL
Giemsa boya, toz (sertifiye)	3 g
Gliserol	140 mL

Temiz, kuru, 500 mL'lik bir kahverengi cam şişe alınır; içine önce cam boncuklar konur ve listedeki diğer maddeler verilmiş sırasına göre şişeye eklenir. Burgu kapak sıkıca kapatılır.

Şişe bir çalkalayıcının üzerine bir açıyla yerleştirilir; orta hızda, en az 14 gün, günde 30-60 dk olacak şekilde çalkalanır.

Kapak nem almayacak şekilde daima sıkıca kapalı tutulduğu sürece stok Giemsa oda ısısında süresiz stabildir (ayrıca stok boya zamanla daha da gelişir).

Kullanmadan önce şişe çalkalanır. Çalışma solüsyonu hazırlamak için kullanılacak kadar bir miktar Whatman No 1 filtre kağıdından süzülerek alınır.

Güvenlik uyarısı!

Metanol yüksek düzeyde **toksik ve parlayıcıdır**. Eğer yutulacak olursa (her hangi bir miktarı) körlüğe ve ölüme neden olabilir. Kullanım harici zamanlarda metanol şişesi kilitli bir dolapta tutulmalıdır!

Giemsa Çalışma Boyası (%2.5'luk)

Çalışma tamponu	40 mL
Giemsa stok boya	1 mL
%5 Triton X-100	20 µL

Günlük olarak taze hazırlanır (testten hemen önce).

Eğer çok sayıda lam boyanacaksa boya gün içinde yenilenmelidir. İdeal olarak hazırlanmış bir çalışma boyası 1 saatten sonra kullanılmamalıdır.

Ek-2 pH düzeltme solüsyonları (%2'lik)⁴

Tamponlu suyun pH'ı, her Giemsa çalışma boyasının hazırlanmasından önce, rutin olarak kontrol edilmelidir.

pH'ı ayarlamak için düzeltme solüsyonları kullanılır; eğer $pH < 7.2$ (asite kaymış) ise %2 Na_2HPO_4 solüsyonundan, eğer $pH > 7.2$ (alkaliye kaymış) ise %2 KH_2PO_4 solüsyonundan az miktarlarda eklenerek ayarlama yapılır.

Bu düzeltme solüsyonlarının hazırlanışı aşağıda verilmektedir.

%2 Na_2HPO_4

Bir erlende 100 mL deiyonize su ile 2 g Na_2HPO_4 karıştırılır, eritilir. Solüsyon bir burgu kapaklı şişeye aktarılır ve "%2'lik Na_2HPO_4 " şeklinde etiketlenir. Gün ışığından uzak, serin bir ortamda saklanır.

Tampon suyu daha alkali yapmak için kullanılır.

%2 KH_2PO_4

Bir erlende 100 mL deiyonize su ile 2 g KH_2PO_4 karıştırılır, eritilir. Solüsyon bir burgu kapaklı şişeye aktarılır ve "%2'lik KH_2PO_4 " şeklinde etiketlenir. Gün ışığından uzak, serin bir ortamda saklanır.

Tampon suyu daha asit yapmak için kullanılır.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Giemsa Boyama) ayrıca aşağıda listelenen UMS'lerle ilgilidir. Özellikle, preparatların incelenmesi hakkında daha ayrıntılı bilgi için bu UMS'lere bakılması önerilir:

- UMS, P-ÖY-03 Kan ve kemik iliği örneklerinin parazitolojik incelemesi
- UMS, P-TP-01 Mikroskop kalibrasyonu (oküler mikrometre ile)
- UMS, P-TP-07 Kalın damla ve ince yayma
- UMS, P-MT-06 Sıtmanın mikrobiyolojik tanısı
- UMS, P-MT-04 Kala-azar'ın mikrobiyolojik tanısı
- UMS, P-MT-05 Şark çıbanının mikrobiyolojik tanısı
- UMS, P-MT-08 Toksoplazmozun mikrobiyolojik tanısı
- UMS, B-MT-16 *Chlamydia trachomatis*'in mikrobiyolojik tanısı

Kaynaklar

- 1 Bullock-Iacullo S. Giemsa stain. In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.8.5.1 - 9.8.5.5
- 2 Fritsche TR, Selvarangan R. Medical parasitology. In: McPherson RA, Pincus MR (eds). *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 22nd ed. Elsevier Inc., Philadelphia. 2011, p.1189-1238
- 3 WHO. Basic Malaria Microscopy Part I. Learner's Guide. Second edition, Switzerland. 2010. http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547826_eng.pdf (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 4 CDC. Laboratory diagnosis of malaria: Staining for malaria parasites. Laboratory identification of parasites of public health concern. DPDx. http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/PDF_Files/malaria_staining_benchaid.pdf (son erişim tarihi: 17.11.2013)
- 5 Garcia LS. Laboratory methods for diagnosis of parasitic infections: Giemsa stain (Procedures 44.20-22). In: Finegold SM, Baron EJ (eds). *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. 7th ed., The C. V. Mosby Company, USA. 1986 p. 812-813
- 6 Finegold SM, Baron EJ (eds). Formulas for commonly used stains: Giemsa stain for *Chlamydiae*. Chapter 46. In: *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. 7th ed., The C.V. Mosby Company, USA. 1986, p. 905.
- 7 Garcia LS. Giemsa stain. http://www.med-chem.com/pages/lab_procedures/pdf/giemsa_blood_stain.pdf (son erişim tarihi: 17.11.2013)
- 8 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.2.1-4.



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Kalın Damla ve İnce Yayma (Parazitolojik İnceleme için)

Hazırlayan Birim	Klinik Parazitoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Parazitoloji
Bölüm	Test prosedürleri
Standart No	P-TP-07
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
TEKNİK BİLGİLER	5
1 Test için asgari laboratuvar koşulları	5
2 Ön hazırlık.....	6
3 Kalın damla ve ince yayma hazırlanması.....	8
4 Preparatların kalitesinin değerlendirilmesi.....	11
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	15
6 Referans Laboratuvar	15
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	16
KAYNAKLAR.....	16

Kapsam ve Amaç

Boyanmış kan yaymalarının mikroskopik incelemesi ile laboratuvar tanısı sıtmada vaka yönetimi ve epidemiyolojik çalışmalar için yaygın olarak tercih edilen ya da referans yöntem olmaya devam etmektedir (1,2).

Sıtma ülkemizde bildirim zorunlu bir hastalıktır ve bir eliminasyon programı yürütülmektedir (3,4). Vaka sayıları çok azaldığı veya hatta bazı yıllarda hiç rastlanmadığı için klinik laboratuvarlara örnek başvurusunun da pratik olarak yapılmadığı varsayılabilir. Ancak hastalığın ülkemizde halk sağlığı açısından önemini koruduğu göz önüne alınırsa yeterli bir tanı kapasitesine halen ihtiyaç vardır. Buna karşın, Sağlık Bakanlığı tarafından 2012 yılında ülke genelinde yürütülen kapasite araştırmasına göre incelenen klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının (n=510) dörtte biri sıtma için inceleme yapabildiklerini beyan etmişlerdir. Bunların ise yaklaşık %20'sinde sonucun ince yayma veya kalın damla preparatlardan sadece birine dayalı olarak verildiği anlaşılmaktadır. Bir diğer ifade ile bu laboratuvarların sıtma için *standart vaka tanımına* göre geçersiz ya da yetersiz bir tanı prosedürü kullanarak sonuç verdikleri söylenebilir (5).

Anlaşılabileceği üzere, kalın damla ve ince yayma preparat hazırlanması ve incelenmesi için mevcut kapasitenin geliştirilmesi başta sıtma olmak üzere çeşitli kan ve doku parazitlerinin tanısında önemli gözükmektedir.

Bu UMS'nin amacı, sıtmanın ve diğer kan parazitlerinin tanısında halen tüm dünyada sıklıkla kullanılan tanısal uygulamalar olan kalın damla ve ince yayma incelemeleri için standart bir işlem tanımlamak ve preparatlar hazırlanırken dikkat edilmesi gereken önemli noktaları vurgulamaktır.

Kalın damla ve ince yayma preparatları ile sıtma dışında kalan diğer kan ve doku parazitleri (*Leishmania* spp, *Trypanosoma* spp, mikrofilaryalar, *Babesia* spp, *Toxoplasma gondii* vb.) de tanımlanabildiğinden bu parazitlerin tanımlanmasıyla ilgili önemli noktalara da yeri geldikçe değinilecektir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

- aköz hümeör** Siliyer epitelden salgılanan şeffaf, plazmaya benzer bir sıvıdır; daha az protein içerir. Lens ile kornea arasında bulunur
- buffy-coat** Santrifüj edilmiş antikoagülanlı kanın eritrosit tabakası ve plazması arasında kalan ve beyaz kan hücrelerini içeren (bulutsu) katman.
- EDTA** Etilen diamin tetra asetik asit

Genel Bilgi

Başta *Plasmodium* spp olmak üzere, *Leishmania* spp, *Trypanosoma* spp ve *Babesia* spp gibi kan protozoonlarının tanısında ilk olarak ince yayma ve kalın damla preparatlar hazırlanıp boyanarak mikroskopta incelenmektedir.

Her iki preparatın da düzgün hazırlanabilmesi için ilk şart, yaymalar için **temiz lam**ların kullanılmasıdır. Bu yüzden uzun süre dışarıda kalmış (rafta beklemiş) lamlar kullanmadan önce deterjanla yıkanmalı ve daha sonra %70'lik etil alkol ile silinmelidir. Yeni ve ilk kez kullanılacak lamlar genellikle temiz ve yağsız kabul edilebilirler ve kullanım öncesi %70'lik etil alkol ile silinmeleri yeterlidir (6,7,8).

Yayma preparatlar sıklıkla parmak ucundan alınan kan ile hazırlanmaktadır. Antikoagülan (EDTA) içeren kan örneklerinden hazırlanan yaymalar her zaman çok iyi sonuç vermese de gerekli olduğu durumlarda kullanılabilir (6,7,8,9).

Kalın damla kan preparatı ile daha fazla hacimde kan incelenerek parazitler ince yayma preparatına oranla daha duyarlı olarak saptanabilmektedir. Bir kalın damla kan preparatı 5-6 yayma preparatın kapsadığı alanı içine aldığı için, kanda parazit az bulunsa bile görülme olasılığı fazladır. Hatta kalın damlada, bir $\times 1000$ büyütme alanında, ince yaymaya göre en az 20 kat örneğin değerlendirilmesi mümkün olabilmektedir (10). Yöntem özellikle mikrofilarya ve *Trypanosoma* türlerinin aranması sırasında en ideal yöntem olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte *Plasmodium* spp araştırmasında kalın damlada parazitlerin bulunması daha kolay olmasına karşın tür düzeyinde tanınmaları daha güç olduğu için tanı konulurken ince yayma preparatlar da ayrıca değerlendirilmelidir (2,11).

İyi bir yayma preparat bir ucu kalın, diğer ucu ise tek bir sıra hücre tabakası kalacak incelikte hazırlanmalıdır. Bir başka deyişle, iyi bir yayma hazırlandıktan sonra altına konulan yazı okunabilecek kalınlıkta olmalıdır. Kötü yayma preparatlarda çizgilenmeler veya boşluklar görülebilir ve bunlar genellikle kirli, yağlı lamlara bağlı olarak oluşmaktadır. Yayma kan preparatı hazırlarken en sık yapılan hatalar Kutu 1'de özetlenmiştir (6,11,12).

Eğer yaymalar çok kalın veya antikoagülan içeren kanla yapılırsa kuruduktan sonra kenarları kalkar ve genellikle de büyük bir bölümü düşer. Boyanma öncesi uzun süre beklenmesi gerekecekse, kan yaymaları önce hemoglobini içeriğinden ayrıştırılmalı (eritrositler distile suda eritilmeli), daha sonra kurutulmalıdır (bkz. "3.5 Hazırlanan yaymalar için sonraki işlemler").

EDTA'lı kanlarla yapılan kalın damla preparatların kullanılması durumunda, kurumaları için oda sıcaklığında uzun süre bekletilmelidir. Antikoagülan madde içeren kandan hazırlanan kalın damla preparatların boyama işlemi öncesi iki hafta saklanabildiği ve bu zaman içinde kanda bulunabilecek parazit yapılarının boyanma özelliklerinde herhangi bir değişiklik oluşmadığı bildirilmektedir.

Sıtma araştırmalarında aynı lam üzerine hazırlanacak ince yayma ve kalın damla preparatların beraberce incelenmesi büyük yarar sağlamaktadır. Ancak, kalın damla preparatların aynı lam üzerindeki ince yayma preparatlara göre daha geç kuruyacağı unutulmamalı ve boyama işlemi öncesi tüm lamın tam anlamıyla kurumaması beklenmelidir.

T. gondii'nin takizoitleri veya doku kistleri de, steril vücut sıvılarından (BOS, idrar, solunum örnekleri, aköz hümör, perikard, amniyon sıvısı vb.) ve tam kan 'buffy-coat' ya da homojenize edilmiş doku örneklerinden yapılan yaymaların Giemsa boyaması ile saptanabilir (bkz. UMS, P-TP-06).

Visseral leishmaniyaz tanısında ise, kemik iliği veya 'buffy-coat' yaymalarının mikroskopik incelemesi ile tanı koyulabilmektedir. Tanı şansını yükseltmek için her örnekten -olabildiğince- birden fazla yayma hazırlanmalıdır. Hasta başında veya laboratuvarında hazırlanıp sabitlenmiş yaymalar Giemsa ile boyanırlar (13).

Teknik Bilgiler

1 Test için asgari laboratuvar koşulları

1.1. Laboratuvar güvenliği

Bu UMS'de bahsi geçen organizmalar ile ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün örnekler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima standart önlemler uygulanmalı, önlemler risk değerlendirmesi ile de desteklenmelidir (ayrıca *bkz.* "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

En ciddi risk kan örneklerinin işlenmesi sırasında personele kan-kaynaklı patojenlerin (özellikle HIV, hepatit) bulaşma riskidir. Bu prosedür uygulanırken **daima** eldiven giyilmelidir.

Boyanmış olsun, olmasın bütün lamlar **kesici-delici atık** kabul edilir ve kesinlikle kesici-delici atık kutusuna atılırlar! Diğer biyolojik kirlilerin bulunduğu torbalara atılmaları halinde torbayı deler ve ciddi enfeksiyöz risk oluştururlar.

Güvenlik uyarısı! Metanol yüksek düzeyde toksik ve parlayıcıdır. Eğer yutulacak olursa (herhangi bir miktarı) körlüğe ve hatta ölüme neden olabilir. Kullanım harici zamanlarda metanol şişesi kilitli bir dolapta tutulmalıdır!

1.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) teknikleri uygulamadan önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) tekniklere tüm yönleriyle aşina olmalı, ve (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Bu UMS'nin uygulanmasından analist; tekniklerin prosedüre uygun yapılmasını sağlamaktan ve denetimi, değerlendirilmesi ve onaylanmasından (sonucun doğru ve güvenilir olmasından) Tıbbi Mikrobiyoloji/Parazitoloji Uzmanı sorumludur.

İnvaziv metot kullanılarak alınmış örneklerle ait preparatlar en kısa sürede ve mutlaka Tıbbi Mikrobiyoloji/Tıbbi Parazitoloji Uzmanı tarafından bizzat incelenmeli, değerlendirilmeli ve sonuçlandırılmalıdır.

1.3. Örnek, Reaktif, Donanım

Kullanılabilecek örnekler

- Periferik kan, EDTA'lı venöz kan, kemik iliği, kanın "buffy-coat" kısmı ya da bir özel konsantrasyon prosedürünün (tripanazomlar için üçlü santrifüj) sedimenti kullanılarak **yaymalar** hazırlanabilir (14,15).

NOT: Bu Belgede **periferik kan**dan ince yayma ve kalın damla hazırlanması için bir prosedür verilecektir. Diğer örneklerden yaymaların da benzer şekilde hazırlanabileceği belirtilmelidir. Farklılıklara yeri geldikçe değinilecektir.

- Periferik kan** – İnce yayma ve kalın damla için geleneksel örnektir. Preparatlar örneğin alındığı anda hazırlandığından dolayı ayrıntılı bilgi ilgili bölümde verilecektir (*bkz. sayfa 8*).

- **Venöz kan** EDTA (0.02g/10mL kan) içeren tüpe alınabilir ve preparatlar bu tüpteki kandan hazırlanabilir. Eğer mikrofilarya veya tripanazomiyaz şüphesi varsa heparin (2mg/10mL kan) veya sodyum sitrat (0.05g/10mL kan) içeren tüplere kan alınmalıdır (14).

NOT: Preparatlar bu tüpteki kandan Pastör pipeti yardımı ile lamın üzerine alınarak hazırlanabilir.

ÖNEMLİ: Antikoagülanlı kan kullanılacaksa, kan alındıktan sonraki 1 saat içinde preparat yapılmış ve sabitlenmiş olmalıdır.

- **Kemik iliği** örneği alınır alınmaz -hasta başında- yayma yapılmalı ve tespit edilmeli; bu yapılamıyorsa ve laboratuvara gönderilmesi gecikecekse örnek EDTA içine konmalıdır.

NOT: Antikoagülanlı örnek kullanılacaksa, kan alındıktan sonraki 1 saat içinde preparat yapılmış ve sabitlenmiş olmalıdır.

ÖNEMLİ: Yayma preparatların hasta başında yapılması, preparat kalitesinin uygunluğu ve tanı konulmasını kolaylaştırması açısından önemlidir. KI'den yayma preparat da kan örneğinininki gibi hazırlanır

- **'Buffy-coat'** konsantrasyon yöntemi ile tam kandan ayrılmış çekirdekli kan hücrelerinden de yaymalar hazırlanabilir. Bunun için tam kan örneği 700 × g'de 30 dk santrifüj edilir; beyaz hücre tabakasından (plazma ve eritrositler arasında kalan kısımdan) Pastör pipeti yardımıyla örnek alınır ve yayma hazırlanır.
- Tüm örnekler antiparaziter tedaviye başlamadan önce alınmalıdır.
- Kan ve kemik iliği örnekleri kesinlikle **sızdırmaz** örnek tüpü/kabına alınır ve taşınır.

Reaktifler

- Metanol, saf (%100'lük; aseton içermeyen)

NOT: Metanol nem (su) çekmesini önlemek için ağzı sıkı kapalı bir şişede saklanmalıdır!

Diğer gereç, donanım

- Önceden temizlenmiş lamlar (25×75 mm) – tercihen kenarı rodajlı
- Lanset, steril enjektör
- Kurşun kalem - lamın rodajlı kenarına örnek numarası vb. yazmak için,
- Kesici-delici atık kabı

2 Ön hazırlık

2.1. Lamaların temizlenmesi

- Kalın damla ve ince yayma preparat hazırlamak için **temiz** lam kullanılmalıdır. Lam paketlerinin üzerinde "yıkılmış" veya "önceden temizlenmiş" ibaresi olsa bile bu, doğrudan kullanılabilir anlamına gelmemektedir.
- Yayma preparat hazırlanması için kullanılmak üzere lamlar yıkayıp kurutulduktan sonra sarılarak saklanmalıdır.

- Yayma preparat hazırlamak için kenarı buzlu (rodajlı) lam kullanılması önerilmektedir.
- Yüksek kaliteli camdan yapılmış lamlar tercih edilmelidir. Düşük kaliteli lamlar ucuzdur, ancak sıcak ve nemli iklimlerde çabuk bozulabilmekte, üzerinde yama tarzında opak lekeler oluşabilmekte, mikroskobik değerlendirmeyi olumsuz etkileyebilmektedir.
- Yıkama ve yayma preparat hazırlanması için iki yol mevcuttur:

Hastane laboratuvarları için

- Hastanelerde hastalar genellikle tek tek başvuruda bulunduğu için lamların temizlenmesi için gerekli zaman vardır.
- Yıkama işlemi için temiz su, iyi kalitede sıvı veya toz deterjan, iyi bir yıkama bezi veya yumuşak sünger, kurulamak için temiz, hav bırakmayan pamuklu bezler gerekir.
- Yıkama işlemi şöyle yapılmalıdır:
 - (a) Bir kutu lam birbirinden ayrılarak deterjanlı su içerisinde 4-8 saat bekletilerek ıslatılır (bir gece tutulması uygundur).
 - (b) Daha sonra bez/sünger yardımıyla lamların her iki yüzeyi de yıkanır.
 - (c) Temiz su içerisinde lamlar ayrı ayrı durulanır.
 - (d) Lamların üzerine kalan su uzaklaştırılıp ağzı sıkıca kapalı bir kavanozda metil alkolde bekletilir. Bu işlem sırasında doğrudan güneş ışığından uzak tutulur.
 - (e) Lamlar teker teker bir kenarından tutularak hav bırakmayan bez yardımıyla kurulanır.
 - (f) Bu şekilde lamlar kullanıma hazır hale gelmiştir.

Sıtma Kontrol Programları için

- Bu tür programlarda sıtma mikroskopi çalışmaları, çok az imkanı olan uzaktaki bir laboratuvarda tek başına çalışan bir mikroskopistten, ilaç direncinin takibi ve sahadaki diğer çalışmalar gibi büyük epidemiyolojik araştırmalara kadar değişiklik gösterir. Bu personele temizlenmiş sarılmış lamlar, boyalar, diğer malzemeler merkez tarafından sağlanmalıdır (11).
- Bazı kırsal bölgelerde ise, merkezden lamların gönderilmesi zaman alabilmekte, laboratuvar personeli bu süreyi kısaltmak amacıyla kendi lamlarını kendileri temizlemekte veya önceden kullandığı lamları tekrar temizleyerek kullanmaktadır.
- İdeali önceden hazırlanmış, temizlenmiş, kağıtlara 10'arlı sarılarak paketlenmiş, desikatörde (silika jel nem önleyici paketlerle konarak) korunmuş iyi lamlara gereksinim vardır. Bu şekilde bir uygulama ile verimlilik önemli ölçüde artırılmış olur (11).
NOT: Bu özellikle nemli iklimlerde önemlidir. Lamlar oda sıcaklığında yüksek nemde saklanırsa birkaç hafta sonra birbirine yapışır ve tekrar yıkanıp kurutulmazsa kullanılamaz hale gelirler (11).
- Kalite kontrol için her bir paketin üzerine lamların temizlenme tarihi ve temizliği yapan kişinin adı yazılır.

2.2. Diğer hazırlıklar

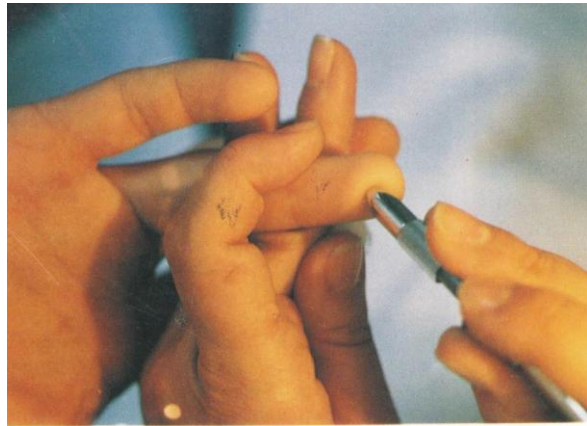
- Periferik kan almak için hastanın eli temiz olmalıdır. Eli soğuksa ısıtılmalıdır.
- Hastanın kaydı yapıldıktan sonra kanı almadan önce koruyucu eldiven giyilmelidir.
- Gerekli malzemeler el altına toplanır: steril lanset, alkollü pamuk, temizlenmiş lamlar; venöz kan alınacaksa vakumlu, EDTA'lı tüp vb.
- Lamin buzlu cam kısmına hasta bilgileri ve örneğin alındığı tarih kursun kalem ile yazıldıktan sonra yayma işlemi yapılmalıdır.

3 Kalın damla ve ince yayma hazırlanması

3.1. Periferik kan alma

- İnce yayma ve kalın damla preparat hazırlamak için en yaygın olarak kullanılan örnek periferik kandır.
- Periferik kan parmak ucundan alınır. Ayrıca kulak memesi ve bebeklerde ayak başparmağından (topuk değil) örnek alınabilir (11).
NOT: Çocuk veya yetişkin el başparmağını asla kullanmayın!

- Parmak ucundan kan alınırken; önce cilt alkollü pamukla silinerek kurutulur.
- Genellikle dördüncü parmağın distal falanks volar yüzü, kanı alacak kişinin baş ve işaret parmağı arasında sabitlenir.
- Steril lanset ile **tek vuruş** şeklinde delme işlemi yapılır (Şekil 1).



Şekil 1. Periferik kan almak için parmağın lanset ile delinmesi (16)

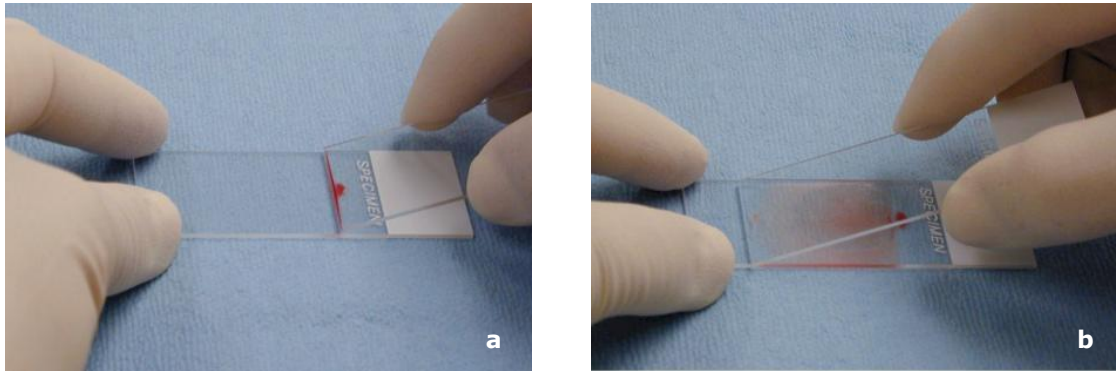
- Kanın serbest bir şekilde akabilmesi için deliğin yeterince derin olmasına dikkat edilmeli; parmak sıkılmamalıdır.

NOT: Kan çıkarmak için parmak sıkılırsa örnek doku aralığına sızan sıvı ile dilüe olacağı için düşük parazitemi oranına sahip hastalarda örnekteki parazit sayısı tespit sınırının altına inebilir.

- Bundan sonra hızlı hareket edilmeli, lamlar sadece kenar kısımlarından tutularak parmak ucundaki damladan preparatlar hazırlanmalıdır.

3.2. İnce yayma hazırlanması

- Delinen parmakta -serbestçe- toplanmış kan damlası, lamın kenarından bir santim kadar mesafede orta bir noktaya (parmak lama değdirilmeden) alınır.
- Lam sol elin baş ve işaret parmakları arasında kan damlası işaret parmağının bulunduğu tarafta olacak şekilde düz bir şekilde tutulur.
- Sağ elin baş ve işaret parmakları arasına alınan **diğer** bir lam, kan damlasının ön kısmına işaret parmağına bakan 45°C'lik bir açı yapacak şekilde temas ettirilir (Şekil 2a).
- Kanın bu *ikinci* lamın iki köşesine kadar yayılması için kısa bir süre beklenir ve açı muhafaza edilmek şartıyla *ikinci* lam sol tarafa tereddüt edilmeden sürülür (Şekil 2b).
- Lamelin peşinden sürüklenen kan içindeki hücreler bozulmadan ince bir tabaka halinde yayılır.
- İnce yaymalar havada iyice kurutulur ve üzeri metanol ile kaplanarak 10-15 saniye bekletilip fikse edilir.



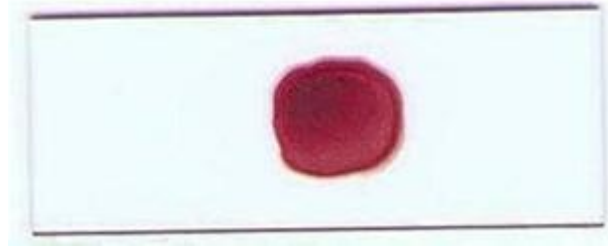
Şekil 2. İnce yayma preparatın hazırlanması (16)

3.3. Kalın damla kan preparatı hazırlanması

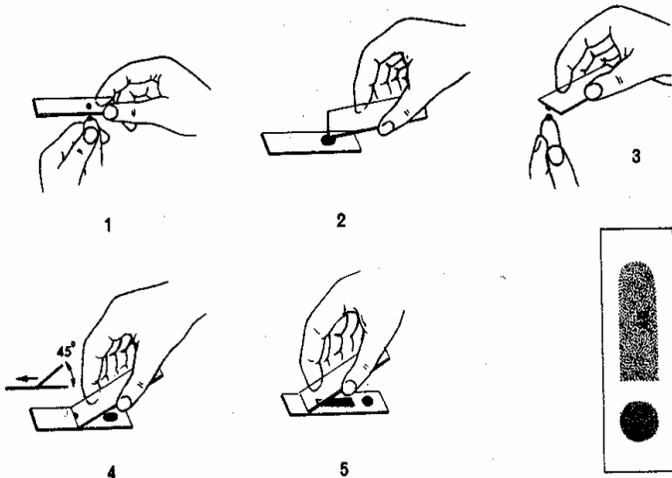
- Delinen parmakta -serbestçe- toplanmış kan damlası, önceden temizlenmiş bir lam üzerine lamın kenarından bir santim kadar mesafede orta bir noktaya (parmak lama değdirilmeden) alınır. Kan mümkünse 2-3 damla şeklinde değdirilir (Şekil 3).
- Bir diğer lamın köşesi veya bir toplu iğne yardımıyla, kan damlası dairesel hareketlerle 1-1.5 cm çapında yayılır. Böylece kanın pıhtılaşmadan kuruması sağlanır (Şekil 4). Bu işlem esnasında ayrıca kan elemanlarının parçalanması ve içlerinde bulunan parazitlerin kan plazmasına çıkmaları sağlanır. Özellikle eritrositlerin çeperi kolayca parçalanır ve içlerinde bulunan *Plasmodium* spp gibi parazitler serbest hale geçer.
- Kalın damla preparatları **kesinlikle** fikse edilmez!



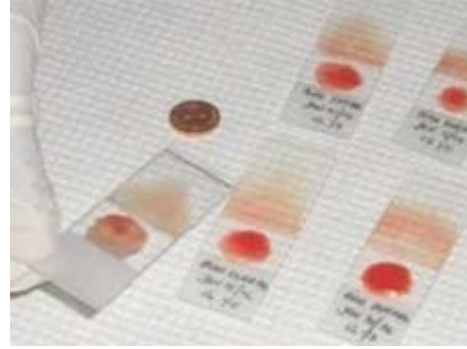
Şekil 3. Kalın damla için kan örneğinin lama aktarılması (11)



Şekil 4. Uygun hazırlanıp yayılmış bir kalın damla preparat (16)



Şekil 5. Aynı lam üzerinde ince yayma ve kalın damla preparatlarının hazırlanması



Şekil 6. Aynı lam üzerinde ince yayma ve kalın damla preparatları (11)

3.4. Aynı lam üzerinde kalın damla ve ince yayma hazırlanması

- Kalın damla ve ince yayma preparat bir lam üzerine birlikte hazırlanabilir. Bu yöntem, kapsamlı saha taramaları gibi durumlarda ekonomik olduğu kadar, hastanın örneğinin alınması, taşınması, saklanması, boyanması ve incelenmesinde bazı kolaylıklar da sağlayabildiği için tercih edilir.
- Şekil 5'de aynı lam üzerine kalın damla ve ince yayma hazırlanması adımları gösterilmektedir. Preparat bu şekilde hazırlanmış ise, iyice kurutulduktan sonra sadece ince yayma kısmı sabitlenir.
- İyi yapılmış bir preparatta kalın damlanın arkasına yerleştirilecek bir yazı rahatça okunabilmelidir (Şekil 6).
- Örneğin alınma zamanı hastanın kliniği ile senkronizasyon açısından hem lama hem de sonuç raporuna yazılı olmalıdır.

3.5. Hazırlanan yaymalar için sonraki işlemler

- Kalın damla düz zeminde tutularak kurutulmalıdır.
- Yaymaların kuruması için beklenirken kesinlikle sinek konmasına, aşırı ısınmasına ve güneş ışığına maruz kalmasına izin verilmemelidir.
- Eğer kalın damla preparatlar 48 saat içinde boyanmayacaklarsa distile su içerisinde bekletildikten sonra 27°C'nin altında tutulmalıdırlar. Bu işlem yapılmadığı takdirde kalın damla ısı nedeniyle tespit olacağı için hemoglobinin eritrositlerin içinde sabitlenir ve parazitlerin tanınması güçleşir.
- Lamların rodajlı kısmına çıkmaz (kuşun) kalemle örneğin alındığı tarih ve hasta bilgileri yazılmalıdır. İnce yayma üzerine kazıma yöntemi ile hasta bilgisinin -eskiden yapıldığı gibi- yazılması yöntemi artık önerilmemektedir!
- Kan veya kemik iliğinden yapılan yaymalar tespit edildikten sonra oda sıcaklığında laboratuvara ulaştırılır.

NOT: Hazırlanan yaymalar havada kurutulup, tespit edildikten sonra boyalı ya da boyasız olarak oda sıcaklığında bir süre (ör., taşıma süresince, birkaç gün) saklanabilirler.

- Eğer yayma yapma imkanı yoksa EDTA'lı venöz kan örneği en kısa sürede +4°C (en fazla 24 saat içinde) laboratuvara ulaştırılmalıdır.
ÖNEMLİ NOT: Sıtmada EDTA'lı kandan yayma eğer kan alındıktan sonraki 1 saatin içinde yapılmadıysa granüller görünmez hale gelebilir.
NOT: Eğer kan oda sıcaklığında ve kapağı açık olarak bekletildiyse, mikrogametositlerin makrogametositleri döllemesinden meydana gelen ookinet *P. falciparum*'un gametositleri ile karıştırılabilir.
- Lamlar bir lam kutusunda güvenli bir şekilde taşınmalıdır. Taşınırken lamların birbirleri ile teması önlenmelidir.
- Aspirasyon ve biyopsi örnekleri taze materyal olarak saklan(a)maz, uzak laboratuvara nakledilemez! 15-20 dk içinde kurumadan uygun besiyerine ekim yapılmalı ve yaymalar hazırlanmalıdır.
- Örnekler başka bir şehirdeki laboratuvara gönderilecekse, *paketleme* ve *taşıma* biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (17) (bkz. UMS GEN-ÖY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).

4 Preparatların kalitesinin değerlendirilmesi

4.1. Hazırlanan preparatın düzgün olup olmadığının değerlendirilmesi

- Kalın damla ve ince yayma preparatların düzgün bir şekilde hazırlanması tecrübenin yanı sıra dikkatli ve özenli çalışmayı gerektirir.
- Preparatların hazırlanmasında en sık yapılan hatalar Kutu-1'de özetlenmiştir.

- Preparatların düzgün hazırlanıp hazırlanmadığı başlıca 2 şekilde değerlendirilebilir:
 - (a) Birincisi, boyanmadan önce lam üzerinde yaymaların görünümüne bakılarak değerlendirmektir (*bkz.* Şekil 6 ve 7). Düzgün preparat hazırlanabilmesi için hatalı uygulamaların bilinmesi önemlidir; bu nedenle Şekil 7'de verilen hatalı preparat örneklerinin önceden incelenmiş olması önerilir.
 - (b) İkinci yol da, boyanmış preparatların mikroskopta incelenmesi sırasında hücrelerin yerleşimini ve dağılımını değerlendirmektir. Yayma düzgün hazırlanıp boyandığında eritrositler ayrı ayrı yerleşir ve soluk pembe renk alır. Aralarında lökositler ile trombositler koyu mor çekirdek ve pembe renkli sitoplazmalarıyla ayırt edilebilirler. İnce yayma preparatlarda sıtma parazitlerinde bulunabilen granüllerin de (Schüffner granülleri, Maurer tanecikleri) rahatlıkla ayırt edilmesi gerekir.

4.2. Kan yaymaları için kalite kontrol sistemi

- Kalın damla ve ince yayma preparatların düzgün bir şekilde hazırlanması için ayrıca iyi bir kalite kontrol sistemi de kurulmuş olmalıdır.
- Kalite kontrol çok önemlidir. Laboratuvar personeli tarafından kendi performansını kontrol etmek, sonuçların tekrarlanabilirliği ve tanı duyarlılığını sağlamak için yapılmalıdır. Kalite kontrol laboratuvar sorumlusunun sorumluluğundadır, ancak tüm personel dahil edilmelidir.
- Yüksek kalitede çalışma, mevcut ekipman ve reaktiflerin kalitesine doğrudan bağlıdır. Tüm ekipman ve malzemeler kabul görmüş standartlara (ulusal/uluslararası) uygun olmalıdır.

Kutu 1. Kan yaymaları hazırlanırken yapılan başlıca hatalar (16)

Kalın damla preparatlarda

- Hastanın ellerinin kirli olması
- Yayma sırasında kanın pıhtılaşması (yayarken yavaş davranma)
- Yaymanın gereğinden fazla kalın olması
- Yaymanın yeterince kurumaması, ıslak kalması
- Kurutmada uzun süre beklenmesi
- Kurutma sırasında ve sonrasında kanın tozlanması
- Yaymanın sıcakta kalması alkolle veya buharıyla temas etmesi

İnce yayma preparatlarda

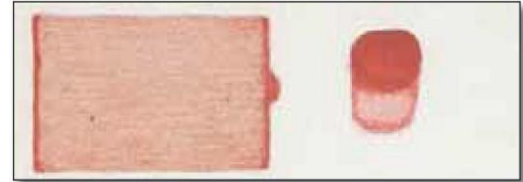
- Alınan kan damlası fazla büyük olursa, kan yayması lamın sonuna kadar gittiği halde yine de yeterli incelikte olmamaktadır.
- Yayma yapan lamın kenarları düzgün değilse, çentikli ise kan yayılırken lamın kenarı yayma yapılan lam üzerine tam temas etmezse, preparat düzgün olmaz.
- Yayma yaparken yavaş hareket edilirse, kan pıhtılaşacağından, yaymada yer yer kalın pıhtılar oluşur.
- Yayma yapılacak lam eski ise yüzeyi çizik ise yaymada boşluklar oluşur.

Hatalı yerleştirilmiş örnekler

Bu lamda ince yayma ve kalın damla yerleşimi hatalıdır. Kalın damla çok kenarda olduğundan; boyama veya diğer işlemler sırasında bazı parçaları silinebilir ve immersiyon objektifi altında incelenirken yeterli hareket imkanı bulunamaz.

**Fazla kan kullanılarak yapılmış preparat**

Böyle bir örnekte zemin rengi daha koyu mavi boyanır. İnce yaymada eritrositler üst üste geleceği için parazitlerin hücreye yerleşimi iyi ayırt edilemez.

**Az kan kullanılarak yapılmış preparat**

Böyle bir örnekte standart inceleme ve sayım için kan miktarı (taranacak alan miktarı) yetersiz kalacağı için sonuç olumsuz yönde etkilenir.

**Yağlı lam üzerine hazırlanmış preparat**

Yayma bölgesinde kan eşit dağılım göstermez ve kalın damla kısmından da boyama esnasında kopmalar olabilir. Böyle bir lamın mikroskopik incelemesi düzensiz dağılım nedeniyle güçtür.

**Kenarı düzgün olmayan (çentikli) lam ile yayılmış kan**

Yayma bölgesinde kan eşit dağılım göstermediğinden lamın mikroskopik incelemesi ve sayım güçtür.



Şekil 7. İnce yayma ve kalın damla preparatlar hazırlanırken en sık yapılan hatalar (11).

- Kalite kontrol için teknik hususlar aşağıda verilmiştir:

Donanım, reaktifler ve boyama kalitesi

- Güvenilir ve bakımı yapılmış mikroskop doğru sıtma mikroskopisinin temelidir. 10× oküler ve 100× objektif büyütmeli binoküler ışık mikroskobu 'altın standart'tır.
- Kırılma indeksi 1.5 olan immersiyon yağı yüksek kalitede olmalıdır.
- Sıtma mikroskopisi için sadece güvenilir bir sağlayıcıdan satın alınan, yüksek kaliteli, yüzeyi çiziksiz lamlar kullanılmalıdır.
- Kaliteli boyamanın önemi göz önüne alındığında Giemsa toz boyası güvenilir bir sağlayıcıdan satın alınmalıdır.

- Boyamada kritik değişkenlerden biri boya çözeltisi ve yıkama için kullanılan suyun pH'sıdır. Sıtma tanısı ile uğraşan laboratuvarlarda çok küçük değerler (ör., pH 7.0 ve 7.2) arasındaki farkı ayırt edebilme yeteneğinde bir pH metre mevcut olmalıdır. Küçük pH farklılıkları boya kalitesinde önemli farklılıklara neden olabilmektedir. pH kağıtları ile küçük pH artışlarını ölçmek mümkün değildir!

Parazitlerin saptanma ve tanınması

- Boyamanın kalitesini kontrol etmek amacıyla *her seferinde* bir ince ve bir kalın damla kan yayması boyanmalıdır. Lökositlerin çekirdek ve granüllerinin boyanması ve eğer varsa parazitlerin kromatinlerinin ve inklüzyonlarının boyanması; tampon kalitesini kontrol etmek için de eritrositlerin boyanması değerlendirilir.
- Boya kalitesinin kontrolü için kontrol suşlarını içeren örnek kullanmak zorunlu değildir; eğer yaymada lökositler iyi boyanmışsa sıtma parazitlerinin de iyi boyanacağı kabul edilir. Sıtma tanısının nadiren konulduğu laboratuvarlarda ise tanıya yol gösterici olarak kullanılmak üzere hem *P. falciparum* hem de *P. vivax* boyalı preparatların bulundurulması önerilir.
- Laboratuvarda pozitif bir örnek saptandığında, daha sonra pozitif kontrol olarak kullanmak üzere mümkün olduğu kadar çok preparat hazırlanmalı ve saklanmalıdır. Bu şekilde hazır, bilinen pozitif kontrol preparatlarından biri hasta numunesiyle birlikte boyanmalı, renk ve morfolojik özellikler için kontrol preparat incelenmelidir.

Laboratuvar personelinin standart prosedüre uyum performansı

- Haftada bir (ya da örnek akış hızına göre laboratuvar sorumlusunun belirlediği sıklıkta), haftanın karşılaşılan zor preparatları tüm personel tarafından ortak olarak incelenmelidir.
- Laboratuvar sorumlusu tarafından her bir personele verilen yaymalar yeniden veya personel arasında değişerek çapraz-kontrol ile incelenmelidir (2,11).

4.3. Kalite kontrol sisteminde Referans Laboratuvar ile işbirliği

- Zayıf pozitif ve negatif preparatlar uygun aralıklarla Referans merkeze dış değerlendirme için seçilip gönderilmelidir (2,11).
- Yaymalar veya örnekler Referans laboratuvara gönderilecekse, *paketleme* ve *taşıma* enfeksiyöz madde taşıma düzenlemelerine uygun olmalıdır (17).
- Buna göre; sabitlenmiş kan yaymaları ve filtre kağıdına emdirilmiş örneklerin "Muaf" şeklinde, tüpte kan ve diğer klinik örneklerin de "Biyolojik madde, Kategori B" şeklinde sınıflanmış olduklarına dikkat edilmeli ve paketleme şartları bu kategoriler için önerildiği gibi yerine getirilmelidir.
- Kategorilerin her biri için gerekli açıklamalar "UMS, GEN-ÖY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi"nde verilmiş olup incelenmesi önerilir.

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Kan yaymalarının kalitesi teknisyenin tecrübesi ve boyanın kalitesiyle doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle Şekil 7'de gösterilen hatalı yaymalardan kaçınılması için düzenli eğitime ve kullanılacak Giemsa boyasının taze olmasına önem verilmelidir.
- *Plasmodium* spp araştırılması için hazırlanan ince yayma preparatlar ile parazitlerin morfolojisi ayrıntılı olarak incelenebilir, ancak inceleme yapılan saha sınırlı olduğu için tek bir inceleme ile sonuç verilmemelidir.
- Kalın damla preparatlar ile parazitlerin morfolojisini değerlendirmek güçtür, ancak ince yaymaya göre birkaç kat daha fazla örnek taranabildiğinden **her hasta için** kalın damla incelemesi yapılmalıdır.
- Tanı şansını artırmak için bir hastadan -olabildiğince- birden fazla yayma hazırlanmalıdır; biri boyanırken diğerleri yedek olarak saklanır.
- Sıtma araştırmalarında aynı lam üzerine hazırlanacak ince yayma ve kalın damla preparatların beraberce incelenmesi büyük yarar sağlamaktadır. Ancak, kalın damla preparatların aynı lam üzerindeki ince yayma preparatlara göre daha geç kuruyacağı unutulmamalı ve boyama işlemi öncesi tüm lamın tam anlamıyla kurumaması beklenmelidir. Ayrıca alkol ile tespiti ve boyanması hususlarına ayrı ayrı dikkat edilmelidir.
- *Leishmania* spp tür düzeyinde mikroskopi ile ayırt edilemez. Hastanın kliniği yol gösterici olsa da kesin tür ayrımı için moleküler yöntemler kullanılır (18,19).

6 Referans Laboratuvar

Adres

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal Parazitoloji Referans Merkez Laboratuvarı
"Ulusal Sıtma Referans Laboratuvarı"
Refik Saydam Yerleşkesi,
Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55,
06100 - Sıhhiye/ANKARA

Tel: 0 312 565 5571

e-posta: parazitoloji@thsk.gov.tr; www.thsk.gov.tr

Görev çerçevesi

Kontrol programı kapsamında klinik örneklerden tanı, doğrulama veya moleküler tiplendirmelerin yapılması; sörveyans çalışmaları yürütülmesi; bölgesel/yerel laboratuvarlara dış kalite örneklerinin hazırlanması; kalite kontrol programının yürütülmesi.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Kalın damla ve ince yayma) ayrıca aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve ilave bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

UMS, P-TP-01	Mikroskop kalibrasyonu (oküler mikrometre ile)
UMS, P-TP-06	Giemsa boyama
UMS, P-ÖY-03	Kan ve kemik iliği örneklerinin parazitolojik incelemesi
UMS, P-MT-06	Sıtmanın mikrobiyolojik tanısı
UMS, P-MT-04	Kala-azarın mikrobiyolojik tanısı
UMS, P-MT-05	Şark çıbanının mikrobiyolojik tanısı
UMS, P-MT-08	Toksoplazmozun mikrobiyolojik tanısı
UMS, GEN-OY-01	Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 WHO. Guidelines for the treatment of malaria. Global Malaria Programme, Switzerland. WHO/HTM/MAL/2006.1108, 2006.
- 2 WHO. Malaria microscopy quality assurance manual. Version 1. February 2009.
- 3 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 4 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 5 T.C. Sağlık Bakanlığı (Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi TR0802.16-01 Avrupa Birliği ve Dünya Bankası desteği ile) (Akbaş E, Pr Danışmanı). Türkiye’de Bulaşıcı Hastalıkların Tanısında Mikrobiyoloji Laboratuvar Kapasitesi Mevcut Durum Değerlendirmesi: Anket - LabKap2012. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kuşadası, 4 Kasım 2012.
- 6 Özbilgin A, Östan İ, Kurt Ö, Balcıoğlu İC. In: Korkmaz M, Ok ÜZ (eds). Kan incelemeleri. *Parazitolojide Laboratuvar*. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, Meta Basım, İzmir. 2011, p. 9-23
- 7 Shimizu RY, Grimm F, Garcia LS, Deplazes P. Specimen collection, transport, and processing: Parasitology. In: Versalovic J (ed in chief). *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 2047-2063
- 8 Ash LR, Orihel TC. Examination of Blood. In: Ash LR, Orihel TC (eds). *Parasites, a guide to laboratory procedures and identification*. ASCP Press, Chicago. 1987, p.99-116
- 9 Garcia LS, Bruckner DA. Procedures for detecting blood parasites. In: Garcia LS, Bruckner DA (eds). *Diagnostic Medical Parasitology*. 2nd ed, ASM Press, Washington D.C. 1993, p. 584-95
- 10 Rogers WO. *Plasmodium and Babesia*. In: Versalovic J (ed in chief). *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 2091-2112
- 11 WHO. Basic Malaria Microscopy. Part 1: Learner’s guide. Second edition, Switzerland, 2010.
http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547826_eng.pdf (son erişim tarihi: 18.12.2013).

- 12 CDC. Laboratory diagnosis of malaria: Staining for malaria parasites. Laboratory identification of parasites of public health concern. DPDx. http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/PDF_Files/malaria_staining_benchaid.pdf (son erişim tarihi: 17.11.2013)
- 13 WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf (son erişim tarihi: 30.01.2014)
- 14 Garcia LS. Giemsa stain. http://www.med-chem.com/pages/lab_procedures/pdf/giemsa_blood_stain.pdf (son erişim tarihi: 17.11.2013)
- 15 Bullock-Iacullo S. Preparation of thin blood films. *In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.8.2.1 - 9.8.2.2*
- 16 Ergüven S. A-16 Sıtma. Bildirimi Zorunlu Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısına Yönelik Standart Uygulama Prosedürleri. Laboratuvar Eğitim Kitabı. Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Ankara. 2008, p. 5-20
- 17 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.
- 18 Özbek Y, Töz SÖ. Parazitolojide Laboratuvar. *In: Korkmaz M, Ok ÜZ (eds). Leishmaniasis. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, Meta Basım, İzmir. 2011, p. 307-320*
- 19 Cota GF, de Sousa MR, Demarqui FN, Rabello A. The diagnostic accuracy of serologic and molecular methods for detecting visceral leishmaniasis in HIV infected patients: meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6(5):e1665



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

HIV Enfeksiyonunun (Human Immunodeficiency Virus) Mikrobiyolojik Tanısı

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Viroloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	V-MT-02
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik
----------	-------	------------

--	--	--

--	--	--

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	4
Hastalığın önemi.....	4
Mikroorganizmanın özellikleri.....	4
Klinik özellikler.....	5
Mikrobiyolojik tanı	5
TEKNİK BİLGİLER	9
1 Hedef mikroorganizmalar	9
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	9
3 HIV tanısında kullanılan teknikler	11
4 Saklama, Referans merkeze gönderme	16
5 Sonuçların yorumu, raporlama ve bildirim	17
6 HIV/AIDS Doğrulama Merkezleri	17
KAYNAKLAR.....	18

Kapsam ve Amaç

'Human immunodeficiency virus' (HIV), Bağışıklık Yetmezlik Sendromu-'Acquired immunodeficiency syndrom' (AIDS) etkenidir. HIV iki major viral türe sahiptir: HIV tip 1 (HIV-1) ve HIV tip 2 (HIV-2). Tüm dünyada yaygın bulunan, AIDS pandemisinde sorumlu olan HIV-1'dir. HIV-2, Batı Afrika'da ve buraya seyahat öyküsü olanlarda saptanmaktadır (1).

Tanı laboratuvara dayanır ve HIV ile enfekte kişilerin hem immünolojik hem de virolojik açıdan değerlendirilmeleri gereklidir. Günümüzde kesin doğru tanıya gereksinimin yanı sıra, erken tanıya, tanı konduktan sonra hastalığın ilerlemesi ile ilgili bilgi verecek ve farklı tedavi stratejilerinin etkinliğini tayin edecek hasta takibine de ihtiyaç vardır. 15-18 aydan küçük çocuklarda HIV enfeksiyonu tanısında, anneden geçen özgül HIV antikorları uzun süre bebeğin serumunda saptandığı için, antikor tarama testlerinin yeri yoktur. 15-18 aydan büyüklerde ise; tanıda serolojik testler (tarama testleri, hızlı testler, doğrulama testleri), tedaviyi izlemede HIV RNA ve DNA testleri, direnç gelişimini tayinde de genotipik ve fenotipik antiviral duyarlılık testleri kullanılır (1,2).

Ülkemizde HIV enfeksiyonunun bildirim zorunludur (3,4). Sağlık Bakanlığınca 2012 yılında ulusal mikrobiyoloji laboratuvar kapasitesinin mevcut durumunun incelendiği bir çalışmanın sonuçlarına göre, ülkemizdeki laboratuvarların bildirim zorunlu hastalıklar arasından en fazla HIV'nin tanısı ile uğraştığı görülmektedir.* Son bir yıl içinde bu laboratuvarlarda HIV için toplam 3.5 milyonun üzerinde örnek test edildiği de öğrenilmektedir (5). Kapasitenin büyüklüğü, HIV tanısı için geçerli testlerin seçimi, doğru ve güvenilir sonuçların elde edilmesi ve yorumunun laboratuvarların büyük çoğunluğunu yakından ilgilendirdiğini göstermektedir.

Bu UMS belgesi, HIV enfeksiyonunun 'kesin tanısı' için geçerli yöntemlere dair prosedürleri kapsamaktadır. Belgenin amacı, 15-18 aydan küçük bebek ve daha büyük çocuk ve erişkinlerde enfeksiyonun farklı evrelerinde doğru ve güvenilir sonuçların elde edilebilmesi için, yöntemlerin seçimi ile tanı ve izlemdeki yerinin değerlendirilmesi ve doğru uygulanmalarında kullanılacak bir prosedür vermektir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

CYBH	Cinsel yolla bulaşan hastalıklar
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
LIA	Line immunoassay
UNAIDS	Birleşmiş Milletler HIV/AIDS Ortak Programı (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS). 1996'da AIDS ile mücadele için kurulmuş bir program olup dünyada bir hastalığa karşı kurulmuş olan en büyük dayanışma örgütlenmesi niteliğindedir.
WB	Western blot

* HIV tanı testleri laboratuvarların (n=530) %83.2'sinde yapılmaktadır. Uygulanan testlere göre dağılım; bunların %13.4'ünde hızlı testlerin, %73.9'unda da hızlı testler ve/veya EIA kullanıldığını göstermektedir (5).

Genel Bilgi

Hastalığın önemi

İlk kez klinik bir tablo olarak 1981 yılında San Francisco'da yaşayan eşcinsel erkeklerde tanımlanan AIDS'in etkeni HIV'dir. HIV-1 tüm dünyadaki HIV pandemisinde esas sorumlu olan tiptir. HIV-2 daha az patojendir ve daha sınırlı bir alanda özellikle Afrika'da görülür.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün 2012 yılı sonu verilerine göre yaklaşık 35.3 milyon kişi HIV/AIDS ile yaşamaktadır. 2001 yılında 3.4 milyon kişi yeni enfekte olurken; 2012 yılında yeni enfekte kişi sayısı %33 azalarak 2.3 milyona düşmüştür.

Ülkemizde ilk AIDS vakası 1985 yılında bildirilmiştir. 2013 Haziran sonuna kadar bildirilen HIV/AIDS vakası sayısı 6802'dir. HIV/AIDS vakalarının %39.4'ünde olası bulaş yolu saptanamamıştır; %46.1'inde heteroseksüel ilişki, %9.9'unda eşcinsel/biseksüel cinsel ilişki ve %1.9'unda damar içi madde kullanımı söz konusudur. Nozokomiyal bulaş oranı %1.6 ve enfekte anneden bebeğe geçiş oranı ise %1.1'dir. Bildirilen olgu sayısında dikkati çeken bir artış ile 2012 yılı için HIV/AIDS vaka sayısı 1024'e ulaşmıştır. Haziran 2013 sonu itibariyle bildirilen enfekte kişi sayısı ise 587'dir. Gerçek rakamların bu rakamların üzerinde olduğu tahmin edilmektedir.

UNAIDS'in 2012 raporuna göre alınan önlemlerle farkındalık artışına paralel olarak 13'ü Sahra altı Afrika'sında olmak üzere Birleşmiş Milletlere üye 25 ülkede yeni enfeksiyon oranı %50 azalmış durumdadır. 2011 Birleşmiş Milletler deklarasyonunda hedeflenen sıfır yeni enfeksiyon amacına 2015 yılında ulaşmak için harcanan emek, bazı ülkelerde sonuçlarını bu şekilde vermektedir. Ancak Orta Doğu, Kuzey Afrika, Doğu Avrupa ve Orta Asya'da yeni enfeksiyon sayısı artmaktadır (6,7).

Mikroorganizmanın özellikleri

Human immunodeficiency virus (HIV), 'Acquired immunodeficiency syndrom' (AIDS) etkenidir. HIV iki majör viral türe sahiptir: HIV tip 1(HIV-1) ve HIV tip 2 (HIV-2). Tüm dünyada yaygın bulunan AIDS pandemisinde sorumlu olan HIV-1'dir. HIV-2 Batı Afrika'da ve buraya seyahat öyküsü olanlarda saptanmaktadır.

Mutasyon ve rekombinasyon eğilimi nedeni ile HIV, genetik değişken bir virüsdür ve genetik gruplara ayrılır. HIV-1 dört genetik gruba ayrılmıştır. M (majör), O (dışında kalan), N (ne M ne O) ve P grubu. M grubu da alttiplere ayrılmıştır. 1980'li yıllarda Kuzey Amerika ve Avrupa'daki ilk epidemide Majör grup HIV-1'in B alttipine aittir. Diğer genotipler dünyanın farklı bölgelerinde bölgesine özgü sıklıkla artmaktadır.

Bazı HIV-1 viral izolatları da birden fazla alttipten sekans içeren rekombinan genotipik yapıdadır. Bunlara 'circulating recombinant form' (CRF) denmektedir. HIV-1'in genetik değişkenliği, HIV enfeksiyonu tanısında ve izlenmesinde kullanılan testlerinin geliştirilmesinde önem taşır (1,2).

Klinik özellikler

HIV-1 enfeksiyonu başlıca üç dönemde incelenebilir: geçici akut retroviral sendrom, klinik olarak latent asemptomatik dönem ve AIDS'e ilerleme dönemi. Akut retroviral sendrom dönemi, primer enfeksiyonu takiben 3 ila 6 haftada oluşan genellikle 7-14 gün süren ve yeni enfekte olan kişilerin %40-80'inde görülen geçici semptomatik bir dönemdir: ateş, makulopapüler döküntü, oral ülser, lenfadenopati, yorgunluk, kilo kaybı, farenjit ve/veya gece terlemelerinin görülebileceği mononükleoz benzeri bir tabloya, yüksek düzeyde, bu dönemde gerçekleşen HIV-1 replikasyonu ve virüse karşı gelişen özgül bağışık yanıt eşlik eder.

Akut HIV-1 enfeksiyonu belirtiler özgül olmadığından dolayı kolay atlanabilir. Bu dönemin laboratuvar tanısı özellik taşır; çünkü ELISA testi hemen reaktif saptanmayabilir ya da zayıf ELISA reaktivitesi Western blot testi ile bu dönemde doğrulanmayabilir. Bu dönemi önemli kılan kişinin HIV bulaşı açısından riskli davranışta bulunma olasılığıdır; dikkatle sorgulanmaz ve testler bir süre sonra tekrarlanmazsa veya gerektiğinde HIV-RNA araştırılmazsa gözden kaçabilir.

Primer HIV-1 enfeksiyonunu takiben uzun süreli klinik (ortalama 10 yıl) latent dönem gelişir. Bu sessiz dönemde de virüs replikasyonu devam etmekle birlikte replikasyon düzeyi sabit kalır. Plazma ve lenfoid dokuda yüksek titrede HIV bulunur. Virüsün kısmen kontrol altına alındığı latent dönemin uzunluğu konağın hücresel bağışık yanıtına bağlı olarak değişir.

Enfeksiyondan sonra 5-8 yıl içinde semptomatik safha gelişmesine rağmen özellikle virülan suşlarla enfeksiyon sonucu asemptomatik safhanın kısa sürdüğü olgular vardır. 'Longterm survivors' (LTS) diye adlandırılan bazı kişilerde bu süre en az 18 yıl sürmüştür. Bu kişilerin viral yükü düşüktür. Enfekte kişiden izole edilen virüsler nispeten nonsitopatiktir ve kanda çok yavaş çoğalır. CD8+ hücre antiviral cevabı güçlüdür.

Son dönem AIDS'tir. Uzun yıllar HIV proteinlerinin sürekli sentez edilmesi, enfekte olan hücrelerde viral replikasyonun devam etmesi ve ardından enfekte konak hücrenin eliminasyonu nedeniyle bağışıklık sistemi harap olur. Fırsatçı enfeksiyonlar ve tümörlerle karakterize olan klinik tablo, AIDS, gelişir. Tedavi edilmeyen kişilerde AIDS'in gelişme süresi ortalama 10-11 yıldır. "Rapid progressor" denilen grubun %5-10'unda enfeksiyondan sonra 2-3 yıl içinde AIDS gelişir. Enfekte kişilerin %5-10'u "Nonprogressor" olarak adlandırılır. Bu grupta 7-10 yıl semptomlar görülmez (1,8,9)

Mikrobiyolojik tanı

HIV tanısında yaklaşım ve stratejiler

Erken tanı ve buna bağlı olarak erken tedavinin, HIV enfeksiyonunun sonlanımları üzerinde olumlu etkilerinin olduğu pek çok çalışmada gösterilmiştir. Erken tanı ölüm oranlarını azaltmakta, yaşam beklentisini uzatmakta ve bulaşma oranlarını düşürmektedir. Bunun için hem DSÖ, hem de European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) HIV taşıyıcılarının olabildiğince erken tespitinin teşvik edilmesini ve bunu sağlayıcı düzenlemelerin yapılmasını önermektedirler.

Her ülke, risk gruplarını, kaynaklarını ve HIV prevalansını gözeterek bir ulusal tarama stratejisi belirlemektedir. Özellikle yeni kuşak ELISA testleri ile yabancı pozitifliklerin azalması da *testlerin herkese önerilmesi* yaklaşımının benimsenmesinde etken olmuştur.

CDC "opt-out" adı verilen bir tarama stratejisi önermektedir (10). Strateji, sağlık kuruluşlarına başvuran herkese test önerilmesi ve hasta reddetmezse testin yapılması şeklindedir. Bu yaklaşımda hastanın bilgi edinme isteğinin karşılanması zorunluluğu bulunmakla birlikte, eskiden olduğu gibi bilgilendirme sonrası onam formu gerekmemektedir. Bilgilendirme sözlü ya da yazılı olarak yapılabilir.

DSÖ de önerilerini 2007 yılında kaynakları kısıtlı olan bölgeler dahil olmak üzere testlerin yaygınlaştırılması doğrultusunda değiştirmiştir. Buna göre, test sürecinin kişiler tarafından değil, sağlık görevlileri tarafından başlatılması önerilmektedir.

DSÖ'nün stratejisi ayrıca; (i) özellikle HIV enfeksiyonu ile uyumlu semptomlarla başvuran hastalara, (ii) endemik bölgelerde *herkese*, ve (iii) düşük endemik bölgelerinde ise riskli bireylerin başvurduğu sağlık birimlerine (tüberküloz, CYBH poliklinikleri vb.) başvuran *herkese* test önerilmesini getirmektedir. Bazı risk gruplarında yer alan kişilerin yıllık ya da daha sık aralıklarla test yaptırmaları önerilmektedir. Risk grupları; damar içi ilaç bağımlıları ve eşleri, para ya da yasadışı ilaç karşılığı seks yapanlar, erkeklerle cinsel ilişkiye giren erkekler, HIV ile enfekte kişilerin eşleri, kendileri ya da eşleri son HIV testinden bu yana başka kişilerle cinsel ilişkiye girmiş olan heteroseksüeller şeklinde sıralanabilir (1,2,8,10).

HIV'in ülkedeki epidemiyolojisinin anlaşılması için testler kritik öneme sahiptir. Testler, bulaşmanın önüne geçilmesinde en önemli araçlardan biridir. Test endikasyonları için bir liste Kutu-1'de verilmektedir. HIV testi önerilirken dikkat edilmesi gereken hususlar da Kutu-2'de özetlenmiştir.

Kutu 1. HIV testlerinin yapılması için endikasyonlar

- Erkekler arasında korumasız cinsel ilişki
- Damar içi ilaç bağımlılığı ve ortak enjektör kullanımı
- HIV pozitif kişinin partneri olmak
- HIV prevalansı yüksek olan bir ülkeden olmak
- HIV prevalansının yüksek olduğu bölgelere seyahat etmiş ya da orada yaşamış olmak
- Temas öyküsü
- Gebeler (mümkün olduğunca erken dönemde)
- Cinsel saldırıya maruz kalma
- Evlilik öncesi (gönüllülük esasına dayanmalı)
- Tüberküloz veya cinsel yolla bulaşan enfeksiyon tanısı
- Kişinin isteği

Kutu 2. HIV testi yapılırken dikkat edilmesi gereken konular

- Kişinin onayı alınmalıdır.
- Gizlilik ve gönüllük esasına dayanmalıdır.
- En yüksek standartta testler uygulanmalıdır
- Test yapılan kişinin yararı güdülmelidir.
- Testler risk altındaki herkese açık ve ulaşılabilir olmalıdır.
- HIV enfeksiyonu tanısı konan kişilerin partnerlerinin bilgilendirilmesi ve test yaptırmaları için enfekte kişi bilgilendirilmelidir.
- HIV enfeksiyonu tanısı konan kişilerin tıbbi bakım altına girmesini sağlayacak ya da kolaylaştırılacak önlemler alınmalıdır

HIV tanısında kullanılan testler

HIV enfeksiyonunun laboratuvar tanısında kullanılan testleri başlıca dört grupta toplamak mümkündür (11,12,13,14,15,16):

- 1 HIV'a karşı özgül antikorların gösterilmesi
- 2 HIV antijeninin tayini
- 3 Hücre kültüründe virüs izolasyonu
- 4 HIV'in nükleik asidinin gösterilmesi

Halen HIV enfeksiyonunun rutin tanısı, 18 aydan büyüklerde virüse özgü antikorların gösterilmesi ile koyulmaktadır. Bu antikorlar HIV ile enfekte kişilerin %100'ünde bulunmaktadır. HIV ile enfekte oldukları halde tayin edilebilir özgül antikor taşımayan kişiler son derece nadirdir ve şu ana kadar bu durumun klinik olarak pratikte önem taşımadığı bildirilmektedir.

Antikorların gösterilmesine dayanan indirekt tanının yanı sıra HIV ile enfeksiyonun tanısında bazı özel durumlarda virüsün direkt olarak gösterilmesi gerekebilir. Bu amaçla nükleik asit testi (NAT) hem pratik hem de duyarlılığı nedeni ile tercih edilmektedir. Ayrıca NAT ile HIV genomunun kantitasyonu da mümkündür (13,15,16).

Serolojik tanıda yaklaşım

1983-1984 yıllarında HIV tip 1'in izolasyonunun ilk kez bildirilmesini takiben 1985 yılında HIV-1'e karşı oluşmuş antikorları kanda saptayan ilk ticari kitler kullanıma girmiştir. HIV antikorlarının tayininde kullanılan serolojik yöntemler iki grupta toplanır: **tarama** (ilk aşama) testleri ve **doğrulama** (destekleyici) testleri.

Tarama testleri, antikor pozitif olan serumların tahminine, doğrulama testleri ise tarama testleri ile reaktif bulunan serumların gerçekten HIV antikorunu taşıyıp taşımadığının tayinine yarar. Tarama testleri ile pozitif sonuç alındığında '**reaktif**' sonuç elde edildi denir, doğrulama testi de pozitif sonuç verirse '**pozitif**' olarak adlandırılırlar.

Tarama testleri

Günümüzde başlangıç testi olarak ELISA (EIA) kullanılmaktadır. HIV-1 ve HIV-2 antikorlarını ve p24 antijeni tayin eden dördüncü jenerasyon kitler tercih edilmektedir.

ELISA kitlerinin özgüllük ve duyarlılıkları çok yüksektir. Ancak çeşitli nedenlere bağlı yalancı pozitiflik ve negatiflikler görülebilir. Özellikle örnek henüz serumda antikorlar oluşmadan önce alındıysa (pencere döneminde) malignite, yoğun ve uzun süreli immünespresif tedavi, replasman transfüzyonu, kemik iliği transplantasyonu ve B hücre disfonksiyonu söz konusu ise, ve romatoid faktör pozitifliğinde kompetitif ELISA ile yalancı negatiflik elde edilebilir.

Cameroon'dan yeni tanımlanan bir alttip o dönem mevcut bazı ELISA'lar ile negatif sonuç verince yeni piyasaya çıkan kitlerin bunu saptayacak duyarlılıkta olması amaçlanmıştır. Deney sırasında yapılan sulandırma, yıkama gibi teknik hatalar sonuçları etkiler. Ayrıca düz kas, mitokondrial, çekirdek, lökosit ve T-hücre antijenlerine karşı (HLA-DR4, DQW3) antikor varlığı (özellikle çok doğum yapmış kadınlarda, sık transfüzyon yapılanlarda), primer biliyer siroz, sklerozan kolanjit, serumun ısı ile inaktivasyonu, RPR pozitifliği, renal transplantasyon,

kronik renal yetersizlik, Stevens- Johnson sendromu, anti-HAV IgM, anti-HBc IgM pozitifliği, hematolojik malignite, lenfoma, DNA virüsleri ile akut enfeksiyonlar, influenza aşılması, kronik böbrek yetersizliği ve otoimmün hastalıklarda yabancı pozitiflik saptanabilir.

Prevalansın düşük olduğu ülkelerde bir ilk aşama testi ile pozitif sonuç elde edildiği zaman, o kişinin gerçekten enfekte olma şansı çok düşüktür. Özgüllüğü yüksek olan bir test kullanıldığı durumda bile bu problem söz konusudur. Doğru sonuç elde etme olasılığı, ilk aşama testi ile pozitif bulunan tüm örneklerin bir **doğrulama** testiyle incelenmesiyle artar. Doğrulama testi ile negatif bulunanlar negatif kabul edilir. Ancak doğrulama testinin yöntem gereği ilk aşama testlerine kıyasla daha az duyarlı ve daha özgül olduğu unutulmamalı ve reaktif EIA ve negatif doğrulama testinin riskli bir kişide erken dönemin göstergesi olabileceği ihtimali de akılda tutulmalıdır.

Hızlı testlerin tanıda yeri

Hızlı HIV tarama testlerinin, özellikle HIV-1+2 antikor ve p24 antijenini içeren hızlı "combo" testlerin duyarlılık ve özgüllükleri ELISA testlerine yaklaşmaktadır. Hızlı testlerin aynı gün içinde sonuç vermesinden dolayı test yaptıracak kişiler tarafından kabul edilmeleri daha kolay olmaktadır. Bu gibi testlerin, özellikle damgalanmak korkusu ile test yaptırmaktan kaçınan riskli davranışlı bireylerin test yaptırmayı kabul etmelerini kolaylaştırdığı bildirilmektedir.

Anonim olarak test yapılan sentinel test merkezlerinin yanı sıra acil servisler, CYBH poliklinikleri ve antenatal polikliniklerinde bu tarz testlerin kullanımının yaygınlaştırılması hem DSÖ hem de ECDC tarafından teşvik edilmektedir.

Ülkemizde hızlı testlerin kullanımına ilişkin bir düzenleme yoktur. Bu tarz kitlerin kullanılması belli koşullarda ve belli kurumlarda belirli düzenlemeler yapıldığında önerilebilir. Böyle bir öneride bulunulacaksa, bunlara ilişkin ayrı bir algoritmanın hazırlanması ve bu iş için uygun olan kitlerin referans merkezleri tarafından onaylanması gerekecektir.

Hızlı test sonucu ne olursa olsun her koşulda mümkün olan en kısa sürede hastalara dördüncü kuşak ELISA ile test yapılmalıdır. Bu testlerin kalite kontrol kurallarına dikkat edilerek laboratuvarında deneyimli personel tarafından çalışılması ve duyarlılıklarının EIA'lar kadar yüksek olmadığı akılda tutulmalıdır (1,2,11,12,15).

Tarama ve tanıda kullanılmak üzere önerilen algoritmalar

HIV enfeksiyonlarının akut döneminde gerek viral yükün yüksek oluşu gerekse bu dönemde viral kökenlerin enfeksiyözitesinin yüksek oluşu bulaşmaların önemli bir kısmının bu dönemde gerçekleşmesi ile sonuçlanmaktadır. Test teknolojilerindeki gelişmeler HIV enfeksiyonunun daha erken dönemde saptanmasını olanaklı kılmıştır. Erken tanı ve tıbbi bakım altına girme ile birlikte hem kişilerin riskli davranış kalıplarında olumlu yönde değişiklikler olması, hem de yaşam beklenti sürelerinin artması HIV enfeksiyonlarının erken dönemde fark edilmesinin önemini artırmaktadır. Bu nedenlerle yakın zamanlarda geliştirilen HIV test algoritmalarında değişikliklere gidilmektedir.

18 aylıktan büyük bebek, çocuk, büyükler ve 18 aylıktan küçük bebekler için iki farklı algoritma önerilmiştir (bkz. Şekil 1 ve Şekil 2).

Doğrulama merkezleri

Dördüncü kuşak ELISA testinin reaktif bulunması halinde doğrulama işleminde merkezin olanaklarına göre Western blot (WB) ya da line immunoassay (LIA) gibi antikora dayalı testler ya da özellikle akut HIV enfeksiyonu kuşkusu olan durumlarda HIV-1 RNA'yı saptamaya yönelik olarak nükleik asit temelli testler kullanılabilir. Ancak şu an için doğrulama amaçlı kullanım onayı almış kit sayısı kısıtlıdır (12,15,17,18).

Bu amaçla antiretroviral tedavinin izlenmesi için onaylanmış kitler kullanılabilir. Fakat bu kitler ile elde edilebilecek pozitif sonuçların yorumunda dikkatli olunmalıdır (17). Bu bağlamda, 10000 kopya/mL'den düşük pozitiflikler kesin pozitif olarak yorumlanmamalı, böyle durumlarda ikinci bir örnek ile elde edilecek bir pozitif sonuç ya da tekrarlanan antikora dayalı testler ile pozitiflik doğrulanmalıdır.

Ayrıca, HIV ile enfekte kişilerin %3-4'ünde HIV RNA negatif olabileceğinden, tarama amaçlı antikör testleri pozitif olduğu halde nükleik asit temelli doğrulama testi negatif olabilir. Böyle bir durumdan kuşulanılıyorsa, antikora dayalı doğrulama testleri tercih edilmeli ya da doğrulama aşaması antikora dayalı testler ile tekrarlanmalıdır.

Doğrulama aşamasında antikora dayalı doğrulama testleri ile kesin sonuç alınamazsa, doğrulama için nükleik asit temelli testlere geçilebilir. Yine kesin bir sonuç alınamazsa ya da nükleik asit testleri olanağı yoksa dördüncü kuşak ELISA testi 10 gün-1 ay içinde tekrar edilebilir (1,2,12,15,17).

(NOT: Ülkemizdeki Doğrulama Merkezlerinin bir listesi sayfa 17'de verilmiştir).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizmalar

Human Immundeficiency Virus tip 1 ve 2 (HIV-1 ve HIV-2)

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

HIV kan ve kan ürünleri ile bulaşma sonucu ciddi sonuçlar doğurma potansiyeli '*en yüksek*' bir patojendir. Bütün sağlık çalışanları, özel olarak da laboratuvar çalışanları risk altındadır. *İster* HIV tanısı amacıyla incelenecek örnekler olsun, *isterse* başka nedenlerle incelenmek üzere laboratuvara gelmiş kan, serum veya diğer klinik örnekler olsun potansiyel HIV bulaş riski nedeniyle daima standart güvenlik önlemleri uygulanmalı; kan alma, serum/plazma ayırma işlemleri ve testlerin uygulanması sırasında kesinlikle **eldiven** giyilmelidir.

HIV risk grubu 2 mikroorganizmadır ve tanısı ile ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Laboratuvarda çalışırken **kesici-delici** önlemlerine yüksek uyum sağlanmalıdır!

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) yöntem(ler)i uygulamadan önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleri ile aşina olmalı ve (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Hem güvenlik önlemlerine uyumun sağlanmasından hem de testlerin standart prosedürlere uygun yapılmasından ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, Reaktif, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

HIV tanısı için örnek alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden edinilebilir. Aşağıda bazı önemli hususlara tekrar dikkat çekilmektedir:

- **HIV antikor-antijen testleri için** – rutin kullanılan örnek serumdur. Plazma da kabul edilebilir örnektir. Serum/plazma örneği kan alımını takiben 15-20 dakika bekledikten sonra pıhtı ve hücresel elemanlardan ayrılmalı ve 2-8°C de saklanmalıdır. Test 7 gün içinde yapılmayacaksa örnek -20°C veya daha düşük ısıda saklanmalıdır.
- **HIV moleküler testleri için** – plazma tercih edilir. **RNA tayininde** degradasyonu önlemek için plazma örneğinin toplanması, saklanması ve *özelikle* taşınması uygun şartlarda yapılmalıdır. **RNA kantitasyonu** için örnek toplama ve plazma ayırma işlemlerinde kullanılan ticari kitin gereklilikleri mutlaka yerine getirmeli; plazma kullanılan kite uygun bir şekilde ayrılmalıdır. Zaman içinde değişiklik yapılacaksa yeni örnek toplama yöntemi için bir başlangıç HIV RNA düzeyi belirlenmelidir. Plazma için EDTA veya ACD içeren tüplere kan alınır. Jelli plazma ayırıcı ticari tüpler de kullanıma girmiştir. Plazma ayırma işlemi, 6 saat içinde moleküler testler için uygun malzeme (eldiven, steril filtreli-pipet ucu, nükleaz içermeyen tüp vb.) ve şartlar sağlanarak yapılmalı; örnek 48 saat içinde teste alınamayacaksa -70°C'ye kaldırılmalı, kuru buzda laboratuvara gönderilmelidir.

Diğer gereç, donanım

- ELISA donanımı
- RT-PCR donanımı

2.4. Kalite kontrol

- HIV serolojik ve moleküler test uygulayan laboratuvarların 12 başlıklı[†] "kalite yönetim sistemi"ni takip eden, iyi işleyen bir kalite yönetim programı olmalıdır.
- Tanı için kullanılan tüm testlerin "validasyon" ve "verifikasyonları" yapılmış olmalıdır. Serolojik her çalışmada "iç kalite kontrolü" için sonucu önceden bilinen standart serum örnekleri kullanılmalıdır.

[†] Başlıklar: organizasyon, personel, donanım, malzeme alım ve stok yönetimi, süreç kontrolü, bilgi yönetimi, dokümantasyon, uygunsuzluk yönetimi, değerlendirme, süreç geliştirme, müşteri hizmetleri, tesis ve güvenlik

- Laboratuvar dış kalite kontrol (DKK) çalışmasına katılıyor olmalıdır. DKK programları yoksa aynı testleri aynı yöntemlerle yapan en az bir laboratuvarla karşılaştırma yapılarak dış kalite kontrolü sağlanmalıdır.

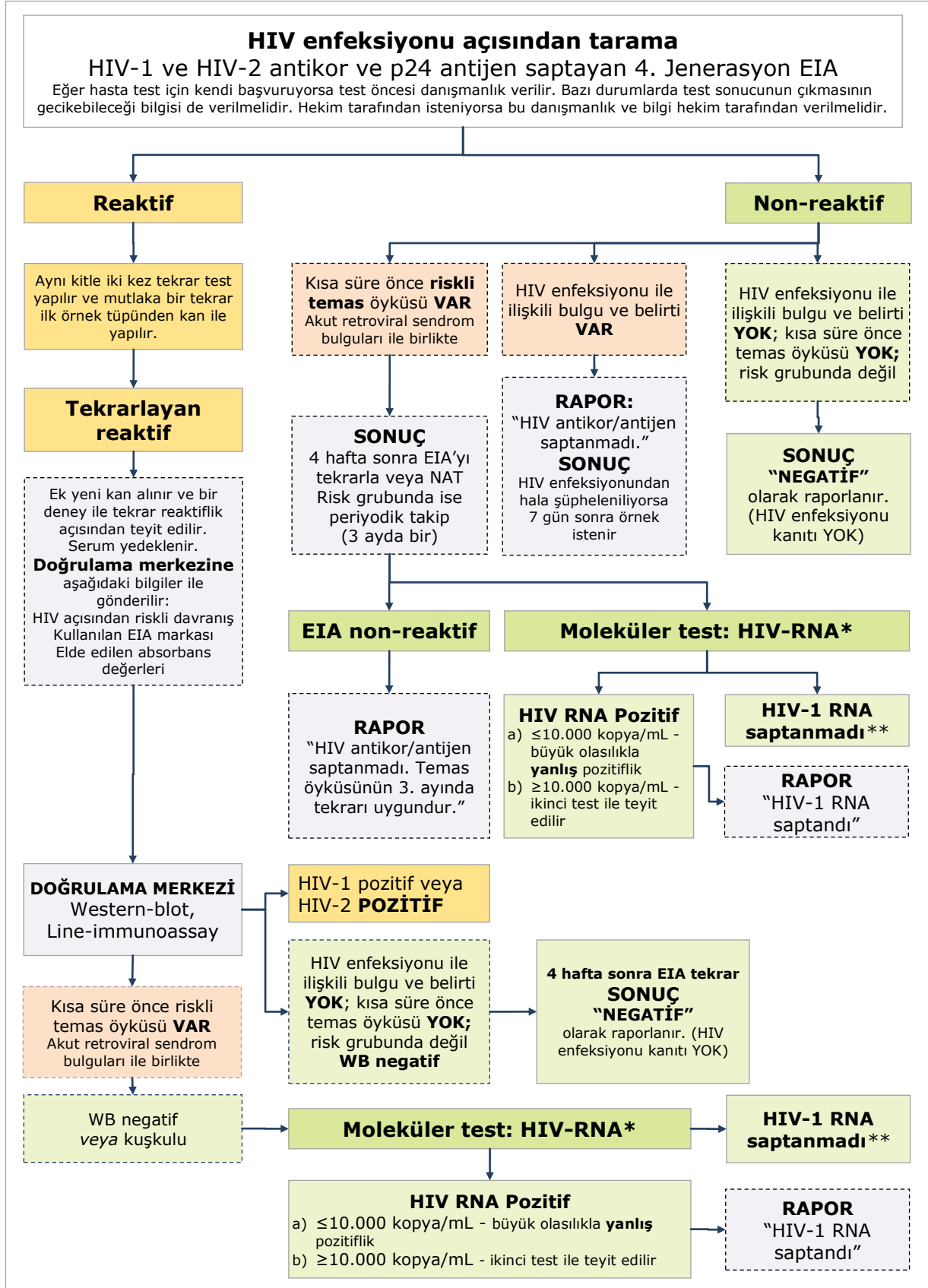
3 HIV tanısında kullanılan teknikler

3.1. Standart tanı yaklaşımı

- HIV ile enfekte kişilerin tanı ve izleminde rutin olarak başlıca iki grup deney kullanılır: **serolojik** tanı (özgül antijen-antikor saptayan immunoassayler) ve **moleküler** tanı
- HIV ile enfekte kişilerin hem immünolojik hem de virolojik açıdan değerlendirilmeleri gereklidir.
- Günümüzde kesin doğru tanıya gereksinimin yanı sıra, erken tanıya, tanı konduktan sonra hastalığın ilerlemesi ile ilgili bilgi verecek ve farklı tedavi stratejilerinin etkinliğini tayin edecek hasta takibine de ihtiyaç vardır. HIV ile enfekte kişilerin bu amaçla monitörizasyonunda önemli gelişmeler olmuş ve viral yük tayininde moleküler yöntemler kullanılmış ve bunlar çok iyi standardize edilmiş ticari kitler haline dönüştürülmüştür. Antiviral ilaçların yaygın kullanımı ve direnç gelişimi HIV enfeksiyonunda antiviral ilaç duyarlılığının tayinini de gündeme getirmiştir (18). Antiviral duyarlılık tayininde hızlı standart yöntemler rutin tanıya girmiştir. Bu arada araştırma laboratuvarlarında PCR ile amplifikasyon ve dizi analizi ile viral genotipin moleküler analizi yapılmaktadır. Bu da farklı izolatlar arasındaki ilişkileri ve viral değişkenliği göstermede en güçlü araçtır.
- Yenidoğan ve 18 aya kadar bebeklerde ve daha büyük çocuk ve erişkinde tanıda izlenecek akış şemaları farklılık gösterir (bkz. Şekil 1 ve Şekil 2). Anneden geçen antikorların varlığı 18 aya kadar devam ettiği için bebeklerde bu süre boyunca serolojik tanının yeri yoktur.
NOT: Buradaki öneriler, kan bağışları ile organ ve doku bağışlarına yönelik taramaları kapsamamaktadır.
- Tarama ve tanıda iki aşamalı bir yaklaşım benimsenmektedir: Önce bir tarama testinin yapılması ve '**reaktif**' bulunan örneklerin doğrulama için incelemeye alınması.
- HIV enfeksiyonunun varlığı ancak doğrulama incelemesinin sonucunun '**pozitif**' olması ve seropozitifliğin ikinci bir örnekle de doğrulanması halinde kanıtlanmış olur (1,2,8,16).

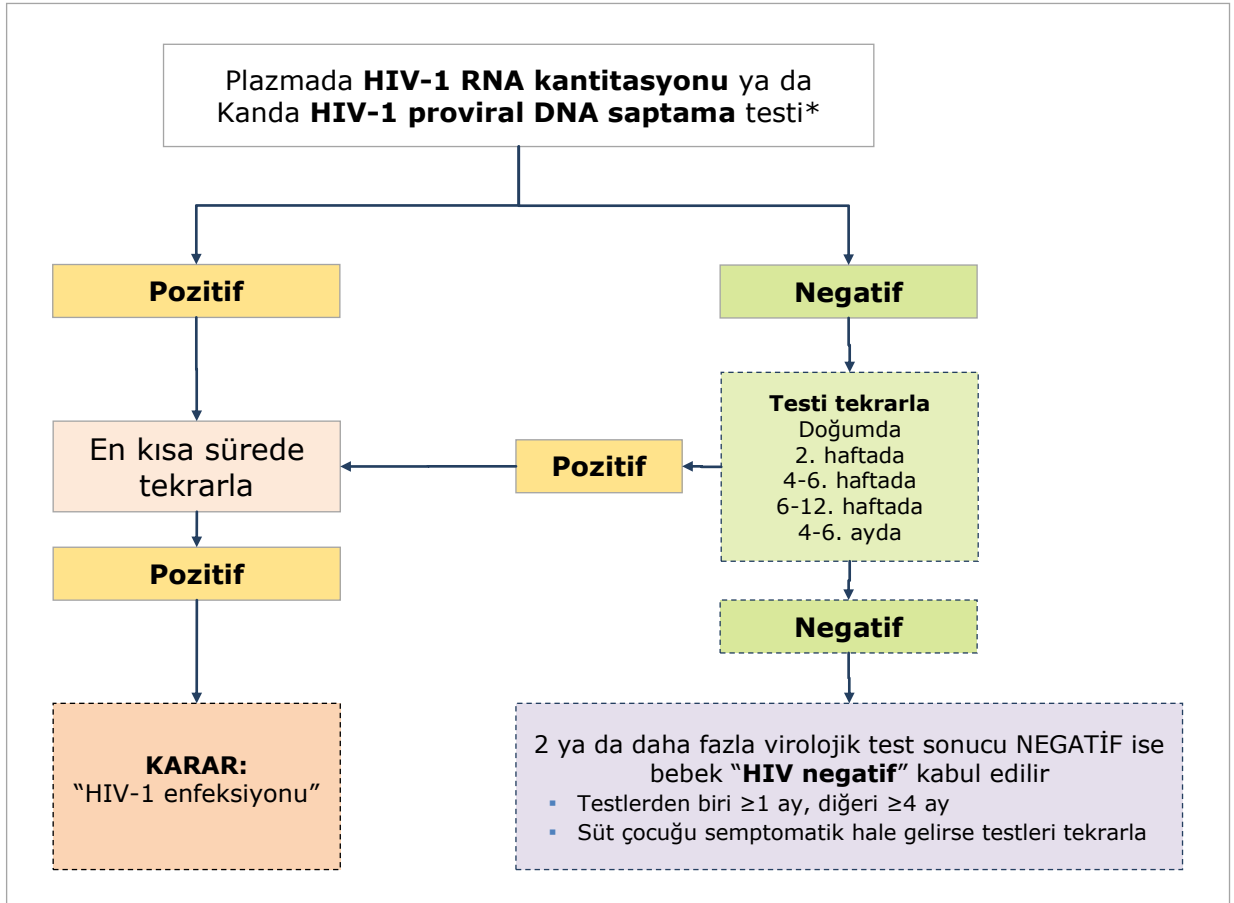
Standart ve otomatik EIA'lar

- 1983 yılından bu yana HIV antikor taramasında kullanılan EIA'larda duyarlılık ve özgüllük açısından son derece hızlı ve önemli gelişme kaydedilmiştir. HIV-1 ve HIV-2 antikorlarını p24 antijeni ile birlikte saptayan **dördüncü jenerasyon** ticari kitler tarama ve tanı için önerilmekte ve tercihen O grubunu da saptaması beklenmektedir.
- HIV antikor tayininde kullanılan EIA'ların %100 duyarlılığa sahip olmaları beklenmektedir.



Şekil 1. Erişkinler ve 18 aydan büyük çocuklar için HIV tarama akış şeması

* FDA tarafından onaylanmış kalitatif HIV-1 RNA kitleri ya da kan donörlerini tarama amaçlı kullanımı ya da tanı destek amaçlı kullanımı onaylanmış kitler tercih edilmelidir. Bu tarz kitler sadece HIV-1 RNA'yı saptamaktadır. HIV-2 enfeksiyonlarının doğrulanmasında kullanılamaz. **Serolojik testler 2-4hafta sonra tekrar edilir. HIV-2 şüphesi varsa HIV-2 RNA da araştırılır



Şekil 2. Yenidoğan ve 18 aydan küçük çocuklar için akış şeması

* FDA tarafından onaylanmış kalitatif HIV-1 RNA kitleri ya da kan donörlerinin taranması amaçlı kullanımı onaylanmış ya da tanı destek amaçlı kullanımı onaylanmış kitler tercih edilmelidir. Bu tarz kitler sadece HIV-1 RNA'yı saptamaktadır. 10.000 kopya/mL altındaki sonuçlar yalancı pozitif olabilir. HIV-2 enfeksiyonlarının doğrulanmasında kullanılamaz. ≥1 aylık çocukta HIV p24 antijeni testi, PCR'den daha az duyarlı olup pozitifliği pozitif virolojik test olarak kabul edilir. 6. aydan sonra iki negatif HIV antikor testi sonucu HIV enfeksiyonunu dışlatır.

Doğrulama testleri

- Doğrulama testleri arasında en sık kullanılan test WB'dir. Western blot ile virüsün tüm yapı proteinlerine karşı oluşmuş antikorları ayrı ayrı saptamak mümkündür. Ancak önceleri daima kesin sonuç veren bir doğrulama testi olduğu düşünülen Western blot ile de her zaman kesin olmayan durumların söz konusu olabildiği saptanmıştır.
- Western blot ile doğrulanan tipik pozitif sonuçta nitroselüloz şerit üzerinde yapı proteinlerinin bulunduğu tüm bölgelerde bant oluşur.
- Yukarıdan aşağıya gp160, gp120, p66, p55, p51, gp41, p31, p24, p17 ve p15 bantları vardır. Hiç bant içermeyen şerit **negatif** kabul edilir. Western blot sonucunun pozitif kabul edilmesi için belirli bantların mutlaka bulunmaları gereklidir. Negatiflik ve pozitiflik kriterlerine uymayan bantları içeren kuşku WB sonucu kabul edilmektedir. WB yöntemi EIA ve hızlı testlere göre daha özgül fakat daha az duyarlıdır.
- LIA, HIV-1 ve HIV-2 rekombinant antijenleri içeren bir yöntem olup WB'nin yerini almış bulunmaktadır.

3.2. Seroloji

- Tanı ve tarama testi olarak kullanılan tarama testleri klasik olarak iki grupta incelenir: İlk aşama-tarama testleri ve doğrulama testleri.
- İlk aşama testleri olarak dördüncü jenerasyon testler duyarlılıkları açısından önerilen testlerdir.
- Daha duyarlı ve özgül 'immunoassay'ler ve moleküler testler kullanıma girdikçe akış şemalarının güncellenmesi gerekmektedir. Akış şemaları dinamik olarak -ülke HIV seroprevalansı da göz önünde bulundurulmak koşuluyla- kanıta dayalı güncel veriler temelinde güncellenmelidirler. Daha özgül, ancak yeni yöntemler kadar duyarlı olmayan doğrulama testleri de yavaş yavaş akış şemalarından uzaklaşmaktadır.
- CDC Amerika'da, FDA tarafından önerilen algoritmada yer alan multispot HIV-1/2 testini, hem hızlı sonuç vermesi hem Western-blot'a göre bir hafta erken pozitifleşmesi nedeniyle doğrulama testi olarak önermektedir (1,2,8,16).

3.3. Moleküler tanı

- PCR, örnekteki nükleik asit miktarını enzimatik yolla arttırarak geleneksel yöntemlerle saptanabilecek düzeye getirme tekniğidir.
- PCR, periferik kan mononükleer hücrelerinde HIV-1 proviral DNA'sını ve HIV-1 RNA'sını saptamada ve miktarını belirlemede kullanılabilir. PCR son derece duyarlı ve özgül bir yöntemdir. Ancak gerekli önlemler alınmazsa yalancı pozitiflik ve negatiflik riski vardır.
- HIV enfeksiyonunun tanısında, izlenmesinde ticari kitler mevcuttur. Üreticiler arasında rekabet, otoritelerin ciddi irdelemeleri ve kontrolleri sonucunda çok sayıda mükemmel, iyi standardize edilmiş yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip ticari kitlerin üretilmelerine ve kullanıma sürülmelerine yol açmıştır.
- Bu kitlerin kullanımı ile devamlı yüksek kalitede sonuç vermek mümkün olmaktadır. Bu testler ister serolojik ister moleküler olsun araştırma laboratuvarlarında geliştirilen 'in-house' yöntemlerden daha güvenilir sonuçlar sunmaktadır. Bu nedenle özellikle HIV için iyi ticari kitler özellikle önerilmekte ve hatta bazı ülkelerde ticari olmayan kitlerin kullanımı mevzuatla yasaklanmaktadır. Ülkemizde de tanı ve viral yük tayininde 'in house' yöntemler kullanılmamaktadır.
- HIV enfeksiyonunda virüs RNA'sı ya da DNA'sını tayin eden çeşitli ticari testler vardır.
- Plazmada HIV-1 RNA konsantrasyonu (viral yük) ölçümü HIV enfeksiyonunun izlenmesi ve tedavisinde dünyanın pek çok ülkesinde standart uygulamalar arasına girmiştir. Viral yük, hastalık gelişme hızının güçlü bir göstergesi olup CD4 T hücre sayısı ile birlikte güçlü prognostik değer taşır. Bu nedenle viral yük testi antiretroviral tedaviye (ART) başlarken, tedavinin izlenmesinde ve tedavide değişiklik planlanırken önerilmektedir.

- Günümüzde viral RNA'yı kantitatif tayin eden ticari kitler ve 'real-time' PCR gibi yeni jenerasyon testler vardır. Bu yeni testler lineer dinamik tayin sınırını, otomasyonu arttırmaları, tekrarlanabilirlik yükselir.
- Günümüzde viral RNA'nın duyarlı bir şekilde tayini ve miktarının belirlenmesinde ya hedef nükleik asidi ya da sinyali amplifiye eden ticari kitler kullanılmaktadır.
- RT-PCR, 'real-time' PCR, dallanmış DNA ve NASBA'ya dayalı beş ticari kitin FDA onayı vardır. Bu kitlerle en düşük kantitasyon oranı 50-80 kopya/mL kadardır. Bu yöntemlerle viral yükte 3 kat ya da daha üzeri ($0.5_{\log_{10}}/mL$) değişiklik anlamlı kabul edilebilir ancak bu özellik bazı kitlerin lineer aralıklarının düşük uçlarında azalabilmektedir. FDA onaylı kitlerin bir listesi Kutu-3'de verilmiştir.
- Gerçek zamanlı PCR'ların kontaminasyon oranları standart PCR'lara göre çok düşüktür.

Kutu 3. FDA onaylı moleküler tanı kitleri

- The AMPLICOR HIV Monitor Test (Roche Diagnostics): RT-PCR assay (standard and ultrasensitive)
- Versant HIV-1 RNA 3.0 assay (Bayer Diagnostics): 'branched DNA' (bDNA) assay
- NucliSens HIV RNA QT (BioMerieux): NASBA assay
- COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Test (Roche Diagnostics): real-time RT-PCR assay.
- RealTime HIV-1 (Abbott Molecular): real-time RT-PCR assay

3.4. Moleküler direnç testleri

- İlaç direnci genotipik ya da fenotipik testlerle incelenebilir. Genotipik testlerde, ilaç direnci ile ilişkili mutasyonlar araştırılırken, fenotipik testler özünde ilaç duyarlılık testleridir. Her iki yöntemde de RNA ekstraksiyonu için plazma kullanılır.
- Rekombinan virüs yöntemlerinin kullanıma girmesi ile birlikte fenotipik yöntemlerde büyük ilerleme kaydedilmiştir. Fenotipik testler direkt olarak ilaç duyarlılığını ölçerler. Fenotipik testlerin en önemli dezavantajı daha pahalı oluşları ve zaman alıcı olmalarıdır. Genotipik direnç testleri, daha kısa sürede sonuç alınması, daha ucuz olmaları ve daha kolay uygulanabilir olmalarından dolayı fenotipik testlere göre daha yaygın olarak kullanılmaktadır.

Genotipik direnç testleri

- Genotipik testlerde, ilaç direnci ile bağlantılı mutasyonlar belirlenir. Genellikle proteaz bölgesinin tamamı ile RT bölgesinin ilk 236 amino asitlik kısmı çoğaltılır. Genotipik test sonuçlarının güvenilirliği açısından viral yükün 1000 kopya/mL'nin üzerinde olması gerekir. Dirençle ilişkili mutasyonlar iki farklı yöntemle saptanabilir.
- *DNA dizi analizi* en yaygın kullanılan yöntemdir. Test örneğinin (plazma) tedavi altında olan ve tedavi başarısızlığı düşünülen hastalarda, mümkün olduğunca henüz tedavi altında iken; primer enfeksiyonlu bireylerde de tedavi başlanmayacaksa bile olabildiğince erken dönemde alınması önerilmektedir.

- *Dizi analizinin* en önemli teknik kısıtlılıklarında biri, toplam virüs popülasyonu içinde %20-25'ten düşük bir oranda bulunan varyantların saptanamamasıdır. Pek çok laboratuvarında, ekonomik oluşu nedeni ile 'home made' yöntemle yapılmaya devam etmektedir. Ancak ticari kitler ve bunların çoğunun kendine özel değerlendirme programları da bulunmaktadır. Ticari genotipik direnç testleri ViroSeq™ (Cela Diagnostics/Abbott Laboratories), HIV-1 Trugene™ (Bayer Healthcare/Siemens Diagnostics), Virco Type HIV-1 (Virco), GenoSure (plus)™ (LabCorp) ve GeneSeq™ (Monogram Biosciences)'dir.
- Uluslararası AIDS Derneği IAS-USA güncel HIV ilaç direnci ile ilişkili mutasyonları yayınlar (www.iasusa.org). Güncel ANRS, Stanford HIVdb ve Rega ilaç direnç yorum sistemleri olup ücretsiz kullanıma açıktır.
- 'Ultradeep pyrosequencing' (UDPS) ≥ 1 minör mutasyonları saptayabilmektedir.
- *Hibridizasyona dayalı yöntemler* için ise iki ticari kit mevcuttur. Bunlardan biri artık kullanımdan kaldırılmış olup DNA çip teknolojisine dayalıdır (Affimetrix). Çoğaltılan virüs genomu üzerinde farklı mutasyonları içeren çok sayıda problemlerin bulunduğu minyatürize (çip) bir sistemle incelenir. Eğer ilgili mutasyon varsa, PCR ürünü problemlerle hibridize olur.
- Revers faz hibridizasyona dayalı olan INNO-LiPA HIV-1 'line prob assay'de (Bayer Healthcare/Siemens Diagnostics), virüs RNA'sı biyotinle işaretli primerle çoğaltılır. Avidin-enzim kompleksi ile işaretli ilaçla ilişkili mutasyonları içeren problemler, nitroselüloz şeritler üzerine fikse edilmiştir. Ürünle karşılaştırıldıklarında, ilgili problemlerin bulunduğu bantta renklenme olur. Dezavantajlarından biri zayıf hibridizasyona bağlı sonuçların %10'unun yorumlanamaması ve sadece bilinen mutasyonları saptıyor olmasıdır. Bunun dışında uygulama açısından en kolay yöntemlerden biridir ve fazla teknik donanım gerektirmez.
- Koreseptör kullanımını tayin eden genotipik ve fenotipik tropizm deneyleri olarak bilinen yöntemler de sadece R5 virüsü inhibe eden maravirok gibi CCR5 antagonisti ilaçlar kullanılacağı zaman önerilmektedir (1,8,18).

4 Saklama, Referans merkeze gönderme

- EIA sonucunun 'reaktif' olması durumunda örnek Halk Sağlığı Müdürlüğü kanalıyla, doğrulama için Doğrulama Merkezi'ne gönderilir. Sağlık Bakanlığı tarafından yetkilendirilmiş doğrulama merkezlerinin bir listesi için bkz. sayfa 17 "HIV/AIDS Doğrulama Merkezleri".
- Serum örnekleri alındıktan sonraki 7 gün içinde, plazma örnekleri de 48 saat içinde +4°C'de doğrulama laboratuvarına ulaştırılmalıdır. Gecikecek bütün örnekler dondurulmalı ve kuru buzda gönderilmelidir.
- Örnekler daima enfeksiyöz madde taşıma şartlarını karşılayacak şekilde *paketlenmeli* ve *taşınmalıdır* (19). Kuru buzda taşıma hususları dahil, ayrıntılı bilgi için ilgili UMS belgesine (UMS, GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi) başvurulması önerilir.

5 Sonuçların yorumu, raporlama ve bildirim

- Dördüncü kuşak ELISA testi ile yapılan incelemede örnek 'reaktif' bulunmazsa, kişide HIV enfeksiyonu ile bağlantılı olabilecek bir bulgu ya da belirti yoksa ve kişi risk grubunda değil ise ya da riskli bir temas öyküsü tanımlamıyorsa incelemenin sonucu HIV negatif (HIV enfeksiyonu kanıtı yok) olarak rapor edilir (bkz. Şekil 1).
- Doğrulama testlerinin "pozitif" bulunması HIV enfeksiyonu göstergesidir (bkz. Şekil 1 ve Şekil 2).
- HIV enfeksiyonunun bildiri zorunludur (3,4). Tarama test sonucu 'reaktif' bulunduğu takdirde doğrulama süreçlerinin hızla başlatılabilmesi için laboratuvar Halk Sağlığı Müdürlüğünü hemen haberdar etmelidir (ör., telefon ile).

6 HIV/AIDS Doğrulama Merkezleri

1. THSK

Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal AIDS/HIV Doğrulama Merkezi ve Viral Hepatit Referans Laboratuvarı
Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55, F Blok 1.kat
06100 – Sıhhiye/ANKARA
Tel: 0312 565 5551 / 5552 / 5553
Faks: 0312 565 5569

2. İzmir Halk Sağlığı Laboratuvarı

Viroloji Laboratuvarı, HIV/AIDS Tanı ve Doğrulama Merkezi
52/18 sok. No: 4, 35350, Poligon - İzmir
Tel: 0232 224 1212
Faks: 0232 224 5989

3. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji AD
Balçova İzmir
Tel: 232- 4124501 (sekreterlik)

4. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji AD
Viroloji ve Seroimmunoloji Laboratuvarı
35100, Bornova-İzmir
Tel: 0232 444 1 343, 0232 390 3303 / 3019

5. Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA)

Tıbbi Mikrobiyoloji AD
Viroloji Bilim Dalı
Etlik, Keçiören – Ankara
Tel: 0312 304 2000 / 0312 304 1810
Faks: 0312 304 2700

6. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
34303 Cerrahpaşa - İstanbul
Tel: 0212 414 3077
Faks: 0212 586 1547

7. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Viroloji ve Temel İmmünoloji Laboratuvarı,
Çapa - İstanbul
Tel: 0212 414 2000
Faks: 0212 414 2037

8. Deri ve Tenasül Hastalıkları Hastanesi

Mikrobiyoloji Laboratuvarı,
Zuhuratbaba Mahallesi, Dr Tefvik Sağlam Caddesi,
No: 26, Bakırköy - İstanbul
Tel: 0212 572 8293 / 94, 95, 96
Faks: 0212 572 8279

Kaynaklar

- 1 Griffith BP, Campbell S, Caliendo AM. Human Immunodeficiency Viruses. *In: Versolovic J, Carroll KC, Jorgensen JH, Funke G, Landry ML, Warnock DW (eds). Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed, ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 1302-22
- 2 Bartlett JG. Serologic screening for HIV infection. www.uptodate.com (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 3 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 - 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 4 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 5 T.C. Sağlık Bakanlığı (Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi TR0802.16-01 Avrupa Birliği ve Dünya Bankası desteği ile) (Akbaş E, Pr Danışmanı). Türkiye'de Bulaşıcı Hastalıkların Tanısında Mikrobiyoloji Laboratuvar Kapasitesi Mevcut Durum Değerlendirmesi: Anket - LabKap2012. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kuşadası, 4 Kasım 2012.
- 6 http://www.hatam.hacettepe.edu.tr/veriler_Haziran_2013.pdf (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 7 http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/UNAI_DS_Global_Report_2013_en.pdf (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 8 Sax PE. Primary HIV-1 infection: Diagnosis and Treatment. <http://www.uptodate> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 9 Altuğlu İ, Bilgiç A, Erensoy S, Yalçınkaya KT, Yılmaz G. HIV enfeksiyonu saptanmasında izlenecek yol (2005). *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2005;35:131-135

- 10 Branson BM, Handsfield HH, Lampe MA, Janssen RS, Taylor AW, Lyss SB, Clark JE. Revised recommendations for HIV testing of adults, adolescents, and pregnant women in health-care settings. *MMWR Recommendations and Reports* 2006;55(RR14):1-17
<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5514a1.htm> (son erişim tarihi: 01.04.2014)
- 11 Health Protection Agency. Anti-HIV screening. UK Standards for Microbiology Investigation. V11 issue df. (2011) <http://www.hpa.org.uk/SMI/pdf> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 12 HIV Diagnostic update 2010.
http://www.aphl.org/AboutAPHL/publications/Documents/ID_2011August_HIVIssueBrief.pdf
(son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 13 Hirsch MS. Diagnostic assays for HIV infections. www.uptodate.com/contents/diagnostic-assays-for-hiv-infection (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 14 CDC. Section IV. HIV testing procedures. <http://www.cdc.gov/hiv/testing/index.html> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 15 Branson BM, Mermin J. Establishing the diagnosis of HIV infection: New tests and a new algorithm for the United States. *J Clin Virol* 2011;52S:S3-S4
- 16 Schwarzwald H. Diagnostic testing for HIV infection in infants and children younger than 18 months. www.uptodate.com (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 17 Caliendo AM. Techniques and interpretation of HIV-1 RNA quantitation www.uptodate.com (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 18 Kozal MJ. Overview of HIV drug resistance testing assays www.uptodate.com (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 19 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Norovirüs Enfeksiyonunun Mikrobiyolojik Tanısı

Hazırlayan Birim	Klinik Viroloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Viroloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	V-MT-03
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik
----------	-------	------------

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
Hastalığın önemi.....	3
Klinik özellikler.....	4
Virüsün özellikleri	5
Laboratuvar tanısı.....	5
TEKNİK BİLGİLER	6
1 Hedef mikroorganizma	6
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	6
3 Norovirüs tanısında kullanılan teknikler	7
4 Sonuçların yorumu, raporlama.....	9
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	10
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	10
KAYNAKLAR.....	10

Kapsam ve Amaç

Norovirüsler (NoV) epidemik gastroenteritlerin en önde gelen nedenidir ve dünya genelinde tüm gastroenterit salgınlarının en az %50'sinden sorumludurlar. Tanı testlerinin gelişmesi ile birlikte her yaş grubundaki sporadik gastroenteritlerin de yaygın nedenlerinden oldukları anlaşılmıştır. Her ne kadar -özellikle salgın durumunda- başka bir patojenin sorumluluğu gösterilemediğinde epidemiyolojik durum temelinde belirlenmiş bazı kriterlere göre hastalığın NoV-ilişkili olduğuna dair 'klinik tanı' konabilirse de bu laboratuvar tanısı gereğini ortadan kaldırmaz; ülkemizde norovirüs enfeksiyonlarının bildirim zorunludur; sürveyans ve enfeksiyon kontrolü için kesin tanı önemli ve gereklidir (1). Bu UMS belgesinde de, NoV enfeksiyonlarının laboratuvar tanısı için güncel ve geçerli yaklaşım ve prosedürlerin verilmesi hedeflenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

NoV	Norovirüs
VLP	Virüs-benzeri partikül
VP	Viral protein

Genel Bilgi

Hastalığın önemi

Norovirüsler (NoV) önceleri Norwalk-like virüs (NLV) veya 'Small Round Structured Viruses' (SRSV) olarak da bilinen bir grup enterik patojen virüslerdir. İlk olarak 1972'de tanımlanmış ve "kış kusma hastalığı" (winter vomiting disease) adı verilen nispeten hafif bir gastroenteritin nedeni olarak kabul edilmişlerdir. Epidemiyolojik özellikleri uzun zaman tam aydınlatılamamıştır (2).

Mikrobiyolojik tanıda moleküler araçların gelişimine ve laboratuvar kapasitesinin artmasına paralel olarak NoV testlerinin yaygınlaşması, norovirüslerin, dünya genelinde gıda-kaynaklı hastalık ve akut bakteriyel olmayan gastroenteritlerin önde gelen nedeni olduğunu göstermiştir; bu gelişimin klinik sonuçları ile birlikte prevalans da küresel boyutta genişlemeye devam etmektedir (2).

NoV, hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde 5-yaş altı çocuklarda ağır gastroenteritlerden sorumlu -rotavirüslerden sonra- en yaygın ikinci etkidir. Her yıl endüstrileşmiş ülkelerde yaklaşık 900.000 pediatrik gastroenterit olgusuna ve gelişmekte olan ülkelerde en az 1.1 milyon olguya ve 218.000 ölüme yol açtığı; dünya genelinde ciddi gastroenterit nedeniyle hastaneye yatırılmış 5-yaş altı çocukların %12 kadarının NoV enfeksiyonu ile ilgili olduğu tahmin edilmektedir (3). Rotavirüs aşılı yaygın ve rutin uygulanır hale geldikçe, ABD'de izlendiği gibi, rotavirüs enfeksiyonlarının prevalansında anlamlı azalmalar kaydedilmiştir. Bu başarının bir sonucu olarak NoV'lerin yakında pediatrik popülasyonlarda en önemli enterik patojen haline gelebileceği düşünülmektedir (2).

NoV, okullar, yolcu gemileri, restoranlar, hastaneler, huzurevleri, bakımevleri, kamplar, yurtlar gibi bireylerin bir arada bulunduğu çevrelerde gelişen salgınların en yaygın sebeplerindendir. Kusmanın sık olmasına ve geniş alana yayılan kontaminasyona bağlı olarak salgınları kontrol altına almak zordur (4,5).

Bulaşma için 18 kadar az virüs partikülü yeterlidir. Salgınlar önemli ölçüde enfekte hazırlayıcıların gıdaları kontamine etmesi ile ilişkilidir. Öte yandan NoV salgınlarının en önemli özelliği yüksek **sekonder atak** hızıdır; ilk kaynak kontamine gıda veya su olsa da, yayılımda fekal-oral yol veya aerosol maruziyeti ile kontamine yüzeyler, cisimler ve doğrudan kişiden kişiye bulaş büyük rol oynar. Dışkı ve kusmuk son derece bulaştırıcıdır. Kontamine aerosollerin solunum yolu ile bulaşta rol oynadığı kabul edilir. Su aktiviteleri ve içme suyu kaynaklı büyük salgınlar da bildirilmiştir. Su ile ilişkili bulaş içme suyuna kanalizasyon karışması ya da yetersiz klorlama sonucu meydana gelmektedir. Hastaneler ve diğer sağlık bakım kuruluşlarında salgınlar bazen aylarca sürebilir (6). Enfeksiyon hastanede yatan kişilerde sağlıklı kişilere göre daha ağır seyredebilir, ölümlere yol açabilir. Küçük çocuklar ve yaşlı bireyler enfeksiyondan daha sık etkilenirler. NoV salgınları yıl boyu görülebilmekle birlikte kış aylarında daha sıktır.

NoV'ler enfektif dozunun düşük olması, cansız yüzeylerde kalıcılığı ve geleneksel temizlik yöntemlerine dirençli olmaları ile enterik salgın patojeni olarak ideal özelliklere sahiptir ve ABD'deki Ulusal Alerji ve Enfektif Hastalıklar Enstitüsü'ne göre biyodefans için önemli patojenler sınıflandırmasında Kategori B potansiyel biyoterörizm ajanı olarak değerlendirilmektedir (2).

Bir akut gastroenterit salgınında, eğer mikrobiyolojik tanı imkan dahilinde değilse salgının NoV-ilişkili olup olmadığına dair 1982'de geliştirilmiş 'Kaplan Kriterleri' oldukça kullanışlıdır. Kriterler, laboratuvar tanısı konuncaya kadar özellikle halk sağlığı ilgililerinin bazı temel önlemleri almaları için zaman kazandırıcı olması bakımından önem kazanmış olup şöyle sıralanabilir: (a) etkilenmiş popülasyonda 12-60 saat* süren hastalık; (b) etkilenmiş popülasyonda 24-48 saat* inkübasyon periyodu; (c) etkilenmiş bireylerin %50'den fazlasında kusma görülmesi; ve (d) bir bakteriyel etken tanımlanamamış olması (2).

Klinik özellikler

NoV gastroenteritleri, genellikle 1-2 günlük inkübasyon periyodunu izleyen bulantı, kusma ve sulu ishal gibi belirtilerle ortaya çıkar. Abdominal ağrı ya da kramp, halsizlik ve düşük ateş gibi semptomlar olabilir. NoV'ler invaziv patojenler değildir ve kanlı veya mukoid diyare veya yüksek ateş gibi dizanterik semptomlar yaygın değildir. Dışkı yumuşak ve suludur (2,7). NoV enfeksiyonu genellikle kısa sürede ve kendi kendine iyileşir (6,7). Enfekte bireylerin %25-50'sinde, enfeksiyona eşlik eden en yaygın semptomlar baş ağrısı, hafif ateş, üşüme-titretilme ve kas ağrısıdır. Hastalık çoğu olguda 24-60 saatte sonlanır. Ancak, enfekte bireyler semptomlar geçtikten yaklaşık 8 hafta sonrasına kadar yüksek viral yükü ($\sim 10^{12}$ NoV/g dışkı) virüs yaymaya devam edebilirler (8).

Enfeksiyonların %30'u asemptomatik seyredebilir ve bu bireyler düşük düzeyde de olsa virüsü yayabilirler. Bunların bulaşma ve salgınlardaki rolü henüz aydınlatılmış değildir.

* Ortalama veya medyan

Virüsün özellikleri

Caliciviridae familyasında bulunan norovirüsler 38 nm çapında, tek zincirli, zarfsız, küçük, ikozahedral virüslerdir. Viral kapsid geninin (VP1) filogenetik analizine dayanan 5 genogrup (GI'den GV'e) içermektedir. GI, GII ve GIV genogrupları insanlar için patojen özellik gösterirken, GIII ve GV genogrupları sırasıyla sığırları ve fareleri enfekte etmektedir. GII genogrubunda insanları enfekte etmekle birlikte domuzları da enfekte eden bir genotipin (GII.11) olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır.

En büyük iki genogrup olan GI ve GII çeşitli ve en yaygın görülen NoV suşlarını içermektedir (2,9). Her genogrup sekans benzerliği ve filogenetik analizlerine göre genetik kümeler ayrılmaktadır. GI genogrubu 8; GII, 17; GIII, 2; GIV ve GV genogrupları ise 1'er genotipten oluşmaktadır (2,9,10).

Laboratuvar tanısı

NoV enfeksiyonunda kesin tanı mikrobiyolojik inceleme ile konabilir. Vakaların dışkılarında ve kusmuklarında fazla miktarda virüs bulunması nedeniyle tanı yöntemlerinin birçoğuyla pozitif sonuç alınabilmektedir.

Laboratuvar tanısı özellikle salgınların saptanması için önemlidir. Bir diğer ifade ile, vaka tanısından ziyade "salgın tanısı" için inceleme yapılır. Bu nedenle salgını temsil edecek şekilde %5 ila 10 vakadan örnek alınıp gönderilmesi önerilir (11). Bununla birlikte, örnekler akut dönem geçtikten sonra alınıyorsa, büyük ya da uzamış bir salgın söz konusu ise veya duyarlılığı daha düşük olan ELISA ile test edileceklerse örnek sayısı çoğaltılabilir.

Kültürlerde üretilmeyen bu virüslerin dışkı örneklerinde gösterilebilmesi için önceleri immün elektron mikroskopi kullanılmışsa da rutin kullanıma uygun olmayışı nedeniyle zaman içinde yeni yöntemlerin geliştirilmesine gereksinim duyulmuştur. Bugün tanıda yaygın başvurulan yöntemler başlıca virüsün nükleik asitlerini ya da antijenik yapılarını göstermeye dayalı testlerdir (12,13).

NoV tanısında RT-PCR öncelikle tercih edilen tanı testidir. Kullanımdaki RT-PCR testleri hayli duyarlıdır ve bir reaksiyon karışımındaki oldukça az sayıda (10 ila 100) kopyayı saptayabilirler. Farklı primerlerin kullanımı ile genogrup I ve II NoV'leri ayırt edebilmek mümkündür. RT-qPCR tekniği kullanıldığında da kantitatif sonuç almak, böylece viral yükü tahmin etmek mümkündür. RT-PCR hem değişik klinik örneklerin hem de gıda, su ve diğer çevresel örnek incelemeleri için kullanılabilir (2).

NoV'daki yüksek antijenik çeşitlilik; tipe özgü ve duyarlı ELISA protokollerinin geliştirilmesinde sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (14). ELISA kitlerinin duyarlılığı bazıları için %50 kadar düşük olabildiğinden, bu kitlerin salgınlar dışında, sporadik vakalar için kullanımı önerilmemektedir.

Norovirüslere karşı meydana gelen antikorları saptamaya yönelik serolojik testler de geliştirilmiştir. Dışkıda virüs atılımının gösterilemediği ve salgınlarda dışkı örneklerinin toplanmasında sorun olduğu durumlarda, serolojik teknikler tanı amaçlı kullanılabilir. Hastalığın başlangıcından sonraki 8-14 gün içinde serum antikor titrelerinin yükseldiği gösterilebilir (15,16).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizma

Norovirüsler

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

Norovirüsler Risk Grubu 2 mikroorganizmalardır ve bu organizmalarla ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün klinik örnekler enfeksiyöz kabul edilmeli, daima standart önlemler uygulanmalı, önlemler risk değerlendirmesi ile de desteklenmelidir. Aerosol oluşturması muhtemel tüm laboratuvar çalışmaları bir biyolojik güvenlik kabini içinde yapılmalıdır (ayrıca bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) yöntem(ler)i uygulamadan önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleriyle aşina olmalı, ve; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır. Testlerin prosedürlere uygun gerçekleştirilmesinden ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

İnceleme örneklerinin seçimi, özellikleri, alınması, gönderilmesi ve laboratuvara kabulü ile ilgili kriterler ve bilgi için "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"ne başvurulmalıdır. Ayrıca bazı önemli noktalara aşağıda tekrar dikkat çekilmiştir.

- Testler için, dışkı, kusmuk veya rektal sürüntü kullanılabilir.
- Dışkı, yüksek sayıda virüs içerdiğinden dolayı öncelikle tercih edilir. Bezli çocuklarda bez ters bağlanarak spatüla ile örnek alınabilir.
- NoV salgını düşünüldüğünde laboratuvara salgını temsil edecek şekilde en fazla %5-10 vakadan örnek gönderilir. İshal başlangıcından sonraki ilk 7 gün içinde alınmış 3-6 örneğin salgın tanısı için yeterli olduğu gösterilmiştir (11).
- Örnek ishal başladığından itibaren 7. güne kadar alınabilir. 7-14 günlerde duyarlılık daha düşük olsa da özellikle salgın söz konusu olduğunda tanı konması mümkündür (11).
- Uzamış (≥ 14 gün) diyaresi olan hastalardan alınan örnekler NoV incelemesi için kabul edilmezler. Biyolojik materyal taşıma şartlarına uygun gönderilmemiş örnekler de laboratuvara kabul edilmez (17).

Reaktif/Kit

- ELISA kiti veya lateks aglütinasyon test kiti veya ICT kitleri
- RNA ekstraksiyon ve RT-PCR kiti

Diğer gereç, donanım

- ELISA için; ELISA okuyucu, yıkayıcı, mikropipetler

PCR ve diğer moleküler testler için;

- En az üç ayrı oda - nükleik asit ekstraksiyonu, PCR karışımının hazırlanması, amplifikasyonun ve sonuç gözetiminin yapılabileceği ayrı odalar. İdeal olarak PCR karışımı hazırlama odası (temiz oda) pozitif basınçlı, agaroz jel elektroforezi yapılan oda (kirli oda) negatif basınçlı havalandırmaya sahip olmalıdır.
- Cihazlar – biyogüvenlik kabini, soğutmalı mikrosantrifüj, hassas terazi, vorteks, su banyosu, yatay çalkalayıcı, PCR ısı döngü cihazı, mikrodalga fırın, jel görüntüleme sistemi, elektroforez ünitesi vb.

2.4. Kalite kontrol

- Referans laboratuvarlardan sağlanan norovirüs pozitif ve negatif standart paneller (dış kalite kontrol örnekleri), serolojik ve moleküler testlerde kontrol numunesi olarak kullanılmalıdır.
- Her çalışma panelinde test edilecek örnekler yanında pozitif ve negatif kontroller de çalışılmalıdır.
- Laboratuvarlar, belirli aralıklarla pozitif buldukları dışkı örneklerini referans laboratuvara göndererek kendilerini kontrol etmelidir (18).

3 Norovirüs tanısında kullanılan teknikler**3.1. Ön hazırlık işlemleri¹⁸**

- Santrifüj tüpüne sırasıyla 5 adet cam boncuk, 0.5 mL kloroform, 10 mL PBS dağıtılır.
- Her dışkı örneğinden yaklaşık 2 g santrifüj tüpüne aktarılır.
- Santrifüj tüpünün ağzı sıkıca kapatıldıktan sonra vortekslenir, tüpteki dışkı parçalanıncaya kadar karıştırılır.
- Örnek tüpü, soğutmalı santrifüjde (4°C) 3500 rpm'de 20 dk santrifüj edilir. Süpernatant berrak değilse kloroform muamelesi tekrarlanır.
- Süpernatant antijen saptama veya moleküler çalışmalar için kullanılır.

3.2. Antijen saptama teknikleri

- İdeal bir NoV saptama yöntemi hızlı ve duyarlı olmalıdır.
- Ancak NoV tanısında antijen saptama tekniklerinin duyarlılıkları genel olarak halen RT-PCR'dan düşüktür; sporadik olgularda kullanılmaları önerilmez.

- Antijen testi ile pozitif sonuç "kesin tanı" bulgusudur. Ancak antijen testinin "negatif" bulunması enfeksiyonu dışlamaz. Örnek PCR ile incelenmelidir.

ELISA

- ELISA ile NoV tespitinde kaydedilen ilerlemelere rağmen halen duyarlılıkları ~%80 dolayında olup RT-PCR'dan belirgin düşüktür; özgüllük ise %100'dür ve çapraz reaksiyon göstermemektedir (2).
- ELISA uygulanması kolay yöntem olarak tercih edilebilir. Saptama sınırı, 1 mL dışkıda 10^4 - 10^5 viral partikül olarak değerlendirilmektedir. Bu yöntemle NoV'un kapsid proteini (antijeni) saptanmaktadır (13,19).

Lateks aglütinasyon testleri

- Antikor ile kaplı lateks boncuklarının kullanıldığı bu kitlerde duyarlılık RT-PCR'a göre ~%35, özgüllük %100 olarak saptanmıştır (20).

İmmünokromatografik testler (ICT)

- Kullanımı çok kolay ve ~20 dk gibi kısa bir sürede sonuç veren testlerdir. Diğer enterik virüslerle çapraz reaksiyon vermezler (21).
- RIDA®QUICK Norovirüs (R-Biopharm AG, Darmstadt, Almanya), SD Bioline Norovirüs (Standard Diagnostics, Inc., Kyonggi-do, Kore), ImmunoCardSTAT®Norovirüs (Meridian, Bioscience Europe, Nice, Fransa) ve NOROTOP®(ALL.DIAG SA, Strasburg, Fransa) ticari kitleri bulunmaktadır (22).
- RIDA®QUICK norovirüs immünokromatografik testi RT-PCR yöntemi ile karşılaştırıldığında; duyarlılığı %52-%83, özgüllüğü %87.5-%100 arasında değişmektedir. Özgüllüğü oldukça yüksek bir testtir. Pozitif prediktif değeri %93, negatif prediktif değeri %91 civarındadır. Ancak Genotip II'ye karşı Genotip I'den daha duyarlıdır. Genotip I'deki 19 genotipin 11'ini saptayabilmektedir. Düşük duyarlılıklar GI örneklerine bağlıdır ve negatif sonuçlar RT-PCR ile doğrulanmalıdır (23,24,25,26).
- SD Bioline NoV immünokromatografik testinin duyarlılığı RT-PCR'a göre %41-%76.5, özgüllüğü %98-%100 arasındadır. Pozitif prediktif değeri %98, negatif prediktif değeri %95.5 dolaylarındadır. GI.1, GI.3, GI.4, GII.1, GII.3, GII.4, GII.6 genotiplerini saptayabilirken, GI.2 ve GII.2 genotiplerini saptamada başarısızdır. Otuz sekiz enterik virüsün (3 astrovirüs, 5 enterik adenovirüs, 30 rotavirüs) hiçbirisiyle çapraz reaksiyon vermemektedir (21,27).
- ImmunoCardSTAT!®Norovirüs ve NOROTOP® testlerinin ise duyarlılıkları sırasıyla %35, %51; özgüllükleri %100'dür (22).

3.3. Moleküler tanı

- RT-PCR testleri NoV enfeksiyonu tanısında öncelikle tercih edilen testlerdir.
- Gerçek zamanlı RT-PCR ve multipleks gerçek zamanlı RT-PCR gibi yöntemler de kullanılmaktadır.
- Gerçek zamanlı RT-PCR, geleneksel PCR'dan 10.000 kat daha duyarlı bulunmaktadır (28).

- Gerçek zamanlı PCR ayrıca daha az zaman alıcıdır; çünkü geleneksel RT-PCR genellikle takiben NoV genogruplarının teyit edilmesi için sekanslama ya da prob hibridizasyon gerektirmektedir.
- RT-PCR ile pozitif sonuç "kesin tanı" bulgusudur. PCR sonrası DNA dizi analizi ile tiplendirme de yapılabilir.

3.4. Antikor saptama

- Rekombinant VLP'lerin antijen olarak kullanıldığı, antikor yanıtını saptayan EIA'lar da IgG, IgM ve IgA serolojik yanıtlarını karakterize etmek için geliştirilmiştir.
- Enfeksiyondan 8-11 gün sonra, virüse özgü IgA ve IgG titrelerinde önemli miktarda artış görülmektedir. IgG antikor titresi, hastalığın ilk 5 günündeki akut evre ile akut evreden 3-6 hafta sonraki nekahat evresi arasında 4 kat artmaktadır. Virüse özgü IgM antikorları ise 2 hafta içerisinde saptanabilmektedir (7,14,15,29,30).

3.5. Saklama, Referans merkeze gönderme

- Norovirüs enfeksiyonu şüphesinde; dışkı örneği 3 haftaya kadar +4°C'de saklanabilir ve taşınabilir. Test edilme süresi 3 haftayı aşarsa dışkı örnekleri -70°C'ye kaldırılmalı ve çözülmeden, kuru buzda laboratuvara taşınmalıdır.
- Dondurulmuş örnekler -70°C'de 5 yıl saklanabilir.
- Genotip tayini için örnekler Ulusal Referans Laboratuvarına gönderilir. Örneklerin gönderilmesinde *paketlenme* ve *taşıma* biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (17) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).
- Örnekler ileri analizler için Ulusal Referans Laboratuvara gönderilmiş ise, laboratuvardan sonuç almak için gerekli süre not edilir.

4 Sonuçların yorumu, raporlama

- Antijen saptama testlerinin sonucu -özellikle salgına ait örnekler söz konusu ise- aynı gün içinde rapor edilmelidir.
- NoV şüphesinde bir antijen saptama testinin sonucu pozitif bulunmuş ise "kesin tanı" koydurucudur ve sonuç hastayı/örneği gönderen birime/hekime hemen rapor edilmelidir.
- NoV şüphesinde bir antijen saptama testinin sonucu negatif bulunmuş ise RT-PCR ile teyit edilmesi gerekir. Negatif sonuç da hastayı/örneği gönderen birime/hekime rapor edilmeli ve kesin tanı için RT-PCR testi önerilmeli; örnek bu testin yapıldığı bir merkeze yönlendirilmelidir.
- NoV şüphesinde RT-PCR sonucu "kesin tanı" koydurucudur ve sonuç hastayı/örneği gönderen birime/hekime hemen rapor edilmelidir.
- Genotiplendirme ve moleküler çalışmaların sonuçları testi talep eden hekime ve/veya laboratuvara bildirilir.

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Örnek alınmasında, taşınmasında ve saklanmasında önerilen şartlara uyulmaması hatalı pozitif ve negatif sonuçlara neden olabilir.
- Antijen saptama testlerinde nispeten düşük olan duyarlılıkları nedeniyle hatalı negatif sonuç alınabilir. NoV şüphesinde bir antijen saptama testinin sonucu negatif bulunmuş ise RT-PCR ile teyit edilmelidir.
- Moleküler tanı tekniklerinin gerektirdiği donanım ve altyapı klinik laboratuvarlarda yaygın kullanımı açısından bir dezavantajdır.
- RT-PCR testlerinin duyarlılıkları kullanılan primerlere bağlıdır. Norovirüslerin geniş genetik çeşitliliği nedeniyle tüm NoV kökenlerini saptayabilen bir primer seti mevcut değildir.
- RT-PCR da, yetersiz RNA ekstraksiyonu, örneğin uygunsuz saklanması yüzünden RNA'nın yıkılmış olması veya örnekteki inhibitörlerinin varlığı gibi nedenlerle hatalı negatif sonuç verebilir.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Norovirüs Enfeksiyonunun Mikrobiyolojik Tanısı) ayrıca aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve ilave bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

UMS, V-MT-04 Rotavirus enfeksiyonunun mikrobiyolojik tanısı
UMS, GEN-ÖY-01 Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014).
- 2 Koo HL, Ajami N, Atmar RL, Dupont HL. Noroviruses: the principal cause of foodborne disease worldwide. *Discov Med* 2010;10(50):61-70.
- 3 Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa K, Vinje J, Parashar UD. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 2008;8:1224-1231
- 4 Lopman BA, Reacher M, Gallimore C, Adak GK, Gray JJ, Brown DWG. A summertime peak of 'winter vomiting disease': Surveillance of noroviruses in England and Wales, 1995 to 2002. *BMC Public Health* 2003 (<http://www.biomedcentral.com/1471-2458/3/13>) (son erişim tarihi: 15.12.2013)
- 5 Marshall JA, Bruggink LD. The dynamics of norovirus outbreak epidemics: recent insights. *Int J Environ Res Public Health* 2011;8:1141-1149.
- 6 Said MA, Perl TM, Sears CL. Gastrointestinal flu: norovirus in health care and long-term care facilities. *Clin Infect Dis* 2008;47:1202-8.
- 7 Thornton AC, Jennings-Conklin KS, McCormick MI. Noroviruses: Agents in outbreaks of acute gastroenteritis. *Disaster Manage Response* 2004;2:4-9

- 8 Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, Estes MK, Crawford SE, Neill FH, Graham DY. Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerg Infect Dis* 2008; 14(10):1553-7.
- 9 Zeng D, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 2006;346:312-323.
- 10 Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RS. Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunol Rev* 2008;225:190-211.
- 11 Plantenga MS, Shiferaw B, Keene WE, Biggs C, Terry JM, Grenz L, et al. Specimen collection and confirmation of norovirus outbreaks. *Emerg Infect Dis* 2011;17(8): 1553-1555.
- 12 Richards AF, Lopman B, Gunn A, Curry A, Ellis D, Cotterill H, et al. Evaluation of a commercial ELISA for detecting Norwalk-like virus antigen in faeces. *J Clin Virol* 2003;26:109-115.
- 13 Kele B, Lengyel G, Deak J. Comparison of an ELISA and two reverse transcription polimerase chain reaction methods for norovirus detection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;70:475-478.
- 14 Duizer E, Pielat A, Vennema H, Kroneman A, Koopmans M. Probabilities in norovirus outbreak diagnosis. *J Clin Virol* 2007;40:38-42.
- 15 Treanor JJ, Dolin R. Noroviruses and other caliciviruses. Chapter 172. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed. Churchill Livingstone, 2005.
- 16 Gary GW, Anderson LJ, Keswick BH, et al: Norwalk virus antigen and antibody response in an adult volunteer study. *J Clin Microbiol* 1987;25:2001-2003
- 17 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.
- 18 World Health Organization. Manual of rotavirus detection and characterization methods. http://whqlibdoc.who.int/hq/2008/who_ivb_08.17_eng.pdf (son erişim tarihi: 15.12.2013).
- 19 Shirato H. Norovirus and histo-blood group antigens. *Jpn J Infect Dis* 2011;64:95-103.
- 20 Lee H, Park Y, Kim M, Jee Y, Cheon DS, Jeong HS, Ko G. Development of a latex agglutination test for norovirus detection. *J Microbiol* 2010;48(4):419-25
- 21 Buggink LD, Catton MG, Marshall JA. Evaluation of the Bioline Standard Diagnostics SD immunochromatographic norovirus detection kit using fecal specimens from Australian gastroenteritis incidents. *Diag Microbiol Infect Dis* 2013;76:147-152.
- 22 Ambert-Balay K, Pothier P. Evaluation of 4 immunocromatographic tests for rapid detection of norovirus in faecal samples. *J Clin Virol* 2013; 56: 194-198
- 23 Pombubpa K, Kittigul L. Assessment of a rapid immunochromatographic test for the diagnosis of norovirus gastroenteritis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:2379-2383.
- 24 Geginat G, Kaiser D, Schrempf S. Evaluation of third-generation ELISA and a rapid immunochromatographic assay for the detection of norovirus infection in fecal samples from inpatients of a German tertiary care hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:733-737.
- 25 Bruins MJ, Wolfhagen MJHM, Schirm J, Ruijs GJHM. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for the detection of norovirus in stool samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010;29:741-743.
- 26 Battaglioli G, Nazarian EJ, Lamson D, et al. Evaluation of the RIDAQuick norovirus immunochromatographic test kit. *J Clin Virol* 2012;53:262- 264.
- 27 Park KS, Baek KA, Kim DU. Evaluation of a new immunochromatographic assay kit for the rapid detection of norovirus in fecal specimens. *Ann Lab Med* 2012;32:79-81.
- 28 Pang X, Lee B, Chui L, Preiksaitis JK, Monroe SS. Evaluation and validation of real-time reverse transcription-PCR assay using the LightCycler system for detection and quantitation of norovirus. *J Clin Microbiol* 2004;42:4679-85.
- 29 Atmar RL, Estes MK. Human caliciviruses. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG (eds). *Clinical Virology*. 3rd ed., ASM Press, Washington D.C. 2009, p. 1109-1121.
- 30 Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev* 2001;14(1):15-37.



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Rotavirüs Enfeksiyonunun Mikrobiyolojik Tanısı

Hazırlayan Birim	Klinik Viroloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Viroloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	V-MT-04
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
Hastalığın önemi.....	3
Klinik özellikler.....	4
Virüsün özellikleri	4
Laboratuvar tanısı.....	5
TEKNİK BİLGİLER	6
1 Hedef mikroorganizma(lar)	6
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	6
3 Rotavirüs tanısında kullanılan teknikler	8
4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim	10
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	10
6 Rotavirüs tanısı için akış şeması	11
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	12
KAYNAKLAR.....	12

Kapsam ve Amaç

Rotavirüsler, tüm dünyada bebekler ve küçük çocuklarda akut gastroenteritin en sık nedenidir. Ağır dehidratasyon ile seyreden olgularda mortalite oranı da yükselmektedir. Kesin tanı laboratuvar incelemesi ile konabilir. Laboratuvar tanısı özellikle güvenilir bir sürveyans ve enfeksiyon kontrolüne yönelik epidemiyolojik veri toplanması amaçları için önemlidir; klinikte gereksiz antibiyotik tedavilerinin kullanılmasını da önler (1,2). Rotavirüs enfeksiyonları ülkemizde bildirim zorunlu hastalıklar listesinde yer alır (3).

Bu UMS belgesinde, rotavirüs enfeksiyonlarının laboratuvar tanısı için güncel ve geçerli yaklaşım ve prosedürlerin verilmesi hedeflenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

cDNA	Komplementer DNA
ICT	İmmünokromotografik test
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
VP	Viral protein(ler)

Genel Bilgi

Hastalığın önemi

Rotavirüsler, dünyada beş yaşın altındaki çocuklarda akut gastroenteritlerin en önemli etkenleridir. Beş yaşına gelinceye kadar çocukların çoğu rotavirüs enfeksiyonu geçirmektedir. Her yıl 25 milyondan fazla kişinin rotavirüs enfeksiyonu nedeniyle hastanelere başvurduğu ve bunların 2 milyondan fazlasının hastaneye yatırıldığı tahmin edilmektedir (2,4). Ilıman iklim kuşaklarında rotavirüs enfeksiyonları tipik olarak kış aylarında pik yapar, tropikal bölgelerde ise yıl boyunca gözlenebilir. Büyük çocuklar ve yetişkinlerde yenileyen enfeksiyonlar gözlenebilir ancak bu enfeksiyonlar genellikle subklinik seyirlidir.

DSÖ raporuna göre 2008 yılında dünya genelinde 5 yaşın altında 453.000 çocuk rotavirüs ishali nedeniyle ölmüştür. Bu oran 5 yaş altı çocuklarda gözlenen ishal nedeniyle ölümlerin %37'sini, genel ölümlerin %5'ini oluşturmaktadır (4,5). Rotavirüslere bağlı gastroenterit vakaları, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde benzer sıklıkta kaydedilse de mortalite gelişmekte olan ülkelerde daha yüksektir. Dünya genelinde rotavirüs ishallerine bağlı çocuk ölümlerinin %80'i gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir (5,6). Öte yandan, aşılama ile morbidite ve mortalite hızlarında ciddi azalmalar (%70-100) kaydedildiği rapor edilmektedir (7,8,9). DSÖ 2009 yılından bu yana, rotavirüs aşısının ulusal bağışıklama programlarına konmasını önermekte; uygulamanın dünya geneline yaygınlaşması ile ilgili çalışmalar yürütmektedir (6).

Klinik özellikler

Rotavirüs enfeksiyonunun ilk epizodu süresince, hastanın dışkı ve kusmuğundan oldukça yüksek yoğunlukta virüs ($>10^{12}$ partikül/g) atılmaktadır. Bulaşma primer olarak fekal-oral yolla; kişiden kişiye yakın temas veya kontamine eşyalar aracılığı ile olur. Rotavirüs küçük bir enfeksiyon dozu ile (<100 partikül) hastalığa neden olabilen oldukça bulaşıcı bir etkindir ve muhtemelen kontamine su ve gıdalarla ve solunum yolu (aerosoller) ile de yayılabilmektedir (6,10,11). Çevresel koşullara çok dirençlidirler. Bulaştığı yüzeylerde dezenfekte edilmediği sürece haftalarca veya aylarca canlı kalabilirler (12).

Virüs ince barsak epitel hücreleri içerisinde çoğalır, mikrovilluslarda ağır hasar oluşturur, malabsorpsiyona, sıvı ve elektrolit kaybına sebep olur. Rotavirüslerin neden olduğu hastalık tablosu basit, sulu dışkılamadan, kusma, ateş ve *dehidratasyon* ile elektrolit dengesizliği, şok ve ölüme kadar gidebilen ağır ishale seyredebilir. Genellikle, 1-3 günlük bir inkübasyon dönemini takiben ani ishal başlar; ishalden önce kusma görülebilir. Belirtiler genellikle 3-7 günde düzelir. Hastaların üçte bir kadarında ateş 39°C 'yi aşar. Ağır, dehidratasyon ile giden rotavirüs enfeksiyonu en çok 3-35 aylık çocuklarda gözlenir (6).

Virüsün özellikleri

Rotavirüsler *Reoviridae* familyası içerisinde yer alan, zarfsız, çift iplikcikli 11 segmentli RNA virüsleridir. Antijenik özellikleri temelinde ya da son zamanlarda VP6 kapsit proteininin amino asit sekanslarına göre gruplara (A'dan H'ye) ayrılır. İnsanlarda enfeksiyona A, B, C ve H gruplarının neden oldukları belirlenmiştir.

Grup A beş yaşın altındaki çocuklarda akut gastroenteritlerden sorumlu virüsleri içerir ki bunlar mevcut aşı programlarının da hedefidirler. Grup B yetişkinlerde ishal oluşturur ve Grup A'dan farklı olarak salgınlarla seyreder. Çin'de binlerce yetişkinin etkilendiği bir salgında gösterilmiştir. Grup C 4-7 yaş arasındaki çocuklarda ishale neden olur; daha ziyade kendini sınırlayan özellikte, sporadiktir. Kurumsal ortamlarda gıda kaynaklı salgınlar ile de ilişkilendirilmiştir. Grup D, E ve G rotavirüslerin yalnızca kuş türlerini enfekte ettikleri bilinir (13).

Dış kapsitte yer alan glikoprotein VP7 ve proteazlara duyarlı VP4 proteinler esas alınarak rota virüsler P ve G serotiplerine (genotiplerine) ayrılırlar (9). Bugüne dek 27 G (G1-G27) ve 35 P (P[1]-P[35]) serotipi tespit edilmiştir (10). On beş farklı G/P kombinasyonu bulunmaktadır; dünyanın birçok yerindeki insan rotavirüs enfeksiyonlarının %90'ından G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] ve G9P[8] tiplerinin sorumlu oldukları gösterilmiştir (6,13). Özellikle G1P[8] güncelliğini korumakta olup, A.B.D., İngiltere ve Avustralya gibi gelişmiş ülkelerde saptanan genotiplerin $>70\%$ 'ini oluşturmaktadır (14). G12 ise dünyada yeni ortaya çıkan bir genotip olarak tanımlanmaktadır (15).

Rotavirüs VP6 proteininin monoklonal antikörlerle oluşturduğu reaksiyona göre insan rota virüsleri iki alt gruba ayrılır. Yaygın görülen G1P[8], G3P[8], G4P[8] ve G9P[8] genotipleri altgrup II, G2P[4] ise altgrup I'de yer almaktadır (16). Dünya genelinde dolaşan rotavirüslerde büyük çeşitlilik gözlenir. İnsanda hastalığa en sık sebep olan tipler ülkeden ülkeye ve yıldan yıla değişmektedir (14). Ancak, genellikle rotavirüs genotipleriyle hastalığın şiddeti arasında ilişki yoktur (6).

Laboratuvar tanısı

Rotavirüs enfeksiyonunda –hastalığın diğer patojenlere bağlı ishallerden klinik olarak ayrılması mümkün olmadığı için- tanı mikrobiyolojik inceleme ile konabilir. Ancak vakalarda standart yaklaşım rehidratasyon ve destekleyici tedavi olduğu için ve tanı bu tedaviyi değiştirmeyeceği için mikrobiyolojik tanı çoğu durumda gerekli değildir. Laboratuvar tanısı esasen güvenilir bir süreyans için gerekir. Bütün vakaların değil, ama epidemiyolojik veri toplamak için yeterli sayıda vakanın tanısı hedeflenebilir. Ayrıca uzamış ishallerde komplikasyon vakalarda ve immün sistem yetmezliği olan konaklarda ayırıcı tanı için laboratuvar doğrulaması amacıyla test edilebilir. Tanı klinikte gereksiz antibiyotik tedavilerinin kullanımını da önler (1,2).

Rotavirüs ishallerde çocukların dışkı ile yüksek miktarlarda atıldığından tanı için dışkı örneği tercih edilir. Tanıda öncelikle başvurulan yöntemler **antijenik yapıları saptamaya dayalı** testlerdir. Virüsün görülmesi (elektron mikroskopi), hücre kültürlerinden üretilmesi veya genetik materyalinin saptanmasına (PAGE, nükleik asit hibridizasyonu, sekans analizi vb.) dayalı yöntemler ise daha ziyade araştırma ve referans laboratuvarlarında kullanılırlar.

Antijen saptama

Enfeksiyonun başlangıcından itibaren yedi gün içinde dışkıda antijen saptanabilir. Bu amaçla üç yöntem; EIA, lateks aglütinasyon ve ICT kullanılır (16). Dışkıda rotavirüs antijenlerinin tespiti için en yaygın kullanılan yöntem, tüm Grup A rotavirüsler için ortak bir antijene yönelik bir EIA'dır. Ucuz, kullanımı kolay, hızlı ve yüksek duyarlılıkta (~%90-100) olmaları nedeniyle hem rotavirüs süreyansı hem de klinik tanı için uygun çeşitli ticari EIA kitleri mevcuttur. Lateks aglütinasyon daha az duyarlı ve özgül olmakla birlikte bazı laboratuvarlarda tercih edilmektedir (1).

Moleküler teknikler ve diğer ileri yöntemler

İshallerde çocukların dışkılarında rotavirus çok büyük miktarlarda bulunduğu için, ekstraksiyonu takiben nükleik asit segmentleri doğrudan akrilamid jelde elektroforez uygulanarak ve gümüş nitrat ile boyanarak gösterilebilirler. Bu teknik (PAGE) EIA kadar duyarlıdır. PAGE ile insan rotavirüs grup A, B ve C'nin ayrımı da yapılabilir. Ancak PAGE zahmetli bir tekniktir ve rutin kullanıma uygun değildir (16).

RT-PCR dışkıda çok az sayıda rotavirüsü bile saptayabilecek derecede yüksek duyarlılıktadır. Yüksek duyarlılığı nedeniyle -düşük viral yükte bile pozitif sonuç elde edilebildiği ve gerçekte semptomlardan başka bir patojenin sorumlu olduğu durumda da yanlışlıkla rotavirus enfeksiyonu şeklinde tanı konmasına neden olabildikleri için- RT-PCR ve gerçek zamanlı RT-PCR tanı testi olarak önerilmez (16,17). RT-PCR daha ziyade, gastrointestinal sistem dışı örneklerde rotavirüsün gösterilmesinde, suş genotiplerinin belirlenmesinde ve ileri analizler için kullanılmaktadır.

Rotavirüs serotipleri EIA ve RT-PCR kullanılarak doğrudan rotavirüs pozitif dışkı örneklerinden tespit edilebilir.

Monoklonal antikor tabanlı EIA teknikleri dünya genelinde en yaygın olan, dolaşan kökenlerin >%90'ını temsil eden ve aşı bileşiminin 4/5'ünü oluşturan dört serotipin (G1-G4) tanımlanmasında çok değerlidir.

Yakın zamanlarda, temsili serotipler için moleküler yöntemler (özellikle multipleks, semi-nested RT-PCR genotiplendirme ve sekanslama) geliştirilmiş ve en sık görülen rotavirüs serotipleri ile birçok nadir G ve P genotiplerini tanımlamak üzere yaygın kullanılır hale gelmiştir (1).

Nükleotid sekanslama daha ziyade RT-PCR genotiplenmesinde tespit edilemeyen nadir suşları ve genetik varyantları belirlemek için ve ayrıca genotiplendirme sonuçlarını teyit etmek için kullanılmaktadır (1).

Elektron mikroskopi yüksek düzeyde özgüdür. Duyarlılığı da bazı EIA testleri kadar iyidir. Ancak yoğun iş yükü ve çok pahalı donanım gerektirmesi nedeniyle rutin kullanılmaz. Rotavirüsler arasında ayırım yapmaya da elverişli değildir (16).

Rotavirüsler MA104 ve primer Afrika yeşil maymun böbrek hücre kültürlerinde üretilmektedir. Hücre kültürünün duyarlılığı oldukça düşüktür ve rutin tanıda kullanıma uygun değildir (16).

Rotavirüs antijenleri, hastalık başladıktan 3-7 gün sonra serumda da saptanabilir. Fakat rutin tanı testleri primer olarak serumda antijen araştırılmasına yönelik değildir (12).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizma(lar)

Rotavirüs

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

Rotavirüsler Risk Grubu 2 mikroorganizmalardır ve bu organizmalarla ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün klinik örnekler enfeksiyöz kabul edilmeli, daima standart önlemler uygulanmalı, önlemler risk değerlendirmesi ile de desteklenmelidir. Aerosol oluşturması muhtemel tüm laboratuvar çalışmaları bir biyolojik güvenlik kabini içinde yapılmalıdır (ayrıca bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) yöntem(ler)i uygulamadan önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleriyle aşina olmalı, ve; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Hem güvenlik önlemlerine uyumun sağlanmasından hem de testlerin standart prosedürlere uygun yapılmasından ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, Reaktif, Kit, Donanım

İnceleme örneği (16)

- Dışkı örneği ve kusmuk – Dışkı öncelikle tercih edilir. Akut gastroenterit nedeniyle hastanede yatan ve/veya acilde gözlem altında tutulan 0-59 aylık çocuklardan ilk muayenede 1-2 mL ya da 1-2 g dışkı örneği alınmalıdır.
- Bezli çocuklarda bez ters bağlanarak spatula ile dışkı örneği alınabilir.
- Seçilecek inceleme örnekleri, özellikleri, alınması ve gönderilmesi ile ilgili bilgi için ayrıca *bkz.* "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"

Örnek ret kriterleri

- Pamuk uçlu veya tahta saplı eküvyon ile alınmış; uygun örnek kabına konmamış; kabının dışına sızmış; önerilen süre içerisinde ve uygun sıcaklıkta gönderilmemiş; kabının üzerinde hasta ve örnek bilgileri yazılı olmayan; hastaya ait uygun bir istek formu düzenlenmemiş örnekler laboratuvara kabul edilmez.
- Biyolojik materyal taşıma şartlarına uygun (18) gönderilmemiş örnekler laboratuvara kabul edilmez.
- 5 yaş üzeri çocuklardan alınan örnekler veya uzamış (≥ 14 gün) diyaresi olan ya da başka bir nedenle hastaneye yatırılan hastalardan (ishal varlığına rağmen) alınan örnekler veya hastaneye başvurduktan 48 saat sonra alınan örnekler rotavirüs incelemesi için laboratuvara kabul edilmez.

Reaktif / Kit

- EIA/ELISA kitleri
- Lateks aglütinasyon test kitleri
- ICT kitleri
- RNA ekstraksiyon ve RT-PCR kiti

Diğer gereç, donanım

EIA için;

- ELISA okuyucu, yıkayıcı
- Ayarlanabilir otomatik mikropipetler (5-1000 μ l) ve pipet uçları

PCR ve diğer moleküler testler için;

- En az üç ayrı oda - Nükleik asit ekstraksiyonu, PCR karışımının hazırlanması, amplifikasyonun ve sonuç gözetiminin yapılabileceği ayrı odalar. İdeal olarak PCR karışımı hazırlama odası (temiz oda) pozitif basınçlı, agaroz jel elektroforezi yapılan oda (kirli oda) negatif basınçlı havalandırmaya sahip olmalıdır.
- Donanım – biyogüvenlik kabini, soğutmalı mikrosantrifüj, hassas terazi, vorteks, su banyosu, yatay çalkalayıcı, PCR ısı döngü cihazı, mikrodalga fırın, jel görüntüleme sistemi, elektroforez ünitesi vb.

2.4. Kalite kontrol

- Referans laboratuvarlardan sağlanan rotavirüs pozitif ve negatif standartlar (dış kalite kontrol örnekleri) testlerde kontrol örneği olarak kullanılmalıdır.
- Her testte klinik örneklerin yanında pozitif ve negatif kontroller de çalışmalıdır.
- Laboratuvarlar, belirli aralıklarla pozitif buldukları dışkı örneklerini referans laboratuvara göndererek kendilerini kontrol etmelidir (16).

3 Rotavirüs tanısında kullanılan teknikler

Akut gastroenteritli çocukların dışkılarında yüksek miktarda virüs bulunması nedeniyle laboratuvar tanı yöntemlerinin çoğu ile pozitif sonuç alınabilmektedir.

Testlere geçilmeden önce örnekler ön hazırlık aşamasından geçirilir.

3.1. Ön hazırlık işlemleri¹⁶

- Santrifüj tüpüne sırasıyla 5 adet cam boncuk, 0.5 mL kloroform, 10 mL PBS dağıtılır.
- Her dışkı örneğinden yaklaşık 2 g santrifüj tüpüne aktarılır.
- Santrifüj tüpünün ağzı sıkıca kapatıldıktan sonra vortekslenir, tüpteki dışkı parçalanıncaya kadar karıştırılır.
- Örnek tüpü, soğutmalı santrifüjde (4°C) 3500 rpm'de 20 dk santrifüj edilir. Süpernatant berrak değilse kloroform muamelesi tekrarlanır.
- Süpernatant antijen saptama veya moleküler çalışmalar için kullanılır.

3.2. Antijen saptama teknikleri

- Enfeksiyonun başlangıcından itibaren yedi gün içinde **dışkıda antijen** saptanabilir.
- Bu amaçla EIA, lateks aglütinasyon ve ICT kullanılabilir (bkz. Şekil 1)

EIA

- EIA, özgüllük ve duyarlılığının yüksek ($\geq 95\%$) olması nedeniyle rotavirüslerin laboratuvar tanısında en yaygın kullanılan yöntemdir.
- Diğer antijen arama testleri lateks aglütinasyon veya ICT ile negatif bulunan örnekler gerek görülüyorsa EIA ile de test edilmelidir .
- EIA kitlerinin bazıları **monoklonal** antikor ile hazırlanmışken (ör., Rotaclone ve Pathfinder Rotavirus), diğerleri **poliklonal** antikor bazlıdır (ör., Rotavirus Immunoassay, Rotazyme II, ve Wellcozyme Rotavirus) (19). Monoklonal antikor içeren testlerin duyarlılığı oldukça yüksek (%100), poliklonal antikor bazlı testlerin duyarlılığı %90'dan fazla fakat özgüllükleri değişkendir. Rotazyme II'nin özgüllüğü %50'ye kadar inmektedir (19).

- DSÖ, sörveyans çalışmalarında kullanılabilir iki ticari EIA kitini önermektedir. Bunlar "Premier™ Rotaclone" (Meridian Biosciences; Cincinnati, Ohio) ve "IDEIA™ Rotavirüs" (Oxoid (Ely) Limited Thermo Fisher Scientific, Cambridgeshire, United Kingdom) kitleridir (16).

Lateks aglütinasyon testleri

- Grup A rotavirüs enfeksiyonlarının tanısında kullanılan pratik ve maliyet etkin testlerdir (16).
- Özgüllükleri genellikle yüksektir (%82-99) (20,21). Hasta kaynaklı özel durumlar hariç hatalı pozitif sonuçlar beklenmemektedir.
- Duyarlılıkları (%68-83) PCR'dan düşük, elektron mikroskopiden yüksek, EIA'ye eşit veya ondan biraz daha azdır (20-22).
- Dört ticari lateks aglütinasyon testinin (Rotastat, Virogen Rotatest, Meritec-Rotavirus, ve Wellcome Latex Test) duyarlılıkları %70-90, özgüllükleri %80-100 arasında değişmektedir (19).

İmmünokomotografik testler (ICT)

- Nispeten ucuz, kullanımı kolay 'dip-stick' tarzı testlerdir. Şeritler üzerinde VP6'ya karşı hazırlanmış monoklonal antikor içerirler.
- Bu kitlerin (IP-Rota V, Dipstick Eiken ROTA, ROTA-ADENO, ASAN Easy Test Rota Strip), RT-PCR ile karşılaştırıldığında duyarlılık (%87-100) ve özgüllükleri (%88-100) oldukça yüksektir (20, 23).

3.3. Moleküler teknikler

- Klinik örnekte rotavirüs saptamak amacıyla geliştirilmiş olan RT-PCR uygulamalarında virüsün VP6 iç kapsit proteinini kodlayan gen hedef alınmaktadır.
- RT-PCR; rotavirüslerin saptanmasında duyarlılığı en yüksek olan yöntemdir. Mevcut kitlerin çoğu serogrup A rotavirüsü saptamaya yöneliktir. Gerçek zamanlı RT-PCR kullanıldığında duyarlılık 2-4 log daha da artmaktadır (16). Ancak, RT-PCR tanı testi olarak önerilmez. Nedeni yüksek duyarlılığıdır; çok düşük viral yükte bile pozitif sonuç verir; gerçekte semptomlardan başka bir patojen sorumlu olduğu halde tanının hatalı olarak *rotavirüs enfeksiyonu* şeklinde konmasına yol açabilir (16,17).
- Genotiplerin belirlenmesi için PCR uygulamasının ilk aşamasında yaygın insan P ve G genotiplerini saptayacak konsensus primerler, ikinci aşamada VP7 (G genotipler) ve VP4 (P genotipler) içerisindeki genotiplere spesifik primerlerin kullanıldığı kısmi-nested multipleks PCR uygulanmaktadır.
- PCR yöntemiyle genotipleri belirlenemeyen örnekler, nükleik asit dizi analiz işlemine alınır (16,24).

3.4. Saklama, Referans merkeze gönderme

- Dışkı örnekleri antijen taraması yapılana kadar (en fazla 7 gün) +4°C'de tutulabilir. Daha uzun süre için örnekler -80°C'ye kaldırılır ve bu süreçte dondurma ve çözme işlemi yapılmaz (16).

- Derin dondurucuda saklanan örneğe eğer birden fazla kez başvurulacaksa dondurma-çözme işleminden kaçınmak için orijinal örnek vida kapaklı tüplere alikotlar halinde bölünmeli, üzerlerine hasta bilgileri de yazılarak dondurucuya kaldırılmalıdır.
- İdeal olan, dışkı örneğine, alındığı yerde yukarıda "4.1 Ön hazırlık işlemleri" başlığı altında anlatılan işlemlerin uygulanması ve elde edilen süpernatanın 1-2 mL'sinin laboratuvara gönderilmesi veya saklanmasıdır. Bu süpernatın bir haftaya kadar buzdolabında tutulabilir; daha uzun süreli saklama gereksinimi için küçük (0.5 mL) alikotlar (en az 3 alikot) halinde derin dondurucuya (-80°C) kaldırılır.
- Antijen pozitif olan örnekler moleküler analizler için Ulusal Referans Merkez Laboratuvarına gönderilir.
- Örneklerin gönderilmesinde *paketlenme* ve *taşıma* biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (18) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).

4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim

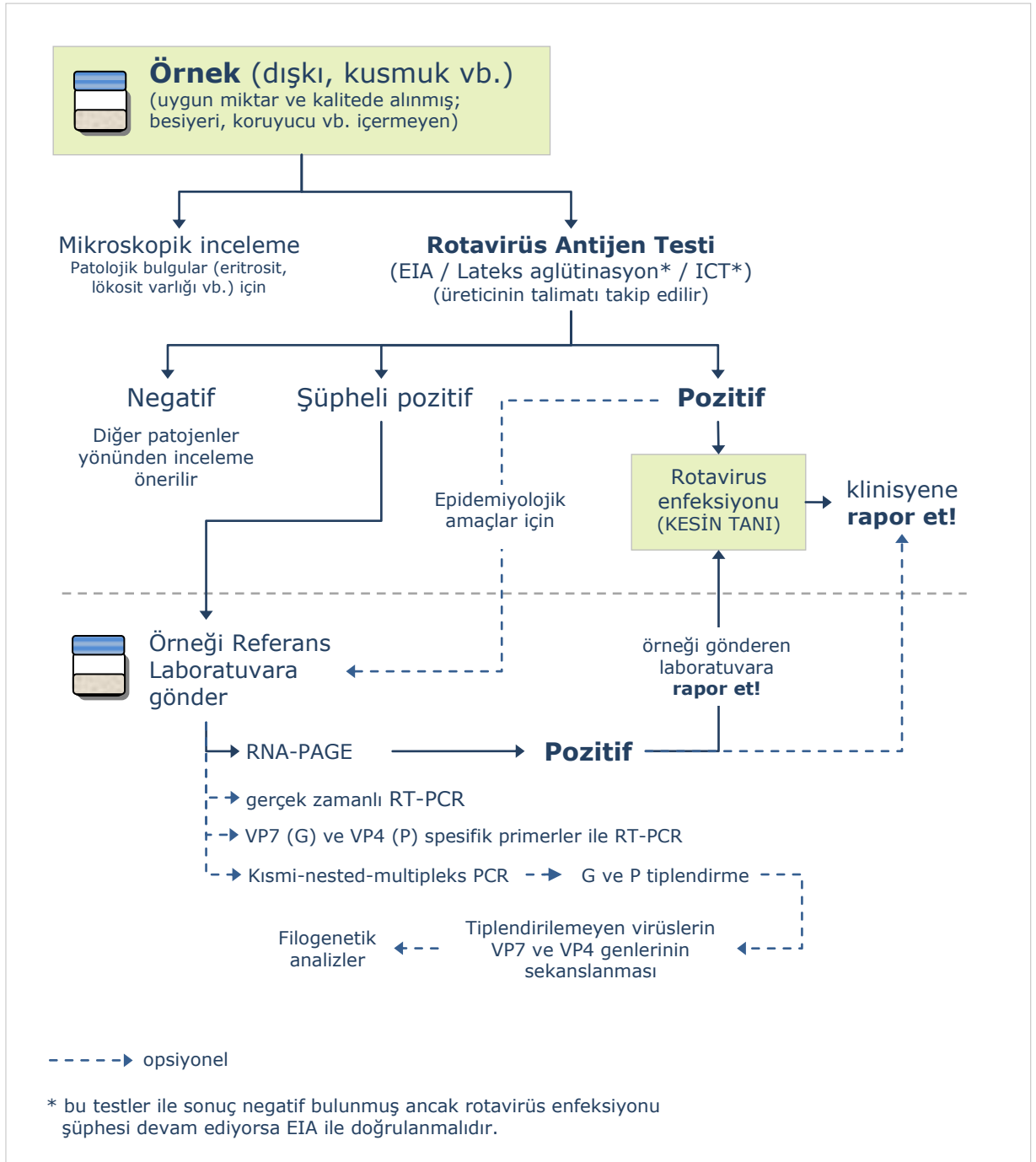
- Rotavirüs enfeksiyonu tanısı için direkt viral antijen arama yöntemleri ile pozitif sonuç – "**kesin tanı**" bulgusudur.
- Rotavirüs tanısı için nükleik asit amplifikasyon (RT-PCR veya gerçek zamanlı RT-PCR) veya nükleik asit saptama (PAGE) yöntemleri ile pozitif sonuç – "**kesin tanı**" bulgusudur.
- Antijen arama testi sonucu örneği gönderen klinisyene / merkeze en kısa sürede (örnek laboratuvara geldiğinden itibaren 24 saat) içinde rapor edilmelidir.
- Genotiplendirme ve moleküler çalışmaların sonuçları testi talep eden hekime ve/veya laboratuvara bildirilir.

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Uygun zamanda alınmayan örneklerde pozitif sonuç alınmasında sorun yaşanabilir. Örnek alınmasında, taşınmasında ve saklanmasında önerilen şartlara uyulmaması da hatalı pozitif ve negatif sonuçlara neden olabilir.
- Viral kültür veya moleküler testler için örnek alırken her zaman sentetik (dakron ya da rayon uçlu) eküvyonlar tercih edilmelidir. Kalsiyum aljinatlı, pamuklu ve ahşap saplı eküvyon kullanılmamalıdır. Virüsler inaktive olabilir, PCR'da inhibitör etki yapabilirler.
- Lateks aglütinasyon testlerinin nispeten düşük olan duyarlılıklarından kaynaklanan hatalı negatiflikler ve nadiren de hatalı pozitiflikler olabilir. Benzer sorunlar daha düşük olmakla birlikte ICT'lerde de yaşanmaktadır. Bu kitlerden alınmış beklenmedik test sonuçlarının EIA testleriyle doğrulanması önerilir.

6 Rotavirüs tanısı için akış şeması

Rotavirüs enfeksiyonu şüphesinde kullanılan tanı yöntemleri ve karar adımları Şekil 1'de özetlenmiştir.



Şekil 1. Rotavirus enfeksiyonu şüpheli vakaların tanısı için önerilen akış şeması. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında rotavirüs antijen testleri kullanılır. Tanı daha ziyade sürveyans amaçları için olup gerektiğinde nükleik asit analizleri ve moleküler tiplendirme çalışmaları ile desteklenir.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Rotavirüs Enfeksiyonunun Mikrobiyolojik Tanısı) ayrıca aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve ilave bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

- UMS, V-MT-03 Norovirüs enfeksiyonunun mikrobiyolojik tanısı
 UMS, GEN-OY-01 Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Payne DC, Wikswo M, Parashar UD. Chapter 13: Rotavirus. VPD Surveillance Manual, 5th ed, Center for Diseases Control and Prevention (CDC). 2011.
<http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/surv-manual/chpt13-rotavirus.pdf> (son erişim tarihi: 04.01.2014)
- 2 Dormitzer PR. Rotaviruses. Chapter 146. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed. Churchill Livingstone. 2005.
- 3 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014).
- 4 World Health Organization. International travel and health. *Rotavirus*.
<http://www.who.int/ith/diseases/rotavirus/en/> (son erişim tarihi: 15.12.2013).
- 5 Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, et al. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2012;12(2):136-41.
- 6 WHO. Rotavirus vaccines WHO position paper-January 2013. *Wkly Epidemiol Rec* 2013;88(5):49-64.
- 7 El Khoury AC, Mast TC, Ciarlet M, Markson LE, Goveia MG. Projecting the effectiveness of RotaTeq® against rotavirus-related hospitalizations and deaths in six Asian countries. *Hum Vaccin* 2011;7(5):506-10.
- 8 Martínón-Torres F, Bouzón Alejandro M, Redondo Collazo L, Sánchez Lastres JM, Pértega Díaz S, Seoane Pillado MT, Martínón Sánchez JM; ROTACOST research team. Effectiveness of rotavirus vaccination in Spain. *Hum Vaccin* 2011;7(7):757-61
- 9 Goldman RD. Effectiveness of rotavirus vaccine in preventing severe acute gastroenteritis in children. *Can Fam Physician* 2012;58(3):270-1.
- 10 Butz AM, Fosarelli P, Kick J, Yolken R. Prevalence of rotavirus on high-risk fomites in daycare facilities. *Pediatrics* 1993;92:202-5.
- 11 Dennehy PH, Nelson SM, Crowley BA, Saracen CL. Detection of rotavirus RNA in hospital air samples by polymerase chain reaction (PCR). *Pediatr Res* 1998;43:143A.
- 12 CDC. Rotavirus. <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/rota.html#diagnosis>. (son erişim tarihi: 15.12.2013)
- 13 Patton JT. Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world. *Discov Med*. 2012;13(68):85-97.
- 14 Kirkwood CD. Genetic and antigenic diversity of human rotaviruses: potential impact on vaccination programs. *J Infect Dis* 2010;202(Suppl:S43-8).

- 15 Matthijnssens J, Heylen E, Zeller M, Rahman M, Lemey P, Van Ranst M. Phylodynamic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. *Mol Biol Evol* 2010;27(10):2431-6.
- 16 WHO. Manual of rotavirus detection and characterization methods. http://whqlibdoc.who.int/hq/2008/who_ivb_08.17_eng.pdf (son erişim tarihi: 15.12.2013).
- 17 WHO. Generic protocol for monitoring impact of rotavirus vaccination on gastroenteritis disease burden and viral strains. http://whqlibdoc.who.int/hq/2008/WHO_IVB_08.16_eng.pdf (son erişim tarihi: 15.12.2013).
- 18 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.
- 19 Dennehy PH, Gauntlett DR, Tente WE. Comparison of nine commercial immunoassays for the detection of rotavirus in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 1988;26(9):1630-4.
- 20 Wilhelmi I, Colomina J, Martin-Rodrigo D, Roman E, Sanchez-Fauquier A. New immunochromatographic method for rapid detection of rotaviruses in stool samples compared with standard enzyme immunoassay and latex agglutination techniques. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:741-3.
- 21 Pereira LA, Raboni SM, Nogueira MB, Vidal LR, Almeida SM, Debur MC, Cruz C. Rotavirus infection in a tertiary hospital: laboratory diagnosis and impact of immunization on pediatric hospitalization. *Braz J Infect Dis* 2011;15(3):215-9.
- 22 Lee SY, Hong JH, Lee SW, Lee M. Comparisons of latex agglutination, immunochromatography and enzyme immunoassay methods for the detection of rotavirus antigen. *Korean J Lab Med* 2007;27(6):437-41.
- 23 Khamrin P, Tran DN, Chan-it W, Thongprachum A, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Comparison of the rapid methods for screening of group a rotavirus in stool samples. *J Trop Pediatr* 2011;57(5):375-7.
- 24 Iturriza-Gomara M, Kang G, Gray J. Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *J Clin Microbiol* 2004;31:259-265.

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Poliomyelitin (Çocuk Felcinin) **Mikrobiyolojik Tanısı**

Hazırlayan Birim	Klinik Viroloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Viroloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	V-MT-05
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	4
Hastalığın önemi.....	4
Klinik özellikler.....	4
Virüsün özellikleri	5
Laboratuvar tanısı.....	5
TEKNİK BİLGİLER	5
1 Hedef mikroorganizmalar	5
2 Tanı için asgari laboratuvar gerekleri	5
3 Poliomyelit tanısında kullanılan teknikler	7
4 Raporlama, bildirim.....	8
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	8
6 Referans Laboratuvarlar	8
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	8
KAYNAKLAR.....	9

Kapsam ve Amaç

Poliomyelit çocuk ölümlerinin ve sakatlıkların önemli nedenlerinden biri olup DSÖ tarafından yürütülmekte olan bir program ile tüm dünyadan eradikasyonu hedeflenmiş bir hastalıktır (1). Konulan hedef, her AFP vakasının ivedilikle araştırılmasını da içeren yüksek düzeyde duyarlı bir sürveyans gerektirmektedir.

Poliomyelit tanısı bu nedenle DSÖ tarafından onay verilmiş ulusal referans laboratuvarlarda ve yine DSÖ tarafından belirlenmiş standart yöntemlerle konur. Bir diğer ifade ile poliomyelit tanısı klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının çalışma kapsamına dahil değildir. Ancak, klinik laboratuvarların poliomyelit tanısı ile ilgili olarak gerektiğinde -danışmanlıklarına başvuran- kişileri/çevreleri doğru bir şekilde yönlendirebilmeleri beklenir. Ayrıca az sayıda da olsa enterovirüs kültürü yapabilen laboratuvarların -şüpheli izolasyonlarının teyidi için- ulusal referans laboratuvarlar ile işbirliği yapma sorumlulukları vardır.

Bu noktalardan hareketle, bu UMS'de klinik laboratuvarların bilgilendirilmesi amacıyla örnek yönetimi hususları, sorumluluklar ve tanıda kullanılan yöntemler özetlenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

AFP	Akut flask paralizi
CPE	Sitopatik etki
IATA	Uluslararası Hava Taşımacılığı Birliği. Tehlikeli maddelerin taşınmasıyla ilgili kuralları belirler
L20B	Polio reseptörleri ile transfekte edilmiş fare L hücrelerinden derive hücre hattı. Poliovirüs ve bazı diğer enterovirüslerin çoğalmasını destekler.
NIBSC	The National Institute for Biological Standards and Control. DSÖ tarafından polio referans suşlarının kullanımı önerilen kurum.
PEP	Polio Eradikasyon Programı
RD	Rabdomiyosarkom hücre hattı. Poliovirüs ve diğer pek çok enterovirüse duyarlıdır.
RIVM	National Institute for Public Health and the Environment (Hollanda). DSÖ'nün 'Polio Laboratuvar Ağı' içinde Türkiye'nin bağlı bulunduğu Bölgesel Referans Laboratuvarı.
VDPV	Vaccine derived polio virus

Genel Bilgi

Hastalığın önemi

Poliomyelit, poliovirüslerin yol açtığı, bulaşıcı, özellikle çocukları etkileyen, kalıcı felçlere ve ölümlere yol açan, aşı ile önlenabilir bir hastalıktır. Vahşi poliovirüs enfeksiyonunun yanı sıra aşya bağlı veya aşı türevi poliovirüslerin (VDPV) yol açtığı vakalar da görülebilir.

Poliovirüsler sadece insanları enfekte eder, hayvan rezervuarı yoktur. Sanitasyonun kötü olduğu ülkelerde ve 5 yaş altı çocuklarda görülme sıklığı fazladır. Fekal-oral yolla bulaşır. Sıcak ve nemli mevsimlerde daha sık görülür.

Eradikasyon programı (PEP) ülkemizde 1989 yılından bu yana yürütülmektedir. En son yerli vahşi poliovirüs 1998 yılında saptanmış ve takip eden dönemde Avrupa bölgesi ülkeleri ile birlikte Türkiye de "poliodan arındırılmış bölge" sertifikası almıştır. Bu durumun sürdürülmesi için sürveyans esastır.

PEP'e göre her "olası vaka" örneklerinin laboratuvara incelemeye gönderilmesi zorunludur (bkz. Kutu 1) (2). Bunun için Halk Sağlığı Müdürlüğü ile iletişime geçilir ve prosedüre göre alınan örnekler ilgili Referans Laboratuvara gönderilir (3,4). Ülkemizde, Ankara'da Ulusal ve İzmir'de Alt-Ulusal olmak üzere iki Polio Referans Laboratuvarı mevcuttur (adres ve iletişim bilgileri için bkz. sayfa 6).

Klinik özellikler

Virüs ağız yoluyla alındıktan sonra farinks ve bağırsaklarda çoğalır, 4-6 hafta boyunca dışkı ile atılır. Bazı vakalarda bu süre daha uzun olabilir. Kan yoluyla sinir sistemine ulaşan virüs, seçici olarak motor nöronları tutar.

Enfeksiyon çoğunlukla asemptomatik (%90) olabildiği gibi, abortif (%8) ya da viral menenjit (%1) şeklinde veya paralitik (%1) seyir gösterebilir. Paralitik vakalarda kuluçka dönemi genellikle 1-2 haftadır. Bu süre 5 haftaya kadar uzayabilir (5). Poliovirüs enfeksiyonunda BOS'ta genellikle beyaz hücre sayısında artış (10-200 hücre/mm³, başlıca lenfositler) ve hafif protein artışı (40-50 mg/100 mL) gözlenir.

Ayırıcı tanıda özellikle Guillian-Barre Sendromu ve transvers myelit göz önünde bulundurulmalıdır (5).

KUTU-1

PEP, Poliomyelit Vaka Tanımları*

Olası vaka;

- 15 yaşından küçük bir kişide şiddetli travma dışında, herhangi bir nedenle AFP olması;
- Ancak 15 yaşından büyük kişilerde, yaşı ne olursa, olsun hekimin poliodan kuşkulandığı AFP'li hastalar da inceleme ve izleme alınmalıdır.

Kesin vaka;

- Olası vaka tanımı geçici bir sınıflandırmadır ve laboratuvar sonucuna göre "kesin polio", "olası polio" veya "polio değil" biçiminde yeniden sınıflandırma gereklidir.

* Ayrıntılı vaka tanımı için bkz. "Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. RG 02.04.2011 -27893" (Kaynak No. 2)

Virüsün özellikleri

Poliovirüsler *Picornaviridae* ailesi içinde *Enterovirus* cinsinde yer alan ikosohedral simetride, zarfsız, küçük, yuvarlak, 30 nm çapında, tek zincirli RNA virüsleridir. Poliovirüsün Tip 1, Tip 2, Tip 3 olmak üzere üç serotipi vardır (6).

İnfeksiyöz partiküller göreceli olarak asitlere, yaygın kullanılan deterjanların ve dezenfektanların büyük kısmına, eter, kloroform ve diğer yağ çözücülere ve magnezyum iyonları ile stabilize edildiğinde ısıya dirençlidir. pH 3-5'de 1-3 saat canlı kalır. Kuruluk, ultraviyole, yüksek sıcaklık, formaldehit ve serbest kloro ise oldukça duyarlıdır.

Laboratuvar tanısı

Laboratuvar tanısında poliovirüsün izolasyonu esastır. Poliovirüs duyarlı hücre kültürlerinde kolaylıkla üreyebilir ve dışkı, farinks ve nadiren BOS örneklerinden izole edilebilir. Laboratuvarda öncelikle tercih edilen örnek **dışkıdır**.

AFP'li bir olgudan poliovirüs izole edildiğinde, ayrıca, ileri teknikler ile virüsün "vahşi tip" (Tip 1, Tip 2 ya da Tip 3) ya da "aşı tipi" (VDPV) olup olmadığının da belirlenmesi gerekir. Tiplendirmede nötralizasyon, oligonükleotid haritalama ('fingerprinting') ve genomik sekanslama gibi teknikler kullanılmaktadır.

Nötralizan antikolar erken dönemde gelişir ve hasta hastaneye yatırıldığında yüksek seviyelere çıkmış olabilir; dört kat titre artışı tayin edilemeyebilir. Poliovirüsün bir tipi ile enfekte olmuş kişilerde o tipe karşı hayat boyu bağışıklık oluşur, ancak tipler arasında çapraz bağışıklık yoktur.

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizmalar

Poliovirüs Tip 1, Tip 2 ve Tip 3, VDPV, diğer enterovirüsler (ayırıcı tanı için)

2 Tanı için asgari laboratuvar gerekleri

2.1. Laboratuvar güvenliği

Polio İmportasyon Genelgesinde (3) belirtildiği üzere, poliomyelit tanısı Ulusal Referans Laboratuvarlarında yapılır. DSÖ tarafından 'BGD2-Polio' olarak özel bir biyogüvenlik düzeyi tanımlanmıştır ve poliovirüs çalışması için yetkilendirilmiş laboratuvarlar bu gerekleri karşılamakla yükümlüdür (7).

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Klinisyen vaka tanımına uygun AFP'den şüphelenir şüphelenmez Halk Sağlığı Müdürlüğü ve Referans Laboratuvar ile iletişim kurmalıdır (2,3).

Poliovirüs çalışması için yetkilendirilmiş laboratuvarın personeli asgari şu gerekleri karşılar: (i) organizmanın izolasyonu/tanımlanması süreçlerine dair bilimsel ve teknik bilgi ve tecrübeye sahip; (ii) DSÖ'nün laboratuvar güvenliği ve kalite gereklerine dair ilgili tüm eğitimleri almış; (iii) PEP'in önemine vakıf.

2.3. Örnek, Besiyeri, Donanım

İnceleme örneği

- Dışkı – Polio tanısında ilk tercihtir.
 - (a) 15 yaş altı ve travma nedeniyle oluşmamış AFP vakalarından, paralizisi başlama tarihinden itibaren tercihen 7 gün içinde olmak üzere, ilk 14 gün içinde 24-48 saat arayla iki örnek, 5 yaş altı 5 temaslısından da birer örnek alınmalıdır.
 - (b) 15 yaş üstü AFP vakalarından alınan örnekler eğer hekim klinik olarak polio düşünüyorsa incelemeye alınır; değilse ret edilir.
 - (c) Travmaya bağlı olduğu kesin bilinen AFP vakalarının örnekleri polio incelemesine kabul edilmez.
 - (d) İnceleme örneğinin alınması, gönderilmesi ve laboratuvara kabulü ile ilgili diğer kriterler ve bilgi için ayrıca "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"ne ve "Polio Eradikasyonu Saha Rehberi"ne başvurulmalıdır (4).
 - (e) Sağlık kurumları kuşkulu vakaları Halk Sağlık Müdürlüğü PEP sorumlusuna bildirmek ve onların aracılığı ile örnekleri Referans Laboratuvarına göndermekle yükümlüdür.
- Enterovirüs pozitif örnekler – Herhangi bir nedenle araştırmaya alınmış ancak tiplendirilememiş bu tip örnekler ileri inceleme için Ulusal Referans Laboratuvarlarından birine gönderilmelidir (2,3).

Besiyeri

- DSÖ tanı kriterleri gereği L20B ve RD hücre hatları

Hücre kültürü laboratuvarı altyapısı ve donanımı

- İvert mikroskop
- Sınıf-IIA BGK, sertifikalı
- -80°C derin dondurucu, sıvı azot tankı

2.4. Kalite kontrol

Polio tanısı için yetkilendirilmiş laboratuvarların kalite kontrol çalışmaları DSÖ denetiminde ve işbirliğinde sürdürülür. Bu çalışmalar kapsamında;

- Her yıl için DSÖ tarafından uygulanan akreditasyon gözden geçirmesine ve dış kalite kontrol uygulamasına tabi olunur.
- Yalancı negatif sonuçların önlenmesi için hücrelerin hedef virüslere duyarlılığından emin olunmalıdır. Bu amaçla NIBSC Sabin 1-Sabin 2-Sabin 3 suşları kullanılarak hazırlanmış, titresi ve hücre duyarlılığında kabul edilir sınırları belirlenmiş kalite kontrol virüsleri kullanılır.
- Tüm reaktifler sterilite testine tabi tutulduktan sonra kullanıma alınır.

- Kullanılan hücre kültürleri en geç 3 ayda bir veya 16 pasajın sonunda atılır ve yeni hücreler kullanıma alınır.
- Yeni canlandırılan hücre hatları için laboratuvar kalite kontrol suşları ile hücre duyarlılık testi yapılır. Test sonucu kabul edilen değerleri taşıyan hücre hatları kullanıma alınır.
- Hücre kültürleri mikoplazma kontaminasyonu açısından test edilerek izlenir. Hücre kültürleri, virüslerle kontamine olmaması için, fiziksel olarak ayrılmış bölümlerde hazırlanır.

3 Poliomyelit tanısında kullanılan teknikler

3.1. Kültür

- Poliomyelit tanısında hücre kültürü 'altın standart'tır. Daha hızlı sonuç vermesi ve yüksek duyarlılığı nedeniyle PCR yöntemlerinin kullanımı artmış olsa da kültür referans laboratuvarlar için birincil yöntemdir; çünkü virüsün elde edilmesi daha ileri analizler ve araştırmalar için esastır.
- Dışkı örneklerinden hazırlanan süspansiyonlar bakteri geçirmeyen filtrelerden süzöldükten sonra hücre kültürlerine pasajlanır; inkübe edilir ve invert mikroskopta CPE, toksisite, dejenerasyon veya kontaminasyon varlığı açısından incelenirler.
- 5-7'şer günlük 2 pasaj süresince CPE saptanmayan örnekler "negatif" olarak değerlendirilir.
- CPE saptanan örnekler RIVM tarafından hazırlanmış poliklonal antiserumlar ile nötralizasyon testine alınır. Poliovirüs saptanan örneklerin tip-içi tanımlaması ise Bölgesel Referans Laboratuvarında (RIVM) yapılır.

3.2. Moleküler tanı

- Primer örnekten veya hücre kültürü izolatlarından virüsün saptanması, tip-içi tanımlama ve genotipik inceleme için gerçek zamanlı RT-PCR yöntemleri kullanılır.

3.3. Saklama, Referans merkeze gönderme

- İşleme alınmış tüm örnekler çalışması tamamlanana kadar saklanır. Laboratuvarın kapasitesi yeterli ise hasta örnekleri 1 yıl saklanır ve sonra otoklavlanarak imha edilir.
- İzolatlar da analiz sonuçları poliovirüs kuşkusunu ortadan kaldırdığında otoklavlanarak veya yakılarak imha edilir.
- Hücre kültüründe CPE veya poliovirüs saptanan veya tiplendirilemeyen tüm örnekler ve izolatlar ivedi olarak RIVM'e gönderilir.
- Bir klinik laboratuvarda herhangi bir nedenle araştırmaya alınmış ancak tiplendirilememiş enterovirüs izolatları ileri inceleme için Ulusal Referans Laboratuvarlarından birine gönderilmelidir.

- İnsanları etkileyen enfeksiyöz maddelerin taşınması için IATA kuralları gereğince 3'lü paketleme sistemi kullanılır. Şüpheli örnekler ve izolatlar UN2814 koduna uygun olarak gönderilir (8,9). (ayrıca bkz. "UMS, GEN-OY-01 Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi")

4 Raporlama, bildirim

- Analizler en geç 20 gün içinde tamamlanır. Negatif sonuçlar hemen Halk Sağlığı Müdürlüğü ve THSK PEP sorumlusuna raporlanır.
- Poliovirüs saptandığında, hemen gönderen Halk Sağlığı Müdürlüğü ve THSK PEP sorumlusu bilgilendirilir. RIVM'e gönderilen izolatların tip-içi tanımlama sonuçları geldikten sonra kesin rapor hazırlanarak gönderen kurum ve PEP sorumlusuna bildirim yapılır.

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Uygun örnek alınmaması, saklanması ve transfer koşullarının yerine getirilmemesinden kaynaklanan hatalı sonuçlar olabilir.
- Hücre hatlarının poliovirüslere duyarlılığından emin olunmalıdır.

6 Referans Laboratuvarlar

Ulusal Referans Laboratuvarı

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal Polio Referans Laboratuvarı
Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55, F Blok 1.kat
06100 – Sıhhiye/ANKARA

Tel: 0 312 565 5340 / 5556 www.thsk.gov.tr

Alt-Ulusal Referans Laboratuvarı

İzmir Halk Sağlığı Laboratuvarı
52/18 sk. No:4 Poligon / İZMİR
Tel: 0232 224 1212 / 1213

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Poliomyelitin Mikrobiyolojik Tanısı) ayrıca aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve ilave bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

UMS, GEN-OY-01 Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 WHO. Polio laboratory manual. World Health Organization, Geneva, WHO/IVB/04.10., 2004.
- 2 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 3 Polio importasyon planı genelgesi. T.C. Sağlık Bakanlığı. Genelge No: 2002/67, Tarih / Sayı: 05.07.2002 / 6191
- 4 Saraç A, Tümay Ş, Noyan N. Polio Eradikasyonu Saha Rehberi. Temel Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Sağlık Projesi Genel Koordinatörlüğü. Ankara, 1999.
- 5 Tümay Ş, Saraç A, Torunoğlu MA, Emiroğlu N. Poliomyelit eradikasyonu klinisyen el kitabı. Temel Hizmetleri Genel Müdürlüğü. Ankara, 2004.
- 6 Pallansch M, Roos R. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Knipe D, Howley P, Griffin D, Lamb GA, Martin M, Roizman B, Straus S (eds). *Field's Virology*. 4th ed., Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA. 2001, p. 723–75.
7. WHO global action plan for laboratory containment of wild polioviruses. World Health Organization, Geneva, WHO/V&B/99.32,1999.
- 8 Guidance on Regulations for the Transport of Infectious Substances, 2013–2014. World Health Organisation. WHO/HSE/GCR/2012.12, 2012.
- 9 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Kabakulak Enfeksiyonunun Mikrobiyolojik Tanısı

Hazırlayan Birim	Klinik Viroloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Viroloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	V-MT-06
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
Hastalığın önemi.....	3
Virüsün özellikleri	3
Klinik özellikleri	4
Korunma	4
Laboratuvar tanısı.....	5
TEKNİK BİLGİLER	6
1 Hedef mikroorganizma	6
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	6
3 Kabakulak tanısında kullanılan Tanı teknikleri.....	8
4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim	10
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	11
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	12
KAYNAKLAR.....	12

Kapsam ve Amaç

Kabakulak genellikle çocukluk yaş grubunda, parotis bezlerinin şişmesi ile karakterli ve tanısı yaygın olarak klinik bulgular temelinde konan bir viral enfeksiyondur. 2000'li yılların ortalarından itibaren ülkemizde sürveyans kapsamına alınmış; bildirim zorunlu hastalıklar listesine ve rutin ulusal aşılama programına dahil edilmiştir. Sürveyans laboratuvar tanısı gerektirmektedir (1,2). Hastalığın görülme sıklığının azalmasına paralel olarak laboratuvar tanısının önem kazanacağı da öngörülmektedir. Bu çerçevede, bu UMS belgesinde kabakulak tanısı için güncel ve geçerli yöntem ve yaklaşımların verilmesi hedeflenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

- MEM** Minimum Essential Medium
MMR Measles-Mumps-Rubella (aşısı)
SH Small hydrophobic (küçük hidrofobik)

Genel Bilgi

Hastalığın önemi

Kabakulak genellikle parotis olmak üzere bir veya daha fazla tükürük bezinin şişmesi ile karakterize akut viral bir hastalıktır. Bütün dünyada görülür. Aşılama programı uygulanmayan ülkelerde kabakulak daha çok 5-9 yaş grubunu etkileyen bir çocukluk çağı hastalığıdır; çocuklarda aseptik menenjit ve sensörinöral sağırılık, askeri personel arasında ise salgınların en sık nedenlerinden biridir (3,4). Ilıman iklimlerde kış sonu ve bahar aylarında pik yapar. Aşılama programı uygulanan bölgelerde artık mevsimsel özellik göstermediği, sporadik vakaların ve salgınların yıl boyunca meydana geldiği bildirilmektedir (5,6).

Kabakulağı halk sağlığı açısından önemli kılan özelliği salgınlar ile seyredebilmesi ve neden olduğu komplikasyonlardır. Kabakulak enfeksiyonu orşit, ooforit, menenjit ve işitme kaybı gibi ciddi komplikasyonlara sebep olabilir. Konjenital anomali ile ilişkili değildir, ancak kabakulağın gebeliğin ilk üç ayında spontan abortus riskini artırdığı (%25) bilinmektedir. Komplikasyonlar parotite eşlik edebilir veya parotit olmadan da ortaya çıkabilirler (7,8).

Virüsün özellikleri

Kabakulak enfeksiyonuna neden olan etken *Paramyxoviridae* ailesi içinde *Rubulavirus* cinsine ait kabakulak (mumps) virüsüdür. Aynı virüs ailesi içinde insan parainfluenza virüsleri de yer alır. Bu tek sarmal RNA virüsü, ısı (>50°C), UV ışık, asit pH, eter, kloroform ve formol ile kolayca inaktive olur (9).

Bütün parotit vakaları kabakulak enfeksiyonuna bağlı değildir. Özellikle sporadik vakalarda parainfluenza virüs tip 1 ve 3, influenza A virüs, Epstein-Barr virüs, coxsackie A virüs, echovirüs, HIV, lenfositik koryomenenjit virüs gibi birçok virüs etken olabilir ve ayırıcı tanı açısından önem kazanırlar. Parotit ilaçlar, tümörler, metabolik bozukluklar (şeker hastalığı, siroz), immünolojik hastalıklar ve tükürük bezi kanalı tıkanıklığı gibi bulaşıcı olmayan sebeplerle de meydana gelebilir. Ancak, epidemik parotite sadece kabakulak virüsü neden olur. (3,10)

İnsanlar kabakulak virüsü için tek konaktır. Virüs solunum damlacıklarının solunması veya solunum sekresyonlarına direkt temas sonucu bulaşır. Kabakulak kızamık ve suçiçeğine göre daha az bulaşıcı olsa da duyarlı bireyler arasında hızla yayılabilir; ilk kez karşılaştıklarında duyarlı bireylerin %85'i enfekte olur (9).

Klinik özellikleri

Kabakulak virüsü parotitin başlamasından önceki 7 gün ve sonraki 9 gün boyunca tükürükten izole edilebilir. Ancak en bulaşıcı dönem parotit başlamasından önceki 2 gün ile sonraki 5 gün arasındadır. Asemptomatik veya atipik enfeksiyonu olan kişiler de virüsü bulaştırabilir.

İnkübasyon süresi genellikle 16-18 gündür (12-25 gün). Hastalık birkaç gün süren düşük ateş, baş ağrısı, kas ağrısı, iştahsızlık ve halsizlik gibi genel semptomlarla başlar. Kabakulak enfeksiyonunun tipik belirtisi olan parotit vakaların %30-65'inde gelişir ve çoğunlukla çift-tarafli olup bazen tek taraflıdır. Hastalık genellikle 7-10 günde iyileşir. Çocuklarda kabakulak enfeksiyonlarının yaklaşık %50'sinde sadece genel belirtiler veya solunum yolu belirtileri görülür. Kabakulak enfeksiyonlarının %30 kadarı ise asemptomatik seyreder (3,7).

Komplikasyonlar, çocuklara göre erişkinlerde daha fazla görülür. Orşit puberte sonrası erkeklerin %20-30'unda genellikle tek taraflı oluşur. Testiküler atrofi olabilir, ancak sterilite nadirdir. Ooforit puberte sonrası kadınların %7'sinde gelişir. Semptomatik aseptik menenjit vakaların yaklaşık %15'e varan kadarında oluşur. Prognozu iyidir. Geçici sağırılık %4 oranında bildirilmiştir.

Gebeliğin ilk üç ayında geçirilen enfeksiyon spontan abortus riskini artırır. Diğer nadir komplikasyonlar ensefalit, pankreatit, miyokardit, mastit, poliartrit, tiroidit, nefrit ve kalıcı işitme kaybıdır (7,8).

Korunma

Kabakulak, aşıyla önlenabilir viral bir hastalıktır. Kabakulak aşısı canlı, atenüe bir aşı olup kabakulak virüsünün Jeryl-Lynn suşunu içerir ve uygulamada 'kızamık-kabakulak-kızamıkçık' (MMR) aşısının bir bileşenidir. Yeterli bağışıklık için iki doz MMR aşısı (ilk doz 12. ayda ve ikinci doz 4-6 yaşta, ilkökula girişte) uygulanır. Ülkemizde MMR aşısı 2006 yılından beri ulusal bağışıklama programı kapsamında uygulanmaktadır (11).

Klinik çalışmalar MMR aşısı için %95 koruyucu etkinlik bildirmiştir ve uzun süreli bağışıklık gelişir. Ancak, kabakulak salgınlarına dayalı bazı araştırmalar da aşının tek doz için ortalama %78 (%49-91) ve iki doz için ortalama %88 (%66-95) ile daha düşük etkinlik oranları olduğunu göstermiştir (3,12).

Aşılama kabakulak insidansını azaltmıştır, ancak yüksek aşılama oranlarının olduğu toplumlarda bile muhtemelen aşı başarısızlığına bağlı kabakulak salgınları (belirli bir bölgede ve sürede ≥ 3 vaka) ortaya çıkmaktadır (13). Kabakulak vakaları parotis şişliğinin başlamasından sonraki 5 gün süreyle izole edilmeli, okul, kreş veya işe gitmemelidir.

Laboratuvar tanısı

Kabakulağın klinik tanısı güvenilir değildir; tanının özellikle eğer parotit ile seyretmeyen şüpheli olgularda laboratuvar testleri ile doğrulanması gerekir.

Tanıda seroloji ilk seçenektir; kolay uygulanabilir. Bu amaç için en yaygın kullanılan test ise ELISA'dır. ELISA hem IgM hem de IgG için yaygın bir şekilde kullanılır ve kabakulak tanısında diğer serolojik yöntemlerden daha duyarlıdır.

Virüs nötralizasyon testi, kompleman fiksasyon, IFA ve hemagglütinasyon-inhibisyon testleri gibi diğer serolojik testler özgüllük ve duyarlılıkları düşük olduğundan dolayı artık yaygın olarak kullanılmamaktadırlar. Ayrıca nötralizasyon testi IgG ve IgM antikörlerini ayırt edemez.

IgM antikörleri hastalığın ilk birkaç günü içinde saptanabilir düzeylere yükselir. Ancak, kabakulak aşısının (MMR veya diğer) herhangi bir dozunu almış kişilerde IgM hiç görülmeyebilir veya kısa sürede kaybolabilir. Bu nedenle serum olabildiğince semptomları takip eden en erken dönemde alınmalıdır; bu serum IgM için ya da IgG serokonversiyon için akut faz serum olarak kullanılır. Konvalesan faz serumunun da 2 hafta sonra alınması önerilir (14).

Serolojik test sonuçlarının negatif bulunması, özellikle aşıli bireylerde, hastalığın tanısından uzaklaştırmamalıdır, çünkü testler yeterince duyarlı değildir ve semptomatik her vakanın enfeksiyonu saptanamayabilir. Bununla birlikte, diğer tanı olanaklarının yokluğunda (ve sürveyans kriterlerine göre) eğer vaka, *standart vaka tanımının* klinik kriterlerini karşılıyorsa **olası**, ya da epidemiyolojik olarak başka bir vaka ile ilişkili ise **kesin** vaka şeklinde rapor edilir (14,15).

Tanıda virüsün kültürlerden izolasyonu ve nükleik asidinin amplifikasyonu (RT-PCR) yöntemleri de kullanılabilir. Kabakulak virüsünün özellikle hastalığın ilk döneminde çeşitli klinik örneklerden (bukkal sürüntü, boğaz sürüntüsü, idrar, BOS gibi) izolasyonu mümkündür. Bu örneklerden PCR ile viral nükleik asitler de saptanabilir. Öncelikle tercih edilen örnek, parotis bezinin veya etkilenmiş diğer tükürük bezinin kanal ağzından eküvyon ile alınan sürüntü örneğidir. Maksimum viral yayılım, genel olarak kabakulak başladıktan hemen önce ve sonraki ilk 3 gün içinde ortaya çıkar, sonraki günlerde kabakulak virüsünü tespit oranı önemli ölçüde azalır. Duyarlılık belirtilerinin başlamasından 7 gün sonra hızla düşerse de aşılanmamış kişilerde 9. güne kadar izole edilebilir.

Hücre kültüründe virüsün izolasyonu kabakulak tanısı için 'altın standart' kabul edilir. Hücre kültüründe kabakulak izolasyon oranı RT-PCR testine göre düşüktür. Ancak RT-PCR testine göre yalancı pozitif sonuç ihtimali daha azdır.

Akut kabakulak enfeksiyonu tanısı için gerçek-zamanlı RT-PCR en duyarlı yöntemdir (7). RT-PCR özellikle önceden aşıli kabakulak şüphesi olan vakalarda tanı için en uygun testtir (16,17). RT-PCR bukkal sürüntü, boğaz sürüntüsü ve BOS örneklerinin incelenmesinde hücre kültürüne göre daha duyarlıdır. İdrar ve kan örneklerinde duyarlılık çok düşüktür.

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizma

Kabakulak virüsü

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

Kabakulak şüpheli enfeksiyonların tanısı asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün klinik örnekler enfeksiyöz kabul edilmeli, daima standart önlemler uygulanmalı ve önlemler risk değerlendirmesi ile desteklenmelidir. Aerosol oluşturması muhtemel tüm laboratuvar çalışmaları sertifikalı bir sınıf-IIA BGK içinde yapılmalıdır (ayrıca bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi"). Serum ayırma ve testlerin yapılması sırasında **daima** eldiven giyilmelidir

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) teknikleri uygulamadan önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleriyle aşina olmalı, ve; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır. Testlerin prosedürlere uygun gerçekleştirilmesinden ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, Reaktif, Kit, Donanım

Serolojik inceleme için örnekler

- Akut faz serum örneği
 - (a) Kabakulak IgM antikorlarını tespit için kullanılır.
 - (b) **Aşılanmamış** vakalarda parotit başlangıcından sonraki 5 gün içinde alınır. **Aşılı** vakalarda IgM tespiti için parotit başlamasından ≥ 10 gün sonra alınmasının daha uygun olduğu bildirilmiştir. Ancak aşılanmış kişilerde örnek alma zamanına bağlı olmaksızın tespit edilebilir IgM antikor olamayabilir (14).
 - (c) IgM negatif olması durumunda akut faz serum örneği saklanarak en az 14 gün sonra alınacak ikinci serum örneği ile birlikte kabakulak IgG antikor için test edilir.
 - (d) Akut faz serum örneği IgM pozitif ise, konvalesan faz örneği gerekli değildir ve kabakulak tanısı konur.
- Konvalesan faz serum örneği
 - (a) IgM test sonucu negatif veya belirsiz ise IgM antikor testini tekrarlamak ve konvalesan IgG antikor titresini test için ilk örneğin alınmasından en az 14 gün sonra konvalesan serum örneği alınır.

Hücre kültürü veya RT-PCR için örnekler

- Bukkal sürüntü örneği (yanak mukozası sürüntü örneği)
 - (a) Virüsün PCR ile tespiti veya kültürden izolasyonu için en iyi örnektir.
 - (b) Bukkal sürüntü ideal olarak parotit başlangıcından sonraki 3 gün içinde alınmalı ve 9 günü geçmemelidir. Aşılı kişilerde, bukkal sürüntü örnekleri kabakulak başlangıcından sonraki 3 gün içinde alınmalıdır.
 - (c) Bukkal sürüntü alınmadan önce parotis bezi bölgesine (kulağın ön ve altındaki bölge) yaklaşık 30 saniye masaj yapılmalıdır. Daha sonra üst ikinci molar dişe yakın yanak mukozasından sürüntü alınır. Parotis kanalı (Stensen kanalı) bu alana drene olur.
 - (d) Bukkal sürüntü bir sentetik eküvyon (dakron, rayon, 'flocked' vb.) eküvyon ile alınmalıdır. Eküvyon 2-3 mL VTM, MEM veya Hanks dengeli tuz çözeltisine veya PBS'ye konur.
- Boğaz sürüntüsü (orofarinks veya nazofarinks sürüntüsü)
 - (a) Orofarinks veya nazofarinks sürüntüsü alınabilir ve bukkal sürüntü ile birlikte gönderilebilir.
 - (b) Boğaz sürüntüsü 2-3 mL VTM veya steril PBS'ye konur.
- İdrar örneği
 - (a) Duyarlılık oldukça düşüktür; eğer diğer örnekler alınamadıysa idrar alınabilir. Hastanın hem bukkal sürüntü örneği hem de idrar örneği gönderilmiş ise, sadece sürüntü örneği test edilir.
 - (b) Tercihen hastalığın ilk 5 gününde olmak üzere 14. güne kadar alınabilir. ~10 mL kadar idrar örneği vida-kapaklı steril bir kap içine toplanır.
- BOS örneği
 - (a) Menenjit veya ensefalitli vakalarda ilk üç gün içinde 1-2 mL BOS steril bir kap içine alınır (3,18).
- Örnekler soğuk zincirde laboratuvara ulaştırılmalıdır. Örneklerle birlikte mutlaka gerekli bütün bilgileri içeren test istem formu da laboratuvara gönderilmelidir. Biyolojik materyal taşıma şartlarına uygun gönderilmemiş örnekler laboratuvara kabul edilmez (19).
- İnceleme örneklerinin seçimi, özellikleri, alınması, gönderilmesi ve laboratuvara kabulü ile ilgili kriterler ve bilgi için ayrıca "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"ne başvurulmalıdır.

Reaktif/Besiyeri

- Kabakulak IgM ELISA, veya IgM "capture" ELISA
- Kabakulak IgG ELISA, veya IgG ELISA (kantitatif)
- BOS'un serolojik incelenmesi için uygun ELISA kiti
- Kabakulak gerçek zamanlı RT-PCR kiti
- VTM, MEM, veya Hanks dengeli tuz çözeltisi
- Hücre kültürü hücreleri

Diğer gereç, donanım

- ELISA okuyucu, yıkayıcı

Hücre kültürü laboratuvarı altyapısı ve donanımı;

- İvert mikroskop
- Biyogüvenlik kabini
- -80°C derin dondurucu, sıvı azot tankı

PCR için gereç, donanım;

- En az üç ayrı oda - nükleik asit ekstraksiyonu, PCR karışımının hazırlanması, amplifikasyonun ve sonuç gözetiminin yapılabileceği ayrı odalar. İdeal olarak PCR karışımı hazırlama odası (temiz oda) pozitif basınçlı, agaroz jel elektroforezi yapılan oda (kirli oda) negatif basınçlı havalandırmaya sahip olmalıdır.
- Cihazlar – biyogüvenlik kabini, soğutmalı mikrosantrifüj, hassas terazi, vorteks, su banyosu, yatay çalkalayıcı, mikrodalga fırın, otomatize / yarı otomatize nükleik asit ekstraksiyon sistemleri, ve nükleik asit amplifikasyon cihazı, jel görüntüleme sistemi, elektroforez ünitesi vb.

2.4. Kalite kontrol

- Her testte iç kalite kontrol amacıyla en az bir pozitif ve bir negatif kalite kontrol serumu çalışmaya dahil edilir.
- Eksternal kalite kontrol testleri belirli aralıklarla çalışılarak sonuçları değerlendirilir.
- Nükleik asit testlerinde ekstraksiyonun ve amplifikasyonun verimliliği ve inhibitör olup olmadığını anlamak için internal kontrol, izolasyon basamağından itibaren hasta örneği ile birlikte aynı reaksiyon tüpünde amplifiye edilmelidir.

3 Kabakulak tanısında kullanılan Tanı teknikleri

3.1. Seroloji

- Kabakulak tanısı için en yaygın kullanılan serolojik test ELISA IgM ve ELISA IgG (kalitatif veya kantitatif) testidir (3,20).
- Aşılammış vakalarda primer enfeksiyon tanısında kabakulak spesifik IgM antikorlarının tespit oranı çok yüksektir (%80-100) ve akut enfeksiyon tanısı için kullanılır (21).
- Aşılammış vakalarda IgM belirtilerin başlamasından sonra 5 gün içinde tespit edilebilir. Kabakulak IgM 1 hafta sonra pik düzeye erişir, haftalarca ve aylarca yüksek kalabilir.
- Aşılı vakalarda kabakulak IgM cevabının zamanlaması oldukça değişkendir. Sekonder immün cevapta IgM yükselmeyebilir, gecikmiş veya geçici olabilir. IgM örnek alınma zamanına bağlı olarak tespit edilmeyebilir, yanlış negatif sonuçlar mümkündür.

- Serolojik testlerin aşısızlarda duyarlılığı yüksektir, fakat aşılı kişilerde enfeksiyon geliştiğinde duyarlılık hızla düşer, tek doz aşıllarda IgM tespiti %60-80 iken iki doz aşıllarda %13-14'dür (22, 23, 24,25).
- IgM'nin negatif bulunması, kabakulak tanısını dışlamaz. Sonucu doğrulamak için belirtilerin başlamasından 14 gün sonra ikinci bir serum örneğinde IgM testi tekrarlanır.
- IgG antikor testi, eğer IgM negatif ise çalışılır; akut ve konvalesan serum örnekleri aynı anda çalışılmalıdır.
- Akut kabakulak enfeksiyon tanısı için tek bir serum örneğinde IgG pozitifliği yeterli değildir; *sadece* immüniteyi gösterir.
- Aşılı kişilerde akut faz serum örneğinde IgG titresi zaten oldukça yüksektir ve konvalesan serum örneğinde IgG titresinde ≥ 4 kat artışı engelleyebilir ve tanıyı güçleştirir.
- Ayrıca serolojik testlerle kabakulak virüsü ve paramiksovirus, Epstein-Barr virüs ve adenovirus gibi birçok virüs arasındaki çapraz reaksiyona bağlı olarak yalancı pozitif sonuçlar alınabilir.
- Menenjit veya ensefalitli olgularda hem BOS hem de serum antikor titreleri incelenmelidir.
- BOS antikorlarının serum örnekleri için geliştirilmiş kitlerle araştırılması uygun değildir. BOS incelemeleri için geliştirilmiş kit kullanılmalıdır!

3.2. Moleküler tanı

- Akut kabakulak enfeksiyonu tanısı için gerçek-zamanlı RT-PCR en duyarlı yöntemdir (7).
- "Nested" RT-PCR testi ve kantitatif gerçek-zamanlı RT-PCR kabakulak enfeksiyonlarının araştırılmasında yaygın olarak kullanılır.
- Kantitatif gerçek-zamanlı RT-PCR, standart PCR testine göre daha hızlı, daha duyarlı, çapraz kontaminasyon riski daha az ve viral yükün tespiti avantajdır.
- Kabakulak virüsünün tespiti için gerçek-zamanlı RT-PCR ticari kitleri kullanılabilir veya kabakulak virüsünün nükleoprotein genini hedefleyen gerçek-zamanlı RT-PCR veya SH genini hedefleyen standart RT-PCR için protokollere göre laboratuvarında tasarlanmış PCR testi yapılabilir (7,26,27,28,29).
- Kabakulak virüsünün SH gen bölgesinin dizi analizi ile günümüzde 12 kabakulak virüsü genotipi (A-L) tanınmıştır. A, C, D, G ve H Batı yarım kürede baskın, oysa B, F, J/K ve L tipleri Asya Pasifik bölgede bulunur.
- Moleküler genotipleme enfeksiyon kaynağının tespiti, bulaşma yollarını izlemek, vakalar ve salgınlar arasındaki epidemiyolojik bağlantıyı göstermek için kullanılır. Genotipleme ile vahşi tip kabakulak virüsü aşı virüsünden ayırt edilebilir.
- İzole edilen virüsün moleküler analizi aşılı kişilerde kabakulak enfeksiyonu tanısını sağlar (30).

3.3. Hücre kültürü

- Kabakulak virüsünün izolasyonu için genellikle Vero hücreleri (African green monkey kidney), primer rhesus monkey kidney hücreleri, LLC-MK2 (devamlı maymun böbrek hücre dizisi), Caco-2 (insan kolorektal adenokarsinoma epitelyum hücreleri) ve B95a hücre dizisi (marmoset lenfoblastoid hücre dizisi) kullanılır (31,32,33).
- Kültürde üreyen virüsün varlığı DFA veya RT-PCR test ile tespit edilir.
- Hücre kültürünün duyarlılığını örnekteki virüs miktarı, antikor bulunması ve örneğin taşınmasında virüsün canlılığının kaybı gibi birçok faktör etkiler ve duyarlılık genellikle %50'den azdır (16).
- Virüs bukkal sürüntü ve BOS örneğinden özellikle hastalığın ilk üç gününde izole edilir. İlk haftadan sonra virüs izolasyon oranı önemli ölçüde düşer.
- Viremi yaygın olmasına rağmen kandan sadece hastalığın ilk 2 gününde izole edilmesi virüsün antikorlar ile birlikte bulunmasına bağlı olabilir.
- İdrar örneğinde viral izolasyon ile başarı oranı RT-PCR testine göre daha yüksektir. İdrardaki PCR inhibitörlerinin varlığına bağlı olarak RT-PCR testinin duyarlılığı düşüktür.
- Hücre kültürü zaman alıcı ve yorucu bir testtir, sonuçların alınması 4 hafta kadar alabilir. Bu sebeple klinik faydası sınırlıdır.

3.4. Örneklerin, izolatların saklanması

- Serolojik testler için laboratuvara gelen örnekler en fazla 5 gün için +4°C'de saklanabilir. Bu süre içinde teste alınmayacaklarsa -20°C'de dondurulmalıdır.
- Moleküler testler veya kültür için gönderilmiş örnekler asla oda sıcaklığında saklanmaz. Oda sıcaklığında kabakulak virüsü inaktive olur.
- Kabakulak IgM pozitif örnekler laboratuvarında sonraki çalışmalarda iç kalite kontrol amacıyla kullanılmak üzere saklanır.
- Kabakulak virüs RNA pozitif bulunan örnekler ileri moleküler genotipleme analizi için -70°C'de tutulur.
- Dondurulmuş örneklerin tekrarlayan dondurma-çözme işleminden sakınılmalıdır. Bunun için örnekler mümkünse başlangıçta alikotlara ayrılarak saklamaya alınmalıdır.

4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim

- Test sonuçları en kısa sürede klinisyene bildirilir.
- Raporlama belgesi hastanın ismi, cinsiyeti, doğum yılını (ve yaşını) içermelidir. Laboratuvara gönderilen örneğin cinsini ve yapılan testi de belirtiyor olmalıdır.

4.1. Serolojik testler

- Serolojik testler özellikle önceden aşılmayan veya enfeksiyonu geçirmeyenlerde akut enfeksiyon tanısı için faydalıdır. Aşıllılarda ise serolojik testlerin yorumu güç olabilir.
- Tek serum örneğinde kabakulak ELISA IgM pozitif bulunmuş ise "kesin tanı" bulgusudur.
- Çift serum örneğinde (akut ve konvalesan faz serumları aynı testte çalışılmış olarak) kabakulak ELISA IgG ile;
 - (a) serokonversiyon saptanmış ise (IgG akut faz örneğinde negatif iken konvalesan faz örneğinde pozitif ise) "kesin tanı" bulgusudur veya
 - (b) ≥ 4 kat titre artışı saptanmış ise "kesin tanı" bulgusudur.
- Ancak konvalesan serum örneğinde IgG titresinde ≥ 4 kat artış, serokonversiyon veya IgM tespitinin -enfeksiyonun geç tanınması anlamına geldiği için- klinik yararı sınırlıdır.
- Tek serum örneğinde IgG pozitifliği *sadece* immüniteyi gösterir.
- Kabakulak IgM ve IgG negatif olan vakalar enfekte değildir ve enfeksiyona karşı duyarlıdır.
- Ensefalit vakalarında BOS/serum antikor oranının >4 olması tanıyı destekler.

4.2. Diğer yöntemler

- RT-PCR veya gerçek-zamanlı RT-PCR testi ile kabakulak virüsü RNA pozitifliği "kesin tanı" bulgusudur (14).
- Klinik örnekten kabakulak virüsünün hücre kültüründe izolasyonu akut kabakulak enfeksiyonu için "kesin tanı" koydurucudur.

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Viral kültür veya moleküler testler için örnek alırken her zaman sentetik (dakron ya da rayon uçlu) eküvyonlar tercih edilmelidir. Kalsiyum aljinatlı, pamuklu ve ahşap saplı eküvyon kullanılmamalıdır. Virüsler inaktive olabilir, PCR'da inhibitör etki yapabilirler.
- Doğru zamanda alınmamış örneklerde pozitif sonuç elde edilmesinde sorun yaşanabilir. Örneklerin uygun zamanda alınması önemlidir.
- Örnekler aseptik şartlarda alınmalıdır, sonuçlar etkilenebilir. Soğuk zincir şartlarında gönderilmeyen örnekler de test için uygun değildir.
- Hemolizli veya lipemik serum örnekleri antikor titrelerinin hatalı okunmasına neden olabilir.
- Serolojik testlerle, hem aşısız hem de aşıllılarda, parotite sebep olan parainfluenza virüs, EBV ve adenovirüs gibi diğer etken virüslerle çapraz reaksiyon olabileceğinden dolayı yalancı pozitif sonuçlar alınabilir.

- Ayrıca aşılama oranları yüksek olan popülasyonlarda kabakulak tanısının laboratuvar testi ile doğrulanması zor olabilir ve aşılı kişilerde IgM testi ile yalancı negatif sonuçların yaygın olmasından dolayı serolojik testler dikkatli yorumlanmalıdır.
- Aşılı kişilerde (özellikle iki doz) veya önceden kabakulak enfeksiyonu geçirenlerde serum IgM test sonuçları %50-60'a varan kadarında negatif olabilir.
- Aşılılarda kabakulak vakalarında akut serum örneğinde IgG zaten oldukça yüksek düzeyde pozitif olabilir. Bu sebeple akut ve konvalesan serumlar arasında kabakulak virüsü IgG titresinde beklenen 4 kat veya daha fazla artışı göstermek mümkün olmayabilir.
- Ayrıca RT-PCR veya kültür için incelenecek bukkal sürüntü örneği parotit başlamasından uzun süre sonra (3 gün sonra) alınırsa virüs tespit oranı düşük olabilir. Bu sebeple negatif laboratuvar sonuçlarına dayanarak kabakulak tanısı dışlanmamalıdır (3,8).

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Kabakulak Enfeksiyonunun Mikrobiyolojik Tanısı) ayrıca aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

UMS, V-MT-07	Kızamıkçık ve Konjenital Kızamıkçık Sendromunun mikrobiyolojik tanısı
UMS, V-MT-08	Kızamık ve SSPE'nin mikrobiyolojik tanısı
UMS, GEN-ÖY-01	Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı Ankara. 2004. <http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (erişim tarihi: 18.12.2013)
- 2 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 3 CDC, Chapter 9: Mumps. Manual for the Surveillance of Vaccine-Preventable Diseases (5th Edition, 2012). <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/surv-manual/chpt09-mumps.html> (son erişim tarihi: 20.12.2013).
- 4 Shanley JD. The resurgence of mumps in young adults and adolescents. *Cleve Clin J Med* 2007;74(1):42-4, 47-8.
- 5 Dayan GH, Rubin S. Mumps outbreaks in vaccinated populations: are available mumps vaccines effective enough to prevent outbreaks? *Clin Infect Dis* 2008;47(11):1458-67.

- 6 Greenland K, Whelan J, Fanoy E, Borgert M, Hulshof K, Yap KB, Swaan C, Donker T, van Binnendijk R, de Melker H, Hahn S. Mumps outbreak among vaccinated university students associated with a large party, the Netherlands, 2010. *Vaccine* 2012;30(31):4676-80.
- 7 Hviid A, Rubin S, M hlemann K. Mumps. *Lancet* 2008;371(9616):932-44.
- 8 Choi KM. Reemergence of mumps. *Korean J Pediatr* 2010;53(5):623-8.
- 9 Leland DS. Parainfluenza and Mumps Viruses. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p.1347-56
- 10 Hatchette TF, Mahony JB, Chong S, LeBlanc JJ. Difficulty with mumps diagnosis: what is the contribution of mumps mimickers? *J Clin Virol* 2009;46(4):381-3.
- 11  zmert EN. Dünya'da ve Türkiye'de aılama takvimindeki gelimeler. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2008; 51: 168-175.
- 12 CDC. Prevention of Measles, Rubella, Congenital Rubella Syndrome, and Mumps, 2013: Summary Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recommendations and Reports* 2013;62(RR04);1-34.
<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr6204a1.htm> (son eriim tarihi: 20.12.2013)
- 13 Kancherla VS, Hanson IC. Mumps resurgence in the United States. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118(4):938-41.
- 14 CDC. Mumps. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. The Pink Book: Course Textbook - 12th edition, Second printing, May 2012.
<http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/mumps.html> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 15 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 16 Costa J. Microbiological Diagnosis of Mumps. *The Open Vaccine Journal* 2010;(3) 86-88.
- 17 Hatchette T, Davidson R, Clay S, et al. Laboratory diagnosis of mumps in a partially immunized population: The Nova Scotia experience. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2009;20(4):e157-62.
- 18 Poggio GP, Rodriguez C, Cisterna D, Freire MC, Cello J. Nested PCR for rapid detection of mumps virus in cerebrospinal fluid from patients with neurological diseases. *J Clin Microbiol* 2000;38(1):274-8.
- 19 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik  rneği taıma y netmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.
- 20 Krause CH, Molyneaux PJ, Ho-Yen DO, McIntyre P, Carman WF, Templeton KE. Comparison of mumps-IgM ELISAs in acute infection. *J Clin Virol* 2007;38(2):153-6.
- 21 Sakata H, Tsurudome M, Hishiyama M, Ito Y, Sugiura A. Enzyme-linked immunosorbent assay for mumps IgM antibody: comparison of IgM capture and indirect IgM assay. *J Virol Methods* 1985;12(3-4):303-11.
- 22 Briss PA, Fehrs LJ, Parker RA, Wright PF, Sannella EC, Hutcheson RH, Schaffner W. Sustained transmission of mumps in a highly vaccinated population: assessment of primary vaccine failure and waning vaccine-induced immunity. *J Infect Dis* 1994;169(1):77-82.
- 23 Narita M, Matsuzono Y, Takekoshi Y, et al. Analysis of mumps vaccine failure by means of avidity testing for mumps virus-specific immunoglobulin G. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5(6):799-803.
- 24 Bitsko RH, Cortese MM, Dayan GH, Rota PA, Lowe L, Iversen SC, Bellini WJ. Detection of RNA of mumps virus during an outbreak in a population with a high level of measles, mumps, and rubella vaccine coverage. *J Clin Microbiol* 2008;46(3):1101-3.
- 25 Rota JS, Turner JC, Yost-Daljev MK, et al. Investigation of a mumps outbreak among university students with two measles-mumps-rubella (MMR) vaccinations, Virginia, September-December 2006. *J Med Virol* 2009;81(10):1819-25.

- 26 Royuela E, Castellanos A, Sánchez-Herrero C, Sanz JC, De Ory F, Echevarria JE. Mumps virus diagnosis and genotyping using a novel single RT-PCR. *J Clin Virol* 2011;52(4):359-62.
- 27 CDC. Laboratory Testing for Mumps Infection <http://www.cdc.gov/mumps/lab/qa-lab-test-infect.html#realtime-pcr> (son erişim tarihi: 20.12.2013).
- 28 Boddicker JD, Rota PA, Kreman T, Wangeman A, Lowe L, Hummel KB, Thompson R, Bellini WJ, Pentella M, Desjardin LE. Real-time reverse transcription-PCR assay for detection of mumps virus RNA in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2007;45(9):2902-8.
- 29 Rota JS, Rosen JB, Doll MK, McNall RJ, McGrew M, Williams N, Lopareva EN, Barskey AE, Punsalang A Jr, Rota PA, Oleszko WR, Hickman CJ, Zimmerman CM, Bellini WJ. Comparison of the sensitivity of laboratory diagnostic methods from a well-characterized outbreak of mumps in New York city in 2009. *Clin Vaccine Immunol* 2013;20(3):391-6.
- 30 Mühlemann K. The molecular epidemiology of mumps virus. *Infect Genet Evol* 2004;4(3):215-9.
- 31 Knowles WA, Cohen BJ. Efficient isolation of mumps virus from a community outbreak using the marmoset lymphoblastoid cell line B95a. *J Virol Methods* 2001;96(1):93-6.
- 32 Reina J, Ballesteros F, Mari M, Munar M. Evaluation of different continuous cell lines in the isolation of mumps virus by the shell vial method from clinical samples. *J Clin Pathol* 2001;54(12):924-6.
- 33 Afzal MA, Dussupt V, Minor PD, Pipkin PA, Fleck R, Hockley DJ, Stacey GN. Assessment of mumps virus growth on various continuous cell lines by virological, immunological, molecular and morphological investigations. *J Virol Methods* 2005;126(1-2):149-56.



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Kızamıkçık Enfeksiyonunda (ve Konjenital Kızamıkçık Sendromunda) Mikrobiyolojik Tanı

Hazırlayan Birim	Klinik Viroloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Viroloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	V-MT-07
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
Hastalığın önemi.....	3
Virüsün özellikleri	4
Klinik özellikler.....	4
Laboratuvar tanısı.....	5
TEKNİK BİLGİLER	7
1 Hedef mikroorganizma	7
2 Tanı için asgari laboratuvar gerekleri	7
3 Kızamıkçık tanısında kullanılan teknikler.....	9
4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim	10
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	12
6 Referans Laboratuvar	12
EKLER.....	13
Ek-1 Gebe kadında kızamıkçık izlemi için akış şeması	13
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	14
KAYNAKLAR.....	14

Kapsam ve Amaç

Kızamıkçık çoğunlukla çocukları ve gençleri etkileyen, gebeliğin erken döneminde geçirilmesi halinde ölü doğuma ya da çeşitli doğumsal sakatlıklara neden olabilen bulaşıcı bir viral enfeksiyondur. Kesin tanısı laboratuvar incelemesine dayanır. DSÖ 2000'li yılların ortalarından bu yana dünyada kızamıkçığa bağlı doğumsal sakatlıkları önlemek için kızamığın eliminasyon hedefine paralel olarak Kızamıkçık Eliminasyon Programı yürütmektedir. Ülkemizde de bu program kapsamında kızamıkçığın tanısı ve doğrulama çalışmaları THSK Ulusal Kızamık/Kızamıkçık Referans Laboratuvarı ve bazı Bölge Halk Sağlığı Laboratuvarlarının oluşturduğu bir ağ tarafından yürütülmektedir (1). Ağa dahil olmasalar da, klinik mikrobiyoloji laboratuvarları da -özellikle ayırıcı tanı gerekleri dolayısı ile- tanı panellerinde kızamıkçık testlerine yer veriyor olabilirler; ancak eliminasyon programı nedeniyle şüpheli sonuçlarının teyidi için ulusal referans laboratuvarlar ile işbirliği yapma sorumlulukları vardır. Bu UMS belgesi, bu nedenlerle, kızamıkçık tanısında örnek yönetimi hususları ve tanıda kullanılan yöntemler hakkında özellikle klinik laboratuvarların güncel uygulamaya dair bilgilendirilmesini hedeflemektedir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

KKS Konjenital Kızamıkçık Sendromu (Congenital Rubella Syndrome-CRS)

URL Ulusal Referans Laboratuvarı

Genel Bilgi

Hastalığın önemi

Kızamıkçık (Rubella; Alman kızamığı -German measles-) ateş ve döküntü ile seyreden esasen ılımlı bir enfeksiyondur. Kızamıkçığı halk sağlığı açısından önemli yapan husus, gebeliğin ilk aylarında geçirildiği takdirde enfeksiyonun genellikle fetal gelişimi etkilemesidir. Fetüsün enfeksiyonu düşüğe veya bebeğin ciddi doğumsal anomalilerle dünyaya gelmesine neden olur. KKS doğumsal körlük, sağırılık, doğumsal kalp hastalığı ve zeka geriliğinin önemli bir nedenidir. Dünya genelinde her yıl 100.000'den fazla bebeğin KKS'li doğduğu tahmin edilmektedir. Vakaların büyük kısmı henüz kızamıkçık aşısının rutin aşı programına konmadığı gelişmekte olan ülkelerde kaydedilmektedir (2,3).

Nitekim, KKS'nin önlenmesi amacıyla DSÖ 2006 yılında iki bölgesinde (Avrupa, Amerika) kızamıkçığın eliminasyonu hedefiyle ve kızamık eliminasyon programına entegre bir program başlatmıştır. Böylece yakın klinik ve epidemiyolojik özelliklere sahip her iki hastalık için de daha etkin sonuç alınması hedeflenmiştir. Kızamıkçık 1996'da 83 ülkede ulusal rutin aşılama programında yer alırken bu sayı 2010 yılı itibarıyla DSÖ'ye üye 130 ülkeye yükselmiştir..

Ülkemizde de kızamık, kızamıkçık ve KKS'nin DSÖ Avrupa Bölgesinden eliminasyonu hedefi kapsamında entegre aktif sürveyans yürütülmektedir (1).

Eliminasyon programlarında laboratuvarın rolü de önem kazanmaktadır. Çünkü özellikle eliminasyon fazında bütün şüpheli olguların laboratuvar tarafından doğrulanması ve dolaşan virüs kökenlerinin de belirlenmesi gerekmektedir (3).

Kızamıkçık, elimine edildiği ülkeler hariç, tüm dünyada görülen bir enfeksiyondur ve kızamık ile benzer epidemiyolojik özellikler gösterir; düzenli salgın dönemlerini düşük insidans dönemleri izler; 3-4 yılda bir küçük, 6-9 yılda bir ise büyük salgınlar eşlik eder. Ilıman iklimlerde, düzenli olarak kış sonu ve ilkbahar aylarında artış izlenir (3).

Kızamıkçık enfekte bir kişinin burun veya boğaz salgıları ile temas yoluyla yayılır; Bu doğrudan temas ya da havadan damlacıkların solunması ya da taze bulaşmış eşyalar ile dolaylı temas sonucu olabilir. Askeri kışla ve gündüz çocuk bakım merkezleri gibi kapalı ortamlarda, tüm maruz kalan duyarlı kişiler enfekte olabilir. KKS'li bebekler bir yıl kadar uzun bir süre boğaz salgılarında ve idrarlarında büyük miktarlarda rubella virüsü saçabilir, bulaştırma kaynağı olabilirler (3,4). Aşı virüsünün temaslılara yayıldığına dair herhangi bir bulgu yoktur (3).

Virüsün özellikleri

Kızamıkçık etkeni olan Rubella virüs *Togaviridae* ailesinin *Rubivirus* cinsine ait 70 nm büyüklüğünde zarflı bir RNA virüsüdür. Virüs tek bir antijenik tipe sahiptir ve sadece insanlarda enfeksiyon yapar. Rubella virüs nispeten kararsız bir virüstür ve lipit çözücüler, tripsin, formalin, ultraviyole ışık, düşük pH, ısı ve amantadin tarafından inaktive edilir (5,6).

Klinik özellikler

Kızamıkçık

Rubella virüsü nazofarinkse yerleştikten sonra solunum yolu epitelinde ve bölgesel lenf düğümlerinde çoğalmaya başlar. 5-7 gün içinde dolaşıma geçer, deri de dâhil olmak üzere vücudun geri kalanına yayılır ve viremi başlar. Kızamıkta olduğu gibi, döküntü immünolojik olaylarla ilişkilidir ve spesifik anti-rubella antikollarının gelişimiyle çakışmaktadır. Virüs döküntünün başlamasından 1 hafta öncesinden 2 hafta sonrasına kadar nazofarinksten izole edilebilir (3).

Kızamıkçık oldukça ılımlı seyreden bir enfeksiyondur. Çoğunlukla çocuk, ergen ve genç erişkinleri etkiler. Yaklaşık %50 olguda subklinik ve laboratuvar testi yapılmadıkça tespit edilemeyebilir. Çocuklarda hastalık düşük ateş, mide bulantısı ve makülopapüler döküntü ile seyreder. Erişkin kadınların %70 kadarında artrit ve eklem ağrıları gelişebilir (3,4,6).

İnkübasyon süresi 14-21 gündür. Klinik olarak başta kızamık olmak üzere diğer döküntülü hastalıklarla karışabilir. Hastalık belirtileri başlamadan önce bir-iki gün süren hafif nezle olur. Daha sonra kulak arkası, boyunda ve ensede bezleri büyür. Eritematöz makülopapüler döküntü yüzden başlayarak tüm vücuda yayılır. Döküntüler deri üzerinde tek tek kırmızı benekler şeklindedir ve 3 günde iz bırakmadan kaybolur (3,4). Kızamıkçığın spesifik bir tedavisi yoktur. Hastalık ancak aşı ile önlenir.

KKS

Gebelik sırasında geçirilen enfeksiyonda virüs bütün organları etkileyebilir ve çok çeşitli fetal anomalilere neden olabilir. Kızamıkçık aşılama programının başlıca amacı KKS'yi önlemektir (3,4).

Kızamıkçık virüsünün fetus üzerine etkileri büyük ölçüde enfeksiyonun zamanına bağlıdır; enfeksiyon gebeliğin ne kadar erken döneminde ise hastalık o kadar şiddetlidir. Gebeliğin ilk 2 ayı içinde %65-85 olasılıkla fetus etkilenir ve çoklu doğumsal anomali veya spontan abortus veya her ikisi birden görülür. Fetal hayatın üçüncü ayında geçirilen kızamıkçık ise %30-35 olasılıkla, sağırılık veya doğumsal kalp hastalığı gibi tek bir anomaliye neden olur. Dördüncü ayda geçirilen fetal enfeksiyon %10 olasılıkla tek anomali riski taşır. Gebeliğin 20. haftasından sonra geçirilen enfeksiyonda, tek anomali işitme bozukluğu olabilir ya da hiçbir doğumsal anomali gözlenmeyebilir (2,4,5,6).

Fetal enfeksiyon maternal viremi sırasında transplasental geçiş ile olmaktadır. Fetal hasarın mekanizması hala net değildir. Ancak anomalilerin dokularda inflamasyonsuz vaskülitte bağlı doku hasarı sonucu oluştuğu düşünülmektedir (7).

Konjenital kızamıkçığın spesifik belirti ve semptomları geçici, kalıcı ve gelişimsel olarak sınıflandırılabilir. En sık görülen belirtiler sağırılık, katarakt veya glokom, konjenital kalp hastalığı ve mental geriliktir. Diğer sık belirti ve bulgular trombositopenik purpura, hepatosplenomegali, geniş ön fontanel, kemik lezyonları, katarakt, mikroftalmi, retinopati, mikrosefali, meningoensefalit, patent duktus arteriosus, pulmoner stenoz, davranış bozuklukları, merkezi dil bozuklukları, kriptorşidizm ve inguinal herni şeklinde sıralanabilir. Buzlu kornea, şiddetli miyopi, sarılık, hepatit, şeker hastalığı, hemolitik anemi, tiroid bozuklukları ve erken ergenlik de konjenital kızamıkçığın neden olabildiği daha nadir klinik sonuçlar arasında sayılmaktadır (2,4,6).

Çalışmalar KKS'nin durağan bir hastalık olmadığını göstermiştir. Anneleri gebelik sırasında kızamıkçık olan ve doğumda normal bazı çocukların, okul çağına gelince KKS belirtileri gösterdikleri gözlenmiştir. Örneğin, geç çocukluk döneminde şeker hastalığı, normal çocuklara göre KKS'li çocuklarda 50 kat daha sık görülmektedir.

Laboratuvar tanısı

Kızamıkçık

Kızamıkçık tanısı laboratuvar incelemeleri ile konur; klinik görünüm temelinde tanı yaklaşımı günümüzde geçerli kabul edilmemektedir (3,8,9). Çalışmalar döküntülü hastalığın ayırıcı tanısı hedefi ile kızamık sürveyansına paralel yürütülür.

Vakalardan virüsün kültür veya PCR ile saptanması ya da serolojik testler ile akut enfeksiyonun gösterilmesi mümkündür. Serolojik testler kızamıkçığa karşı popülasyonun bağışıklık durumunun taranması amacıyla da kullanılabilir.

Rubella virüs enfeksiyonu sonrasında humoral ve hücrel bağışıklık gelişir. IgG ve IgM antikoru enfeksiyonun yaklaşık 14-18. günlerinden itibaren döküntülerin ortaya çıkmasıyla aynı anda gözlenir. Kızamıkçık IgM antikoru hızla azalır ve 2 ay sonra saptanamaz iken IgG antikoru kalıcı olur. Özgül hücrel lenfosit yanıtı ise humoral yanıtın yaklaşık 1 hafta sonra başlar ve bir ömür boyu sürer.

Akut enfeksiyonun laboratuvar tanısında serolojik inceleme için en yaygın olarak ELISA testleri kullanılır ve piyasada ürün seçeneği çoktur. Döküntü başlar başlamaz alınan serumda IgM'in gösterilmesi mümkün olmayabilir. Akut faz örneğinin döküntünün başlamasından 5-7 gün sonrasında, 10. güne kadar alınması idealdir. Bu dönemde vakaların çoğu kuvvetli IgM pozitif bulunur. Akut enfeksiyonun tanısı amacıyla IgG antikoları incelenecekse -ilki döküntüler başladığında alınmış olmak üzere- çift serum örneğinde titrelerin en az 4 kat arttığının gösterilmesi gerekir. İkinci serum örneği 2-4 hafta sonra alınmalı ve ikisi eş zamanlı test edilmelidir (3,8).

Serolojik testler akut enfeksiyonun tanısı amacıyla gerçekleştiriliyorsa, sonuçları değerlendirirken incelenen vakaların en son ne zaman aşılanmış oldukları ya da yakın zaman önce aşılanmış olup olmadıkları biliniyor olmalıdır. Tek serum örneğinde IgG antikolarının varlığı -aşıya veya geçirilmiş enfeksiyona bağlı- bağışıklığın bir göstergesidir.

Gebelikte kızamıkçık enfeksiyonunun tanısı gebeliğin sonlandırılması kararı ile ilişkili olabileceği için kritik bir öneme sahiptir. Tanı sürecinde izlenecek adımlar Ek-1'de verilen akış şemasında özetlenmiştir.

Kızamıkçık serolojisinde özellikle gebelerde IgG avidite testlerinin de özel bir önemi vardır. IgG avidite testleri enfeksiyonun yakın bir geçmişte ya da uzak bir geçmişte geçirilip geçirilmediğinin ayırt edilmesi için kullanışlıdır. Düşük avidite yakında geçirilmiş enfeksiyona işaret ederken, yüksek avidite uzak bir geçmişte geçirilmiş enfeksiyon ile ilişkilidir. Avidite testleri rutin testler değildir ve referans laboratuvarlarda yapılmaları önerilir (8).

Rubella virüs kızamıkçık ve KKS vakalarının boğaz, burun, kan, idrar ve BOS örneklerinden izole edilebilir. Kızamıkçık olgularında virüs boğaz sürüntüsünden döküntü başlamadan önceki haftadan itibaren ve döküntü başladıktan 2 hafta sonrasında kadar izole edilebilir; kültürden izolasyon şansı döküntü başlamadan önceki dönemde en yüksektir. Ancak pratik olarak hastalık akla gelmedikçe örnek alınmadığından, kültür için örneklerin döküntü başlar başlamaz alınması idealdir. Kanda 2. günden itibaren, boğaz sürüntüsünde 4. günden itibaren izolasyon şansının azaldığı da hatırlanmalıdır. Kültür için boğaz sürüntüsü en ideal örnektir ve mümkünse döküntü başladığı gün alınmalıdır (3,8).

Kültürde üreme kesin tanı koydurucu olsa da zahmetli bir işlemdir; referans merkezlerde uygulanabilir ve kızamıkçık tanısında rutin kullanılmaz. Ancak virüsün izolasyonu epidemiyolojik amaçlar için çok değerlidir ve olabildiği ölçüde kızamıkçık ve KKS'den şüphelenildiğinde kültürden izolasyon denenmelidir (3).

KKS'li bebekler uzun süre virüs saçabilirler. Virüsün daha fazla yayılmasını önlemek amacıyla enfekte bebeklerin, mümkün olduğu kadar yaşamın erken döneminde tespit edilmesi gerekir. Enfekte bebeklerin en az 1 yaşına kadar ya da 3 aylıktan büyük bebeklerde klinik örneklerden 1 ay ara ile yapılan iki kültürde kızamıkçık virüsü negatif olduğu teyit edilene kadar bulaşıcı oldukları düşünülmelidir. KKS'nin erken tanısı, ayrıca, bazı anomalilere erken müdahaleye imkân sağlar. Son yayınlar, eğer erkenden tanımlanır ve müdahale hemen başlarsa işitme bozukluğu olan çocuklarda konuşma ve dilin gelişiminde ciddi iyileşme ve nihai okul başarısında yükselme olduğunu göstermektedir.

Özetle kızamıkçık ve KKS'de IgM'in pozitif bulunması veya IgG antikolarının arttığının (KKS'de ısrarcı olduğunun) görülmesi veya RT-PCR ile viral RNA saptanması veya virüsün kültürlerden izolasyonu "kesin tanı" koydurucudur (10).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizma

Rubella virüs (Kızamıkçık virüsü)

2 Tanı için asgari laboratuvar gerekleri

2.1. Laboratuvar güvenliği

Kızamıkçık virüsü Risk Grubu 2 mikroorganizmadır ve şüpheli enfeksiyonlarının tanısı ile ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün kültürler ve klinik örnekler enfeksiyöz kabul edilmeli, daima standart önlemler uygulanmalı ve önlemler risk değerlendirmesi ile de desteklenmelidir. Solunum yolu örneklerinin kültüre veya diğer işlemlere hazırlanması başta olmak üzere aerosol oluşturması muhtemel tüm laboratuvar çalışmaları bir biyolojik güvenlik kabini içinde yapılmalıdır. Serum ayırma ve testlerin çalışılması sırasında **daima** eldiven giyilmelidir (ayrıca bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Kızamıkçık tanısı ve/veya doğrulaması ile uğraşan laboratuvarların personeli asgari şu gerekleri karşılar: (i) hastalığın tanı için geçerli yöntem(ler)i uygulamadan önce, amaçlanan kullanım ile ilgili tüm eğitimleri almış; (ii) laboratuvar güvenliği ve kalite gereklerine dair gerekli tüm eğitimleri almış; (iii) Eliminasyon Programının önemine vakıf olmak. Testlerin prosedürlere uygun gerçekleştirilmesinden ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, Kit, Donanım

İnceleme örneği

İnceleme örneklerinin seçimi, özellikleri, alınması, gönderilmesi ve laboratuvara kabulü ile ilgili kriterler ve bilgi için "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"ne ve "Daimi Genelge"ye (1) başvurulmalıdır.

Ayrıca bazı önemli noktalara aşağıda tekrar dikkat çekilmiştir.

- Serum örneği – Salgın tanısı için örnek alınıyor olabileceği gibi sürveyans kapsamında -sporadik- bir vakanın tanısını koymak için de örnek alınıyor olabilir. Amaca göre şu hususlar önem kazanır:
 - (a) Şüpheli bir vakadan ilk karşılaşmada serum örneğinin alınması öneriliyor olsa da, döküntüden sonraki ilk 3 gün içerisinde alınmış örnekte IgM antikoru saptanamayabilir; böyle örneklerde %50'ye varan oranlarda kızamıkçık için sonuç negatif bulunabilir (3). Bu tür vakalardan mutlaka ikinci serum örneği alınmalıdır.
 - (b) Bir salgının araştırılması amacıyla örnek alınıyorsa, bütün

vakalardan değil salgını temsil edecek sayıda (5-10) örnek alınıp inceleneceği ve bazı örnekler IgM negatif bulunsa bile pozitif bulunan örneklerle dayanarak tanı konabildiği için serum tekrarı gerekmez (3).

- (c) Hem kızamık, hem de kızamıkçık tanısı göz önüne alındığında pratik olarak serum örneğinin döküntünün başlamasından sonraki 4-28 gün içinde alınması önerilir. İlk örnekten 10-20 gün sonra ikinci bir örnek alınması sadece IgM'nin (eğer ilki negatifse) tekrar test edilmesine değil, aynı zamanda IgG titrelerinin artıp artmadığının gösterilmesine de faydalı olacaktır.
- Kültür için örnekler - (nazofarinks, boğaz, burun sürüntüsü, idrar) - virüsün izolasyonu için kullanılır. Bu örneklerden PCR da yapılabilir. Özellikle salgın durumunda sorumlu virüsün (kızamık veya kızamıkçık) kültürden izolasyonu hedeflenir.
 - (a) Örneğin döküntünün ilk başladığı gün alınması izolasyon şansını artırır. Bu nedenle hasta ile ilk temasta serum alınırken kültür için de örnek alınması idealdir.
 - (b) Bu örneklerinin alınması serumun yerine geçmez! Serum her durumda mutlaka alınmalıdır.
 - (c) Nazofarinks örneği (aspirat veya sürüntü) alınması boğaz veya burun örneklerine göre daha zahmetlidir. Özel eküvyon veya aparey gerektirir ve hastaya daha fazla rahatsızlık verir. Eldeki imkânlarla bakılarak -boğaz, burun örnekleri alınabilmiş ise - nazofarinks örneğinin alınıp alınmayacağına karar verilebilir.
 - (d) Kızamık ve kızamıkçık virüsleri ısıya duyarlı oldukları için soğukta saklanmayan örneklerde enfektivite hızla düşer. Örnekler laboratuvara olabildiğince çabuk ve soğuk zincirde gönderilmelidir.
- BOS örneği - Kızamıkçık ensefaliti olasılığında, ilgili uzman doktor tarafından aseptik şartlarda 1-2 mL alınır.
- Örneklerin gönderilmesinde *paketleme* ve *taşıma* biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (11) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).

Reaktif / Kit

- Kızamıkçık IgM ELISA, IgG ELISA, IgG avidite testi
- Kızamıkçık RT-PCR hazır ticari kitleri

Diğer gereç, donanım

- ELISA okuyucu, yıkayıcı
- Hücre kültürü laboratuvarı altyapısı ve donanımı - invert mikroskop, sertifikalı sınıf IIA BGK, -80°C derin dondurucu, sıvı azot tankı

PCR ve diğer moleküler yöntemler için;

- *En az üç ayrı oda* - Nükleik asit ekstraksiyonu, PCR karışımı hazırlama, amplifikasyon ve sonuç gözetimi için ayrı odalar. İdeal olarak PCR karışımı hazırlama odası (temiz) pozitif basınçlı, agaroz jel elektroforezi yapılan oda (kirli) negatif basınçlı havalandırmaya sahip olmalıdır.

- *Donanım* – BGK, soğutmalı mikrosantrifüj, hassas terazi, vorteks, su banyosu, PCR ısı döngü cihazı (gerçek zamanlı veya geleneksel), mikrodalga fırın, jel görüntüleme sistemi, elektroforez ünitesi vb.

2.4. Kalite kontrol

- Her testte iç kalite kontrol amacıyla en az bir pozitif ve bir negatif internal kalite kontrol serumu çalışmaya dahil edilir.
- Eksternal kalite kontrol testleri belirli aralıklarla çalışılarak sonuçları değerlendirilir.
- İnternal kontrol, nükleik asit testlerinde ekstraksiyonun ve amplifikasyonun verimliliği ve inhibitör olup olmadığının gösterilmesi için izolasyon basamağından itibaren hasta örneği ile birlikte aynı reaksiyon tüpünde amplifiye edilmelidir.

3 Kızamıkçık tanısında kullanılan teknikler

3.1. Kızamıkçık IgM ELISA

- Akut enfeksiyonun tanısında ilk tercih IgM saptayan ELISA testleridir. IgM-capture ELISA veya özgül IgM-indirekt EIA formatındaki kitler kullanılabilir (3).
- El ile çalışılan, yıkama ve okuma işlemleri cihaz ile yapılan hazır ticari kitler olduğu gibi, yüksek test sayıları söz konusu olduğunda otomatize cihazlarla çalışılan makro- veya mikro ELISA kitleri de mevcuttur.
- ELISA testi ile saptanan IgM pozitifliği tanı koydurucudur ve her şüpheli vakada IgM ELISA testinin yapılması hedeflenir.
- Kızamıkçık IgM testi döküntü başladıktan sonraki ilk 3 gün %50 kadar vakada negatif sonuç verebildiği için, bu süre içinde gönderilmiş örneklerden negatif bulunanlarda testin 10 gün kadar sonra alınan örnek ile tekrarlanması uygun olur (3).

3.2. Kızamıkçık IgG ELISA

- Akut enfeksiyonun tanısı amacıyla IgG antikorları incelenecekse en az 2 hafta ara ile alınmış iki serum örneğinin eş zamanlı çalışılması ve titrelerin en az 4 kat arttığına gösterilmesi gerekir.
- El ile çalışılan, yıkama ve okuma işlemleri cihaz ile yapılan hazır ticari kitler olduğu gibi, yüksek test sayıları söz konusu olduğunda otomatize cihazlarla çalışılan makro- veya mikro ELISA kitleri de mevcuttur.
- Tek serum örneğinde pozitif sonuç geçirilmiş enfeksiyon veya aşıya bağlı bağışıklık düşündürür.

3.3. Kızamıkçık IgG avidite testi

- Gebelerde enfeksiyonun tanısında IgG avidite testinin kullanılması gerekebilir.

- Enfeksiyon yeni ise antijenle antikor arasındaki bağlar da yeni oluşmuştur. 8M üre veya dietilamin gibi denatüre edici maddelerle hasta örneği muamele edildiğinde bu maddelere karşı dayanıklılık gösteremeyip parçalanır ve düşük avidite ortaya çıkar.
- Enfeksiyon gebelik öncesi geçirilmiş bir enfeksiyon ise avidite yüksek saptanır ve fetal anomali açısından tehlike olmadığını düşündürür (1).
- Avidite testleri rutin uygulanan testler değildir ve URL'de yapılması önerilir (8).

3.4. Moleküler tanı

- Gerçek zamanlı RT-PCR ticari kitleri ile kızamıkçık virüsü RNA'sı saptanabilmektedir.
- Konvansiyonel yöntemlerle de hedef bölgelere yönelik PCR çalışmaları yapılabilir.
- URL'de kızamıkçık için moleküler tanı testleri uygulanabilmektedir (adres ve iletişim bilgileri için *bkz.* sayfa 12).

3.5. Hücre kültürü

- Hücre kültüründen virüsün izolasyonu çok güvenilir bir yöntemdir ve URL'de gerçekleştirilmektedir.
- Dünya Sağlık Örgütü, DSÖ Laboratuvar Ağı'na dâhil laboratuvarlarda hem kızamık hem de kızamıkçık virüs izolasyonları için Vero/SLAM hücre hattını önermektedir. Bu hücre hattı ticari olarak üretilen bir ürün değildir ve piyasadan temin edilemez (3).
- Kızamıkçık virüsünün izolasyonunda Vero hücreleri de kullanılabilir.
- Vero/SLAM veya Vero hücre hatlarında üremenin değerlendirilmesi monoklonal antikorlar kullanılarak rubella E1 glikoproteinini gösterilmesine dayanır (3).

4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim

4.1. Serolojik testler

Kızamıkçık tanısı için

- Son 3 ay içinde aşılama öyküsü olmayan bireyde **IgM pozitif ise** birey **kızamıkçık vakasıdır**.
- Son 3 ay içinde aşılama öyküsü olmayan bireyde **IgM "ara değer" bulunmuş ise** 7-10 gün sonra 2. serum örneği alınıp incelenmelidir ve antikor titresi (IgG titre artışı olup olmadığı) takip edilmelidir.
- Son 3 ay içinde kızamıkçık aşı uygulaması varsa IgM pozitif veya ara değer pozitif sonuç aşıya bağlı pozitiflik olarak değerlendirilir.

Gebelikte şüpheli temas durumunda

- Gebelikte kızamıkçık enfeksiyonunun tanısı gebeliğin sonlandırılması kararı ile ilişkili olabileceği için kritik bir öneme sahiptir.
- Gebelikte şüpheli temas hikâyesi varsa bir şema izlenerek karara varılır (bkz. Ek-1). Buna göre:
 - (a) Rubella IgM pozitifliği araştırılır. Negatif sonuç saptansa da 1-3 hafta sonra test tekrarlanmalıdır.
 - (b) Rubella IgG testi yapılır. Pozitifse hastalığı daha önceden geçirmiş olduğu düşünülür.
 - (c) Rubella IgG negatifse Rubella IgM araştırılıp negatif olduğunu iki kez 3 hafta arayla alınan kan örneklerinde doğrulamak gereklidir.
 - (d) Rubella IgM ve IgG pozitifliği birlikte ise hastalığın gebelikten hemen önce geçirilip geçirilmediğini anlamak için Rubella IgG avidite testi yapılır. Aviditenin %50'nin üzerinde çıkması enfeksiyonun 3-4 ay önce geçirildiğini düşündürür.
 - (e) Düşük avidite ve yüksek IgM pozitifliği 18. haftadan önce saptanmış ise amniyotik sıvıda PCR ile Rubella virus RNA'sı araştırılabilir.

KKS için

- Yenidoğanın kordon kanı veya doğumdan sonraki 1 ay içinde alınan serum örneğinde kızamıkçık IgM test sonucu **pozitif** bulunmuş ise KKS için "**kesin tanı**" bulgusudur. Test sonucu negatif bulunmuş ise bebek en az 1 aylık iken ikinci bir örnek daha alınmalı ve test edilmelidir.
- Altı aylıktan büyük bebekte sadece IgM testine güvenilmemeli, birkaç ay süresince seri IgG antikoru ölçümleri yapılarak antikor düzeyleri değerlendirilmelidir. Doğumdan sonraki 6.-12. aylar arasında en az iki kez yapılan incelemelerde kızamıkçık IgG titrelerinin **aynı düzeyde** devam ettiğinin gösterilmesi KKS için "**kesin tanı**" bulgusudur.
- Anneden geçen kızamıkçık IgG antikor titrelerinin azalıp azalmadığını görmek için doğumdan sonraki 0-6. aylar arasında da ayda bir kez serum örneği alınıp IgG titrelerine bakılması önerilir.

4.2. RT-PCR

- PCR sonucu **pozitif** ise birey **kızamıkçık vakasıdır**.
- Negatif sonuçlar hastalığı dışlamaz. Çünkü örneğin alınma zamanı sonucu belirler. Geç dönemde alınmış örneklerde sonuç negatif olabilir.
- Yenidoğanın boğaz sürüntüsü veya idrarından yapılan RT-PCR testi sonucu "pozitif" ise KKS için "**kesin tanı**" bulgusudur.

4.3. Hücre kültürü

- Hücre kültürlerinde üreme "**kesin tanı**" bulgusudur.
- Negatif sonuçlar hastalığı dışlamaz. Kültür sonuçları örneğin alınma zamanı, taşıma ve saklama şartlarından etkilenmiş olabilir.

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Viral kültür veya moleküler testler için örnek alırken her zaman sentetik (dakron ya da rayon uçlu) eküvyonlar tercih edilmelidir. Kalsiyum aljinatlı, pamuklu ve ahşap saplı eküvyon kullanılmamalıdır. Virüsler inaktive olabilir, PCR'da inhibitör etki yapabilirler.
- Doğru zamanda alınmamış örneklerde pozitif sonuç elde edilmesinde sorun yaşanabilir. Örneklerin uygun zamanda alınması önemlidir.
- Örnekler aseptik şartlarda alınmalıdır, sonuçlar etkilenebilir. Soğuk zincir şartlarında gönderilmeyen örnekler de test için uygun değildir.
- Hücre kültüründen izolasyon uzun zaman alması, laboratuvar güvenliği sorunları ve uygulama zorluğu gibi nedenlerle rutin tanı yöntemleri arasında yer almamaktadır.
- RT-PCR testleri pahalı olması, kontaminasyon riski nedeniyle özel çalışma ortamları ve tecrübe gerektirmesi gibi nedenlerle daha çok referans laboratuvarlarda doğrulayıcı testler olarak kullanılmaktadır.
- Serolojik yöntemler hızlı sonuç alınabilmesi, uzun süreli tecrübe gerektirmemesi, otomatize cihazlar geliştirilmiş olması, örnek alma ve taşınmasının kolaylığı ve ucuz yöntemler olmaları gibi nedenlerle tanıda en çok tercih edilen yöntemlerdir. Ancak hatalı pozitiflik ve hatalı negatiflikleri nedeniyle, özellikle klinik uyumsuz vakalarda doğrulama testlerine ihtiyaç duyulabilmektedir.
- Hemolizli veya lipemik serum örnekleri antikor titrelerinin hatalı okunmasına neden olabilir.
- IgG antikorları anne kaynaklı olabileceği için 6-8 aya kadar hatalı pozitifliğe yol açabilir.
- Akut enfeksiyonda bağışıklık sistemi baskılanmış hastada serolojik testler ile negatif/düşük pozitif sonuçlar alınabilir.
- Bellek B lenfositlerin poliklonal aktivasyonuna bağlı hatalı pozitiflikler saptanabilir.

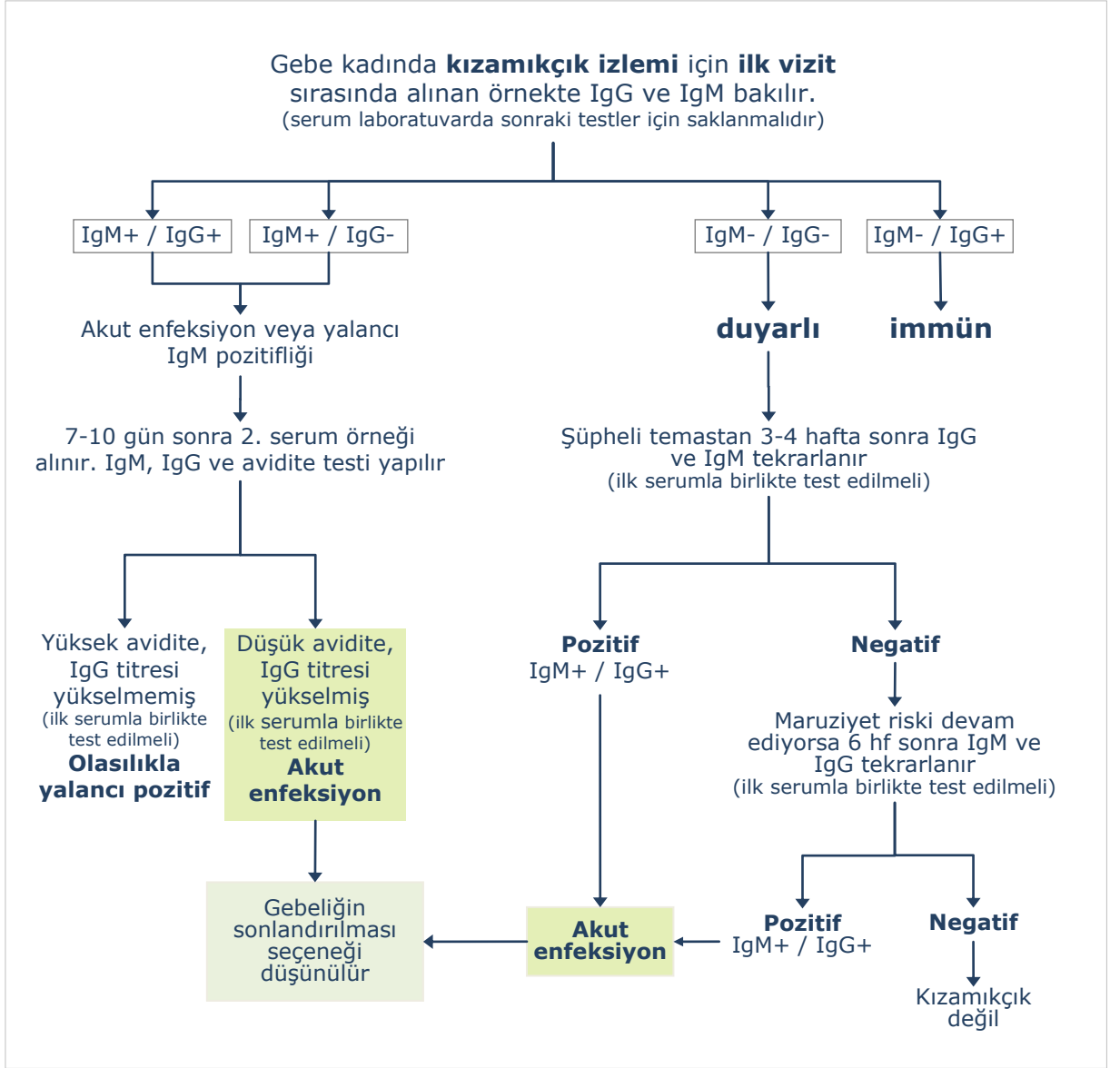
6 Referans Laboratuvar

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal Kızamık/Kızamıkçık Referans Laboratuvarı
Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55, F Blok 1.kat
06100 – Sıhhiye/ANKARA

Tel: 0312 565 5552 / 5340
www.thsk.gov.tr

Ekler

Ek-1 Gebe kadında kızamıkçık izlemi için akış şeması



Şekil 1. Gebe kadının kızamıkçık olasılığı yönünden serolojik izlemi için akış diyagramı: Burada, önceden kızamıkçık geçirmediği bilinen ve kızamıkçığa maruz kalmış hamile kadınların laboratuvar değerlendirmesi için kademeli bir süreç özetlenmektedir. Kan örneği alınmalı ve mümkün olduğunca çabuk kızamıkçık IgG ve IgM antikorları için test edilmelidir. Olası tekrar testleri için örnek laboratuvarında muhafaza edilmelidir. Eğer IgM pozitif ise, IgG yanıtı ne olursa olsun, bu çok yakında geçirilmiş enfeksiyonu veya akut enfeksiyonu ya da yanlış-pozitif IgM yanıtını gösterebilir. Bir sonraki adım, 7-10 gün içinde testi tekrarlamaktır. Test IgM, IgG ve avidite (eğer IgG mevcut ise) testlerini içermelidir. Eğer düşük avidite ya da IgG titrelerinde belirgin bir artış ile birlikte tekrarlanan IgM pozitif ise, akut enfeksiyon olasılığı yüksektir. Eğer IgM ve IgG pozitif ve avidite yüksek ise, bu yanlış pozitif bir sonucu veya reenfeksiyonu gösteriyor olabilir (8).

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Kızamıkçık Enfeksiyonunda ve Konjenital Kızamıkçık Sendromunda Mikrobiyolojik Tanı) ayrıca aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve ilave bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

UMS, V-MT-06	Kabakulak enfeksiyonunun mikrobiyolojik tanısı
UMS, V-MT-08	Kızamık ve SSPE'nin mikrobiyolojik tanısı
UMS, GEN-ÖY-01	Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Kızamık, Kızamıkçık ve Konjenital Kızamıkçık Sendromu Sürveyansı, Daimi Genelgesi. Sağlık Bakanlığı, Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, 2010/20.
- 2 WHO. Measles and rubella: Eliminating measles and rubella and preventing congenital rubella infection. http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0008/79028/E87772.pdf (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 3 WHO. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection. 2nd ed., World Health Organization. Expanded Programme on Immunization (EPI) team of the Department of Immunization, Vaccines and Biologicals, WHO/IVB/07.01, 2007. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70211/1/WHO_IVB_07.01_eng.pdf (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 4 CDC. Rubella. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. The Pink Book: Course Textbook - 12th edition, Second printing, May 2012. <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/rubella.html#rubella> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 5 Bellini WJ, Icenogle JP. Measles and Rubella Viruses. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 1372-87.
- 6 William JB, Icenogle JP, Sever JL. Measles, Mumps and Rubella. In: Specter S, Hodinka RL, Young SA, Wiedbrauk DL (eds). *Clinical Virology Manual*. 4th ed., ASM Press, Washington D.C. 2009, p.362-577
- 7 Dwyer DE, Robertson PW, Field PR. Broadsheet: clinical and laboratory features of rubella. *Pathology* 2001;33:322-28.
- 8 CDC. Vaccines and Immunizations. Chapter 14: Rubella. VPD Surveillance Manual, 5th ed, 2012. <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/surv-manual/chpt14-rubella.html> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 9 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı Ankara. 2004. <http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhbs/BulHastBilSistStanSurveLaReh.pdf> (Son erişim tarihi: 18.12.2013]
- 10 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 11 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmî Gazete 25.09.2010 – 27710.



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Kızamık ve SSPE'de (Subakut Sklerozan Panensefalit) Mikrobiyolojik Tanı

Hazırlayan Birim	Klinik Viroloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Viroloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	V-MT-08
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik
----------	-------	------------

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
Hastalığın önemi.....	3
Virüsün özellikleri	4
Klinik özellikler.....	4
Laboratuvar tanısı.....	5
TEKNİK BİLGİLER	6
1 Hedef mikroorganizma	6
2 Tanı için asgari laboratuvar gerekleri	6
3 Tanı teknikleri	8
4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim	10
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	11
6 Referans Laboratuvar	11
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	12
KAYNAKLAR.....	12

Kapsam ve Amaç

Kızamık çok bulaşıcı ve küçük çocuklarda ölüm oranları yüksek olabilen bir viral sistemik enfeksiyondur. SSPE ise santral sinir sisteminin kızamık virüsü ile persistan enfeksiyonu sonucu gelişen nörodejeneratif bir komplikasyondur. Her iki klinik durumda da kesin tanı laboratuvar incelemesine dayanır.

DSÖ 2000'li yılların başlarından bu yana dünyada kızamığa bağlı ölüm ve komplikasyonları önlemek için bir Eliminasyon Programı yürütmektedir. Ülkemizde de bu Program kapsamında kızamığın tanısı ve doğrulama çalışmaları THSK Ulusal Kızamık/Kızamıkçık Referans Laboratuvarı ve bazı Bölge Halk Sağlığı Laboratuvarlarının oluşturduğu bir ağ tarafından yürütülmektedir (1). Ağa dahil olmasalar da, klinik mikrobiyoloji laboratuvarları da -özellikle ayırıcı tanı gerekleri dolayısı ile- tanı panellerinde kızamık testlerine yer veriyor olabilirler; ancak eliminasyon programı nedeniyle şüpheli sonuçlarının teyidi için ulusal referans laboratuvarlar ile işbirliği yapma sorumlulukları vardır. Bu UMS belgesi, bu nedenlerle, kızamık ve SSPE'de örnek yönetimi hususları ve tanıda kullanılan yöntemler hakkında özellikle klinik laboratuvarların güncel uygulamaya dair bilgilendirilmesini hedeflemektedir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

SSPE Subakut sklerozan panensefalit

URL Ulusal Referans Laboratuvarı

Genel Bilgi

Hastalığın önemi

Kızamık çok bulaşıcı, morbidite ve mortalitesi yüksek bir viral hastalıktır. Etkili ve ucuz bir aşısının bulunmasına rağmen dünyada küçük çocuklarda önde gelen ölüm sebepleri arasında yer almaya devam etmektedir. Son on yılda kızamık aşılama programlarının ölümleri %71 oranında azalttığı tahmin ediliyorsa da DSÖ verilerine göre 2011'de dünya genelinde 158.000 kızamıktan ölüm kaydedilmiştir. Ölümlerin %95'ten fazlasının düşük gelirli, yetersiz sağlık altyapısına sahip ülkelerden olması dikkati çekmektedir (2).

Ülkemizde, DSÖ'nün Avrupa Bölgesinde 2015 yılına kadar kızamığın eliminasyonu hedefi kapsamında (ve kızamıkçık eliminasyonu ile entegre) bir program yürütülmektedir. 2001 yılında 30.000'in üzerinde olan vaka sayısı 2009'da tek haneli rakamlara düşmüş olup kızamıkta eliminasyon aşamasına gelindiği kabul edilmektedir ve Sağlık Bakanlığı kızamık sürveyans stratejilerini de buna göre yeniden düzenlemiştir (1). Ancak son dönemde Avrupa bölgesinde ve Irak, Suriye gibi komşu ülkelerde yaşanan salgınlar nedeniyle kızamık yeniden gündeme yükselmiştir. Salgınlar Türkiye'ye de yansımış olup vaka grupları incelendiğinde çocuklar kadar erişkinlerin de etkilendiği gözlenmektedir.

Virüsün özellikleri

Kızamık etkeni (Measles virüs), *Paramyxoviridae* familyasının *Morbillivirus* cinsine ait, 150 nm boyunda, zarflı, tek sarmallı bir RNA virüsüdür. Hayvan rezervuarı ve vektörü yoktur (1,3,4). UV ışınlar, asit etkisine, ısıya ve kuruluğa duyarlıdır. Isı ile hızla inaktive olur. Havada, eşyalarda veya yüzeylerde canlı kalma süresi oldukça kısadır (<2 saat).

Patogenezi iki membran zarf proteini önemlidir. Bunlardan biri, hücrelere virüsün yapışmasından sorumlu olan H (hemaglütinin) protein, diğeri de virüsün konak hücre membranını delip hücre içine geçişinden sorumlu olan F (füzyon) proteindir (3,4). Kızamık virüsünün yalnızca bir antijenik tipi vardır.

Vahşi virüs, viral genomun en değişken gen bölgeleri olan hemaglütinin (H) ve nükleoprotein (N) genlerinin sekanslanması temelinde, genotip olarak adlandırılan gruplara ayrılır. Salgınların araştırılması, dolaşan vahşi kökenlerin tanımlanması, aşıya bağlı döküntülü reaksiyonlarda aşı süşunun ayırt edilmesi gibi durumlarda moleküler epidemiyolojik çalışmalar genotiplemeye dayanır. Bugüne kadar dünyada dolaşan 20'den fazla genotip tanımlanmıştır (A, B1, B2, B3, C1, C2, D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, E, F, G1, G2, G3, H1, H2) (5).

Klinik özellikler

Kızamık

Kızamık sistemik bir enfeksiyondur. Primer enfeksiyon bölgesi nazofarinks epitelidir. Virüsün epitel hücrelerinde ve bölgesel lenf bezlerinde çoğalmasını 2-3 gün sonra bir primer viremi ve retiküloendotelial sistemin enfeksiyonu takip eder. Viral replikasyonun devamı ile 5-7. günlerde ikinci viremi olur ve enfeksiyon solunum sistemine ve diğeri organlara da yayılır (1,4).

İnkübasyon süresi ortalama 10-12 gündür. İnkübasyonu takiben enfeksiyon, yüksek ateş, öksürük ve burun akıntısı ile seyreden 2-4 günlük bir prodrom dönem ile başlar. Sıklıkla konjonktivit ve bronşit de görülür. Döküntü henüz yoktur. Hastanın virüs yaydığı bu dönem oldukça bulaşıcıdır. Kuru öksürük, lenfadenopati, fotofobi, bazen de eklem ağrıları olabilir. Döküntüler ortaya çıkmadan önce hastaların %80'inin ağız mukozasında Koplik lekeleri denilen kırmızı zeminde beyaz lekeler görülebilir. 2-4 gün sonra önce kulak arkası ve yüzde olmak üzere tipik döküntü başlar. Döküntüyle birlikte ateş çok yükselir. Tipik olarak döküntü 3-7 günde deskuamasyonla ve başladığı sırayla sonlanır (1).

Hastalık, kötü beslenen, özellikle yeterli A vitamini alamayan çocuklarda ve bağışıklık sistemi zayıflamış kişilerde çok şiddetli seyredebilir (1).

Kızamık vakalarının yaklaşık %30'unda bir veya daha fazla komplikasyon gözlenir. Komplikasyonlar en fazla 5 yaşın altındaki çocuklarda ve 20 yaşın üzerindeki bireylerde ortaya çıkmaktadır. En sık görülen komplikasyonlar ishal (%8), orta kulak iltihabı (%7), pnömoni (%6) olup daha az sıklıkla ensefalit (%0.1), nöbetler (%0.6-0.7) ve ölüm (%0.2) rapor edilmiştir (4). Pnömoni viral olabileceği gibi, bakteriyel sekonder enfeksiyon şeklinde de gelişmiş olabilir ve kızamığın en öldürücü komplikasyonudur.

SSPE

SSPE santral sinir sisteminin kızamık virüsü ile persistan enfeksiyonu sonucu gelişen nörodejeneratif bir komplikasyondur. Gelişmiş ülkelerde, SSPE yaygın kızamık aşılama programları nedeniyle nadir bir hastalık haline gelmiştir (6).

SSPE, kızamık enfeksiyonu geçirildikten 4-10 yıllık bir latent dönem sonrası ilerleyici nörolojik bozukluklarla ortaya çıkar. Hastalık kırsal kesimde daha sık görülmekte olup olguların büyük kısmında 4 yaşından önce kızamık enfeksiyonu öyküsü vardır. Kızamık enfeksiyonuna yakalanma yaşı düştükçe SSPE gelişme riski artmaktadır.

Laboratuvar tanısı

Kızamık

Kızamık, eliminasyon öncesi dönemde karakteristik döküntü ve prodrom belirtiler temelinde klinik tanı konulan bir hastalık idi. DSÖ'nün eliminasyon programı ile birlikte pek çok ülkede hastalığın görülme sıklığı (insidans) hızla azalmıştır. İnsidansın düşmesiyle, klinik tanının pozitif tahmin değeri de düştüğü için; tek başına klinik belirtiler artık kızamık tanısı için güvenilir kabul edilmemektedir. Kızamığın tanısı laboratuvara dayalıdır (3). Özellikle eliminasyon fazında, etkili bir süreyans için laboratuvar testleri ile şüpheli vakaların tanısı, salgınların doğrulanması ve dolaşan virüslerin genotiplendirilmesi esastır. Kızamığın tanısı ve doğrulanması için laboratuvar faaliyetlerinin de DSÖ'nün onayladığı ulusal referans laboratuvarlarca yürütülmesi hedeflenmiştir (1,3).

Tanıda başlıca yöntemler virüsün klinik örneklerden izolasyonu, nükleik asitlerinin gösterilmesi ve oluşan antikor yanıtının gösterilmesidir.

Primer bağışıklık yanıtı sırasında kızamığa özgü IgM ve IgG antikorları yükselmeye başlar ve ELISA ile serumda saptanabilirler. Döküntülerin ortaya çıkmasından itibaren kızamık vakalarının %70'inde ilk 2 gün, %90'ında ise 3-5 gün içerisinde IgM pozitifliği saptanır. IgM antikorları 7-10 gün içinde pik yaptıktan sonra düşmeye başlar, 6-8 haftanın sonunda ise artık nadiren saptanabilir. IgG antikor düzeyleri ise 3. haftada pik yaparak enfeksiyondan sonra uzun süre bulunmaya devam eder. Yanıt sırasında, serum ve sekretuar IgA antikorları da oluşmaktadır (3,4).

DSÖ, kızamığın tanısında rutin uygulama için ELISA ile özgül IgM antikorlarının gösterilmesini önermektedir. Sıklıkla tanı için tek bir serum örneği yeterlidir. Akut enfeksiyonun tanısı amacıyla IgG antikorları incelenecekse -ilki döküntüler başladığında alınmış olmak üzere- çift serum örneğinde titrelerin en az 4 kat arttığı gösterilmesi gerekir.

Enfekte olmamış bireylerde IgM negatif, IgG ise negatif veya pozitif bulunabilir.

Klinik örneklerin kültürlerinden virüsün izolasyonu rutin tanı metodu olarak değil, daha ziyade izolatların elde edilmesi ve moleküler epidemiyolojik çalışmalarla dolaşan suşların tiplendirilmesi için kullanılmaktadır. Kızamık virüsü nazofaringeal aspirat, boğaz sürüntüsü, idrar, heparinize kan (mononükleer hücreler) gibi klinik örneklerden döküntülerin başlamasından itibaren ilk 4 gün boyunca izole edilebilir. RT-PCR ile de 7. güne kadar (ve bazen sonrasında) saptanabilir (3).

Şüpheli vakalardan ilk karşılaşmada hemen serum örneği alınmalıdır. İdeal olarak serum örneği alınan bütün vakalardan mümkünse virüs kültürleri için de örnekler alınmalı ve gönderilmelidir. Boğaz, burun ve nazofarinks örnekleri döküntü tarihinden itibaren ilk 4 gün içinde, idrar ilk 7 gün içinde alınır. Birden fazla tip örnek alınması izolasyon şansını yükseltir.

Kızamık IgM'in pozitif bulunması veya çift serum örneğinde IgG antikorlarının arttığına görülmesi veya RT-PCR ile viral RNA saptanması veya virüsün kültürlerden izolasyonu "kesin tanı" koydurucudur (7).

SSPE

SSPE'nin tanısı da laboratuvar incelemeleri ile konur. Tanı başlıca; ölüm öncesi veya sonrası alınmış beyin doku örneklerinin histolojik incelemesinde kızamık inklüzyon cisimlerinin görülmesine ya da BOS'da (intratekal) kızamık IgG antikorlarının üretilmekte olduğunun gösterilmesine dayanır (7,8,9,10).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizma

Measles virus (Kızamık virüsü)

2 Tanı için asgari laboratuvar gerekleri

2.1. Laboratuvar güvenliği

Kızamık virüsü Risk Grubu 2 mikroorganizmadır ve şüpheli enfeksiyonlarının tanısı ile ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün kültürler ve klinik örnekler enfeksiyöz kabul edilmeli, daima standart önlemler uygulanmalı ve önlemler risk değerlendirmesi ile de desteklenmelidir. Solunum yolu örneklerinin kültüre veya diğer işlemlere hazırlanması başta olmak üzere aerosol oluşturması muhtemel tüm laboratuvar çalışmaları bir sertifikalı bir sınıf-IIA BGK içinde yapılmalıdır (ayrıca bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

Serum ayırma ve testlerin çalışılması sırasında **daima** eldiven giyilmelidir.

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Kızamık tanısı ve/veya doğrulaması ile uğraşan laboratuvarların personeli asgari şu gerekleri karşılar: (i) hastalığın tanısı için geçerli yöntem(ler)i uygulamadan önce, amaçlanan kullanım ile ilgili tüm eğitimleri almış; (ii) laboratuvar güvenliği ve kalite gereklerine dair gerekli tüm eğitimleri almış; (iii) Eliminasyon Programının önemine vakıf olmak.

Hem güvenlik önlemlerine uyumun sağlanmasından hem de testlerin standart prosedürlere uygun yapılmasından ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, Reaktif, Kit, Donanım

İnceleme örneği

İnceleme örneklerinin seçimi, özellikleri, alınması, gönderilmesi ve laboratuvara kabulü ile ilgili kriterler ve bilgi için "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"ne ve 'Daimi Genelge'ye (1) başvurulmalıdır. Ayrıca bazı önemli noktalara aşağıda tekrar dikkat çekilmiştir.

- Serum örneği – Salgın tanısı için örnek alınıyor olabileceği gibi sürveyans kapsamında -sporadik- bir vakanın tanısını koymak için de örnek alınıyor olabilir. Amaca göre şu hususlar önem kazanır:
 - (a) Kızamık şüpheli bir vakadan öncelikle serum örneği alınır.
 - (b) Serum örneği vaka ile ilk karşılaşıldığında (döküntülerin başlamasından sonraki 3-28 gün içinde) alınmalıdır.
 - (c) Döküntüden sonraki ilk 3 gün içerisinde kızamık IgM antikoru saptanamayabilir. Bu nedenle ilk 3 gün içerisinde serum örneği alınmış ancak IgM antikoru negatif veya ara değer olarak saptanmış vakalardan mutlaka ikinci serum örneği alınmalıdır.
- Kültür için örnekler - (nazofarinks, boğaz, burun sürüntüsü, idrar) – virüsün izolasyonu için kullanılır. Bu örneklerden PCR da yapılabilir. Özellikle salgın durumunda sorumlu virüsün (kızamık veya kızamıkçık) kültürden izolasyonu hedeflenir.
 - (a) Örneğin döküntünün ilk başladığı gün alınması izolasyon şansını artırır. Bu nedenle hasta ile ilk temasta serum alınırken kültür için de örnek alınması idealdir.
 - (b) Bu örneklerinin alınması serumun yerine geçmez! Serum her durumda mutlaka alınmalıdır.
 - (c) Nazofarinks örneği (aspirat veya sürüntü) alınması boğaz veya burun örneklerine göre daha zahmetlidir. Özel eküvyon veya aparey gerektirir ve hastaya daha fazla rahatsızlık verir. Eldeki imkanlara bakılarak –boğaz, burun örnekleri alınabilmiş ise- nazofarinks örneğinin alınıp alınmayacağına karar verilebilir.
 - (d) Kızamık ve kızamıkçık virüsleri ısıya duyarlı oldukları için soğukta saklanmayan örneklerde enfektivite hızla düşer. Bu nedenle örnekler laboratuvara olabildiğince çabuk ve soğuk zincirde gönderilmelidir.
- BOS örneği - SSPE tanısı için ilgili uzman doktor tarafından aseptik şartlarda 1-2 mL alınır. Özgül antikor indeksinin hesaplanması için mutlaka eş zamanlı olarak serum örneği de alınıp gönderilmelidir.
- Örneklerin gönderilmesinde *paketlenme* ve *taşıma* biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (11) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).

Reaktif / Kit

- Kızamık IgM ELISA

- Kızamık RT-PCR hazır ticari kitleri
- SSPE tanısı için - Kızamık IgG ELISA; BOS ve serum için ayrı tasarlanmış olmalıdır.
- Total IgG nefelometre kitleri (BOS ve serum)
- Total albümin nefelometre kitleri (BOS ve serum)

Seroloji gereç, donanım

- ELISA okuyucu, yıkayıcı
- Nefelometri cihazı

Hücre kültürü laboratuvarı altyapısı ve donanımı

- İnvert mikroskop
- Biyogüvenlik kabini
- -80°C derin dondurucu, sıvı azot tankı

PCR ve diğer moleküler testler için

- En az üç ayrı oda - nükleik asit ekstraksiyonu, PCR karışımının hazırlanması, amplifikasyonun ve sonuç gözetiminin yapılabileceği ayrı odalar. İdeal olarak PCR karışımı hazırlama odası (temiz oda) pozitif basınçlı, agaroz jel elektroforezi yapılan oda (kirli oda) negatif basınçlı havalandırmaya sahip olmalıdır.
- Cihazlar – biyogüvenlik kabini, soğutmalı mikrosantrifüj, hassas terazi, vorteks, su banyosu, yatay çalkalayıcı, mikrodalga fırın, otomatize / yarı otomatize nükleik asit ekstraksiyon sistemleri ve nükleik asit amplifikasyon cihazı, jel görüntüleme sistemi, elektroforez ünitesi vb.

2.4. Kalite kontrol

- Her testte iç kalite kontrol amacıyla en az bir pozitif ve bir negatif internal kalite kontrol serumu çalışmaya dahil edilir.
- Eksternal kalite kontrol testleri belirli aralıklarla çalışılarak sonuçları değerlendirilir.
- İnternal kontrol, nükleik asit testlerinde ekstraksiyonun ve amplifikasyonun verimliliği ve inhibitör olup olmadığının gösterilmesi için izolasyon basamağından itibaren hasta örneği ile birlikte aynı reaksiyon tüpünde amplifiye edilmelidir.

3 Tanı teknikleri

3.1. Kızamık IgM ELISA

- Akut enfeksiyonun tanısında **ilk tercih** IgM saptayan ELISA testleridir. IgM-capture ELISA veya özgül IgM-indirekt EIA formatındaki kitler kullanılabilir (3).
- El ile çalışılan, yıkama ve okuma işlemleri cihaz ile yapılan hazır ticari kitler olduğu gibi, yüksek test sayıları söz konusu olduğunda otomatize

cihazlarla çalışılan makro- veya mikro ELISA kitleri de mevcuttur.

- ELISA testi ile saptanan IgM pozitifliği tanı koydurucudur ve her şüpheli vakada IgM ELISA testinin yapılması hedeflenir.
- Kızamık IgM testi sıklıkla döküntünün görüldüğü günden itibaren pozitif bulunur; ancak %20 kadar vakada 72 saate kadar negatif sonuç verebildiği için, kızamık şüphesinin devam ettiği olgularda testin birkaç gün sonra tekrarlanması gerekebilir (3,4)

3.2. Kızamık IgG ELISA

- IgG antikorları enfeksiyonun ileri evrelerinde veya aşılardan sonra ortaya çıkar.
- Akut enfeksiyonun tanısı amacıyla IgG antikorları incelenecekse serokonversiyonun gösterilmesi gerekir! Bunun için -ilki döküntüler başladığında olmak üzere- en az 3 hafta ara ile alınmış iki serum örneğinin eş zamanlı çalışılması ve titrelerin en az 4 kat arttığına gösterilmesi gerekir.
- El ile çalışılan, yıkama ve okuma işlemleri cihaz ile yapılan hazır ticari kitler olduğu gibi, yüksek test sayıları söz konusu olduğunda otomatize cihazlarla çalışılan makro- veya mikro ELISA kitleri de mevcuttur.
- Tek serum örneğinde pozitif sonuç geçirilmiş enfeksiyon veya aşıya bağlı bağışıklık düşündürür.
- SSPE tanısı için BOS ve serum örnekleri birlikte çalışılır. Sonuçların değerlendirilmesi indeks hesaplamalarına göre yapılır (*bkz.* sayfa 10).

3.3. Moleküler tanı

- Gerçek zamanlı RT-PCR hazır ticari kitleri ile kızamık virüs RNA saptanabilmektedir. Konvansiyonel yöntemlerle de hedef bölgelere yönelik PCR çalışmaları yapılabilir.
- URL'de kızamık için moleküler tanı testleri uygulanabilmekte ve moleküler tiplendirme (sekans analizi) yapılabilmektedir (adres ve iletişim bilgileri için *bkz.* sayfa 11).

3.4. Hücre kültürü

- Hücre kültüründen virüsün izolasyonu çok güvenilir bir yöntemdir ve URL'de gerçekleştirilmektedir.
- Dünya Sağlık Örgütü, DSÖ Laboratuvar Ağı'na dahil laboratuvarlarda hem kızamık hem de kızamıkçık virüs izolasyonları için Vero/SLAM hücre hattını önermektedir. Bu hücre hattı ticari olarak üretilen bir ürün değildir ve piyasadan temin edilemez (3).
- Vero/SLAM hücre hattının kızamık virüsüne duyarlılığı B95 hücrelerine eşdeğer kabul edilir; B95'e üstünlüğü ise Epstein-Barr virüs ile enfekte olmayışı nedeniyle laboratuvar güvenliği açısından uygun olmasıdır.
- Vero/SLAM hücre hattında üreme sitopatik etkinin gözlenmesi ve 'syncytium' oluşumu ile değerlendirilmektedir.

4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim

4.1. Serolojik testler

- Son 3 ay içinde aşılama öyküsü olmayan bireyde **IgM pozitif ise** birey **kızamık vakasıdır**.
- Son 3 ay içinde aşılama öyküsü olmayan bireyde **IgM "ara değer" bulunmuş ise** 7-10 gün sonra 2. serum örneği alınıp incelenmelidir ve antikor titresi (IgG titre artışı olup olmadığı) takip edilmelidir.
- Son 3 ay içinde kızamık aşı uygulaması varsa IgM pozitif veya ara değer pozitif bulunması durumu aşya bağlı pozitiflik olarak değerlendirilir.

4.2. RT-PCR

- PCR sonucu **pozitif** ise birey **kızamık vakasıdır**.
- Negatif sonuçlar hastalığı dışlamaz. Çünkü örneğin alınma zamanı sonucu belirler. Geç dönemde alınmış örneklerde sonuç negatif olabilir.

4.3. Hücre kültürü

- Hücre kültürlerinde üreme "**kesin tanı**" bulgusudur.
- Negatif sonuçlar hastalığı dışlamaz. Kültür sonuçları örneğin alınma zamanı, taşıma ve saklama şartlarından etkilenmiş olabilir.

4.4. SSPE tanısında test sonuçlarının yorumu

- SSPE vakalarında BOS'da kızamık IgG titresi yükselir ve 1:40 ile 1:1280 arası ölçülebilir.
- Özgül kızamık IgG antikorlarının BOS ve serum düzeylerinin birbirine oranının BOS lehine yükselmesi ise esas tanı koydurucu bulgudur.
 - (a) Normalde bu oranın (kızamık IgG BOS / kızamık IgG serum) 1/200 ila 1/500 arasında olması beklenir.
 - (b) SSPE'de bu oran BOS lehine yükselmektedir; 1/5 ila 1/50 arasında bulunması SSPE tanısı açısından anlamlıdır.
- İntratekal antikor yapımının gösterilmesinde nefelometrik yöntem ile total IgG ölçümleri de kullanılır. Bu amaçla BOS IgG ve serum IgG değerleri ölçülerek, aşağıdaki formül ile özgül indeks hesaplanır.

$$\text{Özgül indeks} = \frac{\text{BOS kızamık IgG/Serum kızamık IgG}}{\text{BOS IgG/Serum IgG}}$$

- (a) Özgül IgG indeksi normalde <1.5'dur (~0.69).
- (b) Özgül indeks ≥ 1.5 olursa intratekal özgül antikor sentezi göstergesi olarak değerlendirilir (10).

- Albümin indeksi bir diğer göstergedir. Normal albümin indeksi (BOS albümin/ serum albümin) 0.0018- 0.0074'dir.

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Viral kültür veya moleküler testler için örnek alırken her zaman sentetik (dakron ya da rayon uçlu) eküvyonlar tercih edilmelidir. Kalsiyum aljinatlı, pamuklu ve ahşap saplı eküvyon kullanılmamalıdır. Virüsler inaktive olabilir, PCR'da inhibitör etki yapabilirler.
- Doğru zamanda alınmamış örneklerde pozitif sonuç elde edilmesinde sorun yaşanabilir. Örneklerin uygun zamanda alınması önemlidir.
- Örnekler aseptik şartlarda alınmalıdır, sonuçlar etkilenebilir. Soğuk zincir şartlarında gönderilmeyen örnekler de test için uygun değildir.
- Hücre kültüründen izolasyon uzun zaman alması, laboratuvar güvenliği sorunları ve uygulama zorluğu gibi nedenlerle rutin tanı yöntemleri arasında yer almamaktadır.
- RT-PCR testleri pahalı olması, kontaminasyon riski nedeniyle özel çalışma ortamları ve tecrübe gerektirmesi gibi nedenlerle daha çok referans laboratuvarlarda doğrulayıcı testler olarak kullanılmaktadır.
- Serolojik yöntemler hızlı sonuç alınabilmesi, uzun süreli tecrübe gerektirmemesi, otomatize cihazlar geliştirilmiş olması, örnek alma ve taşınmasının kolaylığı ve ucuz yöntemler olmaları gibi nedenlerle tanıda en çok tercih edilen yöntemlerdir. Ancak hatalı pozitiflik ve hatalı negatiflikleri nedeniyle, özellikle klinik uyumsuz vakalarda doğrulama testlerine ihtiyaç duyulabilmektedir.
- Hemolizli veya lipemik serum örnekleri antikor titrelerinin hatalı okunmasına neden olabilir.
- IgG antikorları anne kaynaklı olabileceği için 6-8 aya kadar hatalı pozitifliğe yol açabilir.
- Akut enfeksiyonda bağışıklık sistemi baskılanmış hastada serolojik testler ile negatif veya düşük pozitif sonuçlar alınabilir.
- Bellek B lenfositlerin poliklonal aktivasyonuna bağlı hatalı pozitiflikler saptanabilir.

6 Referans Laboratuvar

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal Kızamık/Kızamıkçık Referans Laboratuvarı
Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55, F Blok 1.kat
06100 – Sıhhiye/ANKARA

Tel: 0312 565 5552 / 5340
www.thsk.gov.tr

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Kızamıkçık Enfeksiyonunda ve Konjenital Kızamıkçık Sendromunda Mikrobiyolojik Tanı) ayrıca aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve ilave bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

- UMS, V-MT-06 Kabakulak enfeksiyonunun mikrobiyolojik tanısı
 UMS, V-MT-07 Kızamıkçık ve Konjenital Kızamıkçık Sendromunun mikrobiyolojik tanısı
 UMS, GEN-ÖY-01 Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Kızamık, Kızamıkçık ve Konjenital Kızamıkçık Sendromu Sürveyansı, Daimi Genelgesi. Sağlık Bakanlığı, Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, 2010/20.
- 2 WHO. Measles and rubella: Eliminating measles and rubella and preventing congenital rubella infection. http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0008/79028/E87772.pdf (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 3 WHO. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection. 2nd ed., World Health Organization. Expanded Programme on Immunization (EPI) team of the Department of Immunization, Vaccines and Biologicals, WHO/IVB/07.01, 2007. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70211/1/WHO_IVB_07.01_eng.pdf (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 4 CDC. Measles. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. The Pink Book: Course Textbook - 12th edition, Second printing, May 2012. <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/meas.html#epi> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 5 CDC. Measles (Rubeola): Genetic analysis of measles viruses. <http://www.cdc.gov/measles/lab-tools/genetic-analysis.html> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 6 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı Ankara. 2004. <http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (erişim tarihi: 18.12.2013)
- 7 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 8 Koppel BS. Subacute sclerosing panencephalitis: an update. *Develop Med Child Neurology* 2010;52:901-907
- 9 Dorta-Contreras AJ. Polyspecific response in the central nervous system. Use of antibody indeks. *Rev Neurol* 2000;31(11):1070-3.
- 10 Jacobi C, Lange P, Reiber H. Quantitation of intrathecal antibodies in cerebrospinal fluid of subacute sclerosing panencephalitis, herpes simplex encephalitis and multiple sclerosis: discrimination between microorganism-driven and poly specific immune response. *J Neuroimmunol* 2007;187:139-46.
- 11 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmî Gazete 25.09.2010 – 27710.



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Suçiçeğinin (Varicella zoster virus enfeksiyonunun) Mikrobiyolojik Tanısı

Hazırlayan Birim	Klinik Viroloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Viroloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	V-MT-09
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
Hastalığın önemi.....	3
Klinik özellikleri	4
Laboratuvar Tanısı	5
TEKNİK BİLGİLER	6
1 Hedef mikroorganizma	6
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	6
3 Suçiçeğinin tanısında kullanılan teknikler	8
4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim	9
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	10
KAYNAKLAR.....	10

Kapsam ve Amaç

Suçiçeği (varicella; chickenpox) genellikle çocukluk yaş grubunu etkileyen akut döküntülü bir viral enfeksiyondur. 2000'li yılların ortalarından itibaren ülkemizde sürveyans kapsamına alınmış; bildirim zorunlu hastalıklar listesine dâhil edilmiştir (1,2). Suçiçeğinin tanısında enfeksiyon özelliklerinin tipik olması nedeni ile sıklıkla tanı klinik olarak konmakla birlikte bazı olgularda mikrobiyolojik tanı gerekmektedir. Bu çerçevede, bu UMS belgesinde suçiçeğinin laboratuvar tanısı için güncel ve geçerli yöntem ve yaklaşımların verilmesi hedeflenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

- FAMA** Membran antijenine karşı floresan antikör testi
HSV Herpes simpleks virüs
ORF Open reading frame (açık okuma çerçevesi)
VZV Varisella zoster virus

Genel Bilgi

Suçiçeği enfeksiyonu varicella zoster virus (VZV)'ün neden olduğu bir klinik tablodur. Etken VZV bir DNA virüsüdür ve diğer herpes virüslerinde içinde yer aldığı *Herpesviridae* ailesinin bir üyesidir (3). Yalnızca insanda hastalık yapar ve insanlar bu virüs için tek enfeksiyon kaynağıdır. Virüsün çevresel şartlarda kısa bir yaşam süresi olduğu tahmin edilmektedir.

Diğer herpes virüsleri gibi, VZV de ilk enfeksiyondan sonra vücutta latent bir enfeksiyon şeklinde varlığını sürdürme özelliğine sahiptir ve duyuşal sinir ganglionlarında kalmaya devam eder. VZV ile ilk enfeksiyon **suçiçeği** ile sonuçlanır. **Herpes zoster (zona)** tekrarlayan enfeksiyonun bir sonucudur ve genellikle erişkinlerde, hem 45 yaş üzeri bağışıklık sistemi normal bireylerde hem de HIV ve diğer immün yetmezlik durumlarında görülür (4).

Hastalığın önemi

Suçiçeği dünyanın hemen her yerinde görülen bir hastalıktır. Rutin aşılama programı uygulanmayan ülkelerde suçiçeği yaygın olarak çocukluk çağında görülür. Suçiçeği son derece bulaşıcıdır; etken virüs solunum damlacıklarıyla çok kolay yayıldığından, çocukların hemen hepsi hastalığı geçirir. İkincil enfeksiyon atağı duyarlı ev temaslılarında %61-100 oranındadır (4). Rutin aşılama programı uygulanmayan ülkelerde erişkinlerde VZV'ye karşı bağışıklık ~%90'dır.

Suçiçeği genellikle ılımlı bir hastalık tablosu ile seyretse de yol açabildiği komplikasyonlar ve ölüm riski nedeniyle halk sağlığı açısından önem arz eder.

Hastalığın şiddeti ve komplikasyonlarının 1 yaşın altındaki bebeklerde, erişkin yaşta ilk enfeksiyonu geçirenlerde ve bağışıklığı baskılanmış kişilerde arttığı bilinmektedir. Bağışıklığı baskılanmış olgularda VZV enfeksiyonu ciddi ve jeneralize seyreder (5). Doğumdan önceki 5 gün ve sonraki 2 gün arasında döküntüleri başlayan kadınların yeni doğan bebekleri de ciddi enfeksiyon riski altındadır ve fatalite oranı %30 kadar yüksek olabilir (6). Ancak, sağlıklı çocuklar ve yetişkinlerde de ciddi komplikasyonlar gelişebilir ve ölüm olabilir. Sekonder bakteriyel enfeksiyonlar (en önemlisi A grubu beta-hemolitik streptokokun neden olduğu sellülit, nekrotizan fasiit, septisemi, ve toksik şok sendromu gibi enfeksiyonlar), pnömoni, ensefalit, serebellar ataksi, Reye sendromu ve ölüm en önemli komplikasyonlardır (4,6). VZV gebelik esnasında anneden bebeğe plasental yol ile geçebilir ve fetüsü etkiler.

Bulaşma, suçiçeği ya da herpes zosterli kişilerle direkt temas veya suçiçeği olan bireylerin solunum damlacıkları veya lezyonlarından saçılan virüsün solunum yoluyla alınması sonucu olur. Kapalı ortamlarda damlacık enfeksiyonu olasılığının artmasına bağlı olarak suçiçeği prevalansı sert iklimlerde daha yüksektir.

Klinik özellikleri

Suçiçeğinin inkübasyon süresi 10-21 gündür. İnkübasyon döneminden sonra ateş ve halsizlik gibi prodrom belirtiler başlar. Ardından önce kaşıntılı papüller izlenir. Eritemli papül üzerinde oluşan vezikül zaman içerisinde püstülleşir ve kurutlanır. Hastalık tablosunda görülen döküntüler her gün yeni eklenen döküntüler nedeni ile aynı anda makülopapüller, veziküller ve kabuklanmış olabilir. Makülopapüller lezyonlar vezikülleştikten sonra 1-2 gün içinde kabuklanır, ama üç haftadan önce tamamen iyileşmez. Döküntülerin dağılımı gövdede başlar sonra yüz ve ekstremitelere yayılır. Avuç içleri ve ayak tabanları nadir etkilenirler. Bulaştırıcılık döküntülerin/semptomların 1-2 gün öncesinde başlar ve açık lezyonlar olduğu sürece ve immünkompetan olgularda döküntünün yaklaşık beşinci gününe kadar sürer.

Suçiçeği sağlıklı çocuklarda oldukça ılımlı seyreder. Ancak bazen komplikasyonlar görülebilir. Suçiçeğinin en yaygın komplikasyonu deri lezyonlarının stafilokoklar veya streptokoklarla sekonder bakteriyel enfeksiyonlardır (4). Ayrıca pnömoni, menenjit, ensefalit ve myelit tablolarına da neden olabilir. Pnömoni genellikle viraldir, fakat bazen bakteriyel de olabilir. Ensefalit primer akut enfeksiyonu takiben veya postenfeksiyöz izlenebilir; oldukça nadir bir komplikasyon olmakla birlikte (tahminen 10.000 vakada 1.8) nöbetlere ve komaya neden olabilir (3,6). Yaygın serebral tutulum daha ziyade erişkinlerde olur. Gebelikte geçirilen enfeksiyon fetal enfeksiyona yol açar. VZV aşısı sonrasında 7-42. günde (ortalama 3-4 hafta) aşı yerinde veya vücutta suçiçeği benzeri döküntüler de görülebilir. Bu lezyonlardan VZV Oka (aşı) suşu PCR ile saptanabilir (3,7).

Eğer duyu sinir gangliyonlarında yerleşik latent VZV yeniden -genellikle primer enfeksiyondan yıllar sonra- aktive olursa (nüks), **zona** meydana gelir ve dorsal gangliyonun inerve ettiği anatomik bölgede, deride, suçiçeğinde görülene benzer lezyonlar ortaya çıkar. VZV'nin latentlik durumunu kontrol eden immünolojik mekanizma iyi anlaşılmamıştır. Ancak, ileri yaş, immün baskılanma, VZV'ye intrauterin maruz kalma ve erken yaşta (18 aylıktan küçük bebek) suçiçeği geçirme gibi faktörlerin nüks ile ilişkili olduğu bilinmektedir.

Zona lezyonları konak immün yanıtı ile (özellikle anti-VZV sitotoksik T hücre) kontrol altına alınır ve birkaç haftada iyileşir. Nadiren immün yeterli kişilerde, çok ağrılı post-herpetik nevralji, menenjit, ensefalit, göz tutulumu, perivaskülit, atipik nekrotizan retinopati gibi komplikasyonlar gelişebilir. HIV enfeksiyonu ve bazı kanserler gibi immün yetmezlik hallerinde ağır ve yaşamı tehdit eden zona görülebilir (3,4).

Laboratuvar Tanısı

Klinik özelliklerin çok tipik olması nedeni ile tanı çoğunlukla klinik olarak konur. Suçiçeği bildirimi zorunlu bir hastalıktır ve sürveyansa esas **standart vaka tanımına** göre klinik olarak akut başlayan, belirgin başka bir nedeni olmayan - saçlı deri ve gövdede daha yoğun olmak üzere tüm vücutta- yaygın ve değişik dönemleri bir arada görülen papüloveziküler döküntülerin eşlik ettiği hastalık **olası** suçiçeği vakasıdır. Laboratuvarca doğrulanmış bir vakayla epidemiyolojik ilişkili olan *olası* vaka, ya da laboratuvar tanısı yoksa da epidemiyolojik olarak birbiri ile ilişkili iki *olası* suçiçeği vakası **kesin** suçiçeği vakası olarak tanımlanmaktadır (2).

Ancak şüpheli suçiçeği olguları eğer mümkünse laboratuvar incelemesi ile doğrulanmalıdır. Özellikle atipik seyirli enfeksiyon HSV enfeksiyonu döküntüleri ile karışabilir.

Virüs kültürlerden izole edilebilirse de, hayli düşük duyarlılığa sahip olması, buna karşın emek yoğun bir teknik olması ve sonucun günler sonra çıkması nedeniyle tercih edilmemektedir. Eğer kültür yapılacaksa en iyi örnek veziküler sıvıdır. Kültür ile vahşi tip VZV ve aşı suşunun ayrımını yapmak da mümkündür (4). Viral izolasyonda kullanılan hücre dizileri Vero, Afrika yeşil maymun, insan amniyotik epitel ve insan embriyonik deri fibroblastlarıdır. Viral kültür sonrası tanımlama ise floresan ile işaretlemiş monoklonal antikolar ile yapılır. Suçiçeğinde döküntülerin başladığı ilk üç günde virüs lezyonlarda saptanmaya başlanır (3).

Ciddi veya enfeksiyonun alışılmadık bir görünümde seyrettiği bir vakada, özgül antiviral tedavinin en kısa zamanda başlanabilmesi için hızlı tanımlama teknikleri önem kazanmaktadır. Bu nedenle suçiçeği tanısında öncelikle önerilen yöntem PCR'dir. Gerçek-zamanlı PCR en duyarlı tekniktir ve artık laboratuvarlarda yaygın bir şekilde uygulanabilmektedir. Sonuçlar birkaç saat içinde alınabilmektedir.

Eğer gerçek-zamanlı PCR imkânı yoksa -daha az duyarlı, örnek toplanması ve incelenmesi daha fazla titizlik isteyen bir teknik olsa da- DFA kullanılabilir (3,4). Atipik tabloda lezyondan VZV antijeninin saptanması hızlı sonuç veren bir yaklaşımdır. Santral sinir sistemi enfeksiyonunun tanısı ise BOS'ta VZV DNA'nın saptanması ile konur. Vezikül sıvısı, kurut/kabuk ve amniyon sıvısından VZV DNA'nın saptanması tanı koydurucudur (3,5,8,8).

Serolojik tanı da primer enfeksiyonun saptanmasında anlamlıdır. Piyasada çeşitli EIA kitleri mevcuttur. Serum örneğinde kuvvetli IgM pozitifliğinin saptanması veya IgG'nin serokonversiyonunun gösterilmesi tanı koydurucudur.

Öte yandan, suçiçeğinde döküntü ayırt ettirici ve subklinik vakalar da çok nadir olduğu için, suçiçeği geçirmiş olma öyküsü bağışıklığın geçerli bir ölçüsüdür. Bu nedenle bağışıklığın değerlendirilmesi amacıyla özellikle çocuklarda serolojik test yapılmasının gereksiz olduğu kabul edilmektedir (4).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizma

Varicella zoster virus (VZV)

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

Suçiçeği şüpheli enfeksiyonların tanısı asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün klinik örnekler enfeksiyöz kabul edilmeli, daima standart önlemler uygulanmalı ve önlemler risk değerlendirmesi ile de desteklenmelidir. Aerosol oluşturması muhtemel tüm laboratuvar çalışmaları bir sertifikalı sınıf-IIA BGK içinde yapılmalıdır (ayrıca *bkz.* "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi"). Serum ayırma ve testlerin çalışılması sırasında **daima** eldiven giyilmelidir!

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) teknikleri uygulamadan önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleriyle aşina olmalı, ve; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır. Hem güvenlik önlemlerine uyumun sağlanmasından hem de testlerin standart prosedürlere uygun yapılmasından ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, Reaktif, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

İnceleme örneklerinin seçimi, özellikleri, alınması, gönderilmesi ve laboratuvara kabulü ile ilgili kriterler ve bilgi için "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"ne başvurulmalıdır. Aşağıda bazı önemli noktalara tekrar dikkat çekilmiştir.

- Serolojik incelemeler için - Serum
- PCR için - Vezikül sıvısı, vezikül kazıntısı, vezikül kabuğu örnekleri idealdir. Makülopapüler lezyonlardan (henüz vezikül oluşmamış iken) da lezyonun üzeri bir lam veya bistüri kenarı ile tahriş edildikten sonra kazıntı örneği alınabilir. Bu örnekler steril, herhangi bir taşıma besiyeri içermeyen tüpe konurlar ve kuru olarak oda sıcaklığında gönderilirler. Kuru örnekler oda sıcaklığında birkaç hafta stabil kalabilirler. Bu önemli bir taşıma kolaylığı sağlar (8).
- PCR için - BOS, doku biyopsi örnekleri, amniyon sıvısı, BAL ve diğer vücut sıvıları da alınabilir. Bu örnekler laboratuvara soğuk zincirde gönderilmeli; uzun süreli saklama için ise dondurulmalıdır.
- DFA için - Veziküler lezyon tabanından epitel kazıntı örneği kullanılır.

Reaktif/Kit

- ELISA kitleri - VZV IgM ve VZV IgG için; ticari olarak piyasadan temin edilebilir.
- DFA kiti (antijen saptama için) - Floresan işaretlemiş monoklonal antikolar ticari olarak piyasadan hazır temin edilebilir.
- PCR kiti - Piyasadan hazır temin edilebilen kitler vardır. Kullanılan testin özelliklerine göre ayrıca nükleik asit ekstraksiyon kiti ve PCR karışımları da piyasadan hazır temin edilebilir. Nükleik asit testleri laboratuvar yapımı reaksiyon karışımları ile de çalışılabilir. Bunun için amaca uygun primer dizileri temin edilmiş olmalıdır. İster hazır, ister laboratuvar yapımı olsun; PCR ile vahşi virüs için ORF 38 ve ORF 54 bölgeleri, aşı virüsü için ise ORF 62 bölgesi araştırılmalıdır. Bu yaklaşımla aşı suşuna bağlı komplikasyonların gösterilmesi de mümkündür. Bunun dışında hedef bölgeyi ORF 17, 29, 31, 62 ve 69 olarak öneren çalışmalar da vardır (3,7).
- VZV genotiplenmesi yapılacaksa tanımlanan beş majör ve iki minör yedi genotipin saptanması için ORF21, ORF22 ve ORF50 gen bölgeleri araştırılmalıdır (7).

Diğer gereç, donanım

İmmunfloresan boyama (antijen saptama için) donanım;

- Floresan mikroskop (objektifler 40×, 100× immersiyon; oküler 10×)

Seroloji gereç, donanım;

- ELISA okuyucu, yıkayıcı veya otomatize, yarı-otomatize EIA sistemleri

PCR için donanım;

- En az üç ayrı oda - nükleik asit ekstraksiyonu, PCR karışımının hazırlanması, amplifikasyonun ve sonuç gözetiminin yapılabileceği ayrı odalar. İdeal olarak PCR karışımı hazırlama odası (temiz oda) pozitif basınçlı, agaroz jel elektroforezi yapılan oda (kirli oda) negatif basınçlı havalandırmaya sahip olmalıdır.
- Cihazlar – biyogüvenlik kabini, soğutmalı mikrosantrifüj, hassas terazi, vorteks, su banyosu, yatay çalkalayıcı, mikrodalga fırın, otomatize / yarı otomatize nükleik asit ekstraksiyon sistemleri, ve nükleik asit amplifikasyon cihazı, jel görüntüleme sistemi, elektroforez ünitesi vb.

2.4. Kalite kontrol

- Her testte iç kalite kontrol amacıyla en az bir pozitif ve bir negatif internal kalite kontrol serumu çalışmaya dahil edilir.
- Eksternal kalite kontrol testleri belirli aralıklarla çalışılarak sonuçları değerlendirilir.
- Nükleik asit testlerinde ekstraksiyonun ve amplifikasyonun verimliliği ve inhibitör olup olmadığını anlamak için, internal kontrol, izolasyon basamağından itibaren hasta örneği ile birlikte aynı reaksiyon tüpünde amplifiye edilmelidir.

3 Suçiçeğinin tanısında kullanılan teknikler

3.1. Seroloji

VZV IgM

- Diğer kit formatlarında duyarlılık ve özgüllükle ilgili sorunlar fazla olduğu için VZV capture-IgM ELISA önerilir. Özgül bir testtir. Ancak duyarlılık bunda da düşüktür (6).
- Rutin doğrulama için (özellikle önceden aşılanmış bireylerde) güvenilir bir metot değildir ancak pozitif sonuçlar akut/yeni enfeksiyonu düşündürür.
- Klinik bulguların yokluğunda pozitif IgM sonucu anlamlı kabul edilmez.
- Yüksek düzeyde IgG antikorlarının varlığında yalancı IgM sonuçları sorun yaratabilir.

VZV IgG

- IgG antikorlarının gösterilmesinde çok çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Bunlar ELISA, lateks aglütinasyonu (LA), IFA, gpELISA ve FAMA şeklinde sayılabilir.
- gpELISA ve FAMA, her ikisi de yüksek düzeyde duyalı ve özgül olmakla birlikte yaygın bulunmayan ya da ticari olarak her yerde hazır bulunamayan kitlerdir.
- FAMA ile membran antijenine karşı oluşan antikorlar saptanır. Bu yöntem aşıya bağlı serokonversiyonun izleminde yararlıdır (6).
- IFA'nın duyarlılığı ve özgüllüğü de yüksektir.
- LA 15 dakikada sonuç veren hızlı bir testtir; ELISA'dan daha duyarlı ancak daha az özgüldür. Yanlış pozitif sonuç verebilir. Daha çok tarama amaçları için kullanılır.
- Laboratuvarlarda en yaygın kullanılan IgG ELISA'dır. Özgüldür ancak duyarlılığı yüksek değildir.
- Tek serum örneğinde IgG pozitifliği saptanması geçirilmiş enfeksiyon veya aşıya bağlı bağışıklık düşündürür.
- Çift serum örneğinde IgG titrelerinde artışın gösterilmesinin –"geç tanı" anlamına geldiği için- klinik yararı sınırlıdır. Ancak, hastalığın özellikle atipik seyrettiği durumlarda tanı hastanın tedavisini yönlendireceği için değil ama ikinci bir -epidemiolojik ilişkili- vakanın varlığında onun tanısının desteklenmesi amacıyla çift serum örneğinde IgG titrelerinin arttığının gösterilmesi anlamlıdır.
- Çift serum örneğinde (akut ve konvalesan faz serumları aynı testte çalışılmış olarak) VZV IgG ELISA ile;
 - (a) serokonversiyon saptanmış ise (IgG akut faz örneğinde negatif iken konvalesan faz örneğinde pozitif ise) "kesin tanı" bulgusudur veya
 - (b) ≥ 4 kat titre artışı saptanmış ise "kesin tanı" bulgusudur.

3.2. Moleküler tanı

- Suçiçeği tanısında PCR öncelikle önerilen yöntemdir. Ancak gerektirdiği altyapı nedeniyle yaygın kullanılamayabilir.
- Serolojik tanını yeterli olmadığı durumlarda, atipik olgularda, santral sinir sistemi tutulumunda ve intrauterin tanıda gereklidir.
- VZV DNA örnekten PCR/gerçek zamanlı PCR yöntemleri ile araştırılır.
- Lezyondan alınan kurutlarda da VZV DNA'nın araştırılmalıdır (3,8).
- Pozitif sonuç kesin tanı koydurur.

3.3. Örneklerin, izolatların saklanması

- Serolojik testler için laboratuvara gelen örnekler en fazla 5 gün için +4°C'de saklanabilir. Bu süre içinde teste alınmayacaklarsa -20°C'de dondurulmamalıdır.
- Moleküler testler için gönderilmiş kuru örnekler oda sıcaklığında uzun süre stabil kalabildiği için birkaç hafta bu şekilde saklanabilir.
- Moleküler testler için gönderilmiş ıslak örnekler (BOS, diğer vücut sıvıları vb.) asla oda sıcaklığında saklanmaz.
- IgM pozitif örnekler laboratuvarda sonraki çalışmalarda iç kalite kontrol amacıyla kullanılmak üzere saklanır.
- Virüs DNA'sı pozitif bulunan örnekler ileri moleküler genotipleme analizi için -70°C'de tutulur.
- Dondurulmuş örneklerin tekrarlayan dondurma-çözme işleminden sakınılmalıdır. Bunun için örnekler mümkünse başlangıçta alikotlara ayrılarak saklamaya alınmalıdır.

4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim

- PCR veya gerçek-zamanlı PCR testi ile VZV DNA pozitifliği "kesin tanı" bulgusudur. En kısa sürede testi isteyen hekime bildirilmelidir.
- Klinik bulguların varlığında VZV IgM pozitifliği "kesin tanı" bulgusudur. En kısa sürede testi isteyen hekime bildirilmelidir.
- Yakın zaman önce yapılmış bir aşılama varsa aşıya bağlı IgM pozitifliği olabilir. IgM sınır değeri bulunmuş ise 7-10 gün sonra yeni bir kan örneği ile test tekrarlanır.
- Akut enfeksiyonda VZV IgM bağışıklık sistemi baskılanmış hastada ve yeni doğanda/in-utero dönemde negatif veya düşük pozitif olabilir.
- Tek serum örneğinde VZV IgG pozitifliği *sadece* immüniteyi gösterir. VZV IgG sonucu rutin koşullarda raporlanabilir.
- Gebelikte şüpheli temas hikayesi varsa VZV IgM negatif ve VZV IgG testi pozitifse virüs ile daha önce karşılaşmayı gösterir. VZV IgM ve IgG negatifliğinde 7-10 gün sonra test yinelenir.

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Moleküler testler için örnek alırken her zaman sentetik (dakron ya da rayon uçlu) eküvyonlar tercih edilmelidir. Kalsiyum aljinatlı, pamuklu ve ahşap saplı eküvyon kullanılmamalıdır. PCR'da inhibitör etki yapabilirler (3,8).
- Döküntü tarihine göre uygun zaman diliminde alınmayan örneklerde (2-5 gün) pozitif sonuç saptanmasında sorun yaşanabilir. Örneklerin uygun zamanda alınması önemlidir.
- Hemolizli veya lipemik serum örnekleri antikor titrelerinin hatalı okunmasına neden olabilir.
- Bebeklerde VZV IgG antikorları 6-8 aya kadar maternal antikorlar olabilir.
- HSV enfeksiyonları VZV IgM ve IgG testlerinde çapraz reaksiyona neden olabilir.

Kaynaklar

- 1 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurveLa bReh.pdf> (erişim tarihi: 18.12.2013)
- 2 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 3 Puchhammer-Stöckl E, Aberle SW. Varisella-zostervirus. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed. ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 1545-57.
- 4 CDC. Varicella. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. The Pink Book: Course Textbook - 12th ed., Second printing, May 2012.
<http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/varicella.html> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 5 Fölster-Holst R, Kreth HW. Viral exanthems in childhood – infectious (direct) exanthems. Part 2: Other viral exanthems *J Dtsch Dermatol Ges* 2009;7:414–8
- 6 CDC, Chapter 17: Varicella. Manual for the Surveillance of Vaccine-Preventable Diseases (5th ed., 2012). <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/surv-manual/chpt17-varicella.html> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 7 Pahud BA, Glaser CA, Dekker CL, Arvin AM, Schmid DA. Varicella zoster disease of the central nerve system: epidemiological, clinical and laboratory features 10 years after the introduction of the varicella vaccine. *J Infect Dis* 2011;203(3):316-23.
- 8 CDC. Collecting specimens for varicella zoster virus (VZV) testing.
<http://www.cdc.gov/chickenpox/lab-testing/collecting-specimens.html> (son erişim tarihi: 18.12.2013)



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

İnfluenza ve Avian İnfluenzanın Mikrobiyolojik Tanısı

Hazırlayan Birim	Klinik Viroloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Viroloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	V-MT-10
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	4
Mikroorganizmanın özellikleri.....	4
Hastalığın önemi.....	5
Klinik özellikleri	6
Mikrobiyolojik tanı	6
TEKNİK BİLGİLER	8
1 Hedef mikroorganizmalar	8
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	8
3 İnfluenza ve avian influenza tanısında kullanılan teknikler ..	12
4 Sonuçların değerlendirilmesi ve bildirim.....	16
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	16
6 Referans Laboratuvarlar.....	16
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	17
KAYNAKLAR.....	17

Kapsam ve Amaç

İnfluenza virüsleri insanlarda ve hayvanlarda enfeksiyon yapabilen, mevsimsel epidemilere ve küresel pandemilere yol açabilen, yüksek morbidite ve bazen yüksek mortalite ile halk sağlığını yakından ilgilendiren viral patojenlerdir. İnfluenza virüsleri dünyanın her yerinde bulunur ve influenza virüs A, B ve C olmak üzere üç tipi vardır. Neden oldukları enfeksiyonlar klinik özellikleri ile solunum yollarının diğer enfeksiyonlarından ayırt edilemediğinden kesin tanı mikrobiyolojik incelemeler ile konabilir (1,2).

Mevsimsel salgınlar yaparak kısa sürede çok sayıda bireyi etkileyen, ciddi iş gücü kaybı ile ekonomik kayıplara ve sağlık hizmetlerinin zorlanmasına neden olabilen mevsimsel influenzada aşılama korunma ve kontrol için en etkili yoldur. Her yıl influenza sezonunun sonuna doğru bir sonraki yıl etkili olacak suşlar ortaya çıkar ve DSÖ referans merkezlerinde izole edilen suşlardan en uygun kombinasyon bir sonraki yılın aşı kompozisyonunu oluşturmak üzere belirlenir. Bu nedenle ülkeler o yıl hastalığa neden olan kökenlerin saptanması için bütün vakaların tanısına değil ancak, bir kısım vakadan izolatların tanımlanmasına gereksinim duyarlar.

Avian influenza (kuş gribi) ise özellikle kanatlı hayvanların enfeksiyonudur. Avian influenza virüslerinin çoğu, insanları enfekte etmemekle birlikte, H5N1 gibi bazı alt tipleri insanlarda ciddi enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Bu durumda vakaların tanımlanması hem vaka yönetimi için hem de hızla epidemiyolojik araştırmanın yapılabilmesi ve önlem alınabilmesi için büyük önem taşır.

İnfluenza ve avian influenza ülkemizde bildiri zorunlu hastalıklardır (3,4). İnfluenza virüsü ve yüksek riskli bir patojen olması nedeniyle avian influenza virüsü tanısı -sahada uygulanabilecek bazı yöntemlerin haricinde- klinik mikrobiyolojinin rutin tanı kapsamına girmemektedir. Kesin tanı (özellikle virüsün izolasyonu ve tanımlanması) yetkilendirilmiş merkezlerde konur. Şüpheli durumlarda bir klinik laboratuvar büyük olasılıkla yatan hastadan örneklerin alınması ve Referans laboratuvara gönderilmesinde rol üstlenecektir. Bu nedenle bu UMS belgesinde influenza enfeksiyonlarının kesin tanısı için geçerli yöntemler, asgari laboratuvar şartları ve sorumluluklar ile ilgili bilgi verilmesi hedeflenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

drift	sapma
HA	hemaglutinin
HPAI	highly pathogenic avian influenza
MDCK	"Madin Darby Canine Kidney" devamlı hücre hattı
NA	nöraminidaz
NAT	nükleik asit temelli testler
reassortment	genetik çeşitlilik
rRT-PCR	real-time revers transkriptaz PCR
shift	kayma

Genel Bilgi

İnfluenza virüsleri dünyanın her yerinde bulunur ve influenza virüs A, B ve C olmak üzere üç tipi vardır. İnfluenza A bölgesel epidemiler ile küresel pandemilere neden olabilirken, influenza B yalnızca bölgesel epidemilerden sorumludur. İnfluenza virüs C, daha nadir görülür ve küçük lokalize salgınlar ile sporadik vakalardan sorumludur. Epidemiler sırasında genellikle tek bir A alt tipi ya da B tipi ön plana geçer. Hem A hem B influenza virüslerinin ya da iki farklı influenza alt tipinin birlikte olduğu salgınlar da olabilir. Epidemiler genellikle 3 ila 8 hafta sürer. Pandemiler daha nadirdir, 20-30 yılda bir oluşur ve sadece influenza A virüsleri ile görülür (1,2).

Mikroorganizmanın özellikleri

İnfluenza virusu, *Orthomyxovirus* genusu içinde *Orthomyxoviridae* ailesinde yer alır. Genomu segmentlerden oluşan zarflı, negatif polariteli bir RNA virüsüdür. İnfluenza virüs C, A ve B'ye göre bazı yapısal farklılıklar gösterir. Zarf üzerinde Hemagglütinin (HA) ve Nöraminidaz (NA) olarak isimlendirilen iki farklı glikoprotein bulunur. HA, siyalik asit yapısındaki konak hücre reseptörlerine tutunmadan sorumludur. NA ise yeni oluşan virionların siyalik asit rezidülerini keserek virüsün hücreden ayrılmasını sağlar ve antiviral tedavide önemli bir hedeftir. İnfluenza A virüsünün 16 HA, 9 NA alt tipi bulunur. Alt tiplerin tümü kuşlarda bulunur. İnsanda dolaşan influenza A alt tipleri, H1N1, H3N2, H1N2, H2N2'dir. Son 20 yıldır yaygın olarak saptananlar influenza A(H1N1) ve A(H3N2)'dir. 2009 yılında yeni bir influenza A (pandemik H1N1, 2009) virüsü pandemiye yol açmıştır. Pandemi 2010 yılı Ağustos ayında sona ermiş, pandemi virüsü mevsimsel influenza virüslerinden biri haline dönüşmüştür (1,2).

İnfluenza virüsü; yapısı ve konak çeşitliliği nedeniyle çok sık antijenik değişikliğe uğramaktadır. Bu yüzden solunum virüsleri arasında salgınlara neden olmasıyla toplum sağlığını tehdit eden etkenlerin başında gelmektedir. İki tür antijenik değişiklik olabilir:

- Antijenik sapma ('drift') mevcut kökenlerde viral replikasyon sırasında HA ve NA proteinlerinde oluşan nokta mutasyonların birikimi ile gelişir. İnfluenza virüs A ve B'de saptanır. Sürekli olarak kısmen farklılık gösteren yeni suşların oluşumuna yol açar. Önceki influenza enfeksiyonlarında gelişen antikolar, yeni antijenik suşlara karşı tam korunma sağlayamadığı için kişi yaşam boyu influenza enfeksiyonu geçirebilir. Aynı nedenle influenza aşı suşlarının yıllık güncellenmesi gereklidir.
- Antijenik kayma ('shift') influenza A virüslerinde gelişebilen ciddi bir antijenik değişikliktir. İnsan için farklı ve/veya yeni bir HA proteini veya HA/NA kombinasyonu içeren yeni bir influenza virüsü oluşmasına yol açar. Nadiren görülür. İnsanda dolaşan influenza virüsü ile insana ait olmayan virüs arasında genetik "reassortment" olması veya hayvanlarda (ör., kuş) bulunan bir virüs alt tipinin, insanı direkt olarak veya bir başka hayvan (ör., domuz) aracılığı ile enfekte etmesi yoluyla gelişebilir. İnsandan insana kolaylıkla bulaşabilme özelliğine de sahip ise, toplumda bu virüse karşı bağışıklık bulunmaması nedeniyle pandemiye yol açabilir.

Hastalığın önemi

İnfluenza mevsimsel bir hastalıktır ve ılıman iklimde yıllık epidemiler yaparlar. Tropikal iklimde tüm yıl boyunca enfeksiyon oluşturabilirler. Epidemiler kuzey yarımkürede sıklıkla Aralık-Mart ayları arasında görülür. İnfluenza virüsleri yüksek düzeyde bulaşıcıdır ve her yaştan kişiyi etkileyebilir. Damlacık enfeksiyonu ve kontamine solunum yolu sekresyonları ile direkt ve indirekt temas sonucu bulaşabilir. Yüksek risk gruplarında ciddi seyirli hastalığa ve ölümlere neden olabilir. Mevsimsel influenza epidemileri, ateşli solunum yolu enfeksiyonlarında ve buna bağlı okula ve işe devamsızlıkta artışla karakterizedir; ciddi iş gücü kaybına neden olarak ekonomik sonuçlar doğurabilmekte, sağlık hizmetlerini zorlayabilmektedir. Bir diğer ifade ile, koruyucu bir aşısının ve anti-influenza ilaçların bulunmasına rağmen mevsimsel influenza halen bütün dünyada en ciddi sağlık sorunlarından biri olmaya devam etmektedir (5,6).

Dünyanın pek çok yerinde virolojik sürveyans ve hastalık sürveyansı yetersiz olduğundan, epidemiyolojisi ve insan sağlığı üzerine etkisinin derecesi nispeten belirsiz olmakla birlikte, DSÖ'ye göre influenza dünya genelinde hastalık ve ölümlerin önemli bir nedeni olarak kabul edilmektedir. İnfluenza DSÖ'nün hedef hastalıklarından biridir ve 1952'den bu yana ulusal referans laboratuvarlarının oluşturduğu ağ (WHO Global Influenza Surveillance Network; GISN) hastalığın kontrolü ile ilgili uluslararası aktivite yürütmektedir. Buna paralel olarak da laboratuvar tanısı sadece hasta tedavisi bakımından değil, hatta daha ziyade sürveyans, salgın ve kontrol süreçlerinin yönetimi için önem kazanmıştır. 2010 yılı itibarıyla 106 üye devletten toplam 136 ulusal referans laboratuvarı bu ağın üyesidir. Her yıl influenza sezonunun sonuna doğru bir sonraki yıl etkili olacak suşlar ortaya çıkmaktadır; DSÖ referans laboratuvarlarında izole edilen suşlardan en uygun kombinasyon da, bir sonraki yılın aşı kompozisyonunu oluşturmak üzere bu ağ içinde belirlenmektedir (5).

İnfluenza virüsü mevsimsel influenzaya ek olarak, hayli seyrek olmakla birlikte pandemiler de yapmaktadır. Sonuncusu, 21. yüzyılın ilk pandemisi, 2009 yılında Meksika'dan dünyaya yayılan domuz kökenli yeni H1N1 virüsü ile meydana gelen pandemidir (1,2,6).

Avian influenza, ya da diğer adıyla kuş gribi; kanatlı hayvanların bulaşıcı viral bir hastalığıdır. Kanatlılarda avian influenza salgınlarının kümes hayvanlarına etkisi ciddi ekonomik kayıplarla sonuçlanabilmektedir. Avian influenza virüslerinin çoğu insanları etkilemezken, H5N1 gibi bazı alt tipleri insanlarda ciddi enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Böyle kökenler insanlarda ciddi hastalık ve pandemi oluşturma potansiyeli nedeniyle küresel halk sağlığı problemi yaratmaktadır.

Kümes hayvanlarında yüksek derecede patojenik ('highly pathogenic'; HP) avian influenza salgını bildirimleri, yerel ve küresel ekonomileri ve uluslararası ticareti ciddi biçimde etkileyebilmektedir. H5N1 virüsü ile insan enfeksiyonu vakalarının çoğunluğu enfekte canlı veya ölü kümes hayvanları ile doğrudan veya dolaylı temas ile ilişkilidir. Hastalığın insanlara usulüne uygun pişirilmiş gıda yoluyla geçtiğine dair kanıt yoktur. Hayvanlarda hastalığın kontrol edilmesi, insanlar için riskleri azaltmada ilk adımdır (7).

İnsanlarda influenza A/H5 enfeksiyonu sürveyansı, olguların saptanması, daha etkin sürveyans ve kontrol faaliyetleri için influenza A/H5 aktivitesi olan alanları belirlemek ve gereğinde aşı geliştirilebilmesi için çok önemlidir. DSÖ küresel sürveyans ağı tarafından hayvan ve insan olguları yakından takip edilmektedir.

Klinik özellikleri

İnfluenza virüsleri akut üst ve alt solunum yolu enfeksiyonlarına neden olur.

Mevsimsel grip, 1-4 günlük inkübasyon süresinden sonra ani başlayan yüksek ateş, öksürük (genellikle kuru), baş ağrısı, kas ağrısı, eklem ağrısı, halsizlik, boğaz ağrısı ve burun akıntısı ile karakterizedir. Çoğu kişi tıbbi tedaviye gerek kalmadan bir hafta içinde iyileşir. Yıllık epidemiler tüm yaş gruplarını ciddi şekilde etkileyebilir, ancak özellikle 2 yaşın altında ve 65 yaşın üzerinde ve kronik kalp, akciğer, böbrek, karaciğer, kan ya da metabolik hastalıkları (ör., şeker hastalığı) veya bağışıklık yetersizliği olanlarda ağır seyrederek ve ölüme yol açabilir (1,5).

H5N1 virüsünün neden olduğu hastalık çoğunlukla genel durumda hızlı bozulma ve yüksek fatalite ile birlikte agresif bir klinik seyir izler. Virüsün inkübasyon süresi, mevsimsel influenza virüslerinden daha uzun sürebilmekte, 2 ila 8 gün arasında değişmekte ve 17 güne kadar uzayabilmektedir. DSÖ, saha araştırmaları ve temaslıların izlenmesi için 7 günlük inkübasyon periyodunun kullanılmasını önermektedir. İlk belirtiler, genellikle 38°C üzeri ateş ve grip benzeri semptomlardır. İshal, kusma, karın ağrısı, göğüs ağrısı, burun ve dış eti kanaması da bazı hastalarda erken belirtiler olarak bildirilmiştir. Kan içermeyen sulu ishal, H5N1 avian influenzada mevsimsel influenzaya oranla daha yaygın olarak görülmektedir. Klinik belirtilerin spektrumu daha geniş olabilmektedir, ancak, konfirme hastaların hepsi solunum yolu semptomları göstermemiştir. Birçok hastada görülen bir özellik, hastalığın erken dönemlerinde alt solunum yolu belirtilerinin gelişmesidir. Solunum gücünün, ilk semptomları takiben 5 gün içerisinde gelişmektedir (7).

Mikrobiyolojik tanı

İnfluenza enfeksiyonlarının kesin tanısı mikrobiyolojik inceleme ile konur (7,8).

Ancak influenza enfeksiyonu düşünülen her olguda mikrobiyolojik testlerin uygulanması gerekli değildir. Özellikle hastanın içinde yaşadığı toplumda mevsimsel influenza sezonu başlamış ise, poliklinik hastalarında tanı, klinik bulgu ve semptomlar ile konabilir. Öte yandan, hastaneye yatırılması gereken bir olguda test sonuçları klinik kararları ve tedaviyi etkileyecek ise mikrobiyolojik incelemeler yapılmalıdır. Klinik açıdan influenza şüphesi kuvvetli ve anti-viral tedavi gerekiyor ise, laboratuvar sonuçları beklenmeden tedaviye başlanması önerilir. Çünkü elde edilecek yarar, tedavinin enfeksiyonun erken döneminde başlanması ile doğru orantılıdır (7,8).

İnfluenza etkeni, kliniği grip tanımına uyan hastaların solunum yolu örneklerinde hücre kültürü, nükleik asit temelli testler (NAT) veya antijen arama testleriyle saptanabilir. Virüsün gösterilmesinde hücre kültürü ve NAT 'altın standart' olarak kabul edilmektedir. Bir diğer ifade ile klinik örneklerden influenza virüsünün izolasyonu veya viral nükleik asidin varlığının RT-PCR ile gösterilmesi "**kesin tanı**" kriteridir. İnfluenza A izole edilen örneklerde alt tiplendirme de yapılmalıdır. Mevsimsel influenza için klinik örneklerde DFA testi ile influenza virüs antijeninin gösterilmesi veya influenza özgül antikör yanıtının gösterilmesi de gösterilmesi "**kesin tanı**" koydurur. Bu kriterler -işlemlerin tipe özgü (H5N1) yapılması koşuluyla- avian influenza tanısında da geçerlidir (3).

Virüsün izolasyonu

Klinik örneklerin hücre kültürü veya embriyolu tavuk yumurtasına inokülasyonu ile virüs izole edilebilir ve tanıda 'altın standart' olarak kabul edilmektedir. Üreme sitopatik etki, hemadsorbsiyon, IFA veya EIA ile gösterilebilir. Kültür, aşı virüslerinin belirlenmesine ve ileri analizlere imkan sağlar. Ancak hasta örneklerinde canlı virüsün bulunması gerekliliği, örnek alınıp taşınmasında özel koşullara gereksinim duyulması ve üremenin birkaç gün alabilmesi nedeniyle rutinde kullanımı sınırlıdır. Ayrıca, özel altyapı, eğitim ve deneyimli personel gerekliliği vardır. Enfeksiyöz virüsle uğraşılması biyogüvenlik riskleri taşır.

Viral nükleik asitlerin saptanması (NAT)

İnfluenza tanısı viral genomun saptanması ile de konabilir. Nükleik asit saptama teknikleri iyi optimize edildiğinde duyarlı ve özgül tanı sağlar. Sıklıkla laboratuvar yapımı ya da ticari, geleneksel ya da rRT-PCR yöntemleri kullanılmaktadır. Hedef genellikle iyi korunmuş olması nedeni ile nükleoprotein veya matriks gen bölgesidir. Tiplendirme amacı için ise HA ve NA özgül gen bölgesi kullanılır. NAT'ın yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olması ve farklı örneklerde uygulanabilmesi gibi avantajları vardır. Nükleik asit yapıları hedeflendiğinden pozitif sonuç canlı virüs varlığını göstermez. Maliyetinin yüksek olması, özel donanım ve altyapı gerektirmesi, eğitilmiş ve deneyimli personele gereksinim duyulması nükleik asit saptama tekniklerinin kullanımını kısıtlayan faktörlerdir.

Antijenik yapıların tespiti

Klinik örneklerde virüsün varlığını göstermek için DFA kitleri de mevcuttur. Bu testlerde influenza virüs antijenlerine yönelik floresan işaretli monoklonal antikolar kullanılarak örnekteki antijeni saptamak mümkündür. Birkaç saat içerisinde sonuç alınabilmesi önemli bir avantajdır. Örneklerin, enfekte hücreleri içeren 'kaliteli örnek' niteliğinde alınmış olmasına gereksinim vardır. Kültür ve NAT'a göre duyarlılığı düşüktür. Özel donanım, eğitilmiş ve deneyimli personel gerektirmesi diğer dezavantajlarıdır.

Hızlı sonuç veren, basit, EIA veya diğer antijen saptama esaslı testler de geliştirilmiştir. Kültür ve NAT testlerine göre duyarlılık ve özgüllüğü düşük olup ticari kitler arası farklılıklar gösterir (9,10). Yapılan bir metaanalizde 26 farklı teste ait 159 çalışma değerlendirilmiş ve sonuçta duyarlılık %62 (%95 CI; %57.9 -%66.6), özgüllük %98.2 (%95 CI; %97.5-%98.7) olarak belirlenmiştir. Hızlı testlerin duyarlılıkları çocuklarda erişkinlere göre, influenza A'da B'ye göre daha iyi bulunmuştur (10). Özellikle düşük duyarlılığa bağlı yalancı negatiflikler olabildiği için hızlı testlerin tanıda tek başına kullanılması önerilmemektedir. Hızlı testler, kullanılan kite bağlı olarak sadece A ve B tipi virüsü ayırt edebilmekte, alttipler ve avian influenza tipleri saptayamamaktadır.

Serolojik testler

Kompleman fiksasyon, hemagglütinasyon inhibisyon, EIA gibi farklı tekniklerle influenza enfeksiyonuna karşı antikor yanıtı gösterilebilir. Akut ve konvalesan dönemde alınan çift serum örneğinde 4 kat titre artışının gösterilmesi anlamlıdır. Enfeksiyonun geriye dönük tanısında ve seroepidemiolojik çalışmalar için kullanılabilir ancak akut enfeksiyon tanısında kullanımı kısıtlıdır.

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizmalar

Influenza virus (mevsimsel); avian influenza virus

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

İnfluenza virüsleri Risk Grubu 2 mikroorganizmalardır ve enfeksiyonlarının tanısı için şu laboratuvar güvenliği kriterleri dikkate alınmalıdır: (i) serolojik ve moleküler teknikler BGD2 laboratuvarlarda gerçekleştirilebilir; (ii) potansiyel enfeksiyöz klinik örneklerle çalışma ve hücre kültürleri BGD2 laboratuvarlarda, BGD3 pratiği ile gerçekleştirilebilir; aerosol oluşturması muhtemel bütün işlemler kesinlikle sertifikalı bir sınıf-IIA BGK içinde yapılmalıdır; (iii) avian influenza virüs (A/H5N1) şüpheli durumlarda bütün işlemler en az BGD3 (hayvan incelemeleri en az hayvan-BGD3) laboratuvar şartlarında ve sertifikalı sınıf-IIA BGK içinde yapılmalıdır.

İnsan örnekleri ile kanatlı ve domuz örnekleri **asla** aynı laboratuvarında çalışılmamalıdır.

Serum ayırma ve testlerin çalışılması sırasında **daima** eldiven giyilmelidir. Bütün biyogüvenlik düzeylerinde daima standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır (bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

İnfluenza şüpheli örneklerin tanısında görev alan tüm personel; (i) tekniklerin uygulanmasından önce amaçlanan bütün kullanımlar ile ilgili tam bir eğitim almış olmalı; (ii) kullanılan tekniklere tüm yönleriyle aşina olmalı; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır. Bu kurallar örnek kabulü dahil bütün tanımlama aşamalarında **aerosol önlemlerine** yüksek uyumu gerektirir.

Hem güvenlik önlemlerine uyumun sağlanmasından hem de testlerin standart prosedürlere uygun yapılmasından ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, Reaktif, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

İnfluenza tanısı için örnek alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden edinilebilir. Aşağıda bazı önemli hususlara tekrar dikkat çekilmektedir:

- **Güvenlik uyarısı!** Solunum yolundan örnek almak, enfeksiyöz damlacıklar (aerosol) oluşturan bir işlem olması ve hastaya çok yakın mesafede durulmasını gerektirmesi nedeniyle tehlikelidir. Bu nedenle tam kişisel koruyucu donanım (KKD) kullanılması gereklidir.

- Bazı üst solunum yolu örneklerinin alınması ile ilgili teknikler Şekil 2-5'de gösterilmektedir.
- Mevsimsel influenza A ve B virüslerinin tespiti için – **nazofarinksten** veya **burundan** sürüntü, yıkama ve aspirasyon sıvıları uygun örnek türleridir.
- İnfluenza virüs A/H5N1 tanısı için - **boğaz sürüntüsü** en geçerli üst solunum yolu örneğidir.
- BAL, TTA sıvısı, balgam, akciğer biyopsisi alınabilecek alt solunum yolu örnekleridir. Kuşkulu ölüm söz konusu ise post-mortem akciğer veya trakeal doku örnekleri incelenebilir.
- Solunum yolu örnekleri semptomların başlangıcından itibaren ilk 3 gün içerisinde alınmalıdır. 3. günden sonra virüsün saptanması olasılığı azalmaktadır. Hastada **alt** solunum yolu enfeksiyonu varsa, alt solunum yolu örneklerinde virüs daha uzun süre saptanabilir.
- İdeal olarak örnek antiviral tedavi başlanmadan alınmış olmalıdır; ancak örnek almak için tedavi ertelenmemelidir.
- İlk örnekleri influenza için negatif olan, fakat bu enfeksiyonu işaret eden semptomları göstermeye devam eden ve/veya tanıyı destekleyecek temas hikayesi olan vakalardan mutlaka mümkün olan en kısa sürede en az bir kez daha örnek alınmalıdır.

ÖNEMLİ NOT: Sadece plastik saplı steril sentetik uçlu eküvyonlar kullanılmalıdır (bkz. Şekil 1). Kalsiyum alginatlı veya pamuk uçlu eküvyonlar veya tahta saplı eküvyonlar bazı virüsleri inaktive eden maddeler içerebilir ve PCR testini inhibe edebilirler.

- Serum, serolojik incelemeler için akut ve konvalesan faz örnekleri olmak üzere iki kez alınır. Akut faz örneği belirtilerin başlangıcından ~7 gün sonra; konvalesan örnek 3-4 hafta sonra alınmalıdır. Eğer ancak tek serum örneği alınabilecekse, belirtilerin başlangıcından sonraki 14. günde veya sonrasında alınmalıdır; çünkü nötralizan antikorların tespit edilme olasılığı zamanla artmakta, kesin olarak da semptomlar başladıktan sonraki ilk 3-4 hafta arasında tespit edilebilmektedir.
- Elzem olmayan fakat alınırrsa yararlı olabilecek örnekler şöyle sıralanabilir:
 - (a) EDTA'lı plazma - viral RNA tespiti için
 - (b) Rektal sürüntü - özellikle hastada diyare var ise, virüs izolasyonu veya NAT için kullanılabilir.
 - (c) BOS - menenjit şüphesi var ve tanı ya da tedavi amaçlı alınacak ise, virüs izolasyonu veya NAT için kullanılabilir.

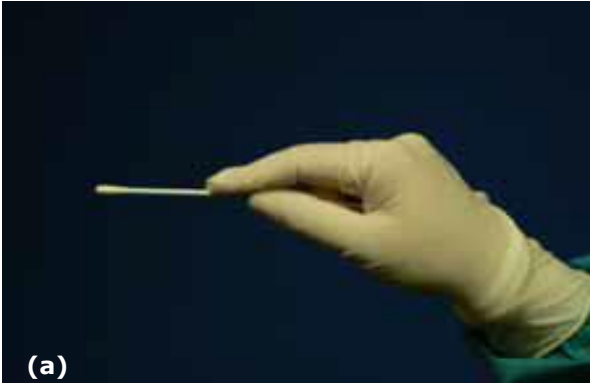
ÖNEMLİ NOT: Virüs kültürü istenen her durumda taşıyıcı ortam gerekiyorsa VTM kullanılır. VTM bu amaçla kullanılan besiyerlerinin genel ismidir. Ticari olarak farklı üreticilerin ürünleri bulunmaktadır. Örnekler Referans laboratuvarına yollanacak ise eküvyon ve VTM, Halk Sağlığı Müdürlükleri'nden temin edilebilir.



Şekil 1. "Virocult" örnek alma ve taşıma kiti



Şekil 2. Sürüntü almak için eküvyonun doğru tutuluşu



(a)

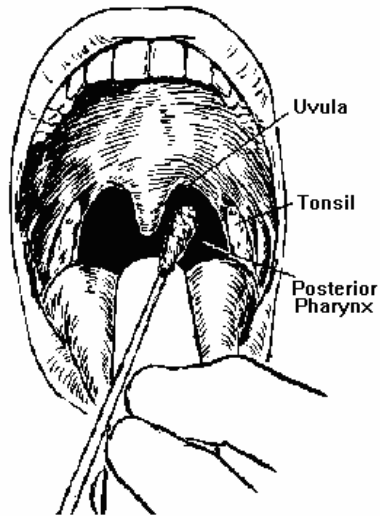


(b)

Şekil 3 (a ve b). Eküvyonun yanlış tutuluşu. Bu şekilde tutulduğunda, örnek alımı sırasında yaralanmalara yol açabilir.



Şekil 4. Nazal sürüntü alınması.



Şekil 5. Boğaz sürüntüsü alınması

Besiyeri / Reaktif / Kit

- DFA testi için FITC işaretli monoklonal antikolar (İnfluenza virüs tip A ve B), DFA lamları - Ticari olarak piyasadan temin edilebilir.
- Hücre dizisi MDCK hücresi - Ticari olarak piyasadan temin edilebilir.
- Hücre kültürü besiyerleri - Ticari olarak piyasadan temin edilebilir veya laboratuvarında hazırlanabilir.
- Moleküler tanı reaktifleri, RT-PCR kiti - Piyasada hazır DNA izolasyon ve PCR kitleri mevcuttur.

Viral nükleik asit ekstraksiyonu için *laboratuvar yapımı* yöntemler kullanılabilir.

Laboratuvar yapımı PCR testi kullanılacak ise polimeraz enzimi, tampon solüsyonlar, primerler, nükleotidler, agaroz jel, DNA boyaları temin edilmelidir. rRT-PCR yöntemi kullanılacak ise yöntemine uygun problemler veya boyalar da gereklidir.

Diğer gereç, donanım

DFA için

- Floresan mikroskopu - objektifler 40× ve 100× immersiyon; oküler 10×; uygun eksitasyon ve emisyon filtreleri ile.
- Ayarlanabilir otomatik mikropipetler (5-1000 µL) ve pipet uçları

Hücre kültürü için

- Sınıf IIA biyogüvenlik kabini (sertifikalı)
- Sitospin santrifüj, soğutmalı santrifüj, vorteks
- İvert mikroskop, CO₂ inkübatör, su banyosu

Moleküler testler için;

- En az üç ayrı oda - nükleik asit ekstraksiyonu, PCR karışımının hazırlanması, amplifikasyonun ve sonuç gözetiminin yapılabileceği ayrı odalar. İdeal olarak PCR karışımı hazırlama odası (temiz oda) pozitif basınçlı, agaroz jel elektroforezi yapılan oda (kirli oda) negatif basınçlı havalandırmaya sahip olmalıdır.
- Donanım – sınıf IIA biyogüvenlik kabini (sertifikalı), santrifüj, soğutmalı mikrosantrifüj, hassas terazi, vorteks, su banyosu, yatay çalkalayıcı, PCR ısı döngü cihazı (gerçek zamanlı veya geleneksel), mikrodalga fırın, jel görüntüleme sistemi, elektroforez ünitesi vb.

2.4. Kalite kontrol

- İç kalite kontrol: İnfluenza A, B ve influenza A alttiplerine ait pozitif ve negatif kontroller sağlanmalı ve her çalışmada hasta örnekleri ile birlikte testin tüm basamaklarına dahil edilmelidir. Ticari olarak elde edilebilir veya laboratuvarında yapılabilir.
- Dış kalite kontrol: Laboratuvarında kullanılan teknik/tekniklere uygun ulusal ve/veya uluslararası dış kalite kontrol programlarına katılım. Yılda en az bir kez bu tür bir programa katılım sağlanmalıdır.

3 İnfluenza ve avian influenza tanısında kullanılan teknikler

- İnfluenza tanısında kullanılan yöntemlerin avantaj ve dezavantajları Tablo 1'de özetlenmiştir.

3.1. Viral antijenlerin gösterilmesi için DFA

- Virüs ile enfekte hücrelerin lam üzerine aktarıldıktan sonra floresan işaretli antikorlarla boyanarak saptanması esasına dayanır.
- Direkt hasta örneklerine veya hücre kültürü izolatlarına uygulanabilir.
- Yöntemin duyarlılığı, materyalin kalitesine, reaktifin özgülüğüne, çalışanın uygulama, okuma ve yorumlama deneyimine bağlıdır.
- Virüsle enfekte hücrelerin lizisinin engellenebilmesi için örnek alındıktan sonra hızla soğutulmalı ve test 1-2 saat içerisinde yapılmalıdır. Hücrelerdeki mukus yıkanarak uzaklaştırılmalıdır.
- Mümkünse birden çok preparat hazırlanarak gereğinde yeniden boyanma imkanı sağlanmalıdır.
- Örnekle beraber mutlaka pozitif ve negatif kontroller çalışılmalıdır.
- Sonuç değerlendirilirken preparatta yeterli sayıda hücrenin bulunmasına dikkat edilmelidir. Bunun sağlanamaması durumunda yeni örnek alınmalı veya yeni preparat hazırlanmalıdır.
- Sonucun raporlanmasında negatif sonucun enfeksiyonu ekarte etmeyeceği vurgulanmalıdır.
- Spesifik boyanma mutlaka elma yeşili renginde ve hücre içi (nükleer ve/veya sitoplazmik) olmalıdır.

3.2. Kültür

- Tanıda 'altın standart' olarak kabul edilmektedir, iyi kalitede örnek sağlandığında duyarlılığı yüksektir.
- Yöntemin performansı örneğin kalitesi, laboratuvar alt yapısı ve personelin eğitim ve deneyimi ile doğrudan ilişkilidir.
- Canlı virüsün çoğaltılması esasına dayalı olduğu için virüs üzerinde ileri incelemelere olanak tanır ancak biyogüvenlik riskleri taşır.
- Standart izolasyon yöntemleri 4-5 gün sürer ve izolatın tanımlanması için IFA, EIA, HAI, PCR gibi yöntemler kullanılır.
- İnfluenza virüslerinin izolasyonunda en duyarlı hücre MDCK devamlı hücre hattıdır. Pasaj sayısı arttıkça hücre duyarlılığında azalma olduğu için erken pasaj sayılı hücre kullanılması tercih edilmelidir.
- Kontaminasyon riski açısından pozitif kontroller ile klinik örnekler aynı zamanda çalışılmamalıdır. Ayrıca, insan örnekleri ile kanatlı ve domuz örnekleri de **asla** aynı laboratuvarında çalışılmamalıdır.

3.3. Moleküler yöntemler (NAT)

- Moleküler tanı teknikleri influenza virüslerinin hem klinik örneklerde hem de izolatlarda tespiti ve tanımlanması için hızlı ve duyarlı metotlardır.
- RT-PCR, hedef viral RNA'dan revers transkripsiyon ile komplementer DNA'nın (cDNA) sentezini, daha sonra cDNA amplifikasyonu ve tespiti basamaklarını içerir (11,12,13).
- Duyarlılık ve özgüllük seçilen primer, prob kalitesi ile doğrudan ilişkilidir. Test ile üniversal veya tipe özgü (influenza virüs A, B, A alttipleri, vb) saptama yapılabilir.
- RT-PCR'da farklı hedef gen bölgelerinin kullanılması virüsün doğru tanımlanması için en uygunudur. Aşağıdaki gen hedefleri diğerlerine göre daha önemlidir:
 - (a) Tip A influenza matriks geni (influenza A virüslerin ortak bölgesidir)
 - (b) İnfluenza A alttiplerine özgü hemaglütinin geni:
 - A(H1N1) 2009 virüs (önceki pandemik virus),
 - A(H3N2),
 - Önceki mevsimsel A(H1N1)
 - Yüksek patojenik avian influenza A(H5N1) virus
 - (c) İnfluenza B virüs spesifik hemaglütinin veya NS geni
- PCR esaslı testlerde yüksek duyarlılık ve özgüllük bulunmakla beraber yalancı negatiflik ve yalancı pozitiflik riskleri söz konusu olabilir. Yalancı negatifliği saptamak açısından internal kontrol kullanılması gereklidir. İnternal kontrolün insan genomuna spesifik olması, örnek kalitesini değerlendirmeye olanak sağlar.
- PCR testinde insan hatasını ve kontaminasyon riskini en aza indirecek teknik seçilmelidir. Bu açıdan tek basamaklı RT-PCR ve rRT-PCR yöntemi avantaj sağlar.
- Mutlaka pozitif ve negatif kontroller ekstraksiyon basamağından itibaren teste dahil edilmelidir.
- İnfluenza virüslerinin moleküler tanısı için ticari ve laboratuvar yapımı testler kullanılabilir. Ticari testler arasında hedef bölge/bölgeler ve alttip belirleme özellikleri açısından farklılıklar vardır.
- DSÖ ve CDC'nin referans merkezler için tanımladığı protokollere ilgili kaynaklardan ulaşılabilir.
- Ticari yöntemler arasında influenza virüslerinin yanı sıra diğer solunum yolu virüslerini de araştıran multipleks PCR testleri de vardır.

NAT sonuçlarının değerlendirilmesi

- Sonuçlar klinik ve epidemiyolojik bilgiler ile beraber değerlendirilmelidir.
- Negatif PCR sonucu, örnekte influenza virüs nükleik asidinin saptanmadığını gösterir. Negatif sonuç, enfeksiyonu dışlamaz.

Tablo 1. Laboratuvar yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları

Yöntem	Avantajlar	Dezavantajlar
Hücre kültürü	Canlı virus izolasyonu, ileri analiz imkanı	Enfeksiyöz virüs riski, deneyimli ve eğitimli personel gereksinimi, uzun süre alması, özel ekipman gereksinimi
DFA	Hız	Deneyimli ve eğitimli personel gereksinimi, özel ekipman gereksinimi, düşük duyarlılık
Hızlı tanı testi	Hız, kolaylık	Düşük duyarlılık ve özgüllük
PCR	Yüksek duyarlılık ve özgüllük	Yüksek maliyet, deneyimli ve eğitimli personel gereksinimi, özel ekipman gereksinimi
Seroloji	Düşük maliyet	Retrospektif tanı

- PCR sonuçları negatif olmasına rağmen klinik şüphenin devam etmesi durumunda testin yeni örnek ile tekrarı veya hücre kültürü ve seroloji gibi alternatif yöntemlerin kullanılması önerilir.
- Pozitif sonuç, influenza virüs nükleik asidinin örnekte varlığını gösterir. Kullanılan test hem influenza A ve hem de alttiplerin saptanmasına yönelik ise influenza A pozitif ancak alttiplerin belirlenememesi durumunda aşağıdaki olasılıklar düşünülmelidir:
 - (a) Yalancı pozitiflik (özgül olmayan reaksiyon, vb.) (bkz. Kutu 1)
 - (b) Yeni bir influenza A alttipi
 - (c) Primer problemlerin bağlanmasını etkileyebilecek mutasyonların varlığı
- Bu durumda aynı örnekten ekstraksiyon aşamasından itibaren testin tekrar edilmesi, aynı sonucun alınması durumunda ise örneğin ileri inceleme için Referans laboratuvara gönderilmesi önerilir.
- Birden çok alttip pozitifliği saptanması durumunda kontaminasyon ihtimali bertaraf edildikten sonra birden çok virüs ile enfeksiyon düşünülmelidir.
- NAT çalışmasında karşılaşılan **yalancı negatiflik** ve **yalancı pozitiflik** nedenleri Kutu 1’de özetlenmiştir.

Kutu 1. NAT’ın sınırlılıkları**Yalancı negatiflik nedenleri**

- Örneğin uygunsuz alınması ve gönderilmesi
- Örnekte inhibitörlerin veya sonucu etkileyebilecek diğer maddelerin varlığı
- Örnekteki virüs miktarının testin analitik duyarlılığının altında olması
- Kullanılan malzemelerin uygunsuz koşullarda saklanması veya son kullanım tarihlerinin geçmiş olması

Yalancı pozitiflik nedenleri

- Örnekler arası veya amplikon ile kontaminasyon
- Özgül olmayan primer prob kullanımı
- Türkiye’de bulunmamakla beraber nazal canlı influenza A aşısı yapılmış kişilerde, aşıya bağlı olarak 3. güne kadar influenza A RT-PCR pozitifliği saptanabilir.

3.4. Saklama, Referans merkeze gönderme

- Örnekler kültür için doğrudan (sentinel sürveyans yapılan illerden) ya da doğrulama, tekrar test edilme, şüpheli sonuç elde edilmesi veya ileri inceleme gibi nedenlerle Referans laboratuvara gönderilebilir.

ÖNEMLİ: Ülkemizde mevsimsel influenza '**sentinel sürveyans**' ile izlenmektedir. Buna göre, vaka bildirimleri (özellikle influenza mevsiminde) Sağlık Bakanlığının 12.10.2005 tarih ve 14141-2005/156 sayılı Genelgesi ile 14 ilden yapılmaktadır. Bu iller; Adana, Ankara, Antalya, Bursa, Diyarbakır, Edirne, Erzurum, İstanbul, İzmir, Konya, Malatya, Samsun, Trabzon ve Van'dır.

Dolayısı ile bu illerde klinik vaka tanımına uyan bireylerden kültür için (ve diğer tanı yöntemleri için de) örnekler alınıp, DSÖ'nün ülkemizdeki iki Referans laboratuvardan birine (THSK, İnfluenza Referans Laboratuvarı, Ankara ve İstanbul Üniversitesi, Çapa Tıp Fakültesi, İnfluenza Referans Laboratuvarı; vakanın bölgesine göre bu laboratuvarlardan birine) gönderilmektedir.

Influenza virüs izolasyonu için kültür de epidemiyolojik olarak bölgesel izolatların belirlenmesi ve aşı geliştirme çalışmalarını desteklemek amacıyla bu Referans laboratuvarlar tarafından yapılmaktadır. Kültür için örnek alınmadan önce durum yukarıda sözü edilen Genelge çerçevesinde değerlendirilmeli ve örnek gönderilmeden önce laboratuvar mutlaka bilgilendirilmelidir.

- İdeal olarak örnekler alındıktan sonra en kısa sürede laboratuvara ulaştırılmalıdır. Ancak çoğu durumda tanı laboratuvarı veya Referans laboratuvar şehirlerarası mesafededir. Buna göre; influenza için **bütün örneklerin** alındıktan sonra +4°C'de korumak şartıyla **96 saate** kadar laboratuvara ulaştırılabileceği hatırlanmalıdır.
- NAT, kültür veya seroloji testleri için örneklerin teste alınması bu sürelerden daha uzun süreceksa, örnekler -70°C'ye kaldırılmalı; kuru buzda laboratuvara ulaştırılmalıdır (seroloji için -20°C de uygun)
- Tekrarlayan dondurma-çözme işlemlerinden kaçınılmalı; gerekiyorsa dondurulmadan önce örnekler yeterli sayıda alikota ayrılmalıdır.
- **Avian influenza** şüpheli durumda örnek almadan önce mutlaka Halk Sağlığı Müdürlüğü ile bağlantı kurulmalı, hastanın avian influenza vaka tanımına uyup uymadığı birlikte değerlendirilmeli ve örnekler bu kanalla gönderilmelidir.
- İnfluenza şüphesinde bütün klinik örnekler biyolojik materyal taşıma şartlarını karşılayacak şekilde *paketlenmeli* ve *taşınmalıdır* (14,15). Yüksek patojen ('highly pathogenic') avian influenza virüs **kültürleri** Kategori A enfeksiyöz madde kabul edilirler. Bu nedenle şüpheli veya kesin tanı konmuş izolatlar kesinlikle Kategori A enfeksiyöz madde taşıma şartlarını karşılayacak şekilde *paketlenmeli* ve *taşınmalıdır*. Kuru buzda taşıma şartları dahil, ayrıntılı bilgi için "UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi"ne başvurulması önerilir.

4 Sonuçların değerlendirilmesi ve bildirim

- Kültürde influenza virüs üremesi "kesin tanı" koydurur.
- RT-PCR veya rRT-PCR ile pozitif sonuç "kesin tanı" koydurur.
- DFA veya hızlı tanı testleri ile pozitif sonuçlar "influenza enfeksiyonu olabilir" şeklinde yorumlanmalıdır. Viral kültür veya PCR önerilir. Sonucun negatif bulunması hastalığı ekarte ettirmez.

NOT 1: Hızlı test sonuçları; (1) kitin duyarlılık ve özgüllüğü, (2) örnek tipi ve alınma zamanı, (3) testin uygulandığı zaman periyodunda toplumdaki influenza prevalansı, ve (4) hastanın klinik özellikleri gibi kriterler eşliğinde değerlendirilmelidir. Salgın dönemlerinde pozitif test sonuçlarının güvenilirliği artmakla birlikte diğer dönemlerde sonuçların mutlaka doğrulanması gereklidir.

- Serolojik incelemede akut ve konvalesan faza ait çift serum örneğinde antikor titrelerinin ≥ 4 kat arttığının gösterilmesi "kesin tanı" koydurur.

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- İnfluenza virüs tanısında kültür ve NAT öncelikli test seçenekleridir. Laboratuvar alt yapısı ve deneyimi sonuçların güvenilirliği açısından önemlidir. Negatif sonuç enfeksiyonun yokluğunu göstermez. Bu nedenle klinik şüphe durumunda tanı olasılığını yükseltmek için bir hastadan alınacak birden fazla ve değişik klinik örneğin incelenmesi önerilir.

6 Referans Laboratuvarlar

- 1) Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal İnfluenza Merkezi ve Solunum Yolu Virüsleri Tanı ve Araştırma Laboratuvarı

Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55, F Blok 2. kat
06100 – Sıhhiye/ANKARA

Tel: 0312 565 5582 / 5565 Faks: 0312 565 5569
e-mail: www.thsk.gov.tr

- 2) İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Viroloji ve Temel İmmünoloji Laboratuvarı
İnfluenza Referans Laboratuvarı
Topkapı Mh., 34093 Fatih/İstanbul

Tel: 0212 414 2000 Faks: 0212 414 2037

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu belge (İnfluenza ve Avian İnfluenzanın Mikrobiyolojik Tanısı) aşağıda verilen UMS belgeleriyle de ilgilidir. Bilgi için bu belgelerin de incelenmesi önerilir:

UMS, SY-04	Akut respiratuvar sendrom
UMS, V-MT-18	Akut solunum yetmezliği sendromu (SARS)
UMS, GEN-OY-01	Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 WHO. Manual for the Laboratory Diagnosis and Virological Surveillance of Influenza, 2011
- 2 Health Protection Agency (HPA). UK Standards for Microbiology Investigations Respiratory Viruses. Clinical Guidance G8, 2012.
- 3 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 4 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelaBReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 5 WHO. Influenza (Seasonal). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/> (son erişim tarihi: 20.12.2013)
- 6 De Gascun CF, Carr MJ, Hall WW. Influenza viruses. *In: Cohen J, Opal SM, Powderly WG et al, (eds). Infectious diseases. 3rd ed., Elsevier Ltd. 2010, p. 1590-97.*
- 7 WHO. Avian Influenza. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian_influenza/en/ (son erişim tarihi: 20.12.2013)
- 8 CDC. Guidance for Clinicians on the Use of RT-PCR and Other Molecular Assays for Diagnosis of Influenza Virus Infection. Centers for Disease Control and Prevention, Department of Health and Human Services, <http://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/molecular-assays.htm> (son erişim tarihi: 27.12.2013)
- 9 CDC. Evaluation of 11 commercially available rapid influenza diagnostic tests - United States, 2011-2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2012;61:873-876.
- 10 Chartrand C, Leeftang MM, Minion J, Brewer T, Pai M. Accuracy of rapid influenza diagnostic tests: a meta-analysis. *Ann Intern Med* 2012;156:500-511.
- 11 WHO. Information for molecular diagnosis of influenza virus in humans. December 2012
- 12 WHO. Recommendations and laboratory procedures for detection of avian influenza A(H5N1) virus in specimens from suspected human cases. August 2007
- 13 CDC. Clinical Description and Lab Diagnosis of Influenza, Centers for Disease Control and Prevention Department of Health and Human Services, <http://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/> (son erişim tarihi: 20.12.2013)
- 14 Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of The Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work. 2000.
- 15 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Viral Hemorajik Ateş (VHA) Sendromunda Mikrobiyolojik Tanı

Hazırlayan Birim	Klinik Viroloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Viroloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	V-MT-11
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik
----------	-------	------------

--	--	--

--	--	--

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
TEKNİK BİLGİLER	5
1 Hedef mikroorganizmalar	5
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	5
3 VHA şüphesinde tanı teknikleri.....	8
4 Sonuçların değerlendirilmesi ve bildirim	9
5 Referans Laboratuvar	10
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	10
KAYNAKLAR.....	11

Kapsam ve Amaç

Viral hemorajik ateşler (VHA) dünyanın farklı bölgelerinde farklı etkenlerin neden olduğu yaşamı tehdit edici ağır hastalıklardır. Yüksek ölüm hızları ve hastane ortamında yayılma potansiyelinden dolayı ciddi sorun oluşturabilen enfeksiyonlardır. Çoğunlukla spesifik tedavileri yoktur ve tanı konması güçtür.

VHA'lar endemik olabilirler, seyahatler sırasında ya da laboratuvar çalışmaları sırasında edinilebilirler. Bu hastalara hızlı bir şekilde tanı konularak yayılmalarının önüne geçilebilmesi için uygun önlemlerin alınması hayati öneme sahiptir. Bunun için ülkede görülebilen VHA etkenlerinin yanı sıra seyahatle ilişkili olabildikleri için dünyadaki coğrafi yayılımlarının çok iyi bilinmesi gerekir. Seyahat ve diğer risk faktörlerinin iyi sorgulanması yurt dışında edinilmiş VHA'da hastalığın tanısı için izlenecek yaklaşımın belirlenmesinde belirleyici olacaktır.

Bir sendrom olarak VHA ülkemizde bildiri zorunlu hastalıklar listesinde yer almaktadır (1,2). Sendrom tanımına uyan vakaların hemen bildirilmesi ve örneklerinin de etken tanısı konmak üzere laboratuvara gönderilmesi gerekir. VHA etkenlerinin çoğu yüksek riskli ve tehlikeli patojenler olduğundan özgül tanıya yönelik incelemeler çoğunlukla yerel koşullarda yapılamaz. Bu etkenlerden şüphelenildiğinde örneklerin böyle patojenler için özel donanım ve alt yapıya sahip referans laboratuvarlarına gönderilmesi gerekir (3,4).

Bu UMS belgesi VHA sendromu olduğundan şüphelenilen durumda başta özgül laboratuvar güvenliği hususları olmak üzere örnek yönetimi ve tanı yaklaşımı ile ilgili hususları kapsamaktadır.

Kısaltmalar ve Tanımlar

VHA Viral hemorajik ateş (Viral kanamalı ateş)

KKKA Kırım Kongo kanamalı ateşi (virüsü)

ACD Asit sitrat dekstroz

Genel Bilgi

“Viral hemorajik ateş” terimi farklı ailelerden çeşitli virüslerin neden olduğu bir hastalık grubunu tanımlar. Klinik görünüm, genellikle vücudun pek çok organının etkilendiği ciddi bir multisistem sendromdur. Karakteristik olarak, bütün damar sistemi zarar görür ve vücudun kendini düzenleme yeteneği bozulur. Sıklıkla semptomlara kanamalar (hemorajiler) eşlik eder. Hemorajik ateş virüslerinin bazı türleri nispeten hafif hastalıklara neden olurken, çoğu da çok ciddi, yaşamı tehdit eden tablolara neden olur (3,4,5).

VHA nedeni virüsler başlıca 4 ailede yer alırlar: arenavirüs, bunyavirüs, filovirus ve flavivirüs aileleri. Ortak özellikleri: (i) hepsi RNA virüsleridir ve zarflı yapıdadırlar; (ii) varlıklarını bir doğal hayvan veya artropod konakta sürdürürler (zoonotik özellik); (iii) coğrafi olarak buldukları bölgeler konak türlerin yaşadıkları bölgelerle sınırlıdır; (iv) insanlar bu virüsler için doğal rezervuar

değildirler; enfekte hayvan veya artropod konaklar ile temas ettiklerinde enfekte olurlar; ancak bu virüslerden bazıları hasta bireylerden diğer insanlara bulaşabilir; (v) VHA sendromu -genellikle düzensiz olarak- sporadik vakalar veya salgınlar şeklinde ortaya çıkabilir; ve salgınların gelişimi kolayca tahmin edilemez; (vi) birkaç önemli istisna dışında, genellikle VHA'ların özgül ilaç tedavisi yoktur (3).

Türkiye'de bugüne kadar görülen VHA etkenleri KKKA ve Hanta virüslerdir. Ülkemizde görülmeyen VHA etkenleri ve dünyadaki coğrafi dağılımları ayrıntılı olarak "UMS, SY-02 Akut Kanamalı Ateş" belgesinde verilmiş olup kısaca şu şekilde listelenebilir:

1. Afrika; Ebola virüs, Marburg virüs, Lassa virüs, Lujo virüs, KKKA virüsü, Dengue ateşi virüsü, Sarı humma virüsü
2. Asya; Dengue ateşi virüsü, Chikungunya virüs, KKKA virüsü, Hantavirüs, Kyasanur Ormanı virüsü, El hurma virüsü, Omsk kanamalı ateşi virüsü,
3. Amerika; Hantavirüs, Sabia virüsü, Junin virüsü, Maçupo virüs, Guanarito virüsü, Chapare virüsü, Sarı humma virüsü, Dengue ateşi virüsü

Türkiye'de görülen ya da importe vaka olarak görülebilmesi olanaklı VHA sendromu etkenleri, bunların doğal rezervuarları, bulaşma yolları ve asgari laboratuvar güvenliği düzeyi Tablo 1'de gösterilmiştir.

Güncel salgınlar ve etken dağılımları için ENIVD, Promed, DSÖ internet sitelerinden yararlanılabilir (4,6,7).

Tablo 1. VHA etkenleri, rezervuarları, bulaşma yolları ve laboratuvar biyogüvenlik düzeyleri.

	Sivri-sinek	Kene	Hayvan konak	Kişiden kişiye	BGD
Arenaviridae					
Lassa virüs			Kemirgen	Bazen	4
Junin (Arjantin) virüsü			Kemirgen	Bazen	4
Machupo (Bolivya) virüsü			Kemirgen	Bazen	4
Sabia (Brezilya) virüsü			Kemirgen	Bazen	4
Guanarito (Venezuela) virüsü			Kemirgen	Bazen	4
Lujo (Güney Afrika) virüsü			Kemirgen	√	4
Bunyaviridae					
KKKA virüsü		√			3+
Hantavirüs			Kemirgen		3
Rift Vadisi ateşi virüsü	√		Evcil hayvan (sığır, keçi, koyun)		3
Filoviridae					
Ebola virüs				Sıklıkla	4
Marburg virüs			Meyve yarasası	Sıklıkla	4
Flaviviridae					
Dengue virüs 1-4	√				3
Sarı humma	√				3
Kyasanur ormanı ateşi		√		Bazen	3
Omsk ateşi				Bazen	3
Elhurma virüsü		√			3
Alphaviridae					
Chikungunya	√				3

VHA'lar hızlı ve ağır seyredediğinden şüpheli hastaların mümkün olan en kısa sürede fark edilip tanımlanarak uygun risk değerlendirmelerinin hızla yapılmasını gerektirir. Vaka tanımları ve risk değerlendirmesi için Sağlık Bakanlığının ilgili dokümanlarına bakılmalıdır (1,2).

VHA etkenlerinin endemik dağılımının bilinmesi olası etkenlerin hızla akla getirilebilmesi için önemlidir. Endemik bölgelere seyahat anamnezi bu nedenle kritik önem arz eder ve örneklerin laboratuvara gönderilmesi sırasında doldurulan bilgi formunda bu bilgi mutlaka yer almalıdır. VHA etkenleri biyoterör amaçları için de kullanılabilirler ve bu bilginin ortaya çıkarılabilmesi de epidemiyolojik bilgiye ve iyi bir sorgulamaya dayanır (8). Sağlık çalışanları da VHA'lar için risk altındadırlar. Ayrıca VHA etkenleri en ciddi laboratuvar kaynaklı enfeksiyon etkenleri arasındadır (9). Nitekim VHA etkenleri genellikle çok özel laboratuvar güvenliği şartları gerektirdiğinden bu etkenlerin laboratuvar tanısına yönelik işlemler referans merkezlerinde yapılır.

VHA vakaları çoğunlukla acil servislere başvurduğundan hastanın değerlendirilmesinde Enfeksiyon Hastalıkları Uzmanı ve Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanından yardım alınması zaman kaybedilmesinin önüne geçebilir. Özgül tanı için alınacak örneklerin belirlenmesinde bu UMS belgesinden ve diğer ilgili UMS belgelerinden yararlanılabilirse de örneklerin gönderileceği laboratuvar ile iletişim kurulması önerilir. Ayrıca, örneklerin gönderilmesi için de Halk Sağlığı Müdürlükleri ile bağlantıya geçilmesi gerekir (1).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizmalar

KKKA virüs ve Hantavirüs (Türkiye'de görülen VHA etkenleri)

Diğer VHA etkenleri (*bkz.* Tablo 1 ve "UMS, SY-02 Akut Kanamalı Ateş")

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

VHA etkenleri yüksek risk grubu (genellikle Risk Grubu 3, bazıları Risk Grubu 4) olarak sınıflandırılan mikroorganizmalardır. Ölümle sonuçlanabilen ciddi enfeksiyonlara yol açabilen bu organizmalar genellikle yüksek aerosol bulaş potansiyeline sahiptirler ve laboratuvar kaynaklı enfeksiyon için çok yüksek risk vardır. Şüpheli klinik örneklerin incelemelerinin asgari BGD3 standardına sahip laboratuvarlarda, bazılarının da BGD4 laboratuvarlarda yapılması gerekir. Risklerinden dolayı laboratuvar incelemelerinin minimumda tutulması tercih edilir. Aşısı mevcut etkenler için testleri uygulayan personel aşılmalıdır.

Rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında bu örnekler ile çalışılması önerilmez; ancak klinik laboratuvarlar bu örneklerin alınması ve ilgili yüksek güvenlikli laboratuvarlara gönderilmesinde görev üstlenebilir.

Eğer örneklerin enfektivitesi bazı önlemlerle giderilmiş ise, bu örneklerle BGD2 şartlarında (rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında) çalışılabilir.

VHA şüpheli durumlarla ilgili başlıca özel önlemler şöyle özetlenebilir:

- Viral hemorajik ateş şüpheli vaka söz konusu olduğunda sağlık çalışanları risk altındadır. Tanı konuluncaya kadar şüpheli vakalar izole edilmeli; hastalar bariyerli-bakım koşulları altında tedavi edilmelidir.
- Örnek alınması ve gönderilmesi sürecinde görev alanlar risk altındadır. Şüpheli vaka örnekleri alınırken *mutlaka maske* takılmalı, **eldiven** giyilmelidir!
- Kan alma işlemi esnasında personele KKKA etkeninin ve diğer kan-kaynaklı patojenlerin (özellikle HIV ve hepatit etkenleri) bulaşma olasılığı ciddi bir risktir. Kan alma ve serumun ayrılması işlemleri yapılırken *kesinlikle* standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır.
- Hasta örnekleri klinik laboratuvara gönderilmeden önce laboratuvar çalışanları uyarılmalıdır. Laboratuvar incelemeleri tamamlanuncaya kadar böyle örnekler önceden belirlenmiş laboratuvar çalışanlarının sorumluluğu altında olmalıdır.
- Eğer rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarı böyle örnekleri yüksek riskli patojen laboratuvarına göndermek üzere almış ise en kısa zamanda biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun *paketleme* yapılmalı ve gönderilmelidir (10) (ayrıntılı bilgi için *bkz.* UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).
- Serolojik ve moleküler tanı BGD2 laboratuvarlarda gerçekleştirilebilirse de önerilmez. Ancak, serolojik tanı BGD2 şartlarında yapılacaksa, serum örnekleri 56°C de ısı ile inaktivasyon ve Triton X-100 ile işleme tabi tutulmalıdır. Bunun için 1 mL seruma 10µL %10 Triton X-100 eklenerek bir saat bekletilmelidir. Bu işlemler her şeye rağmen %100 güvenilir değildir. Deterjan eklenmesi sonuçları bozacaksa sadece ısı ile inaktivasyon kısmen faydalı olabilir.
- Yayma preparatlar metanol ile fiksasyon işleminden sonra bulaştırıcı kabul edilmez. Ancak, sabitlenmiş boyanmış olsun olmasın bütün lamlar **kesici-delici atık** kabul edilir ve kesinlikle kesici-delici atık kutusuna atılırlar! Diğer biyolojik kirlilerin bulunduğu torbalara atılmaları halinde torbayı deler ve ciddi enfeksiyöz risk oluştururlar!
- Yüzey dezenfeksiyonu için %0.5 veya 1'lik sodyum hipoklorit (çamaşır suyu), %0.5'lik fenol içeren bir deterjan ve %70'lik etanol kullanılabilir (4).
- Otomatize analizör sistemlerinin temizlenmesi ve dezenfeksiyonunda 500 ppm sodyum hipoklorit (yaklaşık 5 litre suya 50 mL ev tipi çamaşır suyu) içeren çözelti kullanılır. Klinik materyal ile bariz biçimde kirlenmiş donanımın temizlenmesinde 1/10 oranında sulandırılmış ev tipi çamaşır suyu kullanılmalıdır.
- Serum ayırma ve testlerin çalışılması sırasında daima eldiven ve uygun diğer KKD giyilmeli, daima standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır (*bkz.* "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").
- Laboratuvar personeli, olası klinik semptomlarla ilgili bilgilendirilmeli herhangi bir semptom gelişimi halinde haber verilmesi zorunlu tutulmalıdır.

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) teknikleri uygulamadan önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleriyle aşına olmalı, ve; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

2.3. Örnek, Reaktif, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

VHA tanısı için örneklerinin alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden ve ilgili diğer UMS belgelerinden edinilebilir. Örnek alınmadan ve gönderilmeden önce testleri çalışacak laboratuvar ile mutlaka iletişime geçilmelidir. İlgili UMS'lerin bir listesi bu belgenin sonunda verilmiştir. Aşağıda bazı önemli hususlara tekrar dikkat çekilmektedir:

- Serolojik testler, nükleik asit analizleri veya kültür için hastadan kan alınır. Kan alınmış tüpler pıhtı oluşmaması için hafifçe 5-6 kez alt üst edilmeli, tüplerin *çalkalanmasından* kesinlikle kaçınılmalıdır.
- Serolojik testler için hastadan sarı ya da kırmızı kapaklı tüpe ~5 mL kan alınması yeterlidir. *Jel içermeyen kan tüpü* kullanılmış ise santrifüj sonrası *hemen serum* kısmı steril, vida kapaklı bir tüpe ayrılmalıdır.
- Plazma için hastanın kanı EDTA ya da ACD içeren bir tüpe alınır ve mümkünse hemen laboratuvara gönderilir.
- Viral kültür için tam kan heparinli bir tüpe (en az 5 mL) alınır. Kültür için kanın 24 saat içinde laboratuvarında 'ficoll-gradient' işlemine tabii tutulması gerektiğinden taşıma süresi buna göre ayarlanmalıdır!

NOT 1: Serolojik incelemeler için laboratuvara ulaşma süresi >48 saat ise, serum (veya plazma) kanın alındığı gün santrifüj sonrası steril bir tüpe ayrılmalıdır; bu şekilde en fazla 5 güne kadar +4°C'de saklanabilir.

NOT 2: Nükleik asit analizi için, alındıktan sonraki 6 saat içinde kan laboratuvara ulaşamayacaksa plazma (veya serum) *nükleaz-içermeyen* bir tüpe, uygun steril filtreli-pipet ucu kullanılarak ayrılmalıdır.

NOT 3: Seroloji veya nükleik asit analizleri için örneğin teste alınması üstte belirtilen sürelerden daha uzun süreceksa örnekler -70°C'ye kaldırılmalı (seroloji için -20°C de uygun); kuru buzda laboratuvara ulaştırılmalıdır.

- İdrar - Steril bir tüp veya idrar kabına 5-10 ml idrar alınır.
- BOS - Aseptik şartlarda LP yapılarak hekim tarafından alınır. Tüp, herhangi bir koruyucu konmadan laboratuvara gönderilir.
- Solunum yolu örnekleri – Balgamda örnek kalitesi önemlidir; hastaya nasıl örnek vereceği iyi tarif edilmelidir. Balgam provoke edilebilir (indüklenmiş balgam). Balgam veremeyen hastalardan BAL, ETA, fırçalama ya da yıkama sıvısı alınabilir; <2 mL ise üzerine VTM eklenir. Fırça 2 mL VTM içeren taşıma tüpüne konur.
- Biyopsi / otopsi materyali - Aseptik şartlarda en az 2-3 g doku örneği 2-3 parça halinde alınmalıdır. Kaba 1-2 ml VTM eklenir ve gönderilir.

2.4. Kalite kontrol

- Tanı için kullanılan tüm testlerin "validasyon" ve "verifikasyonları" yapılmış olmalıdır. Serolojik her çalışmada "iç kalite kontrolü" için sonucu önceden bilinen standart IgM ve IgG pozitif serum örnekleri kullanılmalıdır.
- Laboratuvar dış kalite kontrol (DKK) çalışmasına katılıyor olmalıdır. DKK programları yoksa aynı testleri aynı yöntemlerle yapan en az bir laboratuvarla karşılaştırma yapılarak dış kalite kontrolü sağlanmalıdır.

3 VHA şüphesinde tanı teknikleri

3.1. VHA şüphesi ölçütleri

- Hastalığın başlangıcından önceki 21 gün içerisinde;
 - (a) VHA'ların endemik olduğu bölgelere seyahat
 - (b) VHA şüphesi olan bireylerle temas.
 - (c) Enfekte olabilecek hayvanlardan biriyle temas (kemirgenler, yarasalar, böcekçiller, maymunlar, şempanzeler, sivrisinek sokması ya da kene tutması, diğer böceklerle temas)
 - (d) Enfekte materyal ya da örnekle temas olasılığının dışlanamadığı bir laboratuvarında çalışmış olmak.
 - (e) Hastalığı son altı ay içinde başlamış olan, kanıtlanmış ya da olası VHA vakasına ait örneklerle temas etmiş olmak.
- Hastalık ortaya çıktıktan sonra dört hafta içinde ölüm.

3.2. VHA'da sık karşılaşılan klinik bulgular

- Kanama bulgusu (burun, diş eti, cilt ve enjeksiyon yerinden kanama)
- Kanlı ishal
- Melena, hematemez ya da hematüri
- Organ yetersizliği bulguları, şok
- Lökopeni, lökositoz, trombositopeni, transaminazların yüksekliği, hemokonsantrasyon, proteinüri,

3.3. VHA tanısında yöntemler

- Antijen ya da antikor saptamaya yönelik EIA/IFA/DFA ve nötralizasyon testleri – serum veya plazmadan
- Nükleik asit testleri (genellikle DNA dizi analizi ile doğrulamayı gerektirir) – Kan, doku, normalde steril vücut sıvıları
- Virüsün izolasyonu - Kan, doku veya normalde steril vücut sıvıları
- VHA tanısında kullanılan yöntemler Tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2. VHA etkenlerinin tanısında kullanılması gereken örnekler ve laboratuvar testleri. Laboratuvar tanısında seçilecek yöntemler için ayrıca "UMS, SY-02 Akut kanamalı ateş sendromu" belgesinde verilen akış şemasından yararlanılması önerilir.

Virüs	Örnek	Test
Arenaviridae		
Lassa virüs	Serum/plazma	IFA /EIA IgM, IgG, antijen, RT-PCR
Junin (Arjantin) virüsü	Serum/plazma, idrar, boğaz yıkantısı, doku	IFA /EIA IgM, IgG, antijen, RT-PCR, virüs kültürü (ilk 3-10 günde); doğrulama ve tür tayini için nötralizasyon testleri
Guanarito (Venezuela) virüs	Serum/plazma, BOS, idrar, doku	Hücre kültürü, RT-PCR
Machupo (Bolivya) virüsü	Serum/plazma, karaciğer homojenizati	EIA ile antijen ve RT-PCR
Lujo (Güney Afrika) virüsü	Serum/plazma	IFA /EIA IgM, IgG, RT-PCR (viremi 2-13 günler arasında)
Bunyaviridae		
KKKA virüsü		<i>bkz.</i> KKKA rehberi
Hantavirüs		<i>bkz.</i> Hantavirüs rehberi
Rift Vadisi ateşi virüsü	Serum/plazma	EIA IgM, IgG (5. günden itibaren IgM pozitifleşir), Nötralizasyon testleri, RT-PCR (viremi süresi 3-4 gün)
Filoviridae		
Ebola virüs	Serum/plazma, kan, dokular, idrar, BOS	EIA/IFA IgM, IgG, antijen, RT-PCR
Marburg virüs	Serum/plazma, kan, dokular, idrar, BOS	EIA/IFA IgM, IgG, antijen, RT-PCR
Flaviviridae		
Dengue virüs 1-4		EIA IgM, IgG ve PCR
Sarı humma		<i>bkz.</i> Sarı humma rehberi
Kyasanur ormanı ateşi	Serum/plazma	EIA IgM, IgG, RT-PCR
Omsk ateşi	Serum/plazma	EIA IgM, IgG, RT-PCR
Elhurma virüsü	Serum/plazma	
Alphaviridae		
Chikungunya		<i>bkz.</i> Chikungunya rehberi

4 Sonuçların değerlendirilmesi ve bildirim

- Genel olarak hastalığın yaklaşık 7. gününden sonra ELISA veya IFA tekniği ile IgM ve IgG antikorları saptanabilir düzeye ulaşmaktadır. Araştırılan VHA etkenine karşı IgM antikor pozitifliği, semptomatik olgularda akut enfeksiyonu gösterir ve "**kesin tanı**" bulgusudur.
- Kanda IgM antikorları 2-6 ay kadar devam edebilir.
- Akut ve konvalesan dönem serumlarında serokonversiyon ya da özgül IgG antikor titresinde ≥ 4 kat artış "**kesin tanı**" bulgusudur.
- VHA olgularında gerçek-zamanlı PCR erken dönemde oldukça yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir. Semptomların başlangıcında, ilk 1-3 gün içerisinde alınan örnek tanıda değerlidir.
- Akut enfeksiyonda kan, vücut sıvıları veya doku örneklerinden RT-PCR ile nükleik asitlerin gösterilmesi "**kesin tanı**" bulgusudur.

- VHA ülkemizde bildiriimi zorunlu bir sendromdur ve klinik tanıma uygun vaka görülmesi durumunda, bir yandan özgül tanı için örnekler laboratuvara gönderilirken bir yandan da Halk Sağlığı Müdürlüğüne hemen bildirilmelidir (1,2).
- Vakaların kayıt ve bildiriimi için Sağlık Bakanlığının "Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi" izlenmelidir (1). Vakanın bir salgınla ilişkili olabileceği hatırlanmalı ve bildirimler mümkün olan en kısa süre içinde yapılmalıdır.

5 Referans Laboratuvar

Adres

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal Arbovirüs ve Viral Zoonotik Hastalıklar Referans Laboratuvarı
Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55, F Blok 1.kat
06100 – Sıhhiye/ANKARA

Tel: 0312 565 5631 / 5547
e-mail: viralzoonoz@thsk.gov.tr;

Faks: 0312 565 5569;
www.thsk.gov.tr

Görev çerçevesi

Bildiriimi zorunlu olan; viral hemorajik ateş sendromları – Kırım-Kongo kanamalı ateşi (KKKA), hantavirüs enfeksiyonları, Dengue ateşi, sarı humma (Yellow fever), Batı Nil virüsü (West Nile Virus), enfeksiyonu, Chikungunya ateşi ve kene-kaynaklı (Tick-borne) ensefalit (TBE), ve

Bildiriimi zorunlu olmayan; tatarcık humması (Sand-fly fever; SVF) için konvansiyonel ve/veya moleküler tanı, doğrulama; uluslararası referans merkezlerle işbirliği ve moleküler epidemiyolojik tiplendirme.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu belge (Viral Hemorajik Ateşlerin Mikrobiyolojik Tanısı) ayrıca aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir. Özellikle hastalığa özel inceleme yöntemleri ve raporlama hakkında yeterli bilgi için bu belgelere bakılması önerilir:

UMS, V-MT-12	Kırım-Kongo kanamalı ateşinin mikrobiyolojik tanısı
UMS, V-MT-13	Hantavirus enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı
UMS, V-MT-14	Sarı hummanın mikrobiyolojik tanısı
UMS, V-MT-16	Chikungunya ateşinin mikrobiyolojik tanısı
UMS, SY-02	Akut kanamalı ateş sendromu

UMS, GEN-OY-01 Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 2 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014).
- 3 CDC. Viral hemorrhagic fevers. http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dispages/Fact_Sheets/Viral_Hemorrhagic_Fevers_Fact_Sheet.pdf (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 4 Viral haemorrhagic diseases. <http://www.enivd.de/index.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 5 Passler S, Walker DH. Pathogenesis of viral haemorrhagic fever. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2013;8:411-440
- 6 <http://healthmap.org/promed/> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 7 <http://www.who.int/en/> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 8 Borio L, Inglesby T, Peters CJ, at all and Working Group on Civilian Biodefense. Hemorrhagic fever viruses as biological weapons: medical and public health management. *JAMA* 2002;287:2391-2405
- 9 Ftika L, Maltezou HC. Viral haemorrhagic fever in health care settings. *J Hosp Infect* 2013;83:185-192
- 10 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmî Gazete 25.09.2010 – 27710.



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşinin (KKKA) Mikrobiyolojik Tanısı

Hazırlayan Birim	Klinik Viroloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Viroloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	V-MT-12
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik
----------	-------	------------

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
Etken.....	4
Epidemiyoloji	4
Bulaşma yolları	4
Risk grupları	4
Klinik bulgular.....	5
Biyokimyasal testler.....	5
Laboratuvar tanısı.....	6
TEKNİK BİLGİLER	6
1 Hedef mikroorganizma	6
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	6
3 KKKA tanısında kullanılan teknikler.....	8
4 Sonuçların değerlendirilmesi ve bildirim	10
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	10
6 Referans Laboratuvar	10
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	11
KAYNAKLAR.....	11

Kapsam ve Amaç

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA), insanlarda yüksek fatalite ile seyreden, çoğunlukla kenelerle ve enfekte canlıların kan ve vücut sıvılarıyla temas sonucunda bulaşabilen, kanamalarla seyreden bir hastalıktır (1). Hastalık Afrika, Güney Doğu Avrupa ve Asya'daki birçok ülkede endemik olarak görülmektedir. Virüsün coğrafi dağılımı vektör kenenin dağılımı ile paralellik göstermektedir. Türkiye'de ilk vakalar 2002 yılında Tokat ilinden bildirilmiştir; 2013 yılı itibariyle yaklaşık 8000 olgu ve 400 ölüm saptanmıştır. Olgular çoğunlukla, Karadeniz Bölgesinin iç kısımları, Orta ve Doğu Anadolu'nun kuzey ve orta bölgelerinde görülmekle birlikte, Türkiye'nin pek çok iline dağılım göstermektedir. Olguların büyük kısmı Mart ayı başından Ekim sonuna kadar, özellikle kenelerin aktif oldukları Haziran-Temmuz aylarında kaydedilmiştir. Vaka-ölüm oranı %5'dir (2).

KKKA virüsünün vektörü kenelerdir. Türkiye'de ana vektör kene türü *Hyalomma marginatum*'dur (3).

KKKA ülkemizde bildirim zorunlu hastalıklar listesinde yer almaktadır (4,5). Kesin tanısı başlıca serolojik ve nükleik asit tabanlı yöntemlerle konur. Yüksek riskli bir patojen olması nedeniyle KKKA tanısı klinik mikrobiyolojinin rutin tanı kapsamına girmemektedir. Şüpheli durumlarda bir klinik laboratuvar büyük olasılıkla yatan hastadan örneklerin alınması ve Referans laboratuvara gönderilmesinde rol oynayacaktır. Serolojik ve/veya moleküler tanı imkanlarına sahip klinik mikrobiyoloji laboratuvarları da KKKA tanı kapasitesine destek olabilir. Bu çerçevede bu UMS belgesinde KKKA virüsü enfeksiyonlarının kesin tanısı için geçerli yöntemler, örnek yönetimi, asgari laboratuvar şartları ve sorumluluklar ile ilgili bilgi verilmesi hedeflenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

KKKAV Kırım-Kongo kanamalı ateşi virüsü

RT-PCR reverse transcriptase PCR

rRT-PCR real-time reverse transcriptase PCR

Genel Bilgi

KKKAV dünyada en geniş coğrafi yayılıma sahip bir kene türü ile bulaşmaktadır ve enfekte olan kişilerin beşte birinde hastalığa yol açmaktadır. Çoğu bireyde enfeksiyon grip benzeri hafif bir tablo ile seyrederken, bir kısmında da yaygın kanamalar ve şok ile karakterize viral hemorajik ateş tablosuna neden olur (1). Özellikle bu ağır vakalarda ölüm hızları %50'ye kadar çıkabilmektedir; Türkiye'de ölüm hızı %5 dolayındadır. KKKAV bazen enfekte canlıların kan ve vücut sıvılarıyla temas ile de bulaşabilmektedir.

Hastalık Afrika, Güney Doğu Avrupa ve Asya'daki birçok ülkede endemik olarak görülmektedir. Virüsün coğrafi dağılımı vektörü olan kenenin dağılımı ile paralellik gösterir. Türkiye'de ilk vakaların saptanmaya başladığı 2002 yılından bu yana

8000 dolayında vaka ve 400 ölüm bildirilmiştir (6). Olguların büyük kısmı (%95) Mart-Ekim ayları arasında İç Anadolu ve Doğu Anadolu Bölgesi'nin kuzey kısmı ile Karadeniz Bölgesinin güney kesimlerinden gelmektedir. Bununla birlikte Türkiye'nin hemen hemen tüm illerinden vakalar bildirilmiştir (2).

Etken

KKKAV, *Bunyaviridae* ailesi içinde yer alan *Nairovirus* cinsinden tek sarmallı negatif anlamlı bir RNA virüsüdür. Virüsün RNA'sı 3 segmentlidir (S, L, M). Segmentler arası genetik değişkenlik oranları farklıdır. Nükleotid düzeyinde %30'a kadar çıkan genetik değişkenlik, amino asit düzeyinde çok daha düşük düzeylerde kalmaktadır. KKKAV, farklı coğrafi dağılım özellikleri gösteren 6 ya da 7 genetik gruba ayrılmaktadır (1).

Türkiye'de iki genetik gruba ait virüsler dolaşmakla birlikte, salgından sadece gruplardan birine ait virüsler sorumludur (7).

Epidemiyoloji

Doğadaki rezervuarı, evcil omurgalı hayvanlar (sığırlar, koyun ve keçiler) küçük omurgalıdır (tavşan, kirpi vb). Virüs hayvanlarda hastalığa yol açmaz, ancak geçici viremi yapar (8).

Vektör, Türkiye ve Güney Avrupa'da en başta *Hyalomma marginatum* olmak üzere sert kenelerdir. Hastalığın yayılışı ve virüsün evrimi kenelerin coğrafi dağılımı ve evrimiyle paralellik göstermektedir. Vektörün kenelerde transovariyal ve transstadiyal geçişi söz konusudur. Olgular çoğunlukla, yaban hayvanlarıyla evcil hayvanların ortak yaşam alanları olan yarı ormanlık bölgeler ve komşuluklarında saptanmıştır (8).

Bulaşma yolları

Virüs, enfekte kenelerin kan emmesi ya da enfekte insan/hayvanların kan/dokuları ile temas yoluyla bulaşır. Ayrıca enfekte kan veya vücut sıvıları ile ya da bunlarla kontamine olmuş tıbbi aletlerle doğrudan temas sonucu hastane-kaynaklı bulaşma da söz konusudur (1).

Risk grupları

En önemli risk grupları, endemik bölgelerde çiftçiler ve hayvancılıkla uğraşanlar, mezbaha çalışanları, veterinerlerdir. Mezbahadaki işlemler sonrasında virüs inaktive olmaktadır. Pişmiş et tüketimiyle bulaşma söz konusu değildir.

Kanamalı hastalara bakım veren sağlık çalışanları ikinci en önemli riskli meslek grubudur. Hava yoluyla geçiş söz konusu değilse de kanamalı hastalarla yakın temas durumunda aerosol yoldan bulaş bildirilmiştir. Klinikte yapılan işlere göre alınan önlemler gözden geçirilmelidir (9).

Laboratuvar çalışanları bir diğer önemli risk grubudur. KKKAV enfekte kişilerin ve hayvanların kan, serum, BOS ve dokularında bulunur. Hasarlı deri aracılığıyla temas sonucu geçiş olabilmektedir. Özellikle kesici-delici alet yaralanmaları ile ilişkili laboratuvar kaynaklı enfeksiyon riski yüksektir. Endemik bölgelerde, açık havada yapılan aktivitelerde (piknik, doğa gezileri vb.) bulunanlar risk altındadırlar.

Klinik bulgular

Enfekte olanlarda hastalık gelişme olasılığı 0.215'tir, yani, enfekte olan her beş kişiden birinde hastalık gelişmektedir. Ağır KKKAV enfeksiyonları tipik olarak 4 ana döneme ayrılır: inkübasyon, prehemorajik, hemorajik ve konvalesan dönemleri. İnkübasyon dönemi, 1-9 gündür, 14 güne kadar uzayabilir (6). Hafif seyirli vakalarda klinik tablo özgül olmayan bulgu ve belirtilerle sınırlıdır.

IgM sınıfı antikorlar 1. haftanın sonunda pozitifleşmeye başlar ve birkaç ay boyunca pozitif kalırken; IgG sınıfı antikorlar biraz daha geç ortaya çıkar ve en az 5 yıl pozitif kalır. Ağır vakalarda antikor yanıtı yoktur; sağ kalanlarda 9. günden sonra antikorlar pozitifleşmeye başlar. İlk 7-10 gün viremi olur, 16. güne kadar uzayabilir.

Prehemorajik dönem, ani ateş yükselmesi (39-41°C), baş ağrısı, miyalji, baş dönmesi ile karakterizedir. Ateş ortalama 4-5 gün sürer. Ek belirtiler, ishal, bulantı ve kusmadır. Yüz, boyun ve göğüste hiperemi, konjonktivit bu dönemde görülür. Bu dönem 1-7 gün sürer.

Hemorajik dönem kısadır, hızlı gelişir ve genellikle hastalığın 3 ve 5. günlerinde başlar. Kanama bulguları; peteşi, mukoza ve derideki büyük hematomlar spektrumunda yer alır. Vajina, dişeti ve beyin kanamaları bildirilmiştir. En sık görülen kanamalar burun, gastrointestinal sistem (hematemez, melena ve intraabdominal), genital (vajinal), üriner sistem (hematüri) ve solunum yolları (hemoptizi) kanamalarıdır. Ayrıca atipik kanamalar da görülebilir. Hastaların üçte birinde karaciğer ve dalak büyüklüğü bildirilmiştir. Ölümlerin çoğu hemorajik dönemde gerçekleşmektedir.

Konvalesan dönem hastalığın görülmesinden 10-20 gün sonra başlar. Hastanede kalma süresi yaklaşık 9-10 gündür. Hastalığın relapsı yoktur.

Biyokimyasal testler

Trombositopeni enfeksiyonun değişmez bulgusudur. Hastalarda lökopeni, aspartat transferaz (AST), alanin transferaz (ALT), laktik dehidrogenaz (LDH), ve kreatinin fosfokinaz (CPK) yükseklikleri vardır.

Tablo 1. Türkiye'den bildirilen KKKAV olgularında belirti ve bulgular (1)

Belirti ve bulgular	%
Bulantı-kusma	80
Miyalji	70
Ateş	75
Baş ağrısı	75
Kanamalar	48
Epistaksis	40
Hematemez	26
Hematüri	16
Melena	14
Hemoptizi	8
Konjonktivada kızarıklık	42
Makülopapüler döküntü	35
Hepatomegali	35
İshal	34
Uyku hali	20
Sarılık	10
Splenomegali	10
Lenfadenopati	15

Hemostaz testlerinden protrombin zamanı, aktive parsiyel tromboplastin zamanı uzamıştır. Fibrinojen düzeyi düşebilir, fibrin yıkım ürünleri artabilir. Tam kan sayımı ve biyokimya testleri dahil olmak üzere laboratuvar testleri sağ kalan hastalarda yaklaşık 5-9 günde normal sınırlara döner (10).

Laboratuvar tanısı

Klinik (ani başlayan ateş ve genel enfeksiyon bulguları ile birlikte hemorajik belirtiler) ve epidemiyolojik özellikleri ile (keneye temas, kene tutunması, hayvanla temas, kırsal kesimde yaşama veya son iki hafta içinde kırsal alana seyahat öyküsü) bir kişide çok yüksek olasılıkla KKKA akla gelse de kesin tanı mikrobiyolojik incelemeye dayalıdır.

Kan, vücut sıvıları veya doku örneklerinden virüsün izolasyonu, özgül antijenin belirlenmesi ya da virüs RNA'sının gösterilmesi veya virüse özgü IgM antikorunun pozitifliği ya da akut ve konvalesan faz serumlarında virüse özgü IgG titresinde ≥ 4 kat artış kesin tanı koydurur (4,5).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizma

Kırım-Kongo kanamalı ateşi virüsü (KKKAV)

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1 Laboratuvar güvenliği

KKKAV Risk Grubu 3 olarak sınıflandırılan bir mikroorganizmadır. Ölümle sonuçlanabilen ciddi enfeksiyonlara yol açabilen bu organizmalarla laboratuvar kaynaklı enfeksiyon için yüksek risk vardır. Parenteral ve aerosol ile bulaşmaya bağlı laboratuvar enfeksiyonları bildirilmiştir (11,12). Hücre kültürü, hayvan deneyleri ve vektör çalışmaları en az BGD3 (ve hayvan-BGD3) laboratuvar şartlarında ve sertifikalı bir sınıf-IIA BGK içinde yapılır.

Serolojik ve moleküler tanı BGD2 laboratuvarlarda gerçekleştirilebilir. Serum ve diğer enfeksiyöz materyal ile çalışırken kesici-delici yaralanmasına karşı önlem alınmalıdır.

Serum ayırma ve testlerin çalışılması sırasında **daima** eldiven giyilmelidir. Bütün biyogüvenlik düzeylerinde daima standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır (bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

Virüsün bulaşıcılığı, düşük konsantrasyonlarda formol veya β -propiolakton tarafından yok edilir. Virüs kaynatma veya otoklavlama ile de hızla tahrip olur (13) (ayrıca dezenfeksiyon hususları için bkz. "UMS, V-MT-11 Viral hemorajik ateşlerin mikrobiyolojik tanısı").

2.2 Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Eğer klinisyen KKKA'dan şüpheleniyorsa, örnekler laboratuvara gönderilmeden önce hekim laboratuvar ile iletişim kurmalıdır.

KKKA şüpheli örneklerin kabul edilmesinden sonucun raporlanmasına kadarki adımlarda görev alan tüm personel; (i) tekniklerin uygulanmasından önce amaçlanan bütün kullanımlar ile ilgili tam bir eğitim almış olmalı; (ii) kullanılan tekniklere tüm yönleriyle aşina olmalı; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Bu kurallar örnek kabulü dahil bütün tanımlama aşamalarında **kesici-delici** ve **aerosol önlemlerine** yüksek uyumu gerektirir (12). Laboratuvar personeli, muhtemel klinik semptomlarla ilgili bilgilendirilmeli herhangi bir semptom gelişimi halinde haber verilmesi zorunlu tutulmalıdır.

Hem güvenlik önlemlerine uyumun sağlanmasından hem de tekniklerin standart prosedürlere uygun gerçekleştirilmesi ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3 Örnek, Reaktif, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

KKKA tanısı için örneklerinin alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden edinilebilir. Ayrıca örnek alınmadan ve gönderilmeden önce testleri çalışacak laboratuvar ile mutlaka iletişime geçilmelidir.

Aşağıda bazı önemli hususlara tekrar dikkat çekilmektedir:

- Serolojik testler veya nükleik asit analizleri için hastadan kan alınır. Kan alınmış tüpler pıhtı oluşmaması için hafifçe 5-6 kez alt üst edilmeli, tüplerin *çalkalanmasından* kesinlikle kaçınılmalıdır.
- Serolojik testler için hastadan sarı ya da kırmızı kapaklı tüpe ~5 mL kan alınması yeterlidir. *Jel içermeyen kan tüpü* kullanılmış ise santrifüj sonrası *hemen serum* kısmı steril, vida kapaklı bir tüpe ayrılmalıdır.
- Plazma için hastanın kanı EDTA içeren bir tüpe alınır ve mümkünse hemen laboratuvara gönderilir.

NOT 1: Serolojik incelemeler için laboratuvara ulaşma süresi >48 saat ise, serum (veya plazma) kanın alındığı gün santrifüj sonrası steril bir tüpe ayrılmalıdır; bu şekilde en fazla 5 güne kadar +4°C'de saklanabilir.

NOT 2: Nükleik asit analizi için, alındıktan sonraki 6 saat içinde kan laboratuvara ulaşamayacaksa plazma (veya serum) *nükleaz-içermeyen* bir tüpe, uygun steril filtreli-pipet ucu kullanılarak ayrılmalıdır.

NOT 3: Seroloji veya nükleik asit analizleri için örneğin teste alınması üstte belirtilen sürelerden daha uzun süreceksse örnekler -70°C'ye kaldırılmalı (seroloji için -20°C de uygun); kuru buzda laboratuvara ulaştırılmalıdır.

Örneklerin laboratuvara gönderilmesi hususları için *bkz.* sayfa 9, Bölüm 3.4.

Kit, reaktif

- IFA kiti ve/veya IgM 'capture' ELISA, IgG ELISA,
- PCR kit ve reaktifleri

Diğer gereç, donanım

- Floresan mikroskopu ve/veya ELISA okuyucu, yıkayıcı
- RT-PCR donanımı ve uygun PCR alanları
- BGD3 (hayvan deneyleri yapılacaksa hayvan-BGD3) için gerekli koşullara ve donanıma sahip laboratuvar

2.4 Kalite kontrol

- Tanı için kullanılan tüm testlerin "validasyon" ve "verifikasyonları" yapılmış olmalıdır. Serolojik her çalışmada "iç kalite kontrolü" için sonucu önceden bilinen standart IgM ve IgG pozitif serum örnekleri kullanılmalıdır.
- Laboratuvar dış kalite kontrol (DKK) çalışmasına katılıyor olmalıdır. DKK programları yoksa aynı testleri aynı yöntemlerle yapan en az bir laboratuvarla karşılaştırma yapılarak dış kalite kontrolü sağlanmalıdır.

3 KKKA tanısında kullanılan teknikler

3.1 Seroloji

- ELISA veya IFA testi ile IgM ve IgG antikorları hastalığın başlamasından 7 gün sonra saptanabilir. Akut enfeksiyon, tek bir örnekte IgM antikorlarının saptanması veya çift serum örneğinde 4 kat titre artışı ile tanımlanır. Bu nedenle klinik tanıya yönelik incelemelerde hastalığın **erken** döneminde **moleküler testler** tercih edilmelidir.
- Serolojik incelemeler hastalığın daha geç, özellikle ikinci haftadan sonraki dönemlerinde tercih edilmelidir. Kuvvetli klinik şüphe ve erken dönem alınan örnekte moleküler test sonucunun negatif olması halinde daha sonra alınan ikinci örnekte serolojik incelemeler yapılabilir. Özellikle ağır olgularda antikor yanıtının gecikebileceği unutulmamalıdır. Seroepidemiyolojik çalışmalarda da EIA ve IFA testleri kullanılır (10).
- Özgül IgM düzeyi enfeksiyondan 4 ay sonra saptanamayacak kadar azalır, ama IgG düzeyleri en az 5 yıl boyunca saptanabilir.
- Laboratuvarda hazırlanmış ve ticari EIA ve IFA testleri vardır. Bu testlerde nativ ya da rekombinant viral antijenler kullanılmaktadır. Rekombinant antijen olarak genellikle plazmid ekspresyon sistemlerinden elde edilmiş viral nükleokapsid proteinleri kullanılır.
- IgM için EIA ve IFA testlerinin duyarlılık ve özgüllüğü yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda sırasıyla duyarlılık için %87.8 - %93.9 ve özgüllük için %98.9 - %100 arasında bildirilmiştir. Aynı şekilde IgG için EIA ve IFA testlerinin duyarlılıkları sırasıyla %80.4 - %86.1 bulunurken her iki testin özgüllüğü %100 olarak bildirilmiştir (10).

3.2 Moleküler tanı

- Moleküler yöntemler hastalığın erken döneminde enfeksiyonunun özellikle ilk iki hafta hızlı tanısında tercih edilecek yöntemlerdir.
- RT-PCR ya da rRT-PCR yöntemi kullanılır. Özellikle kantitasyona da olanak vermesinden dolayı rRT-PCR daha sık tercih edilir.
- rRT-PCR yöntem olarak son derece özgün, duyarlı ve hızlıdır. KKKAV RNA'sının saptanmasına yönelik testlerde genellikle S segmenti hedef olarak seçilmektedir.
- KKKA virüsünün farklı coğrafi yayılım gösteren 7 genotipinin olduğu da göz önüne alındığında virüsün genetik çeşitliliğinden dolayı aynı anda tüm genotiplerin saptanmasında güçlüklerle karşılaşmaktadır.
- Duyarlılık açısından sorunlu olmakla birlikte, moleküler tekniklerin özgüllükleri oldukça iyidir (10).

3.3 Kültür

- Virüs izolasyonu en az BGD3 standartları olan laboratuvarlarda, özel önlem alınarak yapılmalıdır.
- Hücre kültüründe virüsün izolasyonu, örneklerin yeni doğan farelere intrakraniyal veya intraperitoneal inokülasyonuna göre daha basit ve hızlıdır, ancak daha az duyarlıdır.
- Virüs izolasyonu için Vero E6, LLC-MK2, BHK-21, SW-13, CER hücre soyları kullanılmaktadır. Virüs izolasyonu 2-5 günde başarılıdır, ancak hücre kültürlerinin duyarlılığı düşüktür ve genellikle hastalığın ilk 5 gününde mümkündür. Virüsün çok az sitopatik etkisi vardır ya da hiç yoktur. Üreme, özgül monoklonal antikorlar ile IFA ile veya moleküler yöntemlerle saptanır.
- Yenidoğan farelere inokülasyon, hücre kültürlerine göre biraz daha yavaş (6-9 gün) olmakla birlikte daha duyarlıdır ve hastalığın 13. gününe kadar kanda virüs bu yöntemle saptanabilir (10,12).

3.4 Saklama, Referans merkeze gönderme

- Seroloji, nükleik asit analizleri veya kültür için örneklerin teste alınması önerilen sürelerden daha uzun sürecekse, örnekler -70°C'de saklanmalı; kuru buzda taşınmalıdır (seroloji için -20°C de uygundur).
- KKKAV şüpheli **klirik örnekler** Kategori A enfeksiyöz madde kabul edilirler. Bu nedenle şüpheli klinik örnekler kesinlikle Kategori A enfeksiyöz madde taşıma şartlarını karşılayacak şekilde *paketlenmeli* ve taşınmalıdır (14). Kuru buzda taşıma hususları dahil, ayrıntılı bilgi için ilgili UMS belgesine (UMS, GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi) başvurulması önerilir.
- KKKA şüpheli vaka incelemeleri **sadece** Sağlık Bakanlığı tarafından yetkilendirilmiş merkezlerde yapılır.
- KKKA örnekleri ülke genelinden 3 laboratuvara gönderilir. Gönderilecek laboratuvar şüpheli vakanın bulunduğu ile göre aşağıda belirtilmiştir:

- (a) *Samsun Halk Sağlığı Laboratuvarına* – Samsun, Trabzon, Ordu, Giresun, Gümüşhane, Amasya, Tokat, Sinop, Rize, Artvin
- (b) *Erzurum Halk Sağlığı Laboratuvarına* – Erzurum, Erzincan, Kars, Ardahan, Bayburt, Tunceli, Bitlis, Bingöl, Muş, Ağrı, Iğdır
- (c) *Ankara THSK, Ulusal Arbovirus ve Viral Zoonotik Hastalıklar Referans Laboratuvarı'na* – Erzurum ve Samsun Halk Sağlığı Laboratuvarlarına örnek gönderen illerin haricinde kalan tüm iller.
- NOT: Adres/iletişim bilgileri için bkz. sayfa 10 "Referans Laboratuvar"

4 Sonuçların değerlendirilmesi ve bildirim

- Hastalığın yaklaşık 7. gününden sonra ELISA veya IFA tekniği ile IgM ve IgG antikorları saptanabilir düzeye ulaşmaktadır.
- Tek serum örneğinde IgM pozitifliği, semptomatik olgularda akut enfeksiyonu gösterir ve "**kesin tanı**" bulgusudur. Enfeksiyondan sonra 4 ay sonra IgM saptanamaz düzeye iner.
- Akut ve konvalesan dönem serumlarında serokonversiyon ya da özgül IgG antikor titresinde ≥ 4 kat artış "**kesin tanı**" bulgusudur.
- KKKA için gerçek-zamanlı RT-PCR erken dönemde oldukça yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir. Kan, vücut sıvıları veya dokulardan PCR ile viral RNA'nın gösterilmesi "**kesin tanı**" bulgusudur.
- KKKA ülkemizde bildirim zorunlu bir hastalıktır. Bildirim esasen klinisyenin sorumluluğu olmakla birlikte belirtilen sonuçlardan en az birinin elde edilmesi durumunda, vaka araştırmasının hızla başlatılabilmesi için laboratuvar ilgili birimleri haberdar etmelidir (4,5).

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Ağır vakalarda IgM yanıtları olmayabilir ve/veya geç pozitifleşebilir.

6 Referans Laboratuvar

Adres

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal Arbovirüs ve Viral Zoonotik Hastalıklar Referans Laboratuvarı
Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55, F Blok 1.kat
06100 – Sıhhiye/ANKARA

Tel: 0312 565 5631 / 5547
e-mail: viralzoonoz@thsk.gov.tr;

Faks: 0312 565 5569;
www.thsk.gov.tr

Görev çerçevesi

Bildirimi zorunlu olan; viral hemorajik ateş sendromları – Kırım-Kongo kanamalı ateşi (KKKA), hantavirüs enfeksiyonları, Dengue ateşi, sarı humma (Yellow fever), Batı Nil virüsü (West Nile Virus), enfeksiyonu, Chikungunya ateşi ve kene-kaynaklı (Tick-borne) ensefalit (TBE), ve

Bildirimi zorunlu olmayan; tatarcık humması (Sand-fly fever; SVF) için konvansiyonel ve/veya moleküler tanı, doğrulama; uluslararası referans merkezlerle işbirliği ve moleküler epidemiyolojik tiplendirme.

Samsun Halk Sağlığı Laboratuvarı

Tel: 0 362 233 2331/159; Faks: 0 362 230 3853

Erzurum Halk Sağlığı Laboratuvarına

Tel: 0 442 234 2354; Faks: 0 442 234 2888

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu belge (Kırım-Kongo Kanamalı Ateşinin Mikrobiyolojik Tanısı) ayrıca aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve ilave bilgi için incelenmeleri önerilir:

UMS, SY-02	Akut kanamalı ateş sendromu
UMS, V-MT-11	Viral hemorajik ateşlerin mikrobiyolojik tanısı
UMS, GEN-OY-01	Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Ergonul O. Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Lancet Infect Dis* 2006;6:203-214.
- 2 Yılmaz GR, Buzgan T, Irmak H, et al. The epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey, 2002-2007. *Int J Infect Dis* 2009;13:380-386.
- 3 Hoogstraal H. The epidemiology of tick-borne Crimean-Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe, and Africa. *J Med Entomol* 1979;15:307-417.
- 4 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 5 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014).

- 6 Ergonul O. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: New outbreaks, new discoveries. *Curr Opin Virol* 2012;2:215-220.
- 7 Midilli K, Gargili A, Ergonul O, et al. The first clinical case due to ap92 like strain of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus and a field survey. *BMC Infect Dis* 2009;9:90.
- 8 Vatansever Z, Uzun R, Estrada-Pena A, Ergonul O. Crimean Congo hemorrhagic fever in turkey. *In: Ergonul O, Whitehouse CA (eds). Crimean Congo hemorrhagic fever: A global perspective.* Springer. Dordrecht (NL). 2007, p. 59-74
- 9 Celikbas A, Dokuzoguz B, Baykam N, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever infection among healthcare workers in Turkey. *Emerg Infect Dis* 2014; 20.
- 10 Zeller H. Laboratory diagnosis of Crimean Congo hemorrhagic fever. *In: Ergonul O, Whitehouse CA (eds). Crimean Congo hemorrhagic fever: A global perspective.* Springer, Dordrecht (NL). 2007, p. 233-243
- 11 ECDC. Consultation on Crimean-Congo hemorrhagic fever prevention and control. Stockholm 2008.
- 12 Ergonul O. Viral hemorrhagic fevers. *In: Cornaglia G, Courcol R, Herrmann JL, Kahlmeter G, Peiguie-Lafeuille H, Vila J, eds. European Manual of Clinical Microbiology.* 1 edn: ESCMID SFM, 2012.
- 13 ENIVD. Crimean/Congo VHF. http://www.enivd.de/FS/fs_encdiseases.htm (son erişim tarihi: 16.03.2014).
- 14 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmî Gazete 25.09.2010 – 27710



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Hantavirüs Enfeksiyonlarının Mikrobiyolojik Tanısı

Hazırlayan Birim	Klinik Viroloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Viroloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	V-MT-13
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
Epidemiyoloji	3
Klinik görünümler	4
Laboratuvar tanısı.....	5
TEKNİK BİLGİLER	6
1 Hedef mikroorganizmalar	6
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	6
3 Hantavirüs enfeksiyonu tanı teknikleri.....	8
4 Sonuçların değerlendirilmesi ve bildirim	10
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	10
6 Referans Laboratuvar	11
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	11
KAYNAKLAR.....	11

Kapsam ve Amaç

Hantavirüsler türlerine ve coğrafi dağılımlarına göre insanlarda renal sendromlu kanamalı ateş (RSKA) ve hantavirüs kardiyo-pulmoner sendrom (HKPS) olmak üzere iki ayrı tipte klinik tabloya yol açan kemirici kökenli zoonotik enfeksiyon etkenleridir. Doğada yabani kemiriciler ve böcekçiller aracılığı ile taşınan hantavirüs türleri her biri türe özgül kemiricilerle ile taşınmakla birlikte zaman zaman konak değişiklikleri de bildirilmiştir.

RSKA Eski Dünya adı verilen Avrasya'da dolaşan hantavirüs enfeksiyonlarında görülürken, HKPS'de Kuzey ve Güney Amerika'da dolaşan virüsler etkindir. Türkiye'de önceleri yapılmış çalışmalarda böbrek yetmezlikli hastalarda ve yabani kemiricilerde seropozitiflikler rapor edilmiş olmakla birlikte ilk RSKA olguları 2009 yılında Zonguldak ve Bartın'da çıkan salgınlardan bildirilmiştir (1,2).

Ülkemizde hantavirüs enfeksiyonları bildirim zorunlu hastalıklar arasında yer alır (3,4). Kesin tanı başlıca serolojik ve nükleik asit temelli yöntemlerle konabilir. Yüksek riskli bir patojen olması nedeniyle hantavirüs enfeksiyonlarının tanısı klinik mikrobiyolojinin rutin tanı kapsamına girmemektedir. Şüpheli durumlarda bir klinik laboratuvar büyük olasılıkla yatan hastadan örneklerin alınması ve Referans merkezlere gönderilmesinde rol oynayacaktır. Ancak serolojik ve/veya moleküler tanı imkanlarına sahip klinik mikrobiyoloji laboratuvarları da tanı kapasitesine destek olabilir. Bu çerçevede bu UMS belgesinde hantavirüs enfeksiyonlarının kesin tanısı için geçerli yöntemler, örnek yönetimi, asgari laboratuvar şartları ve sorumluluklar ile ilgili bilgi verilmesi hedeflenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

HPS, HKPS	Hantavirüs pulmoner sendrom; kardiyo-pulmoner sendrom
MAC EIA	Immunglobulin M 'capture' enzim immunoassay
RSKA	Renal sendromlu kanamalı ateş
RT-PCR	reverse transcriptase PCR

Genel Bilgi

Renal sendromlu kanamalı ateş (RSKA) ve hantavirüs pulmoner sendrom (HPS) veya kardiyo-pulmoner sendrom (HKPS) *Bunyaviridae* ailesinden *Hantavirus* cinsinin bazı üyelerinin neden olduğu kemirici-kaynaklı zoonotik enfeksiyonlardır (5). Hantavirüsler dünya üzerinde pek çok farklı türe sahiptirler ve 20'den fazlası insanlarda enfeksiyon etkeni olarak bildirilmiştir (6).

Epidemiyoloji

Neden oldukları iki temel klinik tablo virüsün dünya üzerindeki coğrafi dağılımı ile ilişkilidir. Eski Dünya'da (Avrupa, Asya ve Afrika) görülen hantavirüs

enfeksiyonları daha çok böbrek hasarı ve kanamalı ateş ile seyrederken (RSKA), Yeni Dünya'da (Kuzey ve Güney Amerika) görülen hantavirüs enfeksiyonlarının oluşturdukları klinik tabloda pulmoner tutulum ön plandadır (HPS) (6,7).

Coğrafi dağılıma göre ortaya çıkan bu klinik farklılığın nedeni hantavirüslerin, taşıyıcısı olan kemiricilerin dağılımı ile ilişkilidir. Hantavirüslerin her bir farklı türünün özgül bir kemiricide evrimleştiği ve dolayısı ile her hantavirüs türünün doğada belli kemirici türleri tarafından taşındığı bildirilmektedir. Örneğin ülkemizde de görülen Hantaan virüs *Apodemus agrarius*; Puumala virüs *Myodes glareolus*; Seoul virüs *Rattus norvegicus* türü kemiricilerle taşınmaktadır (8).

Özgül konaklarında kronik bir enfeksiyon yapan hantavirüsler uzun süre hayvana zarar vermeksizin kemiricinin dışkı, idrar, salya ve diğer salgıları ile dışarı atılırlar. İnsana bulaşma büyük ölçüde bu enfekte atıklardan saçılan aerosollerin inhalasyonu ile gerçekleşmektedir (6). Kemiricilerden insana hayvanın ısırması yolu ile de bulaşma bildirilmiştir. Hantavirüsler, kontamine materyalin hasarlı cilde ya da mukoz membranlara teması, enfeksiyöz kemirgen sekresyonları ya da çıkartılarıyla kontamine olmuş gıdaların tüketilmesi sonucu ya da laboratuvar ortamında da bulaşabilirler. Bazı kökenlerin (sadece Andes virüs) neden olduğu HPS vakaları ile akut fazda temas sonucu kişiden kişiye bulaş bilinmektedir. Ancak, bu güne kadar Eski Dünya'da gözlenen hantavirüs enfeksiyonlarında (RSKA), hastalığın ilk 5 gününde virüs hastanın idrarı ve kanında bulunduğu halde, insandan insana bulaşma bildirilmemiştir (6,7,8).

Yapılan çalışmalara göre, Türkiye'de Puumala ve Dobrova serotiplerinin etken olduğu RSKA formu görülmektedir (2). İlk vakalar Zonguldak, Bartın, Giresun ve Ordu illerinden bildirilmiştir. Marmara bölgesi ve İstanbul'dan da bir RSKA olgusu tanımlanmıştır (1,9,10,11). Bartın ve Giresun illerinden toplanan kemirici örneklerinden de Dobrova ve Puumala virüsler izole edilmiştir (11). Henüz bir klinik vaka bildirilmemiş olmasına karşın İzmir'de yapılan seroepidemiolojik araştırmalarda da hantavirüs seropozitifliği saptanmıştır (8).

Hastalık ölümcül olabildiğinden, etkili kontrol önlemlerinin planlanabilmesi ve uygulanabilmesi için hem insanlarda hem de kemiricilerde etkene yönelik sürveyans esastır.

Klinik görünümler

RSKA ve HPS'nin başlıca bulguları ateş, akut trombositopeni ve kapiller geçirgenlikteki geçici artmaya bağlı damar dışına sıvı kaybıdır. RSKA ile HPS arasındaki klinik bulguların **farklılığı** ise kapiller geçirgenlikteki artışa bağlı olarak vücutta sıvı kaybının yoğun görüldüğü bölgelerin farklı olmasından kaynaklanmaktadır. RSKA'da sıvı temel olarak retroperitoneal bölgeye kaçarken, HPS'de kaçak akciğerlere ve göğüs boşluğuna olmaktadır (12,13).

RSKA'ya, hepsi farklı düzeylerde de olsa Dobrova, Puumalaa ve Saarema virüsleri neden olmaktadır. Hantaanvirus'un ve Dobrova virüsün neden olduğu RSKA'da klinik ağır seyrederken, Seoul virüsün neden olduğu RSKA daha hafif seyreder. Hastalık ateşli, hipotansif, oligürik, diüretik ve iyileşme olmak üzere beş döneme ayrılmaktadır. Ölümünün yarısı oligürik dönemde olmaktadır. İyileşme genellikle tam ve komplikasyonsuzdur (12,13).

Nefropati epidemika, RSKA'nın hafif formudur ve hastaların %20-30'unda lensin kalınlaşmasına bağlı geçici miyopi görülmesi patognomonik olarak belirtilmektedir.

RSKA olguları influenza, viral hepatit ve streptokokkal farenjit düşünülerek atlanabilmekte, ayırıcı tanı önem kazanmaktadır (12,13).

HPS'nin seyri prodromal ve kardiyopulmoner dönem olarak gözlenir. Prodromal dönem ateş, baş ağrısı, kas ağrısı ve titremeye kendini gösterirken, kardiyopulmoner dönem akciğer ödemi, nefes darlığı ve hipoksemi ile başlar. Ciddi HPS'si olan hastalarda kardiyak depresyon, solunum yetmezliği ve asidozla giden ölümcül aritmiler oluşabilir (12,13).

HPS ve RSKA'da inkübasyon süresi genellikle 2-4 haftadır, ancak bir kaç gün kadar kısa olabileceği gibi 2 aya kadar da uzayabilir. Vakalar klinik bulgular temelinde diğer pek çok benzer klinik tablodan ayırt edilemediğinden kesin tanı laboratuvar incelemesi ile konabilir.

Hastalığın akla getirilmesinde epidemiyolojik sorgulama (hastalığın başlangıcından önceki iki ay içinde kemirici hayvanlarla direkt temas, veya çıkartılarıyla muhtemel temas, veya bu hayvanların yaşam alanlarına girme öyküsü olup olmadığı) önem kazanmaktadır. Doğada insanlar için risk başlıca mesleki veya rekreasyonel aktivitelerle, ya da bir ekolojik faktör etkisiyle değişim sonucu enfeksiyöz kemirgenlerin anormal çoğalmasıyla vb. ilgilidir. Uzun süreler boyunca kapalı kalmış ve bu süre boyunca enfekte kemirgenler tarafından işgal edilmiş kapalı odalarda temizlik aktivitesi enfeksiyon riskinde defalarca kat artış riski ile ilişkili bulunmuştur (5).

Laboratuvar tanısı

Bildirim sisteminde kullanılan standart vaka tanımlarına göre hantavirüs enfeksiyonlarının kesin tanısı; (i) hastanın serumunda veya dokularında RT-PCR ile hantavirüs nükleik asidinin saptanması; veya (ii) hantavirüs antijenlerinin dokularda immünohistokimyasal yöntemlerle saptanması; ya da (iii) hastanın serumunda IgM pozitifliği ve/veya IgG'de ≥ 4 kat artış saptanması, ile konur (4).

Hantavirüs enfeksiyonlarının tanısında genel olarak standardizasyon istenen düzeyde sağlanamamıştır. Bununla birlikte tanı başlıca moleküler tekniklere ve serolojiye dayanır. Semptomların başlangıcından hemen sonra toplanan klinik örneklerde hantavirüs RNA'sı gösterilebilir. Son yıllarda giderek daha fazla rutin kullanıma giren gerçek zamanlı RT-PCR hantavirüs enfeksiyonu tanısında öne çıkmaktadır (5).

Hastalığın başlangıcından sonra kısa süre içinde IgM antikorları serumda veya plazmada ölçülebilir düzeylere yükselmeye başlar. Bu hastaların büyük kısmında yine hastalığın akut fazında IgG antikorları da ölçülebilir. Hantavirüslere karşı bu antikorların saptanması için de -partikül aglütinasyon, IFA, immün presipitasyon, radyoimmünassay, hemaglütinasyon inhibisyon, nötralizasyon teknikleri, Western blotting, IgM 'capture' ELISA, ve IgG ELISA gibi çok çeşitli testler geliştirilmiştir. En sık kullanılan -pozitif bulunması halinde kesin tanı konulmasına da olanak verdiği için- IgM 'capture' ELISA'dır (5).

Dokularda immünohistokimyasal boyama ile hantavirüs antijenlerinin tespiti dünyada ancak az sayıda merkezde yapılabilen ve rutin uygulanamayan bir yöntemdir. Virüsün kan, serum, idrar ve BOS gibi örneklerin hücre kültürlerinden izolasyonu ise, mümkün olmakla birlikte duyarlılığı düşük ve oldukça zahmetli bir iş olup insan hantavirüs enfeksiyonlarının tanısında tercih edilmemektedir (5).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizmalar

Hantavirüs türleri

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

Hantavirüsler Risk Grubu 3 olarak sınıflandırılan bir mikroorganizmadır. Ölümle sonuçlanabilen ciddi enfeksiyonlara yol açabilen bu organizmalarla laboratuvar kaynaklı enfeksiyon için yüksek risk vardır. Parenteral ve aerosol ile bulaşmaya bağlı laboratuvar enfeksiyonları bildirilmiştir (14,15).

Hantavirüs enfeksiyonlarının tanısı için şu laboratuvar güvenliği kriterleri dikkate alınmalıdır: (i) serolojik ve moleküler teknikler BGD2 laboratuvarlarda gerçekleştirilebilir; (ii) Potansiyel enfeksiyöz dokularla çalışma BGD2 laboratuvarlarda, BGD3 pratiği ile gerçekleştirilebilir; aerosol oluşturması muhtemel bütün işlemler kesinlikle sertifikalı bir sınıf-IIA BGK içinde yapılmalıdır; (iii) hücre kültürü ve hayvan deneyleri en az BGD3 (ve hayvan-BGD3) laboratuvar şartlarında ve sertifikalı bir sınıf-IIA BGK içinde yapılır (16).

Serum ayırma ve testlerin çalışılması sırasında **daima** eldiven giyilmelidir. Bütün biyogüvenlik düzeylerinde daima standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır (bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

Hantavirüsler ısı, asit, alkol, çamaşır suyu, paraformaldehit ve lipid membranlara etkili deterjanlar, dezenfektanlar ve UV radyasyon ile tahrip olurlar. Yüzey dezenfeksiyonu için %1'lik sodyum hipoklorit (çamaşır suyu), %0.5'lik sodyum dodesil sülfat veya %70'lik etanol kullanılabilir (13) (ayrıca bkz. "UMS, V-MT-11 Viral hemorajik ateşlerin mikrobiyolojik tanısı").

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Eğer klinisyen hantavirüs enfeksiyonundan şüpheleniyorsa, örnekler laboratuvara gönderilmeden önce hekim laboratuvar ile iletişim kurmalıdır.

Hantavirüs şüpheli örneklerin kabul edilmesinden sonucun raporlanmasına kadarki adımlarda görev alan tüm personel; (i) tekniklerin uygulanmasından önce amaçlanan bütün kullanımlar ile ilgili tam bir eğitim almış olmalı; (ii) kullanılan tekniklere tüm yönleriyle aşina olmalı; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Bu kurallar örnek kabulü dahil bütün tanımlama aşamalarında **kesici-delici** ve **aerosol önlemlerine** yüksek uyumu gerektirir (16,13). Laboratuvar personeli, muhtemel klinik semptomlarla ilgili bilgilendirilmeli herhangi bir semptom gelişimi halinde haber verilmesi zorunlu tutulmalıdır. Hem güvenlik önlemlerine uyumun sağlanmasından hem de testlerin standart prosedürlere uygun yapılmasından ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, Reaktif, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

Hantavirüs enfeksiyonlarının tanısı için örnek alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden edinilebilir. Örnek alınmadan ve gönderilmeden önce testleri çalışacak laboratuvar ile mutlaka iletişime geçilmelidir. Aşağıda bazı önemli hususlara tekrar dikkat çekilmektedir:

- Serolojik testler veya nükleik asit analizleri için hastadan kan alınır.
- Serolojik testler için hastadan sarı ya da kırmızı kapaklı tüpe ~5 mL kan alınması yeterlidir. *Jel içermeyen kan tüpü* kullanılmış ise santrifüj sonrası *hemen serum* kısmı steril, vida kapaklı bir tüpe ayrılmalıdır.
- Plazma için hastanın kanı EDTA içeren bir tüpe alınır ve mümkünse hemen laboratuvara gönderilir.

NOT 1: Serolojik incelemeler için laboratuvara ulaşma süresi >48 saat ise, serum (veya plazma) kanın alındığı gün santrifüj sonrası steril bir tüpe ayrılmalıdır; bu şekilde en fazla 5 güne kadar +4°C'de saklanabilir.

NOT 2: Nükleik asit analizi için, alındıktan sonraki 6 saat içinde kan laboratuvara ulaşamayacaksa plazma (veya serum) *nükleaz-içermeyen* bir tüpe, uygun steril filtreli-pipet ucu kullanılarak ayrılmalıdır.

NOT 3: Seroloji veya nükleik asit analizleri için örneğin teste alınması üstte belirtilen sürelerden daha uzun sürecekse örnekler -70°C'ye kaldırılmalı (seroloji için -20°C de uygun); kuru buzda laboratuvara ulaştırılmalıdır

(Referans merkeze gönderme için bkz. sayfa 10, Bölüm 3.4).

Reaktif / Kit

- IFA kiti ve/veya IgM 'capture' ELISA, IgG ELISA,
- PCR kit ve reaktifleri

Diğer gereç, donanım

- Floresan mikroskopu ve/veya ELISA okuyucu, yıkayıcı
- RT-PCR donanımı ve uygun PCR alanları
- BGD3 (hayvan deneyleri yapılacaksa hayvan-BGD3) için gerekli koşullara ve donanıma sahip laboratuvar

2.4. Kalite kontrol

- Tanı için kullanılan tüm testlerin "validasyon" ve "verifikasyonları" yapılmış olmalıdır. Serolojik her çalışmada "iç kalite kontrolü" için sonucu önceden bilinen standart IgM ve IgG pozitif serum örnekleri kullanılmalıdır. Laboratuvar dış kalite kontrol (DKK) çalışmasına katılıyor olmalıdır. DKK programları yoksa aynı testleri aynı yöntemlerle yapan en az bir laboratuvarla karşılaştırma yapılarak dış kalite kontrolü sağlanmalıdır.

3 Hantavirüs enfeksiyonu tanı teknikleri

3.1. Seroloji

- Şüpheli hantavirüs enfeksiyonlarının tanımlanması ve doğrulanmasında serolojik yöntemler önemlidir.
- Hantavirüslere özgül IgM ve IgG izotiplerindeki antikor yanıtları tipik olarak hastalığın prodromal ya da ateşli dönemlerinde pozitifken inkübasyon periyodunda negatiftir.
- Akut enfeksiyon serolojik yöntemlerle üç şekilde ayırt edilebilir;
 - (a) Hantavirüse özgül IgM tipi antikorların saptanması,
 - (b) En az 2 hafta ara ile alınan çift serum örneğinde IgG düzeylerinde 4 kat ve üzeri artışın gösterilmesi,
 - (c) Viral N proteinine özgül IgM ve/veya IgG izotipindeki antikor yanıtının gösterilmesi.

ELISA

- Akut hantavirüs enfeksiyonlarının tanısında en sık kullanılan serolojik yöntem IgM 'capture' ELISA yöntemidir. Daha özgül ve yeterince duyarlı olan immunoblot testleri ise ELISA ile tanımlamanın yetersiz kaldığı durumlarda enfeksiyonun doğrulanması amacıyla kullanılabilir.
- Hantavirüslere özgü IgM ve IgG tipi antikor yanıtlarını saptayan validasyon ve verifikasyonları onaylanmış ticari ELISA test kitleri bulunmaktadır. Solid faz ELISA ile çapraz reaksiyonların yarattığı sorunların giderildiği MAC EIA günümüzde hem duyarlılık hem de özgüllük açısından yeni olguların serolojik tanısında tercih edilmektedir.

IFA

- IFA testleri hantavirüs enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında sıkça kullanılan serolojik yöntemlerin başında gelir. Bu yöntemde hantavirüslerle enfekte edilmiş Vero E6 hücreleri substrat olarak kullanılabilirdiği gibi viral nükleokapsid veya zarf glikoproteinlerinin klonlanarak eksprese ettirildiği çeşitli ekspresyon sistemlerine (insekt, maya, memeli hücre hatları vb.) ait hücreler de kullanılabilir.
- IFA yöntemi ile *IgM hatalı pozitif sonuçlar* verebilmektedir. Bu yöntemle akut enfeksiyonun uzun zaman önce geçirilmiş enfeksiyondan ayırt edilmesinde IFA IgG ile hücrelerde granüler paternde sinyal gözlenmesi önemlidir.
- Enfekte hücrelerin kullanıldığı IFA testlerinde akut enfeksiyonda IFA IgG lamlarında granüler bir patern izlenirken, önceden geçirilmiş eski enfeksiyonlarda homojen bir sinyal paterni izlenir.
- Hantavirüslere özgü IgM ve IgG tipi antikor yanıtlarını saptayan ticari IFA test kitleri mevcuttur. Bunlar dışında özellikle salgın zamanlarında büyük miktarda olguların taranması amacıyla *laboratuvar yapımı* IFA testleri de kullanılabilir.

Hızlı tanı testleri

- Hantavirüs enfeksiyonlarının tanısı için özellikle alan çalışmalarında kullanılmak üzere geliştirilmiş yüksek duyarlılık ve özgüllükte IgM izotipindeki antikorları yakalayabilen hızlı testler mevcuttur.
- Viral nükleokapsid proteinine karşı oluşan IgM tipi antikorları μ -capture stratejisiyle yakalayan bu testler akut olguların yakalanmasında önerilmektedir.

İmmunoblot

- Hantavirüslere özgü IgM ve IgG tipi antikor yanıtını virüse özgül olarak saptayan test kitleri vardır.
- Bu kitlerde nitroselüloz membrana emdirilmiş farklı hantavirüs tiplerine ait nativ ya da rekombinant viral nükleokapsid proteinleri kullanılmaktadır.

NOT: Hantavirüslerin laboratuvar tanısında kullanılan piyasada mevcut test seçenekleri için *bkz.* Avrupa İmporte Viral Hastalıklar Laboratuvar Ağı sayfası - www.enivd.de

3.2. Moleküler tanımlama

- İnsan olgularının tanımlanmasında hantavirüs viral RNA'sı için özgül primer setlerinin kullanıldığı RT-PCR yöntemleri bulunmaktadır.
- Bununla birlikte gerek insan enfeksiyonlarında viral yükün düşük olması gerekse vireminin genellikle çok kısa süreli olması ve klinik bulgular başladığında vireminin ortadan kalkabilmesi nedeniyle moleküler yöntemler serolojik yöntemlere göre daha düşük bir duyarlılığa sahiptir.
- Moleküler test uygulamalarında bu özellikler dikkate alınmalıdır.
- Moleküler tanıda hantavirüs viral nükleokapsid bölgesini tanımlayan özgül primer setleri kullanılır. Ancak her hantavirüs türünde farklı primer setleri kullanılmalıdır.
- Tüm hantavirüsleri yakalayabilen ve tanımlayan pan-hantavirüs primer setleri bulunsa da içerdikleri dejenere primerlerin çokluğu nedeniyle bunların duyarlılığının düşük olduğu unutulmamalıdır.
- Moleküler yöntemler ile serum, idrar, idrar sedimentinde hantavirüs taraması yapılabilmektedir.

3.3. Hücre kültürü

- İnsanlarda hantavirüs enfeksiyonlarının tanımlanmasında hücre kültürünün yeri yoktur.
- Ancak saha araştırmalarında alandan toplanan kemirici ve böcekçil örneklerinden olası virüsün izolasyonu için hücre kültürü kullanılır.
- Hücre kültürü için Vero E-6 hücre hattına kemiricilerin doku örneklerinden elde edilen lizatların inoküle edilmesi gereklidir.

3.4. Saklama, Referans merkeze gönderme

- Seroloji veya nükleik asit analizleri için örneklerin teste alınması önerilen sürelerden daha uzun sürecekse, örnekler -70°C'de saklanmalı; kuru buzda laboratuvara ulaştırılmalıdır. Seroloji için -20°C'de saklama da uygundur.
- RSKA **etkeni** hantavirüs şüpheli örnekler Kategori A enfeksiyöz madde kabul edilirler. Bu nedenle şüpheli klinik örnekler kesinlikle Kategori A enfeksiyöz madde taşıma şartlarını karşılayacak şekilde *paketlenmeli* ve *taşınmalıdır* (17). Kuru buzda taşıma şartları dahil, ayrıntılı bilgi için "UMS, GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi"ne başvurulması önerilir.

4 Sonuçların değerlendirilmesi ve bildirim

- Hemen hemen tüm HKPS ve RSKA hastalarının serum ve plazma örneklerinde hantavirüs özgül IgM seviyesi yüksektir ve ELISA IgM pozitif bulunması "**kesin tanı**" bulgusudur. Hastalığın akut dönemde olduğunu gösterir.
- HKPS'de akut fazın sonlanmasından itibaren 2 aydan uzun bir süre ve 'nefropati epidemika'da 6 aya kadar ölçülebilir seviyede IgM antikorları görülür.
- Akut ve konvalesan dönem serumlarında serokonversiyon ya da özgül IgG antikor titresinde ≥ 4 kat artış "**kesin tanı**" bulgusudur.
- Nötralizan antikorlar da enfeksiyonun akut fazı boyunca görülür. Pozitif sonuçlar "**kesin tanı**" bulgusudur.
- Gerçek-zamanlı RT-PCR erken dönemde oldukça yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir. Kan, vücut sıvıları veya doku örneklerinden RT-PCR ile viral RNA'nın gösterilmesi "**kesin tanı**" bulgusudur.
- Hantavirüs enfeksiyonlarının bildirim zorunludur (3,4). Ülkemizde RSKA formu görülmektedir. Bildirim esasen klinisyenin sorumluluğu olmakla birlikte yukarıda belirtilen sonuçlardan en az birinin elde edilmesi durumunda vaka araştırması ile ilgili süreçlerin hızla başlatılabilmesi için laboratuvar ilgili birimleri haberdar etmelidir (*ör.*, telefon ile). Çünkü hantavirüs enfeksiyonu **acil** bir durumdur ve bir salgınla ilişkili olabilir.

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Hantavirüs enfeksiyonlarının insanlardaki laboratuvar tanısında moleküler yöntemlerin yeri sınırlıdır. Hantavirüs enfeksiyonlarının pek çoğunda viremi kısa sürer ve enfeksiyonun erken dönemlerinde görülür. Klinik bulgular ortaya çıktıktan sonra vakaların birçoğunda viremi ortadan kalkmıştır. Bu neden RT-PCR ile negatif bulunan insan örneklerinin serolojik yöntemlerle de incelenmesi gereklidir.

6 Referans Laboratuvar

Adres

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal Arbovirüs ve Viral Zoonotik Hastalıklar Referans Laboratuvarı
Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55, F Blok 1.kat
06100 – Sıhhiye/ANKARA

Tel: 0312 565 5631 / 5547

Faks: 0312 565 5569;

e-mail: viralzoonoz@thsk.gov.tr;

www.thsk.gov.tr

Görev çerçevesi

Bildirimi zorunlu olan; viral hemorajik ateş sendromları – Kırım-Kongo kanamalı ateşi (KKKA), hantavirüs enfeksiyonları, Dengue ateşi, sarı humma (Yellow fever), Batı Nil virüsü (West Nile Virus), enfeksiyonu, Chikungunya ateşi ve kene-kaynaklı (Tick-borne) ensefalit (TBE), ve

Bildirimi zorunlu olmayan; tatarcık humması (Sand-fly fever; SVF) için konvansiyonel ve/veya moleküler tanı, doğrulama; uluslararası referans merkezlerle işbirliği ve moleküler epidemiyolojik tiplendirme.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu belge (Hantavirüs Enfeksiyonlarının Mikrobiyolojik Tanısı) ayrıca aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir. Bilgi için bu belgelerin de incelenmesi önerilir:

UMS, SY-02	Akut kanamalı ateş sendromu
UMS, V-MT-11	Viral hemorajik ateşlerin mikrobiyolojik tanısı
UMS, GEN-OY-01	Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Ertek M, Buzgan T. An outbreak caused by Hantavirus in the Black Sea region of Turkey, January – May 2009. *Eurosurveillance* 21 May 2009;14(20).
- 2 Çelebi G, Sözen M. Hantavirus infections in Turkey. *Flora* 2009;4:145-152
- 3 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 06.01.2014)

- 4 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014).
- 5 Fulhorst CF, Bowen MD. Hantaviruses. *In: Versalovic J (ed in chief). Manual of Clinical Microbiology.* 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 1504-1513
- 6 Reusken C, Heyman P. Factors driving Hantavirus emergence in Europe. *Curr Op Virol* 2013;3:92-99.
- 7 Heyman P, Vaheri A, Lundqvist A, Zupanc TA. Hantavirus infections in Europe: from virus carriers to a major public-health problem. *Expert Rev* 2009;7:205-217.
- 8 Laakkonen J, Kallio-Kokko H, Oktem MA, Blasdell K, Plyusnina A, Niemimaa J, Karataş A, Plyusnin A, Vaheri A, Henttonen H. Serological survey for viral pathogens from Turkish rodents. *J Wild Dis* 2006;42:672-676.
- 9 Oncul O, Atalay Y, Onem Y, Turhan V, Acar A, Uyar Y, Çağlayık DY, Ozkan S, Gorenek L. Hantavirus infection in Istanbul, Turkey. *Emerg Infect Dis* 2013;17:303-304.
- 10 Gozalan A, Kalaycioglu H, Uyar Y, Sevindi DF, Turkyilmaz B, Çakir V, Cindemir C, Unal B, Yağcı-Çağlayık D, Korukluoglu G, Ertek M, Heyman P, Lundkvist Å, Human Puumala and Dobrava hantavirus infections in Black Sea Region of Turkey: a cross sectional study. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2013;13:111-118.
- 11 Oktem IMA, Uyar Y, Dincer E, Gozalan A, Schlegel M, Babur C, Celebi B, Sozen M, Karatas A, Ozkazanc NK, Matur F, Korukluoglu G, Ulrich RG, Ertek M, Ozkul A. Dobrava-Belgradevirus in *Apodemus flavicollis* and *Apodemus uralensis* mice, Turkey. *Emerg Infect Dis* 2014;20:121-125.
- 12 CDC. All about Hantaviruses. National Center for Infectious Diseases, Special Pathogens Branch. <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hanta/hps/noframes/phys/diag.htm> (son erişim tarihi: 08.05.2011)
- 13 ENIVD. Hantavirus haemorrhagic fever with Renal Syndrome (HFRS) and Hantavirus Pulmonary Syndrome. http://www.enivd.de/FS/fs_encdiseases.htm (son erişim tarihi: 19.06.2012)
- 14 Lloyd G, Jones N. Infection of laboratory workers with hantavirus acquired from immunocytomas propagated in laboratory rats. *J Infect* 1986;12:117-125.
- 15 CDC. Laboratory management of agents associated with hantavirus pulmonary syndrome: interim biosafety guidelines. *MMWR Recommend Rep* 1994;43:1-7.
- 16 Department of Health and Human Services. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th ed. U.S. Government Printing Office, Washington D.C. 2009. <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/BMBL.pdf> (son erişim tarihi: 16.03.2014)
- 17 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Sarı Hummanın (Yellow Fever) Mikrobiyolojik Tanısı

Hazırlayan Birim	Klinik Viroloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Viroloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	V-MT-14
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik
----------	-------	------------

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
Etken, bulaş yolu ve vektör özelliği.....	3
Epidemiyoloji ve risk grupları.....	4
Klinik özellikleri	4
Laboratuvar tanısı.....	5
TEKNİK BİLGİLER	5
1 Hedef mikroorganizma	5
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	5
3 Sarı humma tanı teknikleri	8
4 Sonuçların değerlendirilmesi ve bildirim	9
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	10
6 Referans Laboratuvar	10
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	10
KAYNAKLAR.....	11

Kapsam ve Amaç

Sarı humma enfekte sivrisineklerle (*Aedes aegypti* türü) bulaşan akut viral hemorajik bir hastalıktır. Adındaki **sarı** sözcüğü bazı hastaları etkileyen "sarılık" tablosundan gelir. Ciddi etkilenmiş tedavisiz olguların %50 kadarında hastalık ölümle sonuçlanır. Sarı humma için herhangi bir tedavi yoktur. En etkili korunma yolu aşıdır. Vakaların sayısı son yirmi yıl içinde nüfusun enfeksiyona karşı bağışıklığının azalması, ormansızlaşma, kentleşme, nüfus hareketleri ve iklim değişiklikleri gibi nedenlerle artış göstermektedir (1,2). Hastalık Afrika ve Orta-Güney Amerika'da görülmesine rağmen tarihsel olarak Avrupa ve Kuzey Amerika'da da büyük salgınlara neden olmuştur (1).

Sarı Humma ülkemizde "ihbarı zorunlu" bir hastalıktır (3,4). Kesin tanısı başlıca serolojik ve nükleik asit tabanlı yöntemlerle konur. Yüksek riskli bir patojen olması nedeniyle sarı humma tanısı klinik mikrobiyolojinin rutin tanı kapsamına girmez. Şüpheli durumda bir klinik laboratuvar büyük olasılıkla yatan hastadan örneklerin alınması ve Referans laboratuvara gönderilmesinde rol oynayacaktır. Bu çerçevede bu UMS belgesinde sarı humma virüsü enfeksiyonlarının kesin tanısı için geçerli yöntemler, asgari laboratuvar şartları ve sorumluluklar ile ilgili bilgi verilmesi hedeflenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

RT-PCR reverse transcriptase PCR

rRT-PCR real-time reverse transcriptase PCR

Genel Bilgi

Etken, bulaş yolu ve vektör özelliği

Sarı humma, etken virüsün enfekte sivrisineklerle (*Aedes aegypti* türü) bulaşması ile ortaya çıkan akut viral hemorajik bir hastalıktır. Etken, *Flaviviridae* ailesinden *Flavivirus* cinsi içinde yer alan 'Yellow fever virus' olup, zarflı, tek zincirli, pozitif polariteli bir RNA genomuna sahiptir (1,2). Virüs lipit çözücüler (eter, kloroform), ısı (56°C'de 30 dk) ve ultraviyole ışık ile inaktive olur (5).

Sarı humma virüsü *Flavivirus* cinsi içerisinde Batı Nil virüsü, St. Louis ensefaliti virüsü ve Japon ensefaliti virüsü ile ilişkilidir. Virüs insanlara birincil olarak enfekte *Aedes* ya da *Haemagogus* türü sivrisineklerin ısırması ile -enfekte primatlardan (insan ve insan dışı) diğer primatlara- bulaşmaktadır. Virüsün vertikal ve horizontal bulaş da söz konusudur.

Sarı humma virüsü, orman (sylvatic), ara (intermediate) ve kentsel (urban) olmak üzere üç şekilde geçiş göstermektedir (1). Orman döngüsü, maymunlar (ör., primatlar) ve sivrisinek türleri arasında virüsün bulaşmasını içerir. Virüs, insanların ormanda geçirdikleri süre zarfında sivrisinekler aracılığıyla maymunlardan insanlara bulaştırılır. Afrika'da orman sınır bölgelerinde yaşayan

veya çalışan insanlara sivrisinekler yoluyla olan bulaşma "ara döngü" olarak adlandırılır. Bu döngüde, virüs maymundan insana veya insandan insana sivrisinekler ile geçebilir. Kentsel döngü ormanda enfekte olmuş insandan kentsel sivrisineklere (özellikle *Aedes aegypti*) bulaşma ve sonrasında sivrisinekler aracılığıyla insanlar ve sivrisinekler arasındaki virüs geçişini içermektedir (1).

Epidemiyoloji ve risk grupları

Sarı humma, %50'lere varabilen vaka-ölüm oranı ile bilinen en öldürücü viral enfeksiyonlardan biridir. Ancak hastalığın yayılımının büyüklüğü ve ölümlerle sonuçlanan durumların sıklığı kesin bilinmemektedir. Her yıl rapor edilen vaka sayıları çok değişkenlik (bazen 10'lar ile bazen de 100'lerle ifade edilen) göstermektedir ve bazı yıllarda düşük olmasının hastalığın rapor edilmemesi ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Tahminlere göre her yıl dünya genelinde 200.000 kişi sarı hummaya yakalanmakta, 30.000'i ölümlerle sonuçlanmaktadır ve hemen hemen hepsi Sahra-altı Afrika'dandır. Muhtemelen ılımlı vakalar, sağlık kurumlarına başvurmadıklarından dolayı tanımlanamamaktadırlar (5,6).

Sarı humma Afrika ve Latin Amerika'nın tropikal bölgelerinde (Orta ve Güney Amerika) endemiktir; Orta-Doğu, Asya ve Pasifik'te ise görülmemektedir. Bu bölgelerde de sivrisinek vektör, *Aedes aegypti*, yaygın olmasına rağmen Afrika ve Amerika dışında hastalığın neden görülmediği ise bilinmemektedir (5,7).

Güney Amerika'da sarı humma virüsünün bulaş hızı Afrika'dan daha düşüktür; bunda yaygın aşılama çalışmalarının etkili olduğu tahmin edilmektedir. Öte yandan orman döngüsünün meydana geldiği alanlarda sivrisinek kontrolü mümkün olmadığından sarı hummanın eradikasyonu gerçekçi bir olasılık olarak değerlendirilmemektedir (6). Endemik bölgelere seyahat edenler risk altındadır.

Klinik özellikleri

Hastalık, akut başlangıçlı yüksek ateş ve takip eden iki hafta içinde gelişen sarılık ile karakterizedir. Hemorajik manifestasyonlar ve renal yetmezlik gelişebilir.

Virüsün inkübasyon süresi 3 ile 6 gün arasındadır. Takiben bir veya iki fazlı bir enfeksiyon tablosu gelişir. İlk faz (akut) ateş, kas ağrısı, sırt ağrısı, baş ağrısı, üşüme, titreme, iştahsızlık, bulantı veya kusma şikayetleri ile ortaya çıkar. Hastaların çoğu düzelir ve belirtiler 3-4 gün içinde kaybolur. Fakat hastaların %15'i bu iyileşmeden sonraki 24 saat içinde ikinci ve daha toksik bir faza girerler. Yüksek ateş yeniden başlar ve birçok sistem etkilenir. Hastada hızla sarılık, karın ağrısı ve kusma gelişir. Ağız, burun, göz ve midede kanamalar olabilir. Böbrek yetmezliği görülebilmektedir. Toksik faza giren hastaların yaklaşık yarısı 10-14 gün içinde ölmekte ve geri kalanı da belirgin bir organ hasarı olmaksızın iyileşmektedir (1,2).

Hastalık, şiddetli sıtma, Dengue hemorajik ateşi, leptospiroz, fulminan viral hepatitler, diğer hemorajik ateşler ve zehirlenmelerle karışabilmektedir. Tedavisi genellikle semptomatiktir. Aşılama, sarı hummaya karşı en önemli koruyucu önlemdir. Seyahat edilecek bölgeye gitmeden iki hafta önce bu kişilere sarı humma aşısı uygulanmalıdır (1,2,7).

Laboratuvar tanısı

Klinik tablonun diğer pek çok hastalık tablosu ile benzerliği nedeniyle kesin tanı mikrobiyolojik incelemeye dayanır (8). Sarı hummanın laboratuvar tanısı genellikle serolojik olarak virüse-özgü IgM antikollarının ve nötralizan antikolların tespiti ile gerçekleştirilir. Nükleik asit amplifikasyonu (geleneksel ya da gerçek-zamanlı PCR) ve virüs izolasyonu da seçilebilecek diğer tekniklerdir. Virüs izolasyonu için kan hastalığın ilk 4 günü içinde alınmalıdır. Ölümle sonuçlanan durumlarda tanı için otopsi ile alınan dokularda (özellikle karaciğer) PCR, histopatolojik inceleme veya virüs kültürü yapılması önerilir.

Serolojik yöntemler viremi aşamasından sonra iyi bir seçenek sağlar, ancak genellikle birbirinden en az 2 hafta ara ile alınan iki örnek gerektirir. Flavivirüsler arasındaki serolojik çapraz reaksiyonlar diğer flavivirüslerin de dolaşımında oldukları endemik bölgelerde serolojik yöntemlerle kesin tanı konmasının ya da güvenilir serosürveyler yapılmasının önünde önemli bir engeldir (6,8).

Viral genomu tespit için moleküler yöntemler enfeksiyonun viremik fazında erken tanıda veya ölüm sonrası dokularda etkenin gösterilmesinde hızlı, duyarlı ve son derece özgül bir alternatiftir ve pozitif sonuç kesin tanı kabul edilir. Ancak, son zamanlarda moleküler tanı yöntemleri ile sarı humma virüsünün farklı kökenlerini (aşı virüsü, Afrika veya Amerika suşları gibi) saptamada bazı protokollerin yetersiz kalabildiği gündeme gelmiştir (9). Bu gerçek, moleküler tanı protokollerinde kullanılan oligonükleotid sekansların farklı bölgelerde dolaşan suşları temsil eden yeni sekans verileri ile sürekli güncellenmesi gereğine işaret etmektedir. Moleküler tanının bir diğer önemli dezavantajı da hatalı olarak diğer flavivirüslerin tespitidir. Bu özellikle sarı humma virüsüyle benzer klinik görünüşleri ve ortak coğrafik dağılımları nedeniyle Dengue virüsünün ayırımı açısından önemli bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır ve yanlış tanının önde gelen nedenidir (8,9).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizma

Sarı humma virüsü (Yellow fever virus)

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

Sarı humma Risk Grubu 3 olarak sınıflandırılan bir mikroorganizmadır. Ölümle sonuçlanabilen ciddi enfeksiyonlara yol açabilen bu organizmalarla laboratuvar kaynaklı enfeksiyon için yüksek risk vardır. Klinik örneklerden virüsün kültürleri en az BGD3 laboratuvar şartlarında ve sertifikalı sınıf-IIA BGK kabini kullanılarak yapılmalıdır. Sarı humma virüs kültürleri ile uğraşan personel de canlı atenüe 17D aşısı ile aşılanmalıdır (2).

Serolojik ve moleküler tanı BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilebilir. Serum ve diğer enfeksiyöz materyal ile çalışırken kesici-delici yaralanmalarına karşı önlem alınmalıdır.

Serum ayırma ve testlerin çalışılması sırasında **daima** eldiven giyilmelidir. Bütün biyogüvenlik düzeylerinde daima standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır (*bkz.* "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

Dezenfeksiyonda %0.5 fenol içeren deterjan, %0.5-1'lik sodyum hipoklorit (çamaşır suyundan taze hazırlanmış) ya da %70'lik alkol kullanılır (2) (dezenfeksiyon için ayrıca *bkz.* "UMS, V-MT-11 Viral hemorajik ateşlerin mikrobiyolojik tanısı").

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Sarı humma şüpheli vaka incelemeleri yalnızca yetkilendirilmiş merkezlerde yapılır. Sağlık Bakanlığı tarafından THSK, Ulusal Arbovirüs ve Viral Zoonotik Hastalıklar Referans Laboratuvarı yetkilendirilmiştir ve vaka örnekleri Müdürlük kanalıyla doğrudan bu laboratuvara gönderilmektedir (*bkz.* sayfa 10, Bölüm 6 "Referans Laboratuvar").

Bu nedenle sarı humma şüpheli durumlarda klinisyen yetkili laboratuvarla ve Halk Sağlığı Müdürlüğü ile iletişim kurulmalıdır. Örneklerin alınması ve güvenli taşıma şartlarına uygun bir şekilde paketlenerek gönderilmeye hazırlanması hastanın yatmakta olduğu hastanenin klinik laboratuvarının sorumluluğudur ve klinisyen tarafından bu laboratuvara da haber verilmelidir.

Sarı humma şüpheli örneklerin kabul edilmesinden sonucun raporlanmasına kadarki adımlarda görev alan tüm personel; (i) tekniklerin uygulanmasından önce amaçlanan bütün kullanımlar ile ilgili tam bir eğitim almış olmalı; (ii) kullanılan tekniklere tüm yönleriyle aşina olmalı; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Bu kurallar örnek kabulü dahil bütün tanımlama aşamalarında **kesici-delici** ve **aerosol önlemlerine** yüksek uyumu gerektirir. Laboratuvar personeli, muhtemel klinik semptomlarla ilgili bilgilendirilmeli herhangi bir semptom gelişimi halinde haber verilmesi zorunlu tutulmalıdır.

Hem güvenlik önlemlerine uyumun sağlanmasından hem de tekniklerin standart prosedürlere uygun gerçekleştirilmesi ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, Reaktif, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

Sarı humma tanısı için örneklerinin alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden edinilebilir. Ayrıca örnek alınmadan ve gönderilmeden önce testleri çalışacak laboratuvar ile mutlaka iletişime geçilmelidir. Aşağıda bazı önemli hususlara tekrar dikkat çekilmektedir:

- Sarı humma tanısında seroloji önceliklidir ve şüphelenilen hastadan hemen kan alınmalıdır (6).
 - (a) Hastadan steril sarı ya da kırmızı kapaklı tüpe ~5 mL kan alınması yeterlidir. Tüp hafifçe 5-6 kez alt üst edilir.

- (b) Oda sıcaklığında 20 dk-1 saat beklenir.
- (c) Takiben 1000 $\times g$ 'de 10 dk santrifüj edilerek serum ayrılır. Serum steril pipet ucu kullanılarak steril vida kapaklı bir tüpe ayrılmalıdır.
- (d) Tüpün üzerine hastaya ait bilgiler, örnek alma saati vb. yazılarak etiketlenir ve taşınmaya hazırlanır. Taşınmaya kadar buzdolabına (+4°C) kaldırılmalıdır.

NOT 1: Örneğin alındığı noktada serum ayırma imkanı yoksa +4°C'de olmak kaydıyla tam kan gönderilebilir; ancak bu kan en fazla 24 saat içinde laboratuvara ulaşmış olmalıdır. Ayrılmış serum +4°C'de 48 saatte laboratuvara ulaştırılabilir (6).

NOT 2: Mümkünse akut ve konvalesan faz olmak üzere 2-3 hafta ara ile iki kez serum örneği gönderilmelidir!

NOT 3: Sarı humma için incelemelerde plazma daha az tercih edilir. Plazma için hastanın kanı EDTA içeren bir tüpe alınır ve mümkünse hemen +4°C'de laboratuvara gönderilir.

- Serum sarı humma nükleik asit analizleri için de ideal bir örnektir (6). PCR için biyopsi veya otopsi materyali ya da tam kan da kullanılabilir.
- Viral kültür için biyopsi veya otopsi materyali (özellikle karaciğer) ve tam kan (semptomların başlangıcından sonraki 5 gün içinde alınmış) kullanılabilir. Ancak arbovirüsler özellikle ısı değişimlerine çok duyarlı olmaları ve taşınma sırasında etkilenebilmeleri nedeniyle kültürlerden izolasyon başarısı hayli düşüktür (6).

NOT: Örneklerin Referans merkeze gönderilmesi hususları için *bkz.* sayfa 9, Bölüm 3.3.

Kit, reaktif

- IFA kiti ve/veya IgM 'capture' ELISA, IgG ELISA,
- PCR kit ve reaktifleri

Diğer gereç, donanım

- Floresan mikroskopu ve/veya ELISA okuyucu, yıkayıcı
- Spektrofotometre veya uygun dalga boyu filtrelerine sahip fotometre
- RT-PCR donanımı ve uygun PCR alanları
- BGD3 koşullarına ve donanıma sahip laboratuvar

2.4. Kalite kontrol

- Tanı için kullanılan tüm testlerin "validasyon" ve "verifikasyonları" yapılmış olmalıdır. Serolojik her çalışmada "iç kalite kontrolü" için sonucu önceden bilinen standart IgM ve IgG pozitif serum örnekleri kullanılmalıdır.
- Laboratuvar dış kalite kontrol (DKK) çalışmasına katılıyor olmalıdır. DKK programları yoksa aynı testleri aynı yöntemlerle yapan en az bir laboratuvarla karşılaştırma yapılarak dış kalite kontrolü sağlanmalıdır.

3 Sarı humma tanı teknikleri

3.1. Seroloji

- Sarı humma tanısı öncelikle serolojik yöntemlere dayanmaktadır.
- Laboratuvara gelen sarı humma şüpheli serum örneği için, diğer amaçlarla da kullanılabileceği düşünülerek bir ön hazırlık gerekir (6):
 - (a) Laboratuvara ulaşan serum örneği hemen iki alikota bölünmelidir.
 - (b) Alikotlardan biri mümkün olan en kısa sürede teste alınmak üzere +4°C'ye kaldırılmalıdır (dondurulmamalıdır).
 - (c) Eğer laboratuvar IgM testi öncesinde serumu ısı ile inaktive edecekse bir alikot da inaktive edilmeksizin test tamamlanincaya kadar +4°C'de saklanmalıdır (en fazla 7 gün için).
 - (d) Test tamamlandığında bütün alikotlar -80°C'ye kaldırılmalıdır.
 - (e) Testte eğer IgM pozitif bulunursa inaktive edilmemiş alikot doğrulama testlerine (virüs kültürü) alınmalıdır; bu amaçla gerekiyorsa serum uluslararası referans laboratuvarına gönderilir.
- Hastalığın ilk haftasında virüse özgü IgM antikorları saptanabilir düzeye gelmektedir. IgG ise enfeksiyonun orta ve geç fazında saptanabilir.
- IgM antikorları için 'capture' ELISA yöntemi başarı ile kullanılmaktadır ve pozitif sonuç kesin tanı koydurucudur. Diğer flavivirüslerle çapraz reaksiyonlarına rağmen bugün tanıda en fazla başvurulan yöntem 'capture' ELISA'dır (6).
- IFA yöntemi ile hastalığın orta veya geç fazında virüse özgü IgM ve IgG antikorları araştırılabilir.
- Nötralizasyon testi de enfeksiyonun orta ve geç fazında antikorları belirlemeye yardımcıdır.

3.2. Diğer yöntemler

- Nükleik asit tabanlı testler de sarı humma tanısında ve moleküler epidemiyolojik tiplendirmede kullanılmaktadır. Klinik örneklerden rRT-PCR ile viral nükleik asit tespit edilmektedir; PCR ürününden de dizileme (sekanslama) yöntemiyle konfirmasyon ve epidemiyolojik veri sağlanabilir.
- Enfekte hastanın erken fazda alınan kan örneğinden Vero, PS-hücre, C6-36-, MOS61 hücre serilerinde hücre kültürü yapılabilmektedir. Ayrıca 1-3 yaşlarındaki fare beynine inokülasyon ile virüs izole edilebilir.
- Elektron mikroskopi ile de tanı konulabilir. Ancak pahalı ekipman ve her merkezde bulunmaması gibi nedenlerle sık başvurulmaz.
- Sarı hummada karaciğer ana hedef organdır ve patolojik incelemede, hepatositlerde tipik koagülatif nekroz gözlenir. Böbreklerde de sarı bir renk hakimdir ve sıklıkla küçük subkapsüler kanamalar gözlenir. Hepatositlerin eozinofilik dejenerasyonu tipik intranükleer eozinofilik granüler inklüzyonlar ve Councilman cisimciklerinin oluşumu ile

sonuçlanır. Bu oluşumlar histopatolojik incelemede tanı koydurucudur. Ayrıca immünohistokimyasal yöntemlerle virüs antijenleri gösterilebilir. Histolojik ve immünohistokimyasal incelemeler sadece DSÖ'nün kabul ettiği uzmanlaşmış histopatoloji referans laboratuvarları tarafından gerçekleştirilebilir (6).

3.3. Saklama, Referans merkeze gönderme

- Sarı humma şüpheli vaka incelemeleri **sadece** Sağlık Bakanlığı tarafından yetkilendirilmiş merkezlerde yapılır ve ülkemizde bu merkez THSK'nın Ulusal Arbovirüs ve Viral Zoonotik Hastalıklar Referans Laboratuvarıdır.
- Bu laboratuvar da gerektiğinde şüpheli örnekleri doğrudan veya tanı koyduğu örnekleri ileri tanımlama için uluslararası referans laboratuvara gönderebilir.
- Sarı humma virüsü **kültürleri** "Kategori A, Enfeksiyöz Madde" olarak sınıflanır ve şüpheli kültürler, eğer ileri incelemeler için ulusal veya uluslararası bir referans laboratuvara gönderiliyorsa *paketlenme* kesinlikle "Kategori A" şartlarını karşılayacak şekilde yapılmış olmalıdır. Sarı humma şüpheli **klirik örnekler** de daima enfeksiyöz madde taşıma şartlarını karşılayacak şekilde *paketlenmeli* ve *taşınmalıdır* (10). Kuru buzda taşıma hususları dahil, ayrıntılı bilgi için ilgili UMS belgesine (UMS, GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi) başvurulması önerilir.

4 Sonuçların değerlendirilmesi ve bildirim

- Hastalığın yaklaşık 7. gününden itibaren IgM ve IgG antikoru ELISA ile saptanabilir düzeye ulaşmaktadır.
- Semptomatik vakanın klinik örneklerinden şu sonuçlardan herhangi birinin elde edilmesi "**kesin tanı**" bulgusudur (3,4,6):
 - (a) Tek serum örneğinde IgM'in pozitif olması
 - (b) Akut ve konvalesan dönem serumlarında serokonversiyon ya da özgül IgG antikor titresinde ≥ 4 kat artış saptanması
 - (c) RT-PCR ile kan veya dokularda virüs RNA'sının gösterilmesi
 - (d) Hücre kültüründen virüsün izole edilmesi
 - (e) Ölüm-sonrası pozitif karaciğer histopatolojisi
 - (f) Dokularda immünohistokimyasal yöntemle sarı humma virüsü antijenlerinin görülmesi
- Sarı humma hem ülkemizde, hem de uluslararası "ihbarı zorunlu" bir hastalıktır. Buna göre vaka ile ilgili araştırma Bakanlığın ilgili birimlerince henüz vaka "olası vaka" iken incelenmeye başlanır. Laboratuvarın da sonuç çıkar çıkmaz ilgili birimleri haberdar etmesi yürütülecek çalışmalar yönünden büyük önem taşımaktadır (3,4).

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Kültürlerin duyarlılığı düşüktür; ideal şartlarda alınmış ve gönderilmiş örneklerden bile virüsün izolasyonu sorun teşkil edebilmektedir.
- Serolojik tanıda diğer filavivirüslerle çapraz reaksiyon olasılığı (epidemiolojik veriler de göz önüne alınarak) ekarte edilmelidir.
- PCR pozitifliği diğer virüslerle (Dengue) hatalı pozitiflik yönünden dikkatli değerlendirilmelidir.

6 Referans Laboratuvar

Adres

Adres

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal Arbovirüs ve Viral Zoonotik Hastalıklar Referans Laboratuvarı
Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55, F Blok 1.kat
06100 – Sıhhiye/ANKARA

Tel: 0312 565 5631 / 5547
e-mail: viralzoonoz@thsk.gov.tr;

Faks: 0312 565 5569;
www.thsk.gov.tr

Görev çerçevesi

Bildirimi zorunlu olan; viral hemorajik ateş sendromları – Kırım-Kongo kanamalı ateşi (KKKA), hantavirüs enfeksiyonları, Dengue ateşi, sarı humma (Yellow fever), Batı Nil virüsü (West Nile Virus), enfeksiyonu, Chikungunya ateşi ve kene-kaynaklı (Tick-borne) ensefalit (TBE), ve

Bildirimi zorunlu olmayan; tatarcık humması (Sand-fly fever; SVF) için konvansiyonel ve/veya moleküler tanı, doğrulama; uluslararası referans merkezlerle işbirliği ve moleküler epidemiyolojik tiplendirme.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu belge (Sarı Hummanın Mikrobiyolojik Tanısı) ayrıca aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir. İlave bilgi için incelenmeleri önerilir:

UMS, SY-02	Akut kanamalı ateş sendromu
UMS, SY-05	Akut hepatit sendromu
UMS, V-MT-11	Viral hemorajik ateşlerin mikrobiyolojik tanısı
UMS, GEN-OY-01	Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 WHO. Yellow fever. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 2 ENIVD. Yellow fever. http://www.enivd.de/FS/fs_encdiseases.htm (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 3 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 4 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004. <http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelaReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 5 WHO. Yellow Fever. The Immunological Basis for Immunization. Module 8. World Health Organization, Geneva, Switzerland WHO/EPI/GEN/93.18. 1993.
- 6 WHO. Manual for the monitoring of yellow fever virus infection. Department of immunization, Vaccines and Biologicals, World Health Organization, Geneva, Switzerland. WHO/IVB/04.08. 2004.
- 7 Barnett ED. Yellow fever: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis* 2007;44(6):850-6
- 8 Domingo C, Patel P, Linke S, Achazi K, Niedrig M. Molecular diagnosis of flaviviruses. *Future Virology* 2011;6(9):1059-1074.
- 9 Domingo C, Escadafal C, Rumer L, Mendez JA, Garcia P, et al. First International External Quality Assessment Study on molecular and serological methods for yellow fever diagnosis. PLoS ONE, doi:10.1371/journal.pone.0036291. 2012;7(5): e36291.
- 10 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Batı Nil Virüsü Enfeksiyonunun (West-Nile Virus enfeksiyonunun) **Mikrobiyolojik Tanısı**

Hazırlayan Birim	Klinik Viroloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Viroloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	V-MT-15
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
Etken.....	3
Epidemiyoloji	4
Klinik.....	5
Laboratuvar tanısı.....	5
TEKNİK BİLGİLER	6
1 Hedef mikroorganizma	6
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	6
3 BNV enfeksiyonu tanısında kullanılan teknikler	8
4 Sonuçların değerlendirilmesi ve bildirim	11
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	12
6 Referans Laboratuvar	12
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	13
KAYNAKLAR.....	13

Kapsam ve Amaç

Doğadaki rezervuarı kanatlılar olan Batı Nil Virüsü (BNV) başta insan ve atlar olmak üzere çeşitli memeli türlerinde zaman zaman zoonotik enfeksiyonlara ve salgınlara yol açabilen bir flavivirüstür. Virüsün doğal yaşam döngüsü kuş ve sivrisinekler arasında süregelir; insan ve diğer memeliler tesadüfi konak olabilmektedir. Hastalığı ilk kez Afrika'da tanımlanmıştır; yayılımında kuş göçlerinin etkili olduğu kabul edilmektedir. Özellikle son yıllarda Orta Doğu ve Avrupa'da BNV salgınları dikkati çekmektedir. Virüs, 2000'li yılların başında Kuzey Amerika kıtasına atlamış, burada hızla yayılmış ve günümüzde Güney Amerika içlerine doğru ilerlemektedir. Türkiye'de bu virüse bağlı ilk kanıtlanmış olgular ya da salgın ise 2010 yılında bildirilmiştir (1,2,3,4).

Pek çok sivrisinek türü vektörlük yapabilirse de BNV'nin yayılımında asıl sorumlu *Culex* cinsi sivrisineklerdir. Aşısı bulunmadığından etkili korunma yöntemleri sadece sivrisinek mücadelesi ya da sivrisinek ısırılmalarından kaçınmadır (5,6,7). Kesin tanı başlıca serolojiye ve moleküler tekniklere dayanmaktadır (2,5).

BNV ülkemizde bildiri zorunlu hastalıklar arasında yer alır (8,9). Virüsün oldukça çeşitli ekosistemlerde var olabilme yeteneği sayesinde yeni coğrafi alanlara yayılma potansiyeli ve ülkemizin endemik bölgelerle komşuluğu tanıda yeterli bir laboratuvar kapasitesini zorunlu kılmaktadır. BNV yüksek riskli bir patojen olduğundan dolayı tanı genellikle referans laboratuvar ile sınırlı olsa da virüsün üretilmesini gerektirmeyen testlerin yapılmasında klinik mikrobiyoloji laboratuvarları da rol üstlenebilir. Bu UMS belgesinde BNV enfeksiyonlarının kesin tanısı için geçerli yöntemler, örnek yönetimi, asgari laboratuvar şartları ve sorumluluklar hakkında bilgi verilmesi hedeflenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

BNV	Batı Nil Virüsü ('West Nile virus'; WNV)
HBGD3	Hayvan Biyogüvenlik Düzeyi 3
JEV	Japon Ensefaliti Virüsü
KKEV	Kene Kaynaklı Ensefalit Virüsü
rRT-PCR	reverse transcriptase real-time PCR
PRNT	plaque reduction neutralisation test

Genel Bilgi

Etken

BNV, *Flaviviridae* ailesinden *Flavivirus* cinsi altında sınıflandırılmaktadır. Bu cins içinde çoğu insanda hastalık oluşturabilen 70'in üzerinde tür tanımlanmıştır. Dengue ateşi virüsü, sarı humma virüsü gibi insan sağlığı açısından önemli daha

pek çok virüs türü *Flavivirus* cinsi içinde yer alır. Bu türlerin 30 kadarı sivrisineklerle, 10'dan fazlası kenelerle bulaşırken, geri kalanının vektörü tam olarak bilinmemektedir (7,10,11). *Flavivirus* cinsi içinde yer alan virüsler klasik serolojik ölçütler kullanılarak antijenik özelliklerine göre farklı antijenik komplekslere ve alt komplekslere; modern moleküler filogenetik yöntemler ile de kollara, gruplara ya da türlere ayrılmaktadır. BNV de Japon ensefalit virüsü (JEV) serokompleksi içinde yer almaktadır (12,13,14,15).

BNV tek sarmallı, pozitif anlamlı bir RNA'ya sahip, zarflı bir virüstür. Zarf virüse ait M (membran) ve E (zarf) proteinlerinin gömülü olduğu çift tabaka lipitten oluşur. Zarfın içeriği kaynaklandığı konak hücrelerine göre değişebilmektedir (16).

BNV filogenetik olarak altı ana kola ayrılmaktadır. Birinci ana kol 1a, 1b ve 1c olmak üzere 3 alt kola ayrılır. Avrupa'da 1a ve 2 kollarına ait virüs kökenleri dolaşmaktadır. Türkiye'de saptananlar genellikle 1a alt kolundandır (13,14,15).

BNV enfeksiyonları çoğunlukla nezle benzeri hafif bir klinik tabloya neden olsa da yaklaşık 1/150 vakada merkezi sinir sistemi tutulumu görülür. Sivrisinek sokması dışında seyrek de olsa transfüzyon veya transplantasyonla da bulaşabilen virüs, insan sağlığı açısından bir sorun oluşturmasının yanı sıra hayvan sağlığını da olumsuz yönde etkileyerek ciddi ekonomik kayıplara yol açabilmektedir (2,10).

Olguların büyük kısmının asemptomatik ya da hafif seyirli oluşundan dolayı hastalık kolaylıkla gözden kaçabilmektedir. Özellikle merkezi sinir sistemi tutulumunun olduğu ağır olgularda hastalık diğer etkenlerle ayırıcı tanı önem kazanır. Mikrobiyolojik tanı araçlarının kullanılabilirliği hastalığın farklı dönemlerinde değişkenlik göstermektedir (5,6).

Epidemiyoloji

BNV'nin doğadaki rezervuarı kuşlardır. Virüsün yaşam döngüsü kuşlarla sivrisinekler arasında sürer. Pek çok sivrisinek türü BNV'yi bulaştırabilirse de bulaşmaların çoğundan *Culex* cinsi sivrisinekler sorumludur. Zaman zaman başta insan ve atlar olmak üzere tesadüfi konaklar sivrisinek sokması ile enfekte olabilmektedir. Ancak insan ve atlardaki viremi düzeyi çok düşük olduğundan bu konaklar rezervuar görevi göremezler. Virüsün vertikal yolla ya da anne sütü ile bulaşması tartışmalıdır. Özellikle salgınlar sırasında kan tranfüzyonu ve doku nakli ile de bulaşmalar bildirilmiştir. Virüs Asya'da ve Rusya'da kenelerde de saptanmış olmakla birlikte kenelerin yayılmadaki rolü bilinmemektedir (6,7,13,14)

BNV'nin bir bölgedeki bulaşma riski virüs, çoğaltıcı konak, vektörler ve duyarlı insanların bulunmasına bağlıdır. Virüsün yayılımında göçmen kuşların rolü kanıtlanmıştır. Kentsel alanlarda bulaşma düşük biyoçeşitlilikle bağlantılı iken kırsal kesimde yüksek biyoçeşitlilikle bağlantılıdır. Hayvanlar arasında doğrudan bulaşma sadece kazlarda gösterilmiştir. İnsandan insana horizontal bulaşma gösterilememiştir.

Virüs ilk kez 1937'de Uganda'da tanımlanmış olmakla birlikte 1990'lı yıllarda Kuzey Afrika, Güney Avrupa, İsrail ve Rusya'da peş peşe çıkan salgınlarda dikkat çekici özellik hastalığın nörolojik bir tutulumla birlikte ağır bir seyir göstererek fatal sonlanabilmesidir (1,2,11,12). 1999'da virüs ilk kez Kuzey Amerika kıtasına atlayarak burada endemik hale gelmiştir. Virüs halen zaman zaman Güney ve Doğu Avrupa ülkeleri, Rusya ve Türkiye'de salgınlara yol açmaktadır (3,4,6,11).

Klinik

BNV ile enfekte bireylerde çoğu kez herhangi bir belirti görülmez veya hastalık ateş, baş ağrısı, vücut ağrıları, deri döküntüleri, lenfadenopati gibi hafif belirtilerle seyreder (asemptomatik veya subklinik). Merkezi sinir sistemi tutulumunda klinik tablo ağırlaşır ve ölümlerle sonuçlanabilir. Yaşlılar ve immün yetmezlikli bireylerde ciddi hastalık riski daha yüksektir (5,6,10).

Enfeksiyonun kuluçka süresi 2-15 gün arasındadır. BNV enfeksiyonlarının %80'i asemptomatiktir. Semptomatik enfeksiyonların büyük çoğunluğu hafif ateşli bir hastalık şeklinde seyretmekle birlikte hastaların %1 kadarında nörolojik enfeksiyon ve hastalık bulguları ortaya çıkmaktadır. Hafif olgularda baş ve kas ağrısı, bulantı, kusma, üşüme, titremenin yanı sıra bazen kısa süreli kol, bacak ve gövdede makülopapüler döküntüler görülebilmektedir. Hafif olgular genellikle 2-3 gün içerisinde kendiliğinden iyileşmektedir (6,10).

Nörolojik tutulumu olan ağır olgularda semptomlar; yüksek ateş, baş ağrısı, ense sertliği, stupor, oryantasyon bozukluğu, tremor, konvülsiyonlar, ileri derecede kas zayıflığı, gevşek paraliziler ve komadır. Ataksi, kafa çifti tutulumları, myelit, göz küresinde ağrı, poliradikülit ve nöbetler de görülebilir. Bazı salgınlarda miyokardit, pankreatit ve fulminan hepatitler bildirilmiştir (10).

Laboratuvar tanısı

BNV enfeksiyonunun görünümüleri karakteristik değildir ve tanıya yardımcı herhangi bir özellik göstermez. Tanı laboratuvar incelemeleri ile konmaktadır. BNV için laboratuvar incelemelerinin başlatılması ise başlıca **epidemiyojik bilgiye** dayanır. BNV için endemik -at veya kuşlardan geçiş gösterildiği bilinen bir bölgede sivrisinek ısırıklarına maruz kalmak gibi epidemiyojik kriterlerin varlığında; bir vakada eğer başka bir nedenle açıklanamayan, ateş öyküsü ile birlikte ensefalit, menenjit, miyelit bulgularından en az biri varsa BNV enfeksiyonu akla gelmelidir (6,17).

BNV enfeksiyonu en sık serum veya BOS'da anti-BNV IgM antikorlarının tespiti ile teyit edilir (6). Sonucun pozitif bulunması akut enfeksiyonun göstergesidir, ancak yakın bir filavivirüs ile çapraz reaksiyon olmadığından emin olunmalıdır. IgM 1 yıl kadar kalıcı olabildiği ve nadir görülse de pozitif sonuç son 1 yıl içinde geçirilmiş enfeksiyonla ilişkili olabileceği için, bu sonucun şimdiki enfeksiyon ile ilgili olup olmadığına da teyit edilmesi gerekir (17). Hastalığın başlangıcından sonraki 8 gün içinde toplanan serumlarda IgM henüz saptanabilir düzeylerde olmayabilir ve testin bir konvalesan faz örneği ile tekrarlanması gerekir. IgG antikorları genellikle IgM'den kısa süre sonra yükselir ve yıllarca devam eder.

PRNT özgül virüs nötralize edici antikorların ölçülmesinde kullanılabilir. Çift serum nötralizan antikor titresinde ≥ 4 kat artış BNV enfeksiyonu için tanı koydurucudur ve test çapraz reaktif flavivirüs antikorlarından ayırım için kullanılabilir.

Akut faz serumu, BOS veya doku örneklerinden viral kültür ve BNV NAAT da yapılabilir. Ancak immünkompetan hastalarda klinik semptomların ortaya çıktığı sırada BNV RNA saptanabilir düzeyde olmayabileceğinden negatif sonuçlar enfeksiyonu dışlamaz. NAAT bazı klinik durumlarda IgM sonuçlarını destekleyici olarak kullanılabilir (18,19,20).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizma

Batı Nil Virüsü (BNV)

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

BNV Risk Grubu 3 olarak sınıflandırılan bir mikroorganizmadır. Laboratuvar kaynaklı enfeksiyon için yüksek risk vardır ve laboratuvar enfeksiyonları bildirilmiştir (6).

BNV tanısı için; (i) hücre kültürü ve viral nötralizasyon testleri en az BGD3 laboratuvar şartlarında yapılır; (ii) sahadan toplanmış ölü kuşların diseksiyonu yüksek düzeyde virüs içermeleri nedeniyle HBGD3 gerektirir; bütün hayvan deneyleri ve sivrisinek vektör çalışmaları HBGD3 laboratuvar şartlarında yürütülmelidir, (iii) serolojik ve moleküler teknikler (ve kuşlar üzerinde invaziv olmayan işlemler) BGD2 laboratuvarlarda gerçekleştirilebilir.

Aerosol oluşturması muhtemel bütün işlemler kesinlikle sertifikalı bir sınıf-IIA BGK içinde yapılmalıdır.

Serum ayırma ve testlerin yapılması sırasında **daima** eldiven giyilmelidir.

Bütün biyogüvenlik düzeylerinde daima standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır (*bkz.* "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

Yüzey dezenfeksiyonu için %1'lik sodyum hipoklorit (çamaşır suyu), %0.5'lik sodyum dodesil sülfat veya %70'lik etanol kullanılabilir (ayrıca *bkz.* "UMS, V-MT-11 Viral hemorajik ateşlerin mikrobiyolojik tanısı").

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Eğer klinisyen BNV enfeksiyonundan şüpheleniyorsa, örnekler laboratuvara gönderilmeden önce hekim laboratuvar ile iletişim kurmalıdır.

BNV şüpheli örneklerin incelenmesinde görev alan tüm personel; (i) tekniklerin uygulanmasından önce amaçlanan bütün kullanımlar ile ilgili tam bir eğitim almış olmalı; (ii) kullanılan tekniklere tüm yönleriyle aşina olmalı; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Bu kurallar örnek kabulü dahil bütün tanımlama aşamalarında **kesici-delici** ve **aerosol önlemlerine** yüksek uyumu gerektirir. Laboratuvar personeli, muhtemel klinik semptomlarla ilgili bilgilendirilmeli herhangi bir semptom gelişimi halinde haber verilmesi zorunlu tutulmalıdır.

Hem güvenlik önlemlerine uyumun sağlanmasından hem de testlerin standart prosedürlere uygun yapılmasından ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, Reaktif, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

BNV tanısı için örnek alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden edinilebilir. Aşağıda bazı önemli hususlara tekrar dikkat çekilmektedir:

- Serolojik testler için hastadan serum ve mümkünse BOS alınır:
 - (a) Serum için sarı ya da kırmızı kapaklı tüpe ~5 mL kan alınır; **serum** kısmı steril, vida kapaklı bir tüpe ayrılır ve laboratuvara gönderilir.
 - (b) BOS en az 1 ml alınmalıdır.
 - (c) Serum veya BOS için, akut dönem örneği semptomlar geliştikten sonraki 3-10 gün içinde; nekahat dönemi örneği, ilk örnekten 2-3 hafta sonra alınıp gönderilmelidir. Gönderme şartları için bkz. "3.4 Saklama, Referans merkeze gönderme".
- Virüs izolasyonu veya nükleik asit tabanlı testler için serum (en az 0.5 mL), BOS (en az 1 mL), idrar (en az 5 mL) veya taze doku (en az 2-3 g) kullanılabilir. Bütün örnekler dondurulmuş olarak kuru buzda gönderilmelidir.
 - (a) Virüs kültürü ya da viral RNA tespiti için örneklerin erken dönemde alınması uygundur. Geç dönemde alınan örneklere ait negatif sonuçlar enfeksiyonun varlığını dışlamaz.
 - (b) Formalin ile tespit edilmiş dokular histokimyasal yöntemlerle antijen gösterilmesi için uygundur. Hücre kültüründe kullanılamaz. Tespit edilmiş dokular üzerinde yapılan histokimyasal ya da moleküler incelemelerin negatif sonuçları enfeksiyonun varlığını dışlamaz. Nükleik asit tabanlı testler yalancı negatif sonuç verebilir.

Reaktif / Kit

- ELISA IgM, IgG kitleri; (IFA yapılacaksa) IFA kitleri
- PCR kit ve reaktifleri
- Hücre kültürü hücreleri, besiyerleri

Diğer gereç, donanım

- ELISA okuyucu, yıkayıcı
- RT-PCR donanımı ve uygun PCR alanları
- BGD-3/HBGD3 şartlarına ve donanıma sahip laboratuvar

2.4. Kalite kontrol

- Tanı için kullanılan tüm testlerin "validasyon" ve "verifikasyonları" yapılmış olmalıdır. Serolojik her çalışmada "iç kalite kontrolü" için sonucu önceden bilinen standart IgM ve IgG pozitif serum örnekleri kullanılmalıdır. Laboratuvar dış kalite kontrol çalışmasına katılıyor olmalıdır. Dış kalite kontrol programları yoksa aynı testleri aynı yöntemlerle yapan en az bir laboratuvarla karşılaştırma yapılarak dış kalite kontrolü sağlanmalıdır.

3 BNV enfeksiyonu tanısında kullanılan teknikler

- Klinik veya epidemiyolojik duruma göre kullanılacak testler için tercih sıralaması Tablo 2'de özetlenmiştir.

3.1. Seroloji

- BNV tanısında en yaygın kullanılan yöntemler serolojik yöntemlerdir. IgM sınıfı antikorlar viral RNA'nın saptanmasından yaklaşık 4 gün, IgG ise yaklaşık 8 gün sonra serumda saptanabilecek düzeylere ulaşırlar.
- IgM sınıfı antikorlar genellikle 30-90 gün pozitif kalır fakat 90 günden uzun süren IgM pozitiflikleri de olabilir (6,7,17,19,20).

MAC EIA (IgM antikor 'capture' EIA)

- Akut enfeksiyonun saptanması için uygundur. Serum, plazma ve BOS örneklerindeki IgM antikor yanıtını saptayabilir.
- Plaklar deneysel olarak enfekte edilmiş fare beyninden elde edilen BNV antijenleri ve anti-insan IgM antikorları kaplanmış. Sekonder antikor olarak da 'horse radish peroxidase' ile işaretli anti-BNV MAb kullanılır.
- Duyarlılığı %91.7 özgüllüğü %99.2 olarak bildirilmektedir.
- Ayrıca rekombinant antijenlerin kullanıldığı kitlerle standardizasyon ve maliyet konusunda başarılı sonuçlar elde edilmektedir.
- Akut dönemde IgM pozitif bulunan örneklerin 2-3 hafta sonra alınan serum ile de test edilerek doğrulanması gerekir. BOS'ta IgM pozitifliği ise enfeksiyonun varlığını gösterir.

İndirekt IgG EIA

- Enfeksiyon şüphesinde ve sağlıklı asemptomatik grupların taranmasında kullanılır.
- Diğer flavivirüslerle çapraz reaksiyon çok yaygın olduğundan hastalık şüphesinde tek başına değil, **mutlaka** MAC EIA ile birlikte kullanılır.
- Piyasada bulunan ve yaygın olarak kullanılan ticari IgG EIA kitlerinin duyarlılıkları %92-93, özgüllükleri %97-98 arasında bildirilmektedir.
- İndirekt EIA ile saptanan IgG pozitifliklerini titre artışı ya da PRNT 90 testi ile doğrulamak gerekir.
- Enfeksiyon geçirme zamanını belirlemek için geliştirilmiş IgG aviditesini belirleyen ticari kitler de mevcuttur. Enfeksiyondan sonra ilk 30 gün içinde alınan serum örneklerinde IgG aviditesi genellikle %40'ın altında iken 180 gün ve üzeri sürelerde IgG aviditesi %55-60'lara çıkmaktadır.

Epitop 'blocking' EIA

- Test edilecek serumdaki antikorlarla BNV spesifik monoklonal antikorların BNV antijenlerine bağlanmak için yarıştıkları bir yöntemdir.
- Bu test ancak BNV dışındaki flavivirüslerle hiç karşılaşmamış toplumlardaki enfeksiyonların tanısında kullanılabilir.

IFA

- Çoğunlukla laboratuvarında hazırlanmış testler kullanılsa da piyasada MAC-EIA'dan daha yüksek özgüllüğe sahip ticari IFA-IgG ve IgM kitleri mevcuttur.
- Yalancı pozitiflikleri azaltmak için enfekte ve enfekte olmayan hücre karışımları kullanılabilir.
- İlk 8 gün içinde alınan serum örneğinin IgM negatif olması enfeksiyonu dışlamaz.

ÖNEMLİ: BOS ya da serumda anti-BNV IgM pozitifliği başka virüslere bağlı enfeksiyonlardan sonra çapraz reaksiyon veren antikörlerin varlığına ya da özgül olmayan pozitif reaksiyonlara bağlı olabilir.

PRNT (plak redüksiyon nötralizasyon testi)

- Flavivirüs antikör yanıtları hem virüse özgü epitoplara hem de virüs ailesine çapraz reaksiyon veren epitoplara karşı gelişmektedir.
- Nötralizan antikörlerin çoğu E proteinine karşı oluşur.
- Hastalardan alınan serum örneklerinde PRNT-90, belirtisiz enfeksiyon geçiren olgularda ise PRNT-50 titrelerini belirlemek için benzer yöntemler kullanılır.
- PRNT-50 değerleri özellikle kişilerin daha önce BNV ile karşılaşmış karşılaşmadığının değerlendirilmesinde kullanılır.
- Nötralizan antikörlerin o bölgede görülebilecek flavivirüslerin tümüne karşı bir panel halinde test edilmesi gerekir.
- PRNT testleri için bölgemizde panele eklenmesi gereken virüsler Kutu 1'de verilmiştir.

Kutu 1. PRNT testleri için bölgemizde panele eklenmesi gereken virüsler

- 1 BNV
 - 1. koldan iki köken (biri bölgedeki yakın zamanlı insan enfeksiyonundan izole edilmiş olmalı)
 - 2. koldan bir köken
- 2 Usutu virüs
- 3 KKEV (özellikle Orta ve Doğu Avrupa'da yaygın olduğu için)
- 4 JEV
- 5 Dengue virüs
- 6 Sarı humma virüsü

3.2. Moleküler yöntemler

- Virüs RNA'sı periferik kanda enfeksiyondan sonraki 2-3. günden 14-18 güne dek saptanabilir. Ayrıca idrardan virüs RNA'sının daha uzun sürelerde saptanabildiği bildirilmiştir.
- Moleküler testler iki klinik amaç için kullanılır:
 - 1) İnsan enfeksiyonlarının bulunduğu bilinen (endemik) bölgelerde transplantasyon / transfüzyon amacıyla kan ve organ incelenmesi.
Periferik kanında BNV bulunan bireylerin %80'i asemptomatik olduğu için alt saptama sınırı düşük olan moleküler testler kullanılmalıdır. Genellikle bu testlerin duyarlılığının 100 kopya/mL veya altını yakalayabilmesi gerekir.

Bu amaçla (Kan Bankacılığı için) tasarlanmış ve onaylanmış olan ticari nükleik asit saptama kitleri (analitik duyarlılıkları 50 kopya / mL'nin altında olan) kullanılmalıdır.

Ancak bu testlerde Usutu virüse bağlı yalancı pozitiflikler olabilmektedir.

Ayrıca rRT-PCR veya NASBA'ya dayalı tekniklerle de başarılı sonuçlar alınabileceği bildirilmiştir.

2) Uyumlu klinik tablosu olan hastalarda tanı amaçlı olarak.

Özellikle BNV'ye bağlı hastalık şüphesi olanlarda virüs yükleri daha yüksek olduğundan kullanılacak olan moleküler testlerin analitik duyarlılığı, kan ve doku nakli taramalarında kullanılan yöntemlerinki kadar yüksek olması gerekmez.

Konvansiyonel RT-PCR'in analitik duyarlılığı hedef bölgesine göre değişkenlik göstermektedir. Sık kullanılan ve duyarlı olduğu gösterilen hedef bölgeler C ve prM genleri üzerinde yer almaktadır.

'Nested' PCR ile duyarlılık 10 kat arttırılabilir; ancak bu yöntemin de kontaminasyona açık olma ve daha uzun sürede sonuç verme gibi sakıncaları vardır.

Filogenetik analiz için daha çok NS ya da E genlerine ait diziler kullanılmaktadır.

- Farklı saptama sistemleri kullanılan rRT-PCR ile klinik örnekler ve sivrisineklerden hızlı ve güvenilir sonuçlar alınabileceğini bildiren yayınlar vardır.
- Proba dayalı saptama sistemlerinin kullanıldığı rRT-PCR ile bazı varyantların saptanamayabileceği unutulmamalıdır. 'SYBR green'e dayalı rRT-PCR ile bu sorun giderilebilirse de bu yöntemin de duyarlılık ve özgüllük sorunları vardır.
- Yalancı negatiflikleri aşabilmek için üç farklı hedefi çoğaltan multipleks RT-PCR/LDR (PCR-'Ligase detection reaction assay') veya 'genom wide' RT-PCR gibi yöntemler kullanılabilir.
- Ayrıca insanda hastalık yapan tüm flavivirüsleri saptamaya olanak veren multipleks RT-PCR testleri tasarlanmıştır.

Tablo 2. Klinik veya epidemiyolojik duruma göre kullanılacak testler için tercih sıralaması

	BNV enfeksiyonu şüphesi (nöroinvaziv hastalık ve/veya BNV ateşi)	Seroprevalans çalışmaları	Kan ve organ bağışlarının taranması
Tercih sırasına göre testler	<ol style="list-style-type: none">1. MAC EIA2. İndirekt IgG EIA3. IFA4. Virüs izolasyonu5. RT-PCR6. rRT-PCR7. PRNT90	<ol style="list-style-type: none">1. PRNT502. İndirekt IgG EIA3. IFA4. Epitop 'blocking' EIA	<ol style="list-style-type: none">1. Nükleik asit tabanlı testler

3.3. Virüsün kültürden izolasyonu

- Kültür için plazma/serum, BOS veya dokular kullanılabilir. Hücre soyları olarak da memeli ya da sivrisinek kökenli ve oldukça çeşitli hücreler (Vero E-6, RK-13, AP-61, C6/36) kullanılabilir.
- Hücre kültüründe virüsün izolasyonu kolay değildir.
- İdeal olarak örneklerin alındıktan sonra dakikalar içinde ekilmesi başarı şansını artırır.
- Bu kadar kısa sürede ekim yapılamıyorsa örnekler en fazla 24 saat bekletilebilir. Bu süre içinde +4°C de tutulmaları gerekir.
- Örneklerin antibiyotikli taşıma ortamına (VTM) alınması önerilir.

3.4. Saklama, Referans merkeze gönderme

- Serolojik incelemeler için laboratuvara ulaşma süresi >48 saat ise, serum (veya plazma) kanın alındığı gün santrifüj sonrası steril bir tüpe ayrılmalıdır; bu şekilde en fazla 5 güne kadar +4°C'de saklanabilir.
- Nükleik asit analizi için, alındıktan sonraki 6 saat içinde kan laboratuvara ulaşamayacaksa plazma (veya serum) *nükleaz-içermeyen* bir tüpe, uygun steril filtreli-pipet ucu kullanılarak ayrılmalıdır.
- Seroloji veya nükleik asit analizleri için örneğin teste alınması belirtilen sürelerden daha uzun süreceksa örnekler hemen -70°C'ye kaldırılmalı (seroloji için -20°C de uygun); kuru buzda laboratuvara ulaştırılmalıdır.
- Virüs kültürü için alınan örnekler (serum, BOS, dokular) mümkünse hemen dondurularak kuru buzda laboratuvara ulaştırılmalıdır. Bu örnekler seroloji veya nükleik asit analizleri için de kullanılabilir.
- BNV kültürleri "Kategori A, Enfeksiyöz Madde" olarak sınıflanır ve şüpheli kültürler, eğer ileri incelemeler için ulusal veya uluslararası bir referans laboratuvara gönderiliyorsa *paketleme* kesinlikle "Kategori A" şartlarını karşılayacak şekilde yapılmış olmalıdır. BNV şüpheli klinik örnekler de daima enfeksiyöz madde taşıma şartlarını karşılayacak şekilde *paketlenmeli* ve *taşınmalıdır* (21). Ayrıntılı bilgi için ilgili UMS belgesine (UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi) başvurulması önerilir.

4 Sonuçların değerlendirilmesi ve bildirim

- Serumda özgül anti-BNV IgM, yüksek titrede IgG antikor yanıtı ile birlikte pozitif bulunmuş ise "**olası tanı**" bulgusudur.
- IgM antikorları sağlam bir kan-beyin bariyerini geçemez. Bu nedenle, BOS örneğinde özgül anti-BNV IgM antikor titresi pozitifliği, akut santral sinir sistemi enfeksiyonunu gösterir; "**kesin tanı**" bulgusudur.
- Kanda IgM antikorları 2-3 ay kadar devam edebilir. IgM antikorları için diğer filavivirüslerle çapraz reaksiyon olasılığı akılda tutulmalıdır.

- Serumda saptanan anti-BNV IgM ve IgG titreleri nötralizasyon testi ile doğrulanıyorsa "**kesin tanı**" bulgusudur.
- Çok kısa süren *viremi* nedeniyle virüsün serum ve BOS'dan izolasyonu hayli güçtür. Daha çok beyin biyopsilerinden izole etmek mümkündür. Virüsün izolasyonu yapılabildiyse "**kesin tanı**" bulgusudur.
- Kan veya BOS'tan BNV nükleik asidinin tespiti "**kesin tanı**" bulgusudur.
- PRNT **sonuç raporunda** panele dahil edilen virüsler mutlaka belirtilmelidir. Raporda tabloda bulunan virüslerden dahil edilmemiş olan varsa belirtilmelidir. Test sonucunun bu virüslere karşı çapraz reaksiyonlara bağlı da olabileceği ilave edilmelidir.
- BNV enfeksiyonunun bildirim zorunludur (8,9). Bildirim esasen klinisyenin sorumluluğu olmakla birlikte, yine de, yukarıda belirtilen sonuçlardan biri elde edildiği takdirde vaka araştırması süreçlerinin hızla başlatılabilmesi için laboratuvarın ilgili birimleri haberdar etmesi (ör., telefon ile) önerilir. BNV'nin bir salgınla ilişkili olabileceği hatırlanmalıdır.

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Flavivirüsler arasında antijenik benzerliğe bağlı yalancı pozitiflikler antikora dayalı testlerle alınan pozitif sonuçların doğrulanmasını gerektirir. JEV ve Sarı humma aşılamaalarının yalancı pozitif sonuçlara yol açabileceği unutulmamalıdır.

6 Referans Laboratuvar

Adres

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal Arbovirüs ve Viral Zoonotik Hastalıklar Referans Laboratuvarı
Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55, F Blok 1.kat
06100 – Sıhhiye/ANKARA

Tel: 0312 565 5631 / 5547
e-mail: virazonoz@thsk.gov.tr;

Faks: 0312 565 5569;
www.thsk.gov.tr

Görev çerçevesi

Bildirimi zorunlu olan; viral hemorajik ateş sendromları – Kırım-Kongo kanamalı ateşi (KKKA), hantavirüs enfeksiyonları, Dengue ateşi, sarı humma (Yellow fever), Batı Nil virüsü (West Nile Virus), enfeksiyonu, Chikungunya ateşi ve kene-kaynaklı (Tick-borne) ensefalit (TBE), ve

Bildirimi zorunlu olmayan; tatarcık humması (Sand-fly fever; SVF) için konvansiyonel ve/veya moleküler tanı, doğrulama; uluslararası referans merkezlerle işbirliği ve moleküler epidemiyolojik tiplendirme.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu belge (Batı-Nil Virüsü Enfeksiyonunun Mikrobiyolojik Tanısı) ayrıca aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve ilave bilgi için incelenmeleri önerilir:

UMS, V-MT-11	Viral hemorajik ateşlerin mikrobiyolojik tanısı
UMS, SY-03	Akut nörolojik sendrom
UMS, GEN-OY-01	Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- Petersen L R, Marfin AA. West Nile Virus: A primer for the clinician. *Ann Intern Med* 2002;137:173-179.
- Martín-Acebes MA, Saiz J C. West-Nile virus: A re-emerging pathogen revisited. *World J Virol* 2012;12;1(2):51-70
- Ergünay K, Aydoğan S, Menemenlioğlu D, et al. Ankara bölgesinde nedeni bilinmeyen merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarında Batı Nil virusunun araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2010;44:255-262.
- Ozkul A, Yıldırım Y, Pınar D, et al. Serological evidence of West Nile Virus (WNV) in mammalian species in Turkey. *Epidemiol Infect* 2005;134:826-829.
- Watson JT, Pertel EP, Jones RC, et al. Clinical characteristics and functional outcomes of West Nile Fever. *Ann Intern Med* 2004;41:360-365.
- <http://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/wnvGuidelines.pdf> (son erişim tarihi: 31.01.2014)
- ECDC West Nile Fever. http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west_nile_fever/pages/index.aspx (son erişim tarihi:31.01.2014)
- Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004. <http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhbs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014).
- Hayes E B, Sejvar J J, Zaki S R, et al. Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile Virus disease. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1174-1179.
- Gubler D J. The continuing spread of West Nile Virus in the western hemisphere. *Clin Infect Dis*. 2007;45:1039-1046.
- Kramer LD, Styer LM, Ebel GD. A global perspective on the epidemiology of West Nile Virus. *Annu Rev Entomol* 2008;53:61-81.
- Ebel GD, Kramer LD. West Nile virus: molecular epidemiology and diversity. In: Diamond MS (ed). *West Nile Encephalitis Virus Infection*. Springer Science + Business Media. New York. 2009, p. 25-43
- Pesko KN, Ebel GD. West Nile virus population genetics and evolution. *Infect Genet Evol* 2012, doi:10.1016/j.meegid.2011.11.014
- Vázquez A, Sánchez-Seco MP, Ruiz S, Molero F et al. Putative new lineage of West Nile Virus, Spain. *Emerg Infect Dis* 2010;16(3):549-552

- 16 Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. Flaviviridae. *In*: Knipe DM, Howley PM (eds). *Fields Virology*, Vol 1, 5th ed. Lippincott William & Wilkins. Philadelphia. 2007, p. 1101–1113.
- 17 Shi PY, Kramer LD. Serologic diagnosis of West Nile virus enfection. *Expert Rev Mol Diagn* 2003;3:733-741
- 18 Shi PY, Kramer LD. Molecular detection of West Nile virus RNA. *Expert Rev Mol Diagn* 2003;3:357-366.
- 19 Sambri V, Capobianchi MR, Cavrini F, *et al*. Diagnosis of West Nile virus human enfections: Overview and proposal of diagnostic protocols considering the results of external quality assessment studies. *Viruses* 2013;5:2329-2348
- 20 Sanchini A, Donoso-Mantke O, Papa A, *et al*. Second International Diagnostic Accuracy Study for the Serological Detection of West Nile Virus Enfection. *PLOS Negl Trop Dis* 2013;7(4):e2184.
- 21 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Chikungunya Ateşinin Mikrobiyolojik Tanısı

Hazırlayan Birim	Klinik Viroloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Viroloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	V-MT-16
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
Etken, bulaş yolu ve vektör özelliği.....	3
Epidemiyoloji ve risk grupları.....	4
Klinik özellikleri	4
Laboratuvar tanısı.....	4
TEKNİK BİLGİLER	5
1 Hedef mikroorganizma	5
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	5
3 Chikungunya ateşi tanısında kullanılan teknikler	6
4 Sonuçların değerlendirilmesi ve bildirim	8
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	8
6 Referans Laboratuvar	8
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	9
KAYNAKLAR.....	9

Kapsam ve Amaç

Chikungunya ateşi, ateş, baş ağrısı, kas ağrısı, döküntü ve eklem ağrısı ile karakterize Chikungunya virüsü (CHIKV)'nün neden olduğu bir enfeksiyon hastalığıdır. Semptomların büyük çoğunluğu zaman içerisinde kaybolurken bazı hastalarda uzun yıllar şiddetli bir şekilde eklem ağrısı devam edebilmektedir. Bu nedenle hastalarda kambur ve eğik bir postür gelişebilmektedir (1).

CHIKV, *Aedes albopictus*'un bulunduğu Afrika, Hindistan ve Güney Doğu Asya'da endemiktir; Avrupa ülkeleri ve Türkiye'de de özellikle bu coğrafyalara seyahat sonrasında Chikungunya enfeksiyonlarına rastlanabilmektedir (2,3).

Virüs seyahat-ilişkili olarak bir endemik bölgeden alındığında, konak aracılığı ile uygun vektörlerin endemik olduğu yeni bir coğrafi konuma girmesi ve hastalığın böylece yeni alanlara (Avrupa ve Amerika gibi) yerleşmesi olasılığı endişe kaynağıdır (4). Hastalığın önemi de görece ağır morbiditesinin yanı sıra, bu potansiyel epidemiyolojik tehditten kaynaklanmaktadır. Dolayısı ile vakalara en kısa zamanda tanı konması önem taşır. Chikungunya ateşi ülkemizde de benzer gerekçelerle bildirim zorunlu hastalıklar arasında yer almaktadır (5,6).

Bu UMS belgesinde Chikungunya enfeksiyonlarının kesin tanısı için geçerli yöntemler, örnek yönetimi, asgari laboratuvar şartları ve sorumluluklar ile ilgili bilgi verilmesi hedeflenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

CHIKV Chikungunya virüsü

rRT-PCR real-time reverse transcriptase PCR

Genel Bilgi

Etken, bulaş yolu ve vektör özelliği

Chikungunya virüsü (CHIKV), enfekte *Aedes albopictus* ve *Aedes aegypti* cinsi sivrisineklerle insanlara bulaşan bir arbovirüstür. CHIKV *Togaviridae* ailesi içerisinde antijenik özelliklerine göre gruplanmış pek çok serokompleksten oluşan *Alphavirus* cinsine ait bir RNA virüsüdür (1,4).

Serolojik çalışmalar insan dışı primatların CHIKV virüs döngüsünde konak olarak rollerini kanıtlarken, virüs izolasyon çalışmaları da *Aedes* cinsi sivrisineklerin ana vektörler olduğunu ortaya koymaktadır.

Hastalığın geçişi, enfekte sivrisineğin (*Aedes* spp) sokması ve nadiren vertikal yolla olmaktadır. İnsandan insana doğrudan bulaştığına dair bir kanıt yoktur; ancak viremik kişilerden *Aedes albopictus* aracılığıyla duyarlı konaklara geçiş söz konusu olabilir (3). Epidemiler sırasında virüs, insanlar ve sivrisinekler arasında hayvan rezervuara ihtiyaç duymaksızın yayılabilmektedir.

Aedes furcifer-taylori, *Aedes africanus*, *Aedes luteocephalus*, *Aedes aegypti* tanımlanmış en yaygın vektörlerdir (4).

Afrika'da salgınlar genellikle yoğun yağmurlar sonrasında virüsün enzootik orman döngüsünden epizootik savan ya da ormanlık alan döngüsüne geçişi ile olmaktadır (1). Virüsün orman döngüsü, Afrika ormanlarında *Aedes* spp sivrisinekler ile vahşi primatlar, sincaplar, kuşlar ve kemirgenler arasında devam eder. Asya'da ise *A. aegypti* ve *A. albopictus* vektörleriyle bulaşır (3).

Epidemiyoloji ve risk grupları

CHIKV ilk olarak 1952 yılında Tanzanya'da bir salgında sivrisinek ve insandan izole edilmiş ve hastalık da böylece tanımlanmıştır. Bir Makonde kelimesi olan 'chikungunya'nın anlamı 'virajlı' demektir ve yaygın bir şekilde hastalığa bağlı ağrılı ve zorlayıcı poliartralji nedeniyle birçok hastada gelişen eğik duruşu ifade eder. Filogenetik analizler sonucu üç filogrup (Batı Afrika, Asya, Doğu-Orta-Güney Afrika suşları) tanımlanmıştır.

CHIKV, coğrafi olarak Afrika, Hindistan ve Güney-Doğu Asya'da görülmekte ve son 50 yıldır periyodik olarak salgınlara neden olmaktadır (4). 2004'den bu yana Güney Doğu Hint Okyanusu adalarında da görülmektedir. CHIKV Avrupa ve Kuzey Amerika'da endemik bölgeleri ziyaret etmiş vakalardan saptanmaktadır (4). Avrupa bölgesinde ilk salgın ise *A. albopictus* cinsi sivrisineklerle İtalya'da 2007 Temmuz-Eylül aylarında importe vaka kaynaklı olarak gözlenmiştir (1).

Hastalığın aşısı veya tedavisi bulunmamaktadır. Etkilenen bölgelerde vektör kontrolü ve bireysel olarak sivrisinek sokmasından korunmak önerilir (1,7).

Klinik özellikleri

CHIKV enfeksiyonları akut, subakut veya kronik olabilir. Akut hastalık 1-12 gün arasında değişen (ortalama 2-4 günlük) inkübasyon süresinin ardından ani başlangıçlı bir yüksek ateş (tipik olarak $>39^{\circ}\text{C}$) ile birlikte şiddetli eklem ağrıları ve kas ağrıları, baş ağrısı, fotofobi ve döküntülerle seyreder. Bulantı, kusma ve yaygın sırt ağrısı olabilir. Asemptomatik enfeksiyon nadirdir; serolojik olarak pozitif bulunan kişilerin %3-25'inde belirgin bir semptom görülmeyebilir. Hastaların çoğunda poliartralji mevcuttur ve genellikle simetriktir (1,4). Akut faz 3-10 günde sonlanır ve hastalar genellikle 10. günde ağrıları geçmiş olduğundan iyi hissederler. Ancak bazı vakalarda bu dönemin ardından 3 ay kadar sonra çeşitli romatizmal belirtilerle şikayetler yeniden başlayabilir. Kronik hastalık üç aydan uzun bir süre devam eden belirtiler ile tanımlanmaktadır. Sürveylere göre değişmekle beraber vakaların %20 ila 50'si 10 aydan 3 yıla kadar devam eden kronik faza girmektedir (4). Mortalite düşük olarak bilinse de, 2004-2008 Hindistan ve Mauritius salgınları sırasında ölüm oranlarında artış kaydedilmiştir.

Laboratuvar tanısı

Tanıda etkene karşı antikorların gösterilmesi, moleküler yöntemler (RT-PCR) ve virüsün izolasyonu için hücre kültürleri kullanılmaktadır (4).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizma

Chikungunya virüsü (CHIKV)

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

CHIKV, Risk Grubu 3 içinde sınıflandırılan bir mikroorganizmadır. Laboratuvar kaynaklı enfeksiyon için yüksek risk vardır. Serolojik teknikler BGD2 laboratuvarlarda gerçekleştirilebilir. Potansiyel enfeksiyöz dokularla çalışma BGD2 laboratuvarlarda ve BGD3 pratiği ile gerçekleştirilebilir; aerosol oluşturma muhtemel bütün işlemler kesinlikle sertifikalı bir sınıf-IIA BGK içinde yapılmalıdır; Hücre kültürü viral nötralizasyon testleri en az BGD3 laboratuvarında yapılmalıdır.

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) yöntem(ler)i uygulamadan önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleriyle aşina olmalı, ve; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Hem güvenlik önlemlerine uyumun sağlanmasından hem de testlerin standart prosedürlere uygun yapılmasından ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, Reaktif, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

- Serolojik testler için - serum ya da plazma
- Kültür için - tam kan, BOS, eklem sıvısı

NOT: Örnek alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden edinilebilir.

- Vektör çalışmaları için - doğal çevreden sivrisinek örnekleri

Besiyeri/Reaktif/Kit

- Antikor tayini için - ELISA IgM/IgG veya IFA IgM/IgG kitleri
- Antijen tayini için kit
- Kalitatif ve kantitatif RT-PCR (5).
- Virüs izolasyonu için besiyeri, hücre ve reaktifleri - Vero veya sivrisinek hücrelerine serum inokülasyonu ve immünfloresan ile tanımlanması.

Diğer gereç, donanım

- ELISA okuyucu, yıkayıcı ve/veya floresan mikroskobu
- RT-PCR donanımı ve uygun PCR alanları

2.4. Kalite kontrol

- Tanı için kullanılan tüm testlerin "validasyon" ve "verifikasyonları" yapılmış olmalıdır.
- Serolojik her çalışmada "iç kalite kontrolü" için sonucu önceden bilinen standart IgM ve IgG pozitif serum örnekleri kullanılmalıdır.
- Laboratuvar dış kalite kontrol (DKK) çalışmasına katılıyor olmalıdır. DKK programları yoksa aynı testleri aynı yöntemlerle yapan en az bir laboratuvarla karşılaştırma yapılarak dış kalite kontrolü sağlanmalıdır.

3 Chikungunya ateşi tanısında kullanılan teknikler

- Laboratuvar tanısı için, antikor cevabı ve viremi kinetiğinin bilinmesi önemlidir (1).
- Hastalığın akut fazında tanı için serum örneklerinde rRT-PCR ile viral nükleik asitler gösterilebilir, virüs izole edilebilir veya antikor yanıtı saptanabilir.
- Hastalığın tanısında, başlangıçtan itibaren ilk hafta içinde rRT-PCR ile pozitiflik yakalanabilir; oldukça duyarlı ve hızlı bir yöntemdir.
- Özgül IgM yanıtı belirtilerin başlangıcından 2-6 gün sonra başlar ve üç aya kadar devam etmektedir. Özgül IgG antikorları ise serumda yıllarca saptanabilir düzeylerde kalmaktadır (3,7). Daha sonraki dönem örneklerinde ise bağışık yanıtın varlığının (IgG ve IgM) gösterilmesi ile tanı konulabilmektedir.
- ELISA, IFA, kompleman birleşmesi ve hemaglütinasyon inhibisyon gibi klasik testler serolojik tanıda kullanılabilir.
- Yine antijen ELISA ile virüsün gösterilmesi de tanıda kullanılan bir yöntemdir (1).

3.1. Seroloji

- IFA ve ELISA yöntemleri bağışık yanıtın saptanmasında ve IgM ve IgG antikorlarının ayrılmasında hızlı ve duyarlı yöntemlerdir.
- Lateral akım hızlı test ile birinci günde saptanabilmesine rağmen, özgül IgM yanıtı ateşin oluşmasından sonraki hastalığın 2 ile 7. günleri arasında ELISA ve IFA yöntemleri ile saptanabilir.
- Benzer şekilde IgG yanıtı ise hastalığın genellikle 5. gününden sonra saptanabilir. IgG yanıtı yıllarca kalır ve pozitif olarak saptanabilir.
- IgM genellikle enfeksiyonun 3-4. haftasından sonra saptanamayacak düzeylere düşer.
- Virüsün tam antijeni veya rekombinant kapsit antijeni ya da zarf antijenlerinin kullanıldığı çeşitli ticari ya da laboratuvar yapımı (*in-house*) ELISA yöntemleri mevcuttur (1,4,7).

3.2. Antijen ELISA ile virüsün gösterilmesi

- Antijen 'capture' ELISA yöntemiyle bazı çalışmalarda, hastalığın başlangıcından 2 gün öncesinde serum ve BOS örneklerinden virüs saptanmıştır.
- Antijen ELISA yöntemi hem ucuz hem de fazla laboratuvar ekipmanı gerektirmeyen bir yöntemdir.

3.3. Moleküler tanı

- Antikor yanıtı oluşmadan önce ve hastalığın erken döneminde geleneksel PCR veya rRT-PCR yöntemleri ile hızlı ve duyarlı olarak tanı konulabilmektedir.
- Virüsün yapısal olmayan proteini (*nsp1*) ve zarf (E) proteinleri kodlayan gen bölgelerinin hedeflendiği rRT-PCR yöntemleri ve SYBER green veya Taqman prob bazlı teknolojiler kullanılır.
- rRT-PCR ile hastalığın ilk 1-7. gününde alınan klinik örneklerde viral nükleik asitler saptanabilir (1,4).

3.4. Hücre kültürü

- CHIKV, sivrisinek veya memeli hücre kültürlerinde veya bir günlük fare beyne intraserebral inokülasyon ile izole edilebilir (1).
- Çoğunlukla Vero hücreleri kullanılmasına rağmen virüs çeşitli memeli hücrelerinde sitopatik etki oluşturabilir.
- Hastalığın başlangıcının ikinci gününden önce virüs izolasyonu yapılabilmektedir.
- Antikor yanıtı saptanamayan olgularda hücre kültürüne başvurulabilir.
NOT: Chikungunya virüs enfeksiyonun laboratuvar tanısında kullanılan ticari testler için Avrupa İmporte Viral Hastalıklar Laboratuvar Ağı (ENIVD) www.enivd.de sayfasına bakınız.

3.5. Saklama, Referans merkeze gönderme

- Chikungunya ateşi için incelemeler *yalnızca referans laboratuvar*da yapılmakta; şüpheli vaka örnekleri Halk Sağlığı Müdürlüğü kanalıyla laboratuvara gönderilmektedir. Bunun için Halk Sağlığı Müdürlüğü ile bağlantı kurulmalı, laboratuvar da aranarak örnek gönderileceğine dair bilgilendirilmelidir.
- Seroloji, nükleik asit analizleri veya hücre kültürleri için örneklerin teste alınması önerilen sürelerden daha uzun sürecekse, örnekler -70°C'de saklanmalı; kuru buzda laboratuvara ulaştırılmalıdır. Seroloji için -20°C'de saklama da uygundur.
- Şüpheli klinik örnekler enfeksiyöz madde taşıma şartlarını karşılayacak şekilde *paketlenmeli* ve *taşınmalıdır*. Ayrıntılı bilgi için ilgili UMS belgesine başvurulması önerilir (*bkz.* UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi) (8).

4 Sonuçların değerlendirilmesi ve bildirim

- Chikungunya ateşi şüphesinde ELISA ile IgM antikorlarının aranması tanıda en kullanışlı yoldur. ELISA IgM sonucunun pozitif bulunması "**kesin tanı**" koydurur ve hastalığın akut dönemde olduğunu gösterir. IgM bazı bireylerde hastalıktan 2-6 ay sonrasına kadar kalabilir, bu nedenle sonuçlar PCR ile beraber değerlendirilmelidir.
- Akut ve konvalesan dönem serumlarında serokonversiyon ya da özgül IgG antikor titresinde ≥ 4 kat artış da "**kesin tanı**" bulgusudur.
- Kan örneklerinden CHIKV rRT-PCR ile viral RNA'nın gösterilmesi "**kesin tanı**" bulgusudur. Hastanın viremik dönemde olduğunu gösterir.
- Hücre kültüründe kandan CHIKV izolasyonu hastalığın erken fazında mümkündür ve "**kesin tanı**" bulgusudur.
- Antijen 'capture' ELISA pozitif ise virüsün varlığını gösterir ve "**kesin tanı**" bulgusudur.
- CHIKV enfeksiyonlarının bildirim zorunludur (5,6). Bildirim esasen klinisyenin sorumluluğu olmakla birlikte bu sonuçlardan en az birinin elde edilmesi durumunda vaka araştırmasının hızla başlatılabilmesi için laboratuvar ilgili birimleri haberdar etmelidir (ör., telefon ile).

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Tanı Referans laboratuvarlarla sınırlıdır.

6 Referans Laboratuvar

Adres

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal Arbovirüs ve Viral Zoonotik Hastalıklar Referans Laboratuvarı
Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55, F Blok 1.kat
06100 – Sıhhiye/ANKARA

Tel: 0312 565 5631 / 5547
e-mail: virazonoz@thsk.gov.tr;

Faks: 0312 565 5569;
www.thsk.gov.tr

Görev çerçevesi

Bildirimi zorunlu olan; viral hemorajik ateş sendromları – Kırım-Kongo kanamalı ateşi (KKKA), hantavirüs enfeksiyonları, Dengue ateşi, sarı humma (Yellow fever), Batı Nil virüsü (West Nile Virus), enfeksiyonu, Chikungunya ateşi ve kene-kaynaklı (Tick-borne) ensefalit (TBE), ve

Bildirimi zorunlu olmayan; tatarcık humması (Sand-fly fever; SVF) için konvansiyonel ve/veya moleküler tanı, doğrulama; uluslararası referans merkezlerle işbirliği ve moleküler epidemiyolojik tiplendirme.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu belge (Chikungunya Ateşinin Mikrobiyolojik Tanısı) ayrıca aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir. Bilgi için bu belgelerin de incelenmesi önerilir:

UMS, SY-02	Akut kanamalı ateş sendromu
UMS, V-MT-11	Viral hemorajik ateşlerin mikrobiyolojik tanısı
UMS, GEN-OY-01	Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Burt FJ, Rolph MS, Rulli NE, Mahalingam S, Heise MT. Chikungunya: a re-emerging virus. *Lancet*. 2012;18:379(9816):662-71
- 2 Kucharz EJ, Cebula-Byrska I. Chikungunya fever. *Eur J Intern Med* 2012;23(4):325-9.
- 3 Yağcı Çağlayık D, Uyar Y, Korukluoğlu G, Ertek M, Unal S. An imported Chikungunya fever case from New Delhi, India to Ankara, Turkey: the first imported case of Turkey and review of the literature. *Mikrobiyol Bul* 2012;46(1):122-8.
- 4 Pan American Health Organization and CDC. Preparedness and Response for Introduction in the Americas Chikungunya Virus. PAHO, Washington D.C. 2011.
- 5 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurveLa bReh.pdf> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 6 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014).
- 7 ENIVD (European Network for the Diagnostics of "Imported" Viral Diseases): Chikungunya Virus Disease, www.enivd.de (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 8 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Kene-Kaynaklı Ensefalitin (Tick-borne encephalitis; TBE) **Mikrobiyolojik Tanısı**

Hazırlayan Birim	Klinik Viroloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Viroloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	V-MT-17
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik
----------	-------	------------

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
Etken.....	3
Epidemiyoloji	4
Klinik özellikleri	5
Laboratuvar tanısı.....	5
TEKNİK BİLGİLER	6
1 Hedef mikroorganizma	6
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	6
3 KKE tanısında kullanılan teknikler	7
4 Sonuçların değerlendirilmesi ve bildirim	10
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	11
6 Referans Laboratuvar	11
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	11
KAYNAKLAR.....	12

Kapsam ve Amaç

Kene-kaynaklı ensefalit (Tick-borne encephalitis; TBE), başta Orta Avrupa ve bazı İskandinav ülkeleri olmak üzere Avrupa ve Asya'nın daha çok ormanlık bölgelerinde endemik, giderek de yaygınlaşan bir zoonotik enfeksiyondur. Enfeksiyonun sıklığı ve coğrafi yayılımında son 30 yılda gözlenen artıştan küresel iklim değişikliği ve artan seyahat etkinlikleri sorumlu tutulmaktadır. Öte yandan hastaneye yatış verilerine göre Avrupa'da yıllık 10 bine ulaşan olgu sayısına rağmen gerçek insidansı bilinmemektedir. Bunun önemli bir nedeni hastalığın klinik seyir ve bulgularının diğer etiyolojilere bağlı meningoensefalitler ile benzer oluşudur. Ciddi nörolojik sekellere yol açabilen KKE'nin özgül tedavisi bulunmamaktadır. Ancak, etkili ve iyi tolere edilebilen bir aşısı bulunduğu için önlenabilir bir hastalıktır. Kene ile bulaşan bu enfeksiyonun doğadaki rezervuarı küçük kemirgenlerdir. Hastalık ilkbahardan sonbahara dek görülebilmektedir. Laboratuvar kaynaklı enfeksiyon vakaları da mevcuttur.

Türkiye'den doğrulanmış bir KKE vakası henüz bildirilmemiştir, ancak yapılan seroepidemiolojik çalışmalar etkenin Türkiye'de de bulunabileceğine işaret etmektedir (1,2,3).

KKE ülkemizde bildirim zorunlu hastalıklar arasında yer alır (4,5). Kesin tanı başlıca serolojik yöntemlere dayanır. Gerçekte laboratuvar sonuçları KKE tedavisi üzerine etkili değildir. Ancak, özel tedavi gerekebilen diğer meningoensefalit nedenlerini KKE'den ayırt edebilmek için tanı gereklidir. Ayrıca tanı, özellikle epidemiyolojik amaçlar için kullanışlıdır.

Bu çerçevede bu UMS belgesinde KKEV enfeksiyonlarının kesin tanısı için geçerli yöntemler, örnek yönetimi, asgari laboratuvar şartları ve sorumluluklar ile ilgili bilgi verilmesi hedeflenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

KKE	Kene kaynaklı ensefalit
KKEV	Kene kaynaklı ensefalit virüsü
Sp-ELISA	'subviral particle' ELISA

Genel Bilgi

Etken

Kene kaynaklı ensefalit (KKE) ciddi bir akut santral sinir sistemi enfeksiyonudur; kalıcı nörolojik sekellerden ölüme kadar değişen ağır sonuçları olabilen bir viral zoonotik hastalıktır.

Etken KKEV, *Flaviviridae* ailesinden *Flavivirus* cinsi içinde yer alan ve 70'in üzerinde serotipi olan zarflı, bir tek iplikli, pozitif anlamlı RNA virüsüdür.

Epidemiyoloji

Çoğunlukla *Ixodes* cinsi içinde yer alan keneler tarafından bulaştırılan bu enfeksiyon başta Orta Avrupa ve bazı İskandinav ülkeleri olmak üzere Türkiye'nin kuzeyinden geçen geniş bir kuşakta daha çok ormanlık bölgelerde görülmektedir (6,7,8,9).

Virüsün farklı coğrafi dağılım özellikleri gösteren 3 farklı alttipi vardır. Avrupa alttipi Orta, Doğu ve Kuzey Avrupa'nın kırsal ve ormanlık alanlarında *Ixodes ricinus* türü kenelerle bulaşır. Uzak Doğu alttipi, Rusya'nın Uzakdoğu'da kalan kısmı ve Çin, Japonya'nın ormanlık alanlarında *Ixodes persulcatus* türü kenelerle bulaşır. Sibiryaltipi ise Urallar, Sibiryaltipi, Rusya'nın Uzakdoğu'da kalan kısmı ve Kuzeydoğu Avrupa'nın bazı kısımlarında *Ixodes persulcatus* türü kenelerle bulaşır.

Keneler virüs ile bir kere enfekte olduklarında tüm yaşamları boyunca enfekte olarak kalırlar. Özellikle nimf ve erişkin şekilleri bulaştırıcıdır (6,7).

Orta Avrupa'da kene popülasyonu Nisan-Mayıs ve Eylül-Ekim ayları olmak üzere iki defa zirve yaparken, soğuk ve dağlık bölgelerde bir kez yaz aylarında zirve yapar. Bulaşma ile kene aktiviteleri arasında bağlantı vardır. Vakalar, genellikle endemik bölgelerde kene aktivitesinin yüksek olduğu mevsimlerde (Mart-Ekim ayları arası) görülür (6,8,10).

Virüsün doğadaki rezervuarı fareler, tarla fareleri gibi küçük kemirgenlerdir. Vektör Avrupa'da *Ixodes ricinus*; Asya ve Uzakdoğu, Kuzeydoğu Avrupa'da ise *Ixodes persulcatus* türü kenelerdir. Virüsün dolaşımında ise kenelere konaklık ederek çoğalmalarını destekleyen yabani ve evcil memeliler (tilki, yarasalar, tavşan, geyik, yaban domuzları, küçük ve büyükbaş evcil hayvanlar, köpekler, vb.) rol almaktadır (6,7).

İnsanlar tesadüfi ve çıkmaz konaklardır. Hastalığa çoğunlukla kırsal, tarımsal alanlarda veya ormanlık bölgelerde yaşayanlar, çalışanlar, balık tutma, kamp kurma gibi çeşitli aktivitelerde bulunanlar ve bu bölgelere seyahat edenlerde rastlanır (6,7,11).

Enfeksiyon, pastörize edilmemiş süt ve süt ürünleri (özellikle keçi sütü) ile de bulaşabilmektedir. Laboratuvar-kaynaklı enfeksiyon bildirilmiştir ve kesici-delici yaralanması veya aerosol inhalasyonu ile virüsün bulaşma riski hayli yüksektir. Teorik olarak mümkün olmakla birlikte, kişiden kişiye bulaş bildirilmemiştir (6,9).

Enfeksiyonun coğrafi yayılımı ve insidansı artış eğilimi göstermektedir. Avrupa'da son 30 yıl içinde insan vakalarındaki artışın %400'e ulaşmasında küresel ısınmanın da rolü olduğu düşünülmektedir (6).

Ülkemizde yapılan az sayıda seroprevalans çalışmasında antikör pozitiflik oranları %1.4-10.5 arasında bildirilmiş olmakla birlikte, henüz kanıtlanmış TBE vakası rapor edilmemiştir (1,2,3).

Özgül tedavisi olmayan bu enfeksiyondan korunmada aşılama en etkili yoldur. Bunun dışında kenelere karşı riskli bölgelere giderken açıkta kalan vücut kısımlarına kovucuların uygulanması, uzun kol ve paçalı giysilerin giyilmesi, paçaların çorap içlerine sokulması ve çoraplara insektisid uygulaması gibi önlemler alınabilir. Kırsal aktivitelerden sonra vücudun kene tutunması açısından kontrol edilmesi ve tutunan kene varsa uzaklaştırılması da önemlidir (6,10).

Klinik özellikleri

Hastalık virüs alındıktan sonraki ortalama 7 günde (2-28 gün) ortaya çıkmaktadır. Besinle bulaşmalarda inkübasyon süresi daha kısadır (ortalama 4 gün).

İnsandaki KKEV enfeksiyonlarının üçte ikisi asemptomatiktir.

Semptomatik vakalarda hastalık bifazik bir seyir gösterir. Yaklaşık 2-10 gün süren **birinci faz** viremi fazıdır ateş ($>38^{\circ}\text{C}$), halsizlik, baş ve kas ağrıları, bulantı gibi genel enfeksiyon bulgu ve belirtileri görülür. Trombositopeni ve lökopeni olabilir. Viremi fazını 1-33 gün süren bir sessiz dönem izler. Hastalığın **ikinci fazı** ise ateşin yeniden yükselmesi ($>38^{\circ}\text{C}$) ile başlar ve çeşitli nörolojik semptomlar (baş ağrısı, meningeal bulgular, ataksi, bilişsel işlevlerde bozukluk, bilinç düzeyi değişiklikleri, konfüzyon vb.) ortaya çıkar. Bu faz merkezi sinir sistemi tutulumu fazıdır; başlıca menenjit, meningoensefalit, meningoensefalomyelit, meningoensefaloradikülit veya spinal sinir paralizileri gelişebilir.

Gelişen enfeksiyonun klinik ağırlığı virüsün alttipine göre değişir (8,9,11).

Avrupa alttipi daha hafif seyirlidir ve hastaların %20-30'unda ikinci faz gözlenir. Mortalite hızı %0.5-2 civarındadır. Hastaların %10'a varan kısmında ciddi nörolojik sekel kalır. Çocuklarda hastalığın ikinci fazında sadece menenjit görülürken, erişkinlerde nörolojik tutulumun ağırlığı yaşa göre değişir. Kırk yaşın üzerindekielerde ensefalit, 60 yaşın üzerindekielerde mortalite ve uzun süreli sekel gelişme riski daha yüksektir.

Uzakdoğu alttipi daha ağır fakat monofazik bir hastalık tablosuna yol açar. Mortalite oranları %35'e kadar çıkabilir ve ciddi nörolojik sekel kalma riski daha yüksektir.

Sibirya alttipi hafif seyirli bir hastalığa yol açar. Mortalite hızı düşük (%1-3) olmakla birlikte, kronik ve uzun süreli enfeksiyonlara yol açma eğilimindedir.

Hastaların önemli bir kısmında çeşitli sekeller kalır; birinci yılın sonunda %40 hastada değişik bilişsel ve nöropsikiyatrik semptomlar, % 2-6 hastada kalıcı paraliziler görülür (6).

Laboratuvar tanısı

KKE'nin görünümleri karakteristik değildir ve tanıya yardımcı herhangi bir özellik göstermez. Tanı laboratuvar incelemeleri ile konmaktadır. KKE için laboratuvar incelemelerinin başlatılması ise -vakanın KKE için riskli bir bölgede bulunmuş olması gibi- başlıca **epidemiolojik bilgiye** dayanır; kene ısırması hikayesi olabilir, ancak kural değildir.

Özgül KKE IgM ve IgG antikorlarının serumda (*ki*, enfeksiyon için yeterli kanıt sağlar) veya BOS'da gösterilmesi tanı koydurucudur. Tercih edilen test, ELISA ile serumda özgül IgM ve IgG antikorlarının aranmasıdır. Tanıda ayrıca, BOS örneğinde özgül IgM ve IgG aranması için ELISA veya BOS ya da serumda KKE RNA'sının saptanması için rRT-PCR kullanılabilir.

Santral sinir sisteminin etkilendiğini gösteren belirtiler kene ısırmasından genellikle 2-4 hafta sonrasında ancak gözlemlendiğinden, hastaneye başvuru sırasında antikor testi hemen her zaman pozitifdir.

Gerçekte laboratuvar sonuçlarının KKE tedavisi üzerine etkisi yoktur; tanı daha ziyade, bir KKE virüs enfeksiyonunu özel tedavi gerekebileen diğere meningo-ensefalit nedenlerinden ayırt etmek için kullanışlıdır. Elbette, epidemiyolojik amaçlar için de bu bilgi önemlidir (6).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizma

Kene kaynaklı ensefalit virüsü (KKEV)

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

KKE virüsü Risk Grubu 3 olarak sınıflandırılan bir mikroorganizmadır. Laboratuvar kaynaklı enfeksiyon için yüksek risk vardır ve laboratuvar enfeksiyonları bildirilmiştir. KKE tanısı için; (i) hücre kültürü ve viral nötralizasyon testleri en az BGD3 laboratuvar şartlarında KKE aşısı ile aşılınmış ve immün yanıtın geliştiğı gösterilmiş personel tarafından yapılır; (ii) serolojik ve moleküler teknikler BGD2 laboratuvarlarda gerçekleştirilebilir; bu testleri çalışan personelin de aşılınması önerilir. Aerosol oluşturması muhtemel bütün işlemler kesinlikle sertifikalı bir sınıf-IIA BGK içinde yapılmalıdır.

Serum ayırma ve testlerin çalışılması sırasında **daima** eldiven giyilmelidir. Bütün biyogüvenlik düzeylerinde daima standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır (*bkz.* "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

Yüzey dezenfeksiyonu için %1'lik sodyum hipoklorit (çamaşır suyu), %0.5'lik sodyum dodesil sülfat veya %70'lik etanol kullanılabilir (9) (ayrıca *bkz.* "UMS, V-MT-11 Viral hemorajik ateşlerin mikrobiyolojik tanısı").

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Eğer klinisyen KKE'den şüpheleniyorsa, örnekler laboratuvara gönderilmeden önce hekim laboratuvar ile iletişim kurmalıdır.

KKE şüpheli örneklerin incelenmesinde görev alan tüm personel; (i) tekniklerin uygulanmasından önce amaçlanan bütün kullanımlar ile ilgili tam bir eğitim almış olmalı; (ii) kullanılan tekniklere tüm yönleriyle aşina olmalı; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Bu kurallar örnek kabulü dahil bütün tanımlama aşamalarında **kesici-delici** ve **aerosol önlemlerine** yüksek uyumu gerektirir. Laboratuvar personeli, muhtemel klinik semptomlarla ilgili bilgilendirilmeli herhangi bir semptom gelişimi halinde haber verilmesi zorunlu tutulmalıdır.

Hem güvenlik önlemlerine uyumun sağlanmasından hem de testlerin standart prosedürlere uygun yapılmasından ve tanının doğruluğı ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, Reaktif, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

KKE tanısı için örnek alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden edinilebilir. Aşağıda bazı önemli hususlara tekrar dikkat çekilmektedir:

- Serolojik testler veya nükleik asit analizleri için hastadan kan alınır.
 - Hastanın önceden aşılanmış veya profilaksi almış olup olmadığı bilgisi de, epidemiyolojik bilgi ile birlikte mutlaka laboratuvara iletilmelidir.
 - Serolojik testler için hastadan sarı ya da kırmızı kapaklı tüpe ~5 mL kan alınması yeterlidir. *Jel içermeyen kan tüpü* kullanılmış ise santrifüj sonrası *hemen serum* kısmı steril, vida kapaklı bir tüpe ayrılmalıdır.
 - Plazma için hastanın kanı EDTA içeren bir tüpe alınır.
 - BOS tanıda kullanılacak diğer önemli örnektir. BOS'un alındığı tüp, herhangi bir koruyucu konmadan laboratuvara gönderilir. 48 saat içinde teste alınamayacaksa -70°C 'ye kaldırılır; kuru buzda gönderilir.
- NOT: Taşıma şartları için ayrıca bkz. sayfa 9, Bölüm 3.4.

Reaktif / Kit

- ELISA IgM, IgG kitleri; (IFA yapılacaksa) IFA kitleri
- PCR kit ve reaktifleri

Diğer gereç, donanım

- ELISA okuyucu, yıkayıcı
- RT-PCR donanımı ve uygun PCR alanları

2.4. Kalite kontrol

- Tanı için kullanılan tüm testlerin "validasyon" ve "verifikasyonları" yapılmış olmalıdır. Serolojik her çalışmada "iç kalite kontrolü" için sonucu önceden bilinen standart IgM ve IgG pozitif serum örnekleri kullanılmalıdır.
- Laboratuvar dış kalite kontrol (DKK) çalışmasına katılıyor olmalıdır. DKK programları yoksa aynı testleri aynı yöntemlerle yapan en az bir laboratuvarla karşılaştırma yapılarak dış kalite kontrolü sağlanmalıdır.

3 KKE tanısında kullanılan teknikler

- Uygulanacak tanı teknikleri, inceleme örneklerinin hastalığın hangi döneminde alınmış olduğuna göre farklılık gösterir (12,13,14,15).
- **Birinci** fazda viremi olduğu halde, serumda antikorlar saptanmaz. **İkinci** fazda ise genellikle antikorlar pozitifleşmiştir, ancak çok ağır vakalar dışında viremi sonlanmıştır.
- Hastalar, sağlık kurumlarına genellikle ikinci fazda başvurur.

3.1. Seroloji

- KKE'nin tanısı **pratikte** ikinci fazın başından itibaren pozitifleşmeye başlayan antikörlerin ELISA ya da IFA yöntemleri ile saptanmasına dayanmaktadır. Bu testlerde antijen olarak saflaştırılmış virionlar ya da virüsün rekombinant teknoloji ile elde edilmiş prM ve E proteinlerini içeren virüs benzeri partiküller (Sp-ELISA) kullanılmaktadır.
- Sp-IgG ve Sp-IgM ELISA'lar rekombinant teknoloji ile elde edilmelerine rağmen doğal proteinlerle benzer üçboyutlu yapıya sahip olmaları, RNA içermemeleri ve bu nedenle daha güvenli olmaları ve özgüllüklerinin nötralizasyon testi ile benzer olması gibi nedenlerle rutinde tercih edilmelidir.
- Çapraz reaktif antikörler ya da heterofil antikörlere bağlı yalancı pozitifliklerden kaçınmak için ise IgM sınıfı antikörlerin saptanmasında 'immuncapture' formatına sahip ELISA kitleri tercih edilmelidir.
- Birinci fazın sonunda antikörler pozitifleşmeye başlayarak hızla yükselir ve hastalığın ikinci fazında antikörler çoğunlukla pozitifdir. IgM sınıfı antikörler 2-6 ay boyunca pozitif kalabilir.
- İntratekal antikör yapımı serumda antikörlerin pozitifleşmesinden 1-2 gün sonra başlar. BOS'ta nörolojik semptomların ortaya çıktığı sırada vakaların sadece %50'sinde özgül antikörler pozitif iken 10 gün sonra vakaların hemen hemen tamamında pozitif bulunur.
- Tanı için tek başına IgM antikör pozitiflikleri yeterli değildir. İki-dört hafta sonra alınacak ikinci bir örnekle IgG antikörlerinin geliştiğinin gösterilmesi gerekir.
- Profilaksi amacıyla yapılan hiperimmün serum uygulamalarına rağmen gelişen enfeksiyonlarda antikör yanıtları gecikebilir ya da başlangıçta zayıf olabilir. Bu durumda test ikinci örnek alınarak tekrarlanmalıdır.
- Aşıya rağmen gelişen enfeksiyonlarda önce IgG antikörleri pozitifleşir. Bu durumda da ikinci örnek alınarak IgM antikörlerinin pozitifleşmesi, IgG antikörlerinde 4 kat titre artışı ya da intratekal antikör yapımı olup olmadığının araştırılması gerekir (12,15).
- Diğer flavivirüslerin dolaşımında olduğu bölgelerde ya da bazı flavivirüslere karşı aşılama durumunda KKEV enfeksiyonlarının doğrulanması için nötralizasyon testlerine ya da intratekal antikörlerin saptanması yoluna başvurulabilir.
- Seroprevalans çalışmalarında çapraz reaktivitelerden dolayı yalancı yüksek pozitiflikler elde edilebildiğinden pozitif bulunan örneklerle nötralizasyon testlerinin uygulanması gerekir (12,15).

3.2. Moleküler tanı

- Viremi hastalığın birinci fazı ile sınırlıdır ve hastalar çoğunlukla ikinci fazda başvururlar. Bu nedenle nükleik asit tabanlı incelemelerin hastalığın erken dönemi hariç klinikte pek kullanılabilirliği yoktur.
- Ancak bazı ağır vakalarda viremi daha uzun sürebilir ve virüs, beyin dokusu ve başka dokularda rRT-PCR yöntemi ile saptanabilir.

- KKEV RNA'sının saptanması tanının doğrulanması ve diğer heterolog flavivirüslere bağlı yalancı pozitifliklerin dışlanmasında kullanılabilir.
- KKEV, %15-20 dolayında genomik değişkenlik gösterdiğinden virüsün her üç alttipini benzer duyarlılıkta saptayıp ayırmalarının yapılmasına olanak verecek PCR formatlarının tasarlanmasında güçlüklerle karşılaşmaktadır.
- Kalite kontrol çalışmaları; iki aşamalı ('nested') PCR'da tek aşamalı PCR'a göre yalancı pozitifliğin 2 kat daha yüksek olduğunu ve tek aşamalı PCR testlerine daha fazla RNA konularak da duyarlılığın arttırılabileceğini göstermiştir. Dolayısıyla tek aşamalı PCR ya da gerçek-zamanlı PCR formatları tercih edilmelidir. Ayrıca PCR'ın tüm aşamalarının kontrol edilebilmesi için örnekler ekstraksiyon aşamasından önce internal kontroller eklenmelidir.
- Virüs RNA'sının PCR ile saptanmasına yönelik bir kalite kontrol çalışmasında en tutarlı sonuçlar 3' NCR ('non-coding region') bölgesinden tasarlanmış prob ve primerlerin kullanıldığı bir gerçek-zamanlı PCR yöntemini uygulayan laboratuvarlardan bildirilmiştir. Aynı çalışmada, nükleik asit ekstraksiyonunda ticari kitlerin kullanılmasının da daha başarılı olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, NS1 bölgesini hedef alan prob ve primerlerin kullanıldığı bir gerçek-zamanlı PCR ile de her üç alttipinin benzer bir duyarlılıkla saptanabildiği bildirilmiştir (12,14).

3.3. Virüs kültürü

- Vireminin hastalığın ilk fazı ile sınırlı olmasından dolayı, virüs kültürünün rutin tanıya yönelik incelemeler arasında pek yeri yoktur. Ancak virüs kültürü, 'rapid fluorescent focus inhibition test' (RFFIT) gibi nötralizasyon testleri için gerekli olabilir (11,12).
- Virüs embriyonlu yumurta ve yeni doğmuş farelerin yanı sıra domuz böbrek (PS) hücre kültürleri gibi çeşitli hücre hatlarında üretilebilir

3.4. Saklama, Referans merkeze gönderme

- Serolojik tanı için laboratuvara ulaşma süresi >48 saat ise, serum (veya plazma) kanın alındığı gün santrifüj sonrası steril bir tüpe ayrılmalıdır; bu şekilde en fazla 5 güne kadar +4°C'de saklanabilir.
- Nükleik asit analizi için kan alındıktan sonraki <6 saatte laboratuvara ulaşamayacaksa plazma (veya serum) *steril nükleaz-ıçermeyen* bir tüpe, uygun steril filtrelili-pipet ucu kullanılarak ayrılmalı; -70°C'ye kaldırılmalı; kuru buzda gönderilmelidir. Bu örnek serolojik testler için de kullanılabilir.
- KKE kültürleri "Kategori A, Enfeksiyöz Madde" olarak sınıflanır ve şüpheli kültürler, eğer ileri incelemeler için ulusal veya uluslararası bir referans laboratuvara gönderiliyorsa *paketlenme* kesinlikle "Kategori A" şartlarını karşılayacak şekilde yapılmış olmalıdır. KKE şüpheli klinik örnekler de daima enfeksiyöz madde taşıma şartlarını karşılayacak şekilde *paketlenmeli* ve *taşınmalıdır* (16). Kuru buzda taşıma hususları dahil, ayrıntılı bilgi için ilgili UMS belgesine (UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi) başvurulması önerilir.

4 Sonuçların değerlendirilmesi ve bildirim

- Serolojik inceleme sonuçlarının değerlendirilebilmesi için hastanın aşılama durumu veya profilaksi alıp almadığı bilgisinin mutlaka laboratuvara iletilmiş olması gereklidir.
- ELISA ile serum incelemelerinde elde edilen bulguların yorumu için olasılıklar Tablo 1’de özetlenmektedir:

Tablo 1. Serum örneklerinde KKE antikorlarının değerlendirilmesi

Serum örneğinde, eş zamanlı olarak		Yorum
IgM	IgG	
+	+	KKEV enfeksiyonu için yeterli kanıttır; “kesin tanı” konur. <i>NOT: Aşılama sonrası IgM sınıfı antikorlar 2-6 ay boyunca pozitif kalabilir; bu durumun dışlanması gerekir.</i>
-	-	Anamnez ve epidemiyolojik verilere göre bir süre sonra kontrol örneği alınarak testin tekrar edilmesi gerekebilir.
+	-	KKEV enfeksiyonu şüphesi vardır; kontrol örneği alınarak testin tekrar edilmesi gerekir. <i>NOT: Standart vaka tanımına göre daha önce aşılanmamış semptomatik bir kişide IgM’in pozitif bulunması “kesin tanı” bulgusu kabul edilmektedir. Ancak, yine de test ikinci bir serum örneği ile tekrar edilmelidir.</i>
-	+	Bağışıklığı gösterir; geçirilmiş enfeksiyona, aşılama, pasif bağışıklama ya da çapraz reaksiyona bağlı olabilir. <i>NOT: Aşıya rağmen gelişen enfeksiyonlarda önce IgG yanıtının gelişebileceği, IgM yanıtının da gecikebileceği hatırlanmalıdır. Bu nedenle semptomatik vakalarda kontrol örneği alınarak testin tekrar edilmesi ve IgM yanıtı ya da IgG titrelerinde artış olup olmadığının izlenmesi gerekir.</i>

- BOS’ta özgül antikorlar başlangıç döneminde hastaların %50 kadarında gösterilebilirken, 10 gün sonra hemen hepsinde BOS antikorları pozitif olur. BOS’ta özgül IgM veya IgG’nin saptanması akut enfeksiyon lehine yorumlanır ve “**kesin tanı**” bulgusudur.
- BOS veya serumda RT-PCR ile KKEV RNA’sının saptanması akut enfeksiyon için “**kesin tanı**” bulgusudur. PCR’ın birinci (*viremi*) fazdan sonra pozitif bulunma olasılığının düşeceği hatırlanmalıdır.
- KKE’nin bildirim zorunludur (4,5). Bildirim esasen klinisyenin sorumluluğu olmakla birlikte, yine de, yukarıda belirtilen sonuçlardan biri elde edildiği takdirde vaka araştırması süreçlerinin hızla başlatılabilmesi için laboratuvarın ilgili birimleri haberdar etmesi (ör., telefon ile) önerilir.

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Diğer flavivirüslere bağlı çapraz reaktiviteler IgG antikor testlerinde yalancı pozitifliklere yol açabilir. Antikor titrelerinde 2-4 hafta sonrasında 4 kat artışın gösterilmesi gerekir.
- Aşıya bağlı antikor testi pozitifliklerini dışlamak için aşılama öyküsünün alınması gerekir.

6 Referans Laboratuvar

Adres

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal Arbovirüs ve Viral Zoonotik Hastalıklar Referans Laboratuvarı
Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55, F Blok 1.kat
06100 – Sıhhiye/ANKARA

Tel: 0312 565 5631 / 5547

e-mail: viralzoonoz@thsk.gov.tr;

Faks: 0312 565 5569;

www.thsk.gov.tr

Görev çerçevesi

Bildirimi zorunlu olan; viral hemorajik ateş sendromları – Kırım-Kongo kanamalı ateşi (KKKA), hantavirüs enfeksiyonları, Dengue ateşi, sarı humma (Yellow fever), Batı Nil virüsü (West Nile Virus), enfeksiyonu, Chikungunya ateşi ve kene-kaynaklı (Tick-borne) ensefalit (TBE), ve

Bildirimi zorunlu olmayan; tatarcık humması (Sand-fly fever; SVF) için konvansiyonel ve/veya moleküler tanı, doğrulama; uluslararası referans merkezlerle işbirliği ve moleküler epidemiyolojik tiplendirme.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu belge (Kene-kaynaklı Ensefalitin Mikrobiyolojik Tanısı) ayrıca aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve bilgi için incelenmeleri önerilir:

UMS, V-MT-11	Viral hemorajik ateşlerin mikrobiyolojik tanısı
UMS, SY-03	Akut nörolojik sendrom
UMS, GEN-OY-01	Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Ergünay K, Saygan MB, Aydoğan S, Litzba N, Sener B, et al. Confirmed exposure to tick-borne encephalitis virus and probable human cases of tick-borne encephalitis in Central/Northern Anatolia, Turkey. *Zoonoses Public Health* 2011;58(3):220-7
- 2 Uyar Y, Akçalı A, Çarhan A, Özkaya E, Ertek E. Türkiye'de kene ısırığı öykülü olgularda tick-borne encephalitis virüsünün seroprevalansı. *Türk Hijyen Den Biyol Derg* 2007;64(2):21-25
- 3 Ergunay K, Ozer N, Us D, Ozkul A, Simsek F, Kaynas S, Ustacelebi S. Seroprevalence of West Nile virus and tick-borne encephalitis virus in southeastern Turkey: first evidence for tick-borne encephalitis virus infections. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2007;7(2):157-61.
- 4 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 5 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014).
- 6 Tick borne encephalitis. http://www.tbe-info.com/upload/medialibrary/Monograph_TBE.pdf (son erişim tarihi: 30.01.2014).
- 7 Kunz C, Heinz FX. Tick-borne encephalitis. *Vaccine* 2003;21(Suppl1):1-2
- 8 Haglund M and Günther G. Tick-borne encephalitis-pathogenesis, clinical course and long-term follow-up. *Vaccine*. 2003;21(Suppl 1):11-18
- 9 Niedrig M, Aberle S, Schädler R. Tick borne encephalitis.
http://www.enivd.de/FS/fs_encdiseases.htm (son erişim tarihi: 30.01.2014)
- 10 Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) RKI-Ratgeber für Ärzte.
http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_FSME.html (son erişim tarihi: 30.01.2014).
- 11 Lindquist L, Vapalahti O. Tick-borne encephalitis. *The Lancet* 2008;371(9627):1861-1871
- 12 Holzmann H. Diagnosis of tick-borne encephalitis. *Vaccine* 2003;21(Suppl1):50-55
- 13 Sonnenberg K, Niedrig M, Steinhagen K, Rohwäder E, Meyer W, Schlumberger W, Müller-Kunert E, Stöcker W. State-of-the-art serological techniques for detection of antibodies against tick-borne encephalitis virus. *Int J Med Microbiol* 2004;293(Suppl37):148-51
- 14 Donoso Mantke O, Aberle SW, Avšič-Županc T, Labuda M, Niedrig M. Quality control assessment for the PCR diagnosis of tick borne encephalitis virus infections. *J Clin Virol* 2007;38(1):73-7. Epub 27 Oct 2006
- 15 Niedrig M, Avšič T, Aberle SW, Ferenczi E, Labuda M et al. Quality control assessment for the serological diagnosis of tick borne encephalitis virus infections. *J Clin Virol* 2007;38:260-264 Epub 29 Jan 2007
- 16 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

SARS ve MERS'in (SARS-coronavirus [SARS-CoV] ve MERS-coronavirus [MERS-CoV]) **Mikrobiyolojik Tanısı**

Hazırlayan Birim	Klinik Viroloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Viroloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	V-MT-18
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik
----------	-------	------------

--	--	--

--	--	--

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
Virüsün özellikleri	3
Epidemiyolojik önemi	3
Klinik özellikler.....	4
Laboratuvar tanısı.....	5
TEKNİK BİLGİLER	6
1 Hedef mikroorganizmalar	6
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	6
3 SARS-CoV ve MERS-Cov tanısında kullanılan teknikler	8
4 Sonuçların değerlendirilmesi ve bildirim	11
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	11
6 Referans Laboratuvar	11
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	12
KAYNAKLAR.....	12

Kapsam ve Amaç

Coronavirüsler insanda solunum yolu enfeksiyonu yapan etkenler arasındadır. Son yıllarda, bu ailede yer alan ve yeni tanımlanan SARS-Coronavirus (SARS-CoV) ve MERS-Coronavirus (MERS-CoV) salgınlar ve ölümcül enfeksiyonlara yol açmaktadır. SARS salgını sırasında ölümlerle sonuçlanan laboratuvar kaynaklı enfeksiyonlar bildirilmiştir (1,2).

Bu etkenlere bağlı enfeksiyonlar ülkemizde bildiri zorunlu hastalıklardır (3,4). Yüksek riskli patojenler olmaları nedeniyle tanı sadece yetkilendirilmiş merkezlerde konur. Şüpheli durumlarda bir klinik laboratuvar büyük olasılıkla yatan hastadan örneklerin alınması ve Referans laboratuvara gönderilmesinde rol üstlenecektir. Bu nedenle bu UMS belgesinde SARS-CoV ve MERS-CoV enfeksiyonlarının tanısında geçerli yöntemler, asgari laboratuvar şartları ve sorumluluklar ile ilgili bilgi verilmesi hedeflenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

ARDS	Akut respiratuvar distres sendromu
MERS	Middle East Respiratory Syndrome (Ortadoğu solunum yetmezliği sendromu)
rRT-PCR	real time reverse transkriptaz PCR
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome (Ciddi akut solunum yetmezliği sendromu)
NF/OF	nazofaringeal (sürüntü) / orofaringeal (sürüntü)

Genel Bilgi

Virüsün özellikleri

Coronavirüs'ler, *Coronaviridae* ailesinde yer alan zarflı, pozitif polariteli RNA virüsleridir. İnsan ve hayvanlarda solunum yolu ve gastrointestinal sisteme yerleşirler. İnsanda üst ve alt solunum yolu enfeksiyonları yaparlar. Hayvanlarda pek çok CoV tanımlanmıştır ve genellikle bu virüsler başka türlere geçmezler. Bugüne kadar insanda tanımlanmış Coronavirüs'lerin ise 6 tipi bulunmaktadır. Bunlar; HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HKU1-CoV2003, SARS-CoV ve MERS-CoV'dir (1,2,5,6,7).

Epidemiyolojik önemi

Coronavirüs'lerin etken olduğu, SARS ve MERS, akut viral solunum yolu enfeksiyonlarıdır. Her iki virüsün de zoonotik olduğu düşünülmektedir.

İlk olarak 12 Mart 2003 tarihinde DSÖ, hem kişiden kişiye hem de uluslararası hava taşımacılığı ile hızla yayılan ve yeni öldürücü bir enfeksiyon hastalığı olarak tanımlanmış ciddi akut solunum yetmezliği sendromu (SARS) için küresel alarmlarda bulunmuştur (1). İlk enfekte olan bireylerin çoğunun canlı hayvan ticareti ile ilgili bulunması nedeniyle, etkenin Çin'in Guangdong şehrindeki yabani hayvan pazarlarından yayıldığı tahmin edilmektedir. Kısa süre içinde virüsün izolasyonu ve gen analizlerinin yapılmasıyla daha önce insanlarda tanımlanmamış yeni bir CoV ile karşı karşıya olduğu anlaşılmış ve SARS-CoV olarak adlandırılmıştır. Toplumda yayılmanın insandan-insana damlacık enfeksiyonu yoluyla **yakın temas** (hasta bireye yaklaşık bir metre mesafede bulunmak ve öksürük-aksırık esnasında solunum yolu ile saçılan damlacıklara maruz kalmak, öpüşmek ve sarılmak) sonucu olduğu ya da hasta bireyin yaydığı damlacıklarla enfekte olmuş eşyalara, yüzeylere dokunma ve sonra ellerin ağza, göze sürülmesi veya hasta kişinin kullandığı kaplardan yeme-içme ile taşındığı düşünülmektedir (1,2).

DSÖ'nün raporlarına göre, Çin'de ortaya çıkan salgın 6 ay içinde 29 ülkeye yayılmış; Kasım 2002'den Temmuz 2003'e kadar 8.098 kişide enfeksiyon gelişmiş ve 774'ü ölümlü sonuçlanmıştır. Bu salgının dünya genelinde 100 milyar dolarlık ekonomik kayba neden olduğu hesaplanmaktadır. Salgın, halk sağlığı müdahalesiyle ilgili önemli dersler çıkarılmasına da yol açmıştır. SARS salgınının sonuçlarından biri de, hastane personelinin yüksek oranda etkilenmesidir. Sağlık çalışanları ve laboratuvar çalışanları enfeksiyonun yayılmasına aracılık etmiş ya da SARS'tan hayatını kaybetmişlerdir. SARS salgını dünya genelinde hem sağlık çalışanları hem de laboratuvar personeli için güvenlik ve kişisel koruyucu donanım (KKD) kullanımının önemi yoğun bir şekilde gündeme taşınmış, kurallar gözden geçirilmiştir. Salgının son dönemine doğru KKD kullanımının hastane kaynaklı enfeksiyon sıklığını belirgin olarak azalttığı ve salgın yönetiminde önemli bir rol oynadığı anlaşılmıştır (1,2).

2004'ten bu yana dünyada insan SARS vakası bildirilmemiştir (1,2).

2012 yılında Suudi Arabistan'da tanımlanan yeni bir Coronavirus'un (MERS-CoV) insanlarda SARS benzeri hastalığa yol açtığı saptanmıştır. Bugüne kadar olguların çoğu Orta Doğu ülkelerinde yaşayan veya bu bölgeyi ziyaret etmiş kişiler arasında saptanmıştır. Enfeksiyonun bu kişilerden aile üyelerine ve yakın temastaki sağlık personeline de bulaşabildiği gözlenmiştir. Genomik ve serolojik çalışmalar MERS-CoV'un yarasa ve develer ile ilişkili olabileceğini göstermiştir. Ancak insana hangi yolla bulaştığı kesin olarak tanımlanamamıştır (5,6,7).

Klinik özellikler

SARS ve MERS'in önemi, diğer Coronavirus enfeksiyonlarından farklı olarak, hastalığın ölümcül seyir gösterebilmesinden kaynaklanmaktadır. Kuluçka süresi 2-10 gündür. MERS için bu sürenin 14 güne kadar uzayabildiği düşünülmektedir.

SARS'da başlangıç semptomları baş ağrısı, vücut ağrıları ve halsizlik gibi genel belirtilerdir ve hemen her zaman 38°C'nin üzerinde ateş vardır. Bazı bireylerde üst solunum yolu semptomları saptanabilir. Vakaların %10-20'sinde ishal görülebilir. İlk semptomları takiben hipoksi veya hipoksiye ilerleyen nefes darlığı gelişir. Hastalığın 7-10. gününde tablo radyolojik olarak doğrulanmış pnömoniye ilerler (1,2).

MERS kliniğinde de çoğu olgu, hastaneye yatmayı gerektirecek şiddetli akut solunum yolu belirtileri gösterir. Solunum sistemi dışında saptanabilen bulgular; ishal ve diğer sindirim sistemi belirtileri, böbrek yetmezliği, koagülopati, perikardit ve ARDS'dir. İmmün yetmezlikli olgularda atipik gidiş olabilir. Bildirilmiş olguların çoğu erişkin yaş grubunda olup altta yatan bir hastalık mevcuttur. Son zamanlarda hastalığın hafif semptomlarla ortaya çıktığı vakalar, hatta asemptomatik vakalar da bildirilmiştir (5,6,7).

Her iki etkenin neden olduğu hastalık tablosu da klinik olarak benzer tablolardan ayırt edilemediğinde tanı laboratuvar incelemeleri ile konabilir.

Bir başka nedenle açıklanamayan, ateş veya ateş öyküsü olan bir kişide, öksürük veya nefes darlığı veya solunum yetmezliği varlığında radyolojik olarak pnömoni ve/veya radyolojik olarak ARDS bulgularının tespit edilmesi, SARS enfeksiyonunu düşündürür.

MERS-CoV enfeksiyonundan ise; akut ciddi solunum yetmezliği ve/veya akciğer infiltrasyonları olan bir kişide, son 2 hafta içinde vaka görülen ülkelere seyahat öyküsü ve/veya yakın temas öyküsü bulunması halinde şüphelenilir.

Laboratuvar tanısı

Tanıda başlıca serolojik testler, virüs izolasyonu ve nükleik asit amplifikasyonu (PCR) temelli testler kullanılmaktadır (8,9,10).

Öncelikle her iki hastalık için de, bir vakada klinik ve epidemiyolojik özellikler uyumlu olmadıkça ya da şüpheli SARS veya MERS'e işaret etmiyorsa testlerin kullanılmaması gerektiği önemle vurgulanmaktadır (9,10).

2004 yılından bu yana SARS vakası görülmemekle birlikte laboratuvar tanısı için hayli kapsamlı rehberler mevcuttur. SARS tanısında, hastalığın yeniden görülmesi olasılığına karşın bir "epidemik hazırlıklılık" yaklaşımı önem kazanmaktadır (1,2).

SARS-CoV tanısı için pek çok yetkin tanı yöntemi geliştirilmiştir, ancak genellikle hastalığın erken döneminde kesin tanı konmasında yetersiz kalabilmektedirler. Mevcut tekniklerin duyarlılıkları anlamlı derecede yüksek değilse de, farklı örnek tipleri ve sık aralarla örnek alınarak incelenmesi, kaliteli örnek temini ve örneklerin kaliteli işlenmesi ile duyarlılık artırılabilir. Sonuçlar PCR ve serolojik testler ile yalancı pozitiflik ve yalancı negatiflikler görülebileceği göz önünde tutularak değerlendirilmelidir. Diğer solunum virüsleri ile SARS benzeri klinik tablolar gelişebileceğinden hızla ayırıcı tanıya gidilebilmesi ayrıca önem kazanmaktadır (bkz. "UMS, SY-04 Akut respiratuvar sendrom").

MERS-CoV tanısı için kaynaklar hali hazırda elde bulunan tanı tekniklerine oldukça ihtiyatlı yaklaşmaktadırlar. Doğrulayıcı laboratuvar testi olarak PCR ile en az 2 özgül genomik hedef için pozitif sonuç elde edilmesi veya sekanslama ile birlikte tek bir genomik hedef pozitifliği kriter olarak kabul edilmektedir (8).

Tek bir genomik hedef için pozitif PCR test sonucu, performansına dair eldeki verilerin sınırlı olduğu bir teknik ile pozitif sonuç ya da yetersiz örnekten negatif bir test sonucu değerlendirmeyi zorlaştırmaktadır. Böyle durumlarda klinik ve epidemiyolojik bulguları ile birlikte vakanın "olası vaka" olarak değerlendirilmesi akla yakın bulunmaktadır (11).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizmalar

SARS-CoV, MERS-CoV

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

SARS-CoV Risk Grubu 3 mikroorganizma olarak sınıflandırılmaktadır. 2003 salgını sırasında Singapur, Tayvan ve Çin'de laboratuvar kaynaklı SARS vakaları kaydedilmiştir (12,13). MERS-CoV için, henüz tüm patojenik potansiyelinin ve bulaş dinamiklerinin tanımlanmadığı belirtilmektedir (14). Mevcut bilgilere göre şüpheli örnekler ile laboratuvar çalışmasının Risk Grubu 3 mikroorganizma gibi değerlendirilerek yürütülmesi önerilmektedir.

SARS-CoV ve MERS-CoV enfeksiyonlarının tanısı için şu laboratuvar güvenliği kriterleri dikkate alınmalıdır: (i) serolojik ve moleküler teknikler BGD2 laboratuvarlarda gerçekleştirilebilir; (ii) hücre kültürleri BGD3 laboratuvarlarda, BGD3 pratiği ile gerçekleştirilmelidir; (iii) şüpheli durumlarda hayvan incelemeleri asgari hayvan-BGD3 laboratuvar şartlarında yapılmalıdır. Potansiyel enfeksiyöz klinik örnekler BGD3 laboratuvarında saklanmalı; eğer bu mümkün olamıyorsa BGD2 laboratuvarında erişim kısıtlaması getirilerek saklanmalıdır. Bütün aerosol oluşturması muhtemel işlemler sertifikalı bir sınıf-IIA BGK içinde yapılmalı, gerekli durumlarda HEPA filtreli solunum maskeleri kullanılmalıdır. Kontamine atıklar laboratuvar içinde dekontamine edildikten sonra atılmalıdır (14,15).

Serum ayırma ve testlerin çalışılması sırasında **daima** eldiven giyilmelidir. Bütün biyogüvenlik düzeylerinde daima standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır (*bkz.* "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

Güvenlik uyarısı! Solunum yolundan örnek almak, enfeksiyöz damlacıklar (aerosol) oluşturan bir işlem olması ve hastaya çok yakın mesafede durulmasını gerektirmesi nedeniyle tehlikelidir. Bu nedenle tam kişisel koruyucu donanım (KKD) kullanılması gereklidir.

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Eğer klinisyen SARS veya MERS'den şüpheleniyorsa, örnekler laboratuvara gönderilmeden önce hekim kesinlikle laboratuvar ile iletişim kurmalıdır.

İnfluenza şüpheli örneklerin tanısında görev alan tüm personel; (i) tekniklerin uygulanmasından önce amaçlanan bütün kullanımlar ile ilgili tam bir eğitim almış olmalı; (ii) kullanılan tekniklere tüm yönleriyle aşina olmalı; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır. Bu kurallar örnek kabulü dahil bütün tanımlama aşamalarında **aerosol** ve **kesici delici** önlemlerine yüksek uyum gerektirir. Hem güvenlik önlemlerine uyumun sağlanmasından hem de testlerin standart prosedürlere uygun yapılmasından ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, Reaktif, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

SARS için örnek alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden edinilebilir.

- SARS ve MERS tanısında başlıca 2 amaç için örnekler alınır (9,16):
 - (a) RT-PCR testi için solunum yolu örnekleri, dışkı ve kan
 - (b) Serolojik inceleme için serum/kan
- MERS-CoV için veriler sınırlı olmakla beraber viral yük daha yüksek olduğu için öncelikle **alt solunum yolu** örnekleri tercih edilir. MERS-CoV için öncelikli örnekler aşağıda verilmiştir.
 - (a) Alt solunum yolu örnekleri - ETA, BAL, plevral ponksiyon sıvısı, balgam (ayaktan hastalarda), akciğer biyopsisi, post-mortem akciğer veya trakeal doku
 - (b) Alınabilecek diğer (üst) solunum yolu örnekleri - nazofaringeal aspirat, yıkama sıvısı veya sürüntü, burun ve boğaz sürüntüsü

NOT 1: Pek çok -izolasyon şansı semptomlar başladıktan sonraki 72 saat içinde yüksek olan- solunum yolu patojeninin aksine, SARS-CoV (ve tahminen MERS-CoV) için kültür veya PCR ile virüsün gösterilmesi olasılığı daha sonraki dönemlerde alınan örneklerde daha yüksektir.

NOT 2: Aspirat ve balgam örnekleri en az 2-3 mL olacak şekilde steril, vida kapaklı ve sızdırmaz kaplara alınmalıdır. Sürüntü örnekleri (eküvyonlar) ise 2-3 mL VTM içeren tüpe konmalıdır. Biyopsi/otopsi materyali VTM veya steril SF içerisine alınmalı ve gönderilmelidir.

- Ayrıca süreyans ve araştırma amacıyla şu örneklerin alınması önerilir:
 - (a) Tam kan (plazma) – EDTA içeren kan tüpüne ~10 mL kan alınmalı, dondurulmadan +4°C derecede saklanıp yollanmalıdır.
 - (b) Dışkı örneği – MERS-CoV tanısında önemli bir örnektir. 2-5 g dışkı örneği sızdırmaz, vida kapaklı bir kaba alınıp gönderilir.
 - (c) Serum (RT-PCR için) – hastalığın ilk haftası içinde, tercihen 3-4. günlerde alınmalıdır.
 - (d) Serum (serolojik incelemeler için) - akut ve konvalesan fazda olmak üzere iki kez alınır. Akut faz örneği belirtilerin başlangıcından ~7 gün sonra; konvalesan örnek 2-3 hafta sonra alınır. Eğer ancak tek serum örneği alınabilecekse, belirtilerin başlangıcından sonraki 14. günde veya sonrasında alınmalıdır.
- **Taşıma şartları** – Örnekleri laboratuvara gönderme şartları için bkz. sayfa 10, Bölüm "3.3 Saklama, Referans merkeze gönderme".

ÖNEMLİ NOT 1: Her iki enfeksiyon için de hastalığın seyri sırasında çoklu örnekleme (ör., solunum yolu örneği, dışkı ve serumun aynı anda alınması) veya bir örneğin sık aralıklarla (ör., 2 günde bir) alınıp gönderilmesi tanı olasılığını yükseltmektedir (2,9,15,16).

Buna göre RT-PCR için; 1. haftada NF+OF+serum/plazma örnekleri; 2. haftadan itibaren ise NF+OF+dışkı örnekleri gönderilebilir (16).

Besiyeri / Reaktif

- SARS-CoV ve MERS-CoV için hücre kültürü yapılabilir. Ancak duyarlılık, RT-PCR'dan daha düşük olduğu ve BGD3 laboratuvar koşulları gerektirdiği için rutin tanıda kullanılması önerilmez.
- Moleküler tanı reaktifleri, RT-PCR kiti - Piyasada hazır DNA izolasyon ve PCR kitleri mevcuttur.

Viral nükleik asit ekstraksiyonu için *laboratuvar yapımı* yöntemler kullanılabilir.

Laboratuvar yapımı PCR testi kullanılacak ise polimeraz enzimi, tampon solüsyonlar, primerler, nükleotidler, agaroz jel, DNA boyaları temin edilmelidir. rRT-PCR yöntemi kullanılacak ise yöntemeye uygun probler veya boyalar da gereklidir.

Diğer gereç, donanım

Moleküler testler için;

- En az üç ayrı oda - Nükleik asit ekstraksiyonu, PCR karışımının hazırlanması, amplifikasyonun ve sonuç gözetiminin yapılabileceği ayrı odalar. İdeal olarak PCR karışımı hazırlama odası (temiz oda) pozitif basınçlı, agaroz jel elektroforezi yapılan oda (kirli oda) negatif basınçlı havalandırmaya sahip olmalıdır.
- Donanım – biyogüvenlik kabini, santrifüj, soğutmalı mikrosantrifüj, hassas terazi, vorteks, su banyosu, yatay çalkalayıcı, PCR ısı döngü cihazı (gerçek zamanlı veya geleneksel), mikrodalga fırın, jel görüntüleme sistemi, elektroforez ünitesi vb.

2.4. Kalite kontrol

- İç kalite kontrol amacıyla, araştırılacak koronavirüs için pozitif ve negatif kontroller sağlanmalı ve her çalışmada hasta örnekleri ile birlikte testin tüm basamaklarına dahil edilmelidir. Uluslararası ve/veya ulusal referans laboratuvarlardan elde edilebilir.
- Laboratuvarda kullanılan teknik/tekniklere uygun ulusal ve/veya uluslararası dış kalite kontrol programlarına yılda en az bir kez katılım sağlanmalıdır.

3 SARS-CoV ve MERS-Cov tanısında kullanılan teknikler

3.1. Tanıda genel yaklaşım

- Tanıda alt solunum yolu örnekleri öncelikle tercih edilse de olabildiğince çeşitli örnekten ve hastalığın farklı dönemlerinde alınmış örneklerden çalışılması önemle tavsiye edilmektedir. NF / OF örnekleri, serum ve dışkı da mutlaka incelenmesi gereken örnekler arasındadır.

- Klinik örneklerin yaygın solunum patojenleri için de moleküler ya da antijen saptama yöntemleri (viral kültür değil) kullanılarak test edilmesi önemle tavsiye edilir. Yaygın solunum yolu patojenleri ile kastedilenler; 1) influenza A, influenza B, solunum sinsisyal virüsü, insan metapnömovirüs, insan parainfluenza virüs, adenovirüs, insan rinovirüsü ve diğer solunum yolu virüslerini, ve 2) *Streptococcus pneumoniae*, *Chlamydia pneumophila*, *Legionella spp*, *Francisella tularensis* ve şiddetli alt solunum yolu enfeksiyonlarına neden olabilen diğer patojenleri kapsar. Bunlardan hangileri için inceleme yapılacağına klinik görünüm, epidemiyolojik bilgi ve mevsim göz önüne alınarak karar verilmelidir. MERS-CoV'u tanımlamadan önce böyle bir başka patojen tanımlanmış olsa bile, MERS'den kuvvetle şüpheleniliyorsa, bu sonuç MERS-CoV için testin yapılmasına engel olmamalıdır. Zira bazı MERS-CoV vakalarında diğer bir solunum yolu patojenin varlığı da tespit edilmiştir (7).
- SARS enfeksiyonu 2004 yılından bu yana insanda saptanmamıştır. DSÖ hastalığın yeniden görülebilmesi olasılığına karşı küresel sürveyans yürütmektedir. Bu nedenle SARS şüphesinin bulunduğu durumlarda sağlık otoritelerinin acil olarak uyarılması ve örneklerin ulusal referans laboratuvarına yollanması uygun olur (8,9,10,16).
- Aşağıda MERS-CoV için tanı süreci yer almaktadır (6,7,8).

3.2. MERS-CoV'un tanısı

- MERS-CoV enfeksiyonu şüpheli vakaların rutin konfirmasyonu viral RNA varlığının rRT-PCR ile tespiti ve eğer gerekli ise nükleik asit sekans analizi ile konfirmasyonu temeline dayanır. Rutin teşhis amaçlı olmamakla birlikte bazı özel durumlarda uygun altyapı ve deneyime sahip laboratuvarlar hücre kültüründe virüs izolasyonu gerçekleştirebilir. Serolojik testler de geliştirilme aşamasındadır.
- MERS-CoV rutin tanısı için 3 rRT-PCR protokolü geliştirilmiştir. Bu testlerin hedefleri: E protein geninin üst bölgesi (upE), açık okuma bölgesi 1b (ORF 1b) ve 1a (ORF1a) dır. upE'yi ve ORF1a'yı hedef alan testlerin duyarlılığı yüksek ve eşdeğerdir.
- upE testi tarama testi olarak önerilmektedir. Konfirmasyon için ise testi ise ORF1a ve duyarlılığı daha düşük olan ORF1b testi kullanılır. Ayrıca nükleokapsid (N) geni için geliştirilen rRT-PCR testi de tarama ve doğrulamada upE ve ORF1a testini tamamlayıcı olarak kullanılabilir.
- Laboratuvar doğrulaması için aşağıdaki kriterlerden birinin sağlanması gereklidir:
 - (a) Virüsün en az 2 farklı gen bölgesine ait pozitif PCR sonucunun bulunması, veya
 - (b) Bir bölgeye ait PCR pozitifliği ve diğer bir bölgeye ait (RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp ve N genleri) sekans analizi ile virüsün varlığının doğrulanması.
- Potansiyel temas öyküsü bulunan ve klinik belirtileri enfeksiyon ile uyumlu olan vakalarda virüsün sadece bir gen bölgesine ait PCR pozitifliği varsa, bu durum "olası vaka" olarak kabul edilir.

- Laboratuvar testlerinde negatif sonuç elde edilmesi enfeksiyonun varlığını dışlamaz. Aşağıdaki faktörler yalancı negatif sonuçlara yol açabilir:
 - (a) Örnek kalitesinin kötü olması,
 - (b) Örneğin hastalığın çok erken veya geç döneminde alınması,
 - (c) Örneğin uygun koşullarda alınıp gönderilmemesi,
 - (d) Testi etkileyen teknik nedenler (virüs mutasyonu veya PCR inhibisyonu gibi)
- MERS-CoV enfeksiyonu şüphesinin yüksek olduğu ancak negatif test sonuçları elde edildiğinde ilave örnekler alınmalı ve test edilmelidir. Laboratuvar, sonucu negatif çıkan örneklerin, başka bir laboratuvar da yeniden çalışılmasını sağlamalıdır.
- Test sonuçlarının uyumsuz olması durumunda, sekans analizi yapılmalıdır.
- Birden çok örnekte etken araştırmak ve sekans analizi yapmak, virüsün varlığını konfirme etmenin yanı sıra etkenin kaynağını ve yayılımını anlamak amacıyla da değerli bilgiler sağlayacaktır.
- MERS-CoV testlerinde yeterli deneyimi olmayan laboratuvarların, sonuçlarının doğrulanması için deneyimli laboratuvarlar, Referans merkezler ile işbirliği içinde çalışması desteklenmelidir.

3.3. Saklama, Referans merkeze gönderme

- İdeal olarak örnekler alındıktan sonra en kısa sürede laboratuvara ulaştırılmalıdır. Ancak çoğu durumda tanı laboratuvarı veya Referans laboratuvar şehirlerarası mesafededir. Buna göre; SARS-Cov veya MERS-CoV için bütün örneklerin alındıktan sonra +4°C'de korumak şartıyla **72 saate** kadar laboratuvara ulaştırılabileceği hatırlanmalıdır.
 - Nükleik asit amplifikasyon testleri, kültür veya seroloji testleri için örneklerin (EDTA'lı tam kan örneği hariç) teste alınması bu sürelerden daha uzun sürecekse, örnekler -70°C'ye kaldırılmalı; kuru buzda laboratuvara ulaştırılmalıdır (seroloji için -20°C de uygun)
 - Tekrarlayan dondurma-çözme işlemlerinden kaçınılmalı; gerekiyorsa dondurulmadan önce örnekler yeterli sayıda alikota ayrılmalıdır.
- Güvenlik uyarısı!** Serum ayırma ve alikotlara ayırma işlemleri mutlaka sertifikalı bir sınıf-IIA BGK içinde yapılmalıdır!
- SARS-CoV veya MERS-CoV tanısı veya elde edilen test sonuçlarının (negatif veya pozitif) doğrulanması için de örnek ulusal Referans laboratuvarına yollanmalıdır. Bunun için ilin Halk Sağlığı Müdürlüğü ile bağlantı kurulmalıdır.
 - SARS ve MERS şüphesinde bütün klinik örnekler biyolojik materyal taşıma şartlarını karşılayacak şekilde *paketlenmeli* ve *taşınmalıdır* (17). Kuru buzda taşıma şartları dahil, ayrıntılı bilgi için "UMS, GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi"ne başvurulması önerilir.

4 Sonuçların değerlendirilmesi ve bildirim

- SARS-CoV bildirimi zorunlu bir hastalıktır (3). Çok yeni saptanmış bir patojen olması nedeniyle MERS-CoV en son 2011'de güncellenmiş olan bildirim listesinde yer almamaktadır. Ancak bildirim listesi benzeri durumları "uluslararası öneme haiz halk sağlığı acil durumları" başlığı altında kapsamında almaktadır ve bu bağlamda MERS bildirimi zorunlu bir hastalıktır (3).
- Her iki enfeksiyonun aynı zamanda uluslararası bildirimi de zorunludur. DSÖ'nün 2007 yılında yürürlüğe soktuğu ve bütün taraf ülkelerin uymakla yükümlü olduğu mevzuat olan "Uluslararası Sağlık Tüzüğü, 2005"e göre de bu tür enfeksiyonlar "uluslararası öneme haiz halk sağlığı acili" kategorisindedirler ve ülkeler 24 saat içinde vakaları DSÖ'ye bildirmek zorundadırlar.
- Bu nedenle pozitif test sonucu alındığında derhal Halk Sağlığı Müdürlüğü'ne ve hastanede yatan vakalar için ilgili doktora ve enfeksiyon kontrol komitesine bilgi verilmesi gereklidir.

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- SARS-CoV ve/veya MERS-CoV tanısında nükleik asit temelli testler öncelikli test seçeneğidir. Laboratuvar alt yapısı ve deneyimi sonuçların güvenilirliği açısından önemlidir.
- Negatif sonuç enfeksiyonun yokluğunu göstermez. Bu nedenle klinik şüphe durumunda tanı olasılığını yükseltmek için bir hastadan alınacak birden fazla ve değişik klinik örneklerin incelenmesi, örneklerin referans laboratuvara da yollanması önerilir.

6 Referans Laboratuvar

Adres

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal İnfluenza Merkezi ve Solunum Yolu Virüsleri Tanı ve Araştırma Laboratuvarı
Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55, F Blok 2.kat
06100 – Sıhhiye/ANKARA

Tel: 0312 565 5582/5565
e-mail: www.thsk.gov.tr

Faks: 0312 565 5569

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu belge (SARS-CoV ve MERS-CoV Enfeksiyonlarının Mikrobiyolojik Tanısı) ayrıca aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir. Bilgi için bu belgelerin de incelenmesi önerilir:

UMS, SY-04	Akut respiratuvar sendrom
UMS, V-MT-10	İnfluenza ve avian influenzanın mikrobiyolojik tanısı
UMS, GEN-OY-01	Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 CDC. Public Health Guidance for Community-Level Preparedness and Response to Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS). www.cdc.gov/sars/guidance/ (son erişim tarihi: 27.12.2013)
- 2 WHO guidelines for the global surveillance of severe acute respiratory syndrome (SARS) Updated recommendations October 2004. www.who.int/csr/resources/publications/WHO_CDS_CSR_ARO_2004_1/en/ (son erişim tarihi: 27.12.2013)
- 3 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 4 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004. <http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurveLaBReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 5 The WHO MERS-CoV Research Group -. State of Knowledge and Data Gaps of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) in Humans. *PLOS Currents Outbreaks*. 2013 Nov 12. Edition 1. doi: 10.1371/currents.outbreaks.0bf719e352e7478f8ad85fa30127ddb8
- 6 ECDC. Severe respiratory disease associated with Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). 7th update, 24 September 2013.
- 7 CDC. Middle East Respiratory Syndrome (MERS) www.cdc.gov/coronavirus/mers/case-def.html (son erişim tarihi: 27.12.2013).
- 8 CDC. Public Health Guidance for Community-Level Preparedness and Response to Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS). Supplement F: Laboratory Guidance www.cdc.gov/sars/guidance/ (son erişim tarihi: 27.12.2013)
- 9 CDC. Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Patients Under Investigation (PUIs) for Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) – Version 2 www.cdc.gov/coronavirus/mers/guidelines-clinical-specimens.html (son erişim tarihi: 27.12.2013)
- 10 WHO. Laboratory testing for Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus - interim recommendations. www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/en/ (son erişim tarihi: 27.12.2013)
- 11 CDC. Case Definitions. <http://www.cdc.gov/coronavirus/mers/case-def.html> (son erişim tarihi: 20.03.2014)
- 12 WHO. SARS case in laboratory worker in Taiwan, China. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/np26/en/> (son erişim tarihi: 24.03.2014)

- 13 Risk Assessment for Laboratory Biosecurity and Biosafety. Nashville, TN. 6 October 2007.
<http://www.biosecurity.sandia.gov/ibtr/subpages/pastConf/20062007/FNBEPtraining/overviewlabRiskNEW.pdf> (son erişim tarihi: 24.03.2014)
- 14 CDC. Interim Laboratory Biosafety Guidelines for Handling and Processing Specimens Associated with Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV).
<http://www.cdc.gov/coronavirus/mers/guidelines-lab-biosafety.html> (son erişim tarihi: 24.03.2014)
- 15 WHO. SARS Laboratory Workshop, World Health Organization, 22 October 2003
<http://www.who.int/csr/sars/guidelines/en/SARSLabmeeting.pdf> (son erişim tarihi: 24.03.2014)
- 16 CDC. Appendix F4— Guidelines for Collecting Specimens from Potential SARS Patients.
<http://www.cdc.gov/sars/guidance/F-lab/app4.html>
- 17 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Kuduzun (Rabies Virüs Enfeksiyonunun) Mikrobiyolojik Tanısı

Hazırlayan Birim	Klinik Viroloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Viroloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	V-MT-20
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
Hastalığın önemi.....	3
Klinik özellikler.....	4
Virüsün özellikleri	4
Laboratuvar tanısı.....	5
TEKNİK BİLGİLER	6
1 Hedef mikroorganizma	6
2 Tanı için asgari laboratuvar gerekleri	6
3 Tanı teknikleri	8
4 Raporlama	10
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	10
6 Referans Laboratuvar	10
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	10
KAYNAKLAR.....	10

Kapsam ve Amaç

Kuduz, merkezi sinir sisteminin akut seyirli, öldürücü viral bir enfeksiyonudur. Ülkemizde son yıllarda önemli ölçüde azalmış olsa da sokak köpeği kaynaklı kuduz olguları halen görülmektedir.

Laboratuvar tanısı için testler yalnızca bir merkezde, "Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Kuduz Teşhis Ulusal Referans Laboratuvarı"nda yapılır. Bir diğer ifade ile kuduz tanısı klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının çalışma kapsamına dahil değildir. Ancak, klinik laboratuvarların kuduzun tanısı ile ilgili olarak gerektiğinde -danışmanlıklarına başvuran- kişileri/çevreleri doğru bir şekilde yönlendirebilmeleri beklenir.

Bu noktadan hareketle, bu UMS'de özellikle klinik laboratuvarların bilgilendirilmesi amacıyla, örnek yönetimi hususları ve tanıda kullanılan güncel ve geçerli yöntemler özetlenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

IU	International unit
OIE	Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü
RABV	Rabies virüs
URL	Ulusal Referans Laboratuvarı (Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Kuduz Teşhis Ulusal Referans Laboratuvarı)

Genel Bilgi

Hastalığın önemi

Kuduz, kuduz virüsünün neden olduğu ölümcül bir zoonozdur. Hastalığa bütün kıtalarda (Antarktika hariç), 150'den fazla ülkede/bölgede rastlanmaktadır. Kuduz %100 önlenabilir bir hastalıktır; günümüzde hastalığın önlenmesine ve yönetilmesine yönelik etkili araçlar mevcuttur. Buna rağmen, DSÖ'ye göre her yıl 60.000 dolayında insan kuduzdan ölmekte, en fazla da çocuklar etkilenmektedir (her 10 kuduz ölümünden dördü <15 yaş çocuk). Daha da ilerisi, kuduz yaygın bir hastalıktır ve Asya ve Afrika'da -insan aşıları ve immünglobülin preparatlarının kolay temin edilebilir olmadığı kırsal bölgelerde yaşayan) 3 milyardan fazla kişi potansiyel tehdit altındadır (1).

Türkiye, DSÖ Avrupa Bölgesi'nde sokak köpeği kaynaklı kuduz olgularının görüldüğü tek ülkedir. Vahşi hayvan kuduzuna da rastlanmaktadır. 1990'lı yılların başından bu yana, insan kuduzu olgularında belirgin bir azalma görülmüştür. Ancak özellikle büyük kentlerde köpek kuduzu önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Sağlık Bakanlığı'na her yıl yaklaşık 100.000 şüpheli ısırık olgusu bildirilmektedir (2).

Kuduz, memeli hayvanlar ve insanlar başta olmak üzere diğer hayvan türlerinde de görülür. Hastalık insanlara evcil ve yabani hayvanlardan bulaşır; bulaşma ısırık veya çizik yoluyla olabileceği gibi enfekte tükürük ile mukozal yüzeylere doğrudan temas yoluyla da olabilir. Virüs sağlam ciltten geçemez.

Enfeksiyon kırsal ve kentsel olmak üzere iki ilgili döngü arasında devamlılık arz etmektedir. Kırsal döngüde, virüs vahşi hayvanlar arasında birinden diğerine geçerek devam eder. Bu tip kuduzla vahşi kuduz (silvatic rabies) adı verilir. Tilki, kurt çakal, porsuk, gelincik, yarasa, geyik ve rakun kuduz virüsünü yayan başlıca yabani hayvanlardır. Başiboş (evcil olmayan) kedi ve köpekleri etkileyen kentsel kuduz ise insanlar için en tehlikeli olan kuduz şeklidir ve tüm bildirilmiş vakaların %99'unu teşkil eder.

Kuduz aşısı ile önlenilebilir bir hastalıktır. Bir kuduz önleme programının en ciddi kısmını toplu köpek aşılamaları oluşturur ki, böyle bir programın köpek nüfusunun en az %70'ini kapsaması gerekir.

Klinik özellikler

İnkübasyon süresi tipik olarak 1-3 aydır. Ancak bu süre alınan virüs miktarına, etkenin virülansına, yaranın merkezi sinir sistemine olan yakınlığına ve yara bölgesindeki sinir dokusunun sıklığına, yaranın büyüklüğüne, ısırılan yerde koruyucu katman (kıyafet vb.) bulunup bulunmadığına göre <1 haftadan ≥1 yıla kadar değişmektedir.

Hastalık genellikle ateş, baş ağrısı, iştahsızlık, bulantı, boğaz ağrısı, aşırı halsizlik gibi tipik olmayan belirtiler ile başlar. Bunu yara yerinde ağrı veya karıncalanma, iğnelenme ve yanma hissi (parestezi) izlenir. Virüs santral sinir sistemine yayıldığında, beyin ve omurilikte ilerleyici, ölümcül inflamasyon gelişir. İki tipi vardır: Hiperaktif formda hiperaktivite, heyecanlı davranış, hidrofobi ve bazen aerofobi izlenir. Birkaç gün sonra, kalp-akciğer yetmezliği ile ölüm meydana gelir. Paralitik form ise insan vakalarının yaklaşık %30'unu oluşturur. Bu form daha az dramatik seyreder ve daha uzun sürer. Isırık (yara) yerinden başlayarak kaslarda yavaş yavaş felç gelişir; takiben koma ve sonunda ölüm meydana gelir. Paralitik form kuduz genellikle yanlış teşhis edilir ve hastalık sıklık raporlarını olumsuz etkiler (3).

Hastalığın bütün seyri genellikle 5-6 gün sürer ve ölümlerle sonuçlanır. Kuduzun bu klinik tablosu 5 evrede değerlendirilebilir; inkübasyon dönemi, prodrom belirtilerin ortaya çıkışı, akut faz, koma ve ölüm (3,4).

Virüsün özellikleri

Etken *Rhabdoviridae* familyasında Lyssavirus genusu içinde yer alan segmentsiz, negatif polariteli, 5 protein kodu içeren tek sarmal RNA genomu olan bir virüstür.

Değişik bölgelerdeki kuduz virüsleri monoklonal antikolar aracılığı ile nükleotid sekansları arasındaki farklılıklar ile birbirinden farklı 2 genotipe ayrılır.

Genotip 1'de Rabies virüs (RABV), Duvenhage virüsü (DUVV), Avrupa yarasa lyssa virüsleri, tip 1 ve 2 (sırasıyla EBLV-1 ve 2) ve Avustralya yarasa lyssavirus (ABLV) içerir.

Ayrıca, Aravan virüsü (Arav), Kocand virüsü (KHUV) ve Irkut virüsü (IRKV) de genotip 1'de yer alır. Genotip 2'de ise Lagos bat virüs (LBV), Mokola virüs (MOKV) ve Shimoni bat virüs (SHIBV) yer alır.

RABV genotip 1 lyssavirus, klasik kuduz etkenidir. Tüm insan kuduz vakalarının büyük çoğunluğundan sorumludur (1,3)

Laboratuvar tanısı

Kuduz her zaman tipik bir seyir izlemediği için ve hidrofobi, aerofobi gibi tipik bulguların yokluğunda -özellikle paralitik form- diğer bazı klinik durumlarla karışabileceği için, klinik bulgular temelinde tanısı konamaz. Tanı laboratuvara dayanır (3).

Kuduz virüsünün tanısına yönelik laboratuvar incelemeleri hastalığın olduğu kadar hastalık öncesi durumun değerlendirilmesini de kapsar. Hayvan kuduzunun tanısında, beyin dokusu örneklerinden RABV antijenlerinin gösterilmesine yönelik DFA testi tanı koydurucudur. Ancak insanda çeşitli testler gerekmektedir (5).

Hızlı ve doğru bir laboratuvar tanısı özellikle temas sonrası profilaksinin zamanında uygulanabilmesi için kritik önemdedir. Bir tanı laboratuvarı birkaç saat içinde, bir hayvanın kuduz olup olmadığını belirleyebilir ve sorumlu tıbbi personeli bilgilendirebilir. Laboratuvar sonuçları, eğer hayvan kuduz değilse, hastanın gereksiz fiziksel ve psikolojik travmalardan ve sağlık sisteminin mali yüklerden korunması bakımından anlamlıdır. Ayrıca laboratuvar tarafından kuduz pozitif vakaların tanımlanmış olması hastalığın mevcut epidemiyolojik paterninin değerlendirilmesine ve kuduz kontrol programlarının bu bilgiler temelinde geliştirilmesine katkı sağlar (5).

Kuduz hastalığının doğası laboratuvar testlerinin standardize edilmiş, hızlı, duyarlı, özgül, ekonomik ve güvenilir olmasının zorunluluğunu da belirler.

Hayvanlarda tanı

İnsanlarda kuduz hastalığının önlenmesi hayvanlarda hastalık durumunun izlenmesi ve tanımlanması ile çeşitli biçimlerde ilişkilidir. Bunlardan biri de, bir bireyin bir hayvan ile ısırılma, tırmalanma, sekresyonlarına maruz kalma ve benzeri temasının (şüpheli temas) kuduz olasılığı açısından değerlendirilmesidir.

Her ne kadar mevcut mevzuatımıza (6) göre temas eden bireye kuduz profilaksisi başlanması için temas edilen hayvanın kuduz olup olmadığı tanısının konması bir zorunluluk değilse de hayvanlarda tanı kuduz kontrol programlarının önemli bir parçasıdır ve ülkelerin yeterli laboratuvar kapasitesine sahip olmaları gerekir.

Hayvanlarda kuduz tanısı etkilenmiş beyin dokusunun herhangi bir yerinden kuduz virüsünün tespitine dayanır; ancak kuduzu ekarte edebilmek için, test en az iki farklı beyin bölgesinden, tercihen, beyin sapı ve serebellumdan alınmış dokuları içermelidir (3,5). Test hayvanın ötenazi ile öldürülmesini gerektirir. Testin sonucu kısa sürede (~2 saat) alınır; ancak kuduz olduğundan şüphelenilen hayvanın laboratuvara gönderilmesi ve otopsi zaman alan işlerdir. İdeal olarak bu süreçlerin 24-72 saatte tamamlanması hedeflenir. Hayvan kuduz ise kişiye aşı başlanacağı için bu süre önemlidir ve test riskli temasın kuduz bir hayvana maruziyet niteliğinde olup olmadığını belirler.

ABD verilerine göre, ABD’de her yıl 120.000 dolayında hayvan kuduz için test edilmekte ve yaklaşık %6’sı kuduz tanısı almaktadır. Kuduz pozitif hayvanların oranı büyük ölçüde hayvanın türüne bağlıdır ve evcil hayvanlarda %1’in altında iken vahşi türlerde görülme sıklığı %10’a kadar çıkabilmektedir (5).

Ülkemizde ise Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının (GTHB) Veteriner Kontrol Enstitülerinin verilerine göre son yıllarda hayvanlarda kuduz görülme sıklığında bir artış eğilimi olduğu 2012’de kuduz yönünden test edilen toplam 1394 adet hayvanda %35.7 oranında pozitiflik bulunduğu belirtilmektedir. 2013 yılında bu oran test edilen toplam 1298 adet farklı hayvan türüne ait örnekte %41.3 olarak kaydedilmiştir (*Kaynak: GTHB, Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü; henüz yayınlanmamış veri*).

Rutin halk sağlığı surveyansı ve patogenezi çalışmalarına dayanarak, ısırık veya başka şekilde potansiyel kuduz maruziyetine neden olan bütün hayvanların test edilmesinin gerekli olmadığı söylenebilir. Köpekler, kediler ve dağ gelinciği gibi kuduz olma olasılığı düşük olan hayvanlar için 10 günlük bir gözlem süresi potansiyel insan kuduzu riskini ekarte etmek için uygun bir süredir. İdeali, nasıl bir yol izleneceğine, maruziyetin karakterine göre ve ilgili Yönerge de göz önüne alınarak Halk Sağlığı Müdürlüğü yetkilisi ile birlikte karar verilmesidir (6).

İnsanlarda tanı

İnsanlarda ölüm öncesi kuduz tanısı için tek bir test yeterli değildir; çeşitli testler gereklidir. Testler tükürük, serum, BOS örnekleri ve ense saç köklerinin deri biyopsilerinden yapılır.

Tükürük virüs izolasyonu ya da RT-PCR ile test edilebilir. Serum ve BOS’ta kuduz virüsü antikoru aranabilir. Ense saç köklerinin deri sinir uçlarında kuduz virüsü antijenlerinin gösterilmesine yönelik inceleme yapılabilir.

Testlerin özellikleri aşağıda “Tanı Teknikleri” başlığı altında (*bkz. sayfa 8*) verilmiştir.

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizma

Rabies virus (RABV genotip 1 lyssavirus)

2 Tanı için asgari laboratuvar gerekleri

2.1. Laboratuvar güvenliği

Kuduz tanısı asgari BGD2, kuduz araştırmaları ise BGD3 (ve hayvan-BGD3) laboratuvar şartlarında yürütülür. Daima standart önlemler uygulanmalı, önlemler risk değerlendirmesi ile de desteklenmelidir. Kuduz kuşkulu örneklerle çalışan laboratuvar personeli önceden aşılınmış olmalıdır (3).

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Rabies virüs çalışması için yetkilendirilmiş bir laboratuvarın personeli asgari şu gerekleri karşılar: (i) organizmanın izolasyonu/tanımlanması süreçlerine dair bilimsel ve teknik bilgi ve ileri tecrübeye sahip; (ii) laboratuvar güvenliği ve kalite gereklerine dair DSÖ ve OIE'nin ilgili tüm eğitimlerini almış; (iii) kuduz eliminasyon-kontrol programının önemine vakıf.

2.3. Örnek, Kit, Donanım

İnceleme örneği

İnceleme örneklerinin seçimi, özellikleri, alınması, gönderilmesi ve laboratuvara kabulü ile ilgili diğer kriterler ve bilgi için "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"ne başvurulmalıdır. Ayrıca bazı önemli noktalara aşağıda tekrar dikkat çekilmiştir.

- Ölüm-sonrası örnekler – beyin dokusu (beyin sapı, serebellum, hipokampus) örnekleri, cilt, kornea olabilir.
- Ölüm-öncesi örnekler – ense saç folikülleri çevresinden biyopsi, tükürük, salya, gözyaşı örneği olabilir. Semptomlar başladıktan sonraki herhangi bir dönemde alınabilir. Bu örnekler virüs antijeninin izole edilmesi için uygun olmakla birlikte hasta bireyden özellikle hastalığın ileri evrelerinde örnek alınmasında belirgin güçlük vardır.
- Seroloji için – serum, BOS. Kuduz tanısında serolojinin değeri çok sınırlıdır. Hastaya antiserum başlandıysa serolojinin tanısız bir değeri yoktur. Eğer alınacaksa, aşılama veya immün serum uygulamadan önce alınmalıdır. Genellikle hastalığın 8. gününden önce BOS veya serumda antikor saptanmaz. Bu süre göz önünde tutularak BOS, hastalık şüphesi olan kişilerden kesin tanı sağlanıncaya kadar 5 gün aralıklarla alınarak gönderilmelidir. Seroloji daha çok profilaksi sonrası bağışıklık düzeyi değerlendirmesi için tercih edilebilir.
- Örnek almadan önce mutlaka Halk Sağlığı Müdürlüğü ile bağlantı kurulmalı, hastanın "olası kuduz" vaka tanımına uyup uymadığı birlikte değerlendirilmelidir.
- **Kuduz şüpheli vakadan** örnek alınırken mutlaka standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır. Maske, gözlük takılmalı ve eldiven giyilmelidir.
- **Kuduz şüpheli hayvana** ait örnek gönderilmesi için de Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının İl/İlçe Müdürlükleri ile temasa geçilmeli, örneklerin URL'ye gönderilmesi sağlanmalıdır. Kuduz şüpheli hayvana ait örneklerin alınması ve gönderilmesi ile ilgili daha fazla bilgi için Kuduz Korunma ve Kontrol Yönergesi'ne başvurulmalıdır (6).
- Örnekler, vaka ve örnek bilgilerinin kaydedildiği bir form ile birlikte ve biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olarak paketlenip gönderilmelidir (7) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).
- Formol içeren veya laboratuvara ulaştığında kokuşmuş olan örnekler, uygun istek formu düzenlenmemiş veya biyolojik materyal taşıma şartlarına uygun taşınmamış örnekler laboratuvara kabul edilmez.

2.4. Kalite kontrol

- URL'de kuduz teşhisi DSÖ monografında ve 'OIE Manual'de belirtildiği şekilde yapılır.
- Ayrıca testler için iç ve dış kalite kontroller yapılmaktadır (8,9).
- İç kalite kontrolü için, her testte referanslar (referans pozitif, negatif ve/veya referans ring test pozitif, ring test negatif veya daha önce çalışılan serumlardan standardize pozitif veya standardize negatif) kullanılır.
- Dış kalite kontrol için, URL her yıl düzenli olarak, yeterlilik test sağlayıcılarının düzenlediği yurtdışı yeterlilik testlerine katılır.

3 Tanı teknikleri

3.1. Histolojik boyama

- Beyin dokusunda (post-mortem örnek) Negri cisimciklerinin görülmesi amacıyla kullanılan bir tekniktir. 1-3 günde sonuçlanır.
- Negri cisimciklerinin aranmasında duyarlılık ve özgüllük düşüktür; uygun şekilde yapılan Seller's boyama yöntemi ile kuduz hayvanların ancak %50-80'inde Negri cisimcikleri gösterilebilmektedir. Pozitif sonuç tanıyı destekler (8,9).
- Kesin tanı için, özellikle sonucun negatif bulunduğu hallerde diğer yöntemlere başvurulmalıdır.
- İmmünohistokimyasal boyama yapılabilirse, duyarlılık ve özgüllük belirgin artar. Monoklonal antikoların kullanıldığı durumlarda rabies virüs varyantlarının değerlendirilme olasılığı vardır.

3.2. DFA

- Beyin dokusu gibi ölüm-sonrası örneklerin yanı sıra kadar, ensenin saç folikülleri sinir dokusu, kornea sürüntüsü gibi ölüm-öncesi örneklerle de uygulanabilir.
- Hızlı bir yöntemdir. Aynı gün sonuç verilebilir.
- Pozitif sonuç "kesin tanı" bulgusudur. Negatif sonuçların fare inokülasyonu testi (MIT) ile doğrulanması gerekir (8,9).

NOT: ABD'de son 50 yılda uygulanmış DFA testlerinin sonuçlarına göre, test edilen hayvanların kuduz durumu hakkında DFA'nın sağladığı klinik bilginin (maruz kalan kişilerin tedavi endikasyonunu belirleyen) başarısız olduğuna dair hiç bir göstergeye rastlanmamıştır. Virüsün izolasyonu yöntemlerine kıyasla yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü nedeniyle DFA testi kuduz için ölüm-sonrası insan ve hayvan örneklerinde "altın standart" tanı yöntemi olarak kabul edilmiştir (3). Test şu anda ABD'de hayvanlarda rutin kuduz tanısı için tavsiye edilen tek tanı yöntemidir (10,11).

3.3. RTCIT (Doku kültürü enfeksiyon testi)

- Bu teknikte beyin dokusu, tükürük veya BOS gibi klinik örnekler doku kültürlerine pasajlanarak virüsün izolasyonu hedeflenir. 7-15 günde sonuç alınabilir.
- Virüsün kültürden izolasyonu "kesin tanı" bulgusudur. Ancak virüs izolasyonu yapılamaması örneklerde kuduz virüsü bulunmadığı şeklinde yorumlanamaz (3,8,9).

NOT: Örneklerde az miktarda rabies virüsün bulunduğu ve rutin boyama vb. yöntemlerle gösterilmesinde güçlük olduğu durumlarda doku kültürlerine inokülasyon değerli bir tanı aracıdır. Özellikle bazı antijen saptama tekniklerinin doğrulanması amacıyla kullanılır ve izolasyon ileri tanımlama testlerinin yapılmasına da imkan sağlar (3). 'Mouse neuroblastoma (MNA)' ve 'baby hamster kidney (BHK)' hücreleri rabies virüsün çoğaltılması için uygun kültür ortamlarıdır ve hayvan inokülasyon deneylerine duyulan gereksinimi genellikle ortadan kaldırır (5).

3.4. MIT (Fare inokülasyon testi)

- Beyin dokusu, tükürük, BOS gibi klinik örnekler uygulanır. Yaklaşık 30 günde sonuç alınır.
- Gerek pozitiflik, gerekse negatiflikler "kesin tanı" koydurucu olarak değerlendirilir (8,9).

3.5. RT-PCR (Revers transkripsiyon - PCR)

- Beyin dokusu, cilt, kornea, tükürük ve BOS gibi örnekler uygulanır. Yaklaşık 2 günde sonuç alınır.
- Hızlı bir yöntem olmasına karşın yeni nesil yöntemlerle (gerçek zamanlı RT-PCR gibi) kombine edilmediği durumlarda sonuçların doğrulanmasına ihtiyaç duyulabilir.
- RT-PCR'in duyarlılığı DFA ile karşılaştırılabilir ancak maliyeti daha yüksektir. Özellikle uygun olmayan transport veya saklama koşulları sebebiyle tanısal değeri düşen örneklerde tercih edilebilir. Diğer taraftan vahşi doğadaki rezervuarlarında çok sayıda kuduz virüs-genetik varyantlarının olması dolayısı ile primer seçimi sorundur.
- RT-PCR ile pozitif sonuç, mümkünse diğer tekniklerin kullanımıyla birlikte yorumlanmalıdır (8,9).

3.6. FAVN (Floresan antikor virüs nötralizasyon testi)

- Serum veya BOS'da kuduz virüsüne karşı nötralizan antikorların saptanmasına yönelik bir testtir. 1-3 günde sonuç alınır.
- Aşısız bir kişide, serum veya BOS'ta FAVN ile $\geq 1/5$ IU titrede (tam nötralizasyon) nötralizan antikorların saptanması "kesin tanı" bulgusudur (8,9).

3.7. RREID (Rapid Rabies Enzyme Immuno Diagnosis)

- Antijenik yapıların gösterilmesine yönelik bir ELISA testidir.
- Özgüllüğü düşük olduğu için, tanıda geçerli laboratuvar teknikleri arasında yer almamaktadır (8,9).

4 Raporlama

- URL, gönderilen örneğe uygulanan tanı yöntemine uygun -yukarıda testler için belirtilen- süre içinde raporlamayı yapar.

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Uygun örnek alınmaması, saklanması ve transfer koşullarının yerine getirilmemesinden kaynaklanan hatalı sonuçlar olabilir.

6 Referans Laboratuvar

Kuduz hastalığının laboratuvar tanısı için testler ülkemizde *sadece* aşağıda adresi verilen merkezde (URL) yapılmaktadır.

Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı
Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü
Kuduz Teşhis Ulusal Referans Laboratuvarı
Ahmet Şefik Kolaylı Cad. No: 23
06020 Etlik – ANKARA; Tel: 0312 326 0090 (8 Hat) / 332

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Kuduzun Mikrobiyolojik Tanısı) ayrıca aşağıda listelenen UMS belgesiyle de ilgilidir ve ilave bilgi için bu belgeye bakılması önerilir:

UMS, GEN-OY-01 Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 WHO. Rabies. <http://www.who.int/rabies/> (son erişim tarihi: 19.12.2013)
- 2 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurveLaBReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)

- 3 WHO Expert Consultation on Rabies. First report. Geneva, World Health Organization, 2005 (WHO Technical Report Series, No. 931). http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_931_eng.pdf (son erişim tarihi: 19.12.2013)
- 4 WHO Expert Consultation on Rabies, WHO Technical Report Series 982, Second report, 2013.
- 5 Centers for Diseases Control and Prevention. Rabies. How is rabies diagnosed? <http://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/index.html> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 6 Sağlık Bakanlığı, Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Kuduz Korunma ve Kontrol Yönergesi. 09/05/2001 tarih ve 7755 sayılı, Ankara, 2005. <http://www.saglik.gov.tr/TR/dosya/1-75996/h/kuduz-korunma-ve-kontrol-yonergesi.doc> (son erişim tarihi: 17.12.2013)
- 7 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmî Gazete 25.09.2010 – 27710.
- 8 OIE Manual of standarts for diagnostic tests and vaccines, 2013. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.13_RABIES. (son erişim tarihi: 19.12.2013)
- 9 Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H (eds). Laboratory techniques in rabies. 4th ed., World Health Organization, 1996. http://libdoc.who.int/publications/1996/9241544791_eng.pdf (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 10 Centers for Diseases Control and Prevention. Rabies. Accuracy of the tests. <http://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/accuracy.html> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 11 Protocol for postmortem diagnosis of rabies in animals by direct fluorescent antibody testing: A minimum standard for rabies diagnosis in the United States. <http://www.cdc.gov/rabies/pdf/rabiesdfaspv2.pdf> (son erişim tarihi: 06.01.2014)



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

AKUT SENDROMİK YAKLAŞIM REHBERİ

Akut gastroenterit (Akut sulu/kanlı ishalde sendromik yaklaşım)

Hazırlayan Birim	Sendromik Yaklaşım Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Sendromik Yaklaşım
Bölüm	-
Standart No	SY-01
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
GENEL BİLGİ	3
SENDROMİK YAKLAŞIM SÜREÇ AKIŞI	5
1 Sendromun tanımı	5
2 Olası hastalıklar/etkenler	5
3 Laboratuvara gönderilecek örnek türü	7
4 Laboratuvardan istenecek tetkikler	7
EKLER.....	8
Ek-1 İnkübasyon süresine ve eşlik eden semptomlara göre olası etkenler ⁶	8
Ek-2 Sporadik vakada sendromik yaklaşım akış şeması	10
Ek-3 Salgın durumunda sendromik yaklaşım akış şeması	11
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	12
KAYNAKLAR.....	12

Kapsam ve Amaç

Akut gastroenteritler veya akut ishal ile seyreden klinik tablolar ulusal ve uluslararası ölçekte salgınlara yol açabilmeleri, özellikle çocuklarda ve yaşlılarda morbidite ve mortalite oranlarının yüksek olabilmesi gibi nedenlerle önemlidir. Etkenin belirlenmesi, özellikle salgınlara kontrol altına alınması ile ilgili çabalar açısından büyük değer taşımaktadır (1).

Akut gastroenterit veya akut ishal yakınmalarıyla hekime başvuran kişi bazen bir salgının ilk vakası (habercisi) olabilir. Bu nedenlerle bu Belgenin, potansiyel halk sağlığı tehdidi oluşturan patojen etkenlerin erken dönemde tanımlanabilmesi için vakaları ilk görececek hekimlere yol gösterecek bir Rehber olması hedeflenmiştir. Amacı; hekimin ana semptomlardan (ve biliniyorsa epidemiyolojik ipuçlarından) yola çıkarak *hangi etkenleri öncelikle düşüneceğine ve hangi örnekleri, hangi tanı testleri için, ne zaman göndereceğine* dair izleyebileceği bir **akış şeması** vermektir.

Belgenin paralel amaçlarından biri de, -sendromik yaklaşımın iyi bir şekilde işlenmesi halinde akut ishali tanıyarak preanalitik süreçlerin iyileşmesi sağlanmış olacağından, bunun- laboratuvar sonuçlarının doğruluğu ve güvenilirliği de dahil, laboratuvarların tanısal kapasitesinin gelişmesini teşvik etmesidir.

Benzer tabloya yol açan kimyasal, toksik etkenler ve inflamatuvar nedenler ile hastanede yatan hastalarda gelişen ishal bu Belgenin kapsamı dışındadır. Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda ishal etkenleri normal popülasyondan farklı olabilir; olası etkenler için uygun kaynaklara başvurulmalıdır. Ayrıca, 14 günden uzun süren ishaller "kronik ishal" olarak tanımlanır ve bu Belge kapsamında değerlendirilmemiştir.

Genel Bilgi

Dünya genelinde her yıl 2 milyar kişinin akut gastroenterit olduğu tahmin edilmektedir. İshalle seyreden hastalıklar, küçük çocuklarda morbidite ve mortalitenin en önemli nedenlerinden biridir. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde 5 yaşın altındaki çocuklarda önde gelen ölüm nedenleri arasındadırlar ve yılda yaklaşık 1.5 milyon çocuğun ölümüne neden olurlar. Kaynakları sınırlı ülkelerde ishalleri hastalıklar çocuklarda yetersiz beslenme, yavaşlamış büyüme ve bilişsel gelişimin bozulması gibi başka olumsuz sonuçlara da yol açmaktadır (1,2). Sanayileşmiş ülkelerde, ishal yüzünden ölümler nispeten az olsa da ciddi sağlık maliyetleri ile ishal önemli bir morbidite nedeni olmaya devam etmektedir (2).

İshal, çoğunlukla dışkıyla-kontamine suyun tüketilmesiyle vücuda alınan bakteriyel, viral veya paraziter bir etkenin neden olduğu enfeksiyonun bir semptomudur. Bir bölgede içmek, yiyecek hazırlamak veya temizlenmek için temiz suya ulaşım düzeyi ne kadar düşük ise ishalleri hastalıkların görülme sıklığı o denli artmaktadır. Kişisel-hijyen standartlarının düşük olduğu şartlarda etkenler kişiden kişiye yayılabilir. En önemli yayılma yollarından biri de hijyenik olmayan şartlarda hazırlanmış veya saklanmış yiyeceklerin tüketilmesidir. Su, yıkama sırasında yiyecekleri kontamine edebilir. Kirli sulardan yakalanmış balık ve deniz ürünleri de akut gastroenteritler için kaynak olabilirler (3).

Gelişmekte olan ülkelerde akut gastroenteritlerde bakterilerin ve parazitlerin sorumluluğu ön plandadır ve tipik olarak yaz aylarında artış kaydedilir. Sanayileşmiş ülkelerde ise önde gelen etkenler virüslerdir ve mevsimsel durum kış aylarına kayar.

Akut **bakteriyel** gastroenteritlere neden olan etkenler küçük çocuklarda en sık enteropatojen *Escherichia coli* olmak üzere *Shigella sp*, *Salmonella sp*, *Campylobacter sp*, Enterohemorajik *E.coli* (EHEC), *Vibrio cholerae*, *Vibrio sp*, *Yersinia sp* şeklinde sıralanabilir. *Campylobacter*'ler özellikle gelişmekte olan ülkelerde <5 yaş çocuklarda dışkıdan en sık izole edilen etkenler arasındadır.

Başlıca akut **viral** gastroenterit etkenleri ise; özellikle <2 yaş çocuklarda rotavirus ve adenovirus 40, 41; her yaştaki bireyde sporadik veya salgınlar şeklinde norovirus ve sappoviruslar; ve özellikle <6 yaş çocuklar arasında astroviruslardır. Norovirüsler bütün dünyada kitlesel salgınlardan sorumludur.

Akut **paraziter** gastroenteritlerin en yaygın etkenleri de *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium spp*, *Entamoeba histolytica*, *Dientamoeba fragilis* şeklinde sıralanabilir. *Cryptosporidium*'un su kaynaklı kitlesel salgınları kaydedilmiştir.

Hazır gıda sektörünün gelişmesine ve yaygınlaşmasına paralel olarak bir gıdanın bir patojen ile kontaminasyonu aynı anda pek çok ülkede vakaların görüldüğü salgınlarla sonuçlanabilmektedir. Su kaynaklı salgınlarda da, suyun fekal kirlenmesinin bir sonucu olarak, birden fazla türde patojen etken rol oynayabilir. Bazı enterik patojenler (norovirüsler) düşük enfektif doz, dış çevreye dayanıklılık ve yüksek sekonder atak hızı nedeniyle potansiyel biyoterörizm ajanı olarak da (Kategori B) değerlendirilmektedir (4).

İshal; kişinin günlük dışkılama sayısının artması ve kıvamının sulu olması ile karakterli bir semptomdur. Bazı bakteriyel ve paraziter etkenlere (*Shigella sp*, *Campylobacter sp*, EHEC, *E.histolytica* vb.) bağlı enfeksiyonda kanlı ve/veya mukuslu olabilir. İshal ağrısız olabildiği gibi, yine etkene bağlı olarak mide krampları, bulantı, kusma, karın ağrısı, ateşle birlikte görülebilir. 10 günden uzun süren ishallerde daha çok paraziter etkenler akla gelmelidir. İshalli hastalıkta en ciddi tehdit dehidratasyondur. Aşırı dışkılama ve kusma ile su ve elektrolitlerin (sodyum, klor, potasyum ve bikarbonat) önemli düzeyde kaybına bağlı olarak ciddi elektrolit dengesizliği gelişebilir ve zamanında yerine konmadığında tablo, özellikle bebeklerde ve yaşlılarda, ölümle sonuçlanabilir.

"Akut gastroenterit" ülkemizde bildirim zorunlu hastalıklar listesindedir ve vaka tanımına uyan vakaların bildirim istenir. Bir diğer ifade ile akut gastroenteritte hekimin laboratuvar desteği arama ve kesin tanı koyma zorunluluğu yoktur. Bununla birlikte hekim, -belirgin bir güçlük yoksa- iyi hasta yönetimi açısından etken araştırması için hastayı laboratuvara yönlendirmelidir (5).

Mikrobiyolojik inceleme **ateşli** veya **dehidrate** vakalarda ya da **dışkıda kan** veya **irin** olan bütün hastalarda kesin endikedir (2).

Öte yandan, akut gastroenteritlerin laboratuvar tanısı potansiyel halk sağlığı tehdidi olabilecek olayları açığa çıkarabilir. Bu nedenle vakayı ilk gören hekimin iyi bir anamnez ile epidemiyolojik ipuçlarını (sıra dışı gıda veya su tüketimi, inkübasyon süresi, başka vakaların varlığı, seyahat, gibi...) yakalama ve hastayı laboratuvara yönlendirme şansı vardır. Laboratuvar tanısı ayrıca özellikle salgınlarda önem kazanır. Salgın söz konusu olduğunda laboratuvar incelemesi vaka tanısından ziyade salgının tanısı için yapılır ve %5 ila 10 vakadan örneklerin laboratuvar tarafından incelenmesi yeterlidir.

Sendromik Yaklaşım Süreç Akışı

1 Sendromun tanımı

Akut ishal, son 14 gün içinde başlayan, günde üç kez veya daha fazla yumuşak, sulu veya kanlı dışkılama durumudur (6).

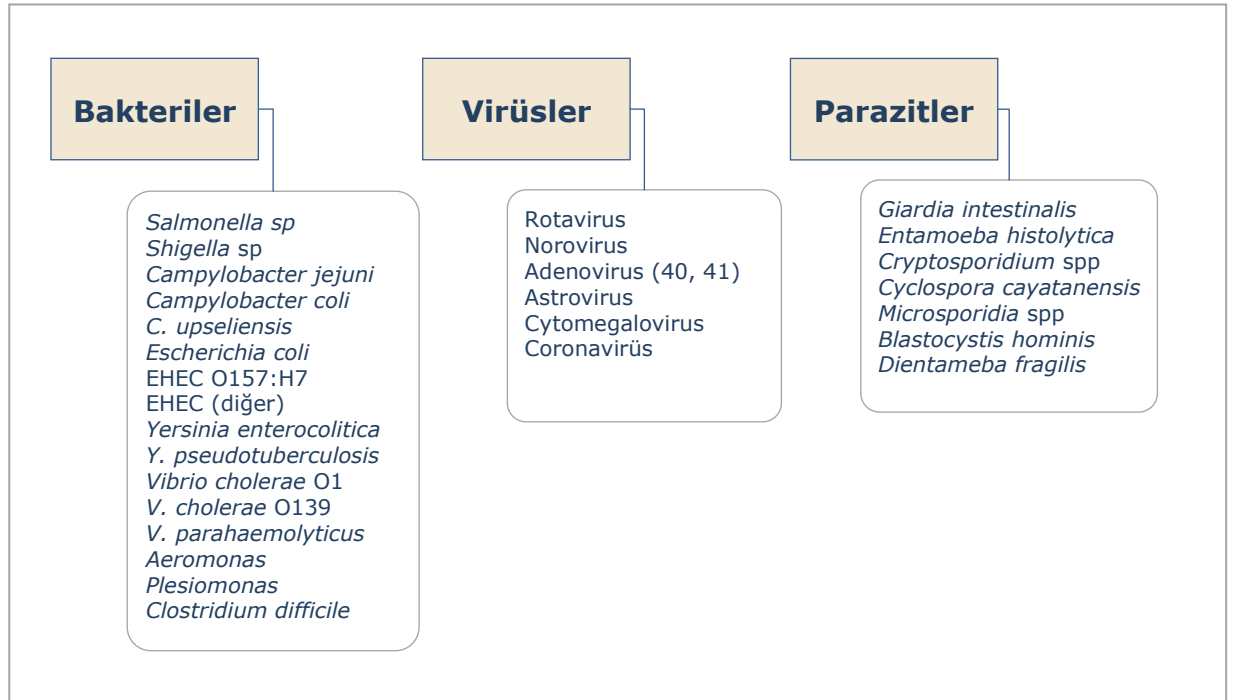
Akut gastroenterit ishal, bulantı, kusma, ateş, karın ağrısı, tenesmus, özellikle çocuklarda ve yaşlılarda dehidratasyon bulguları ile seyreden klinik tablodur.

Salgın; yukarıdaki klinik tabloya uygun, aralarında epidemiyolojik bağlantısı olan (aynı okula gitmesi, aynı yemeği yemesi, vb.) birden çok kişinin bulunması durumudur.

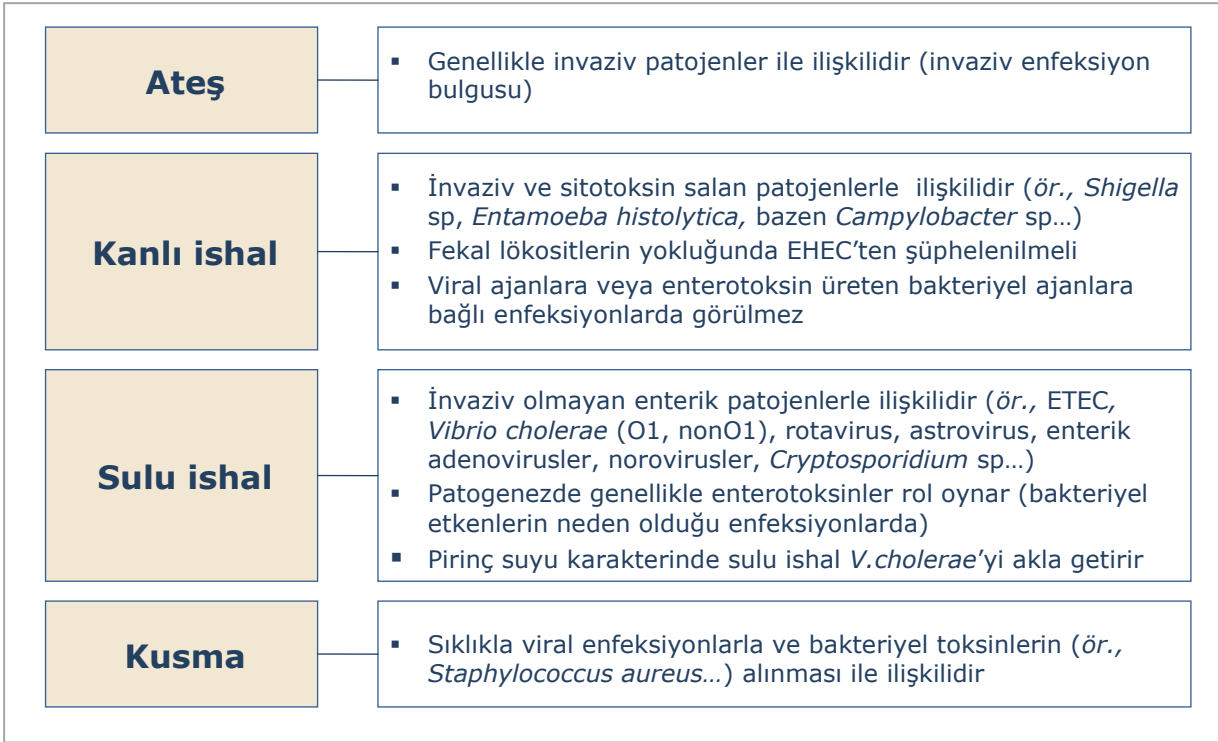
2 Olası hastalıklar/etkenler

Akut enfeksiyöz ishallerden sorumlu olabilen etkenler Şekil-1'de gösterilmektedir. Belirleyici ya da önde giden semptomun hangi etkenleri öncelikle akla getirmesi gerektiğine dair basit bir yaklaşım önerisi de Şekil-2'de verilmiştir. Ayrıca bütün olası etkenler inkübasyon süresine ve eşlik eden semptomlara göre Ek-1'de listelenmektedir (7). Vaka klinik ve epidemiyolojik bulgulara göre endikasyon varsa laboratuvara yönlendirilir. Başlıca endikasyonlar:

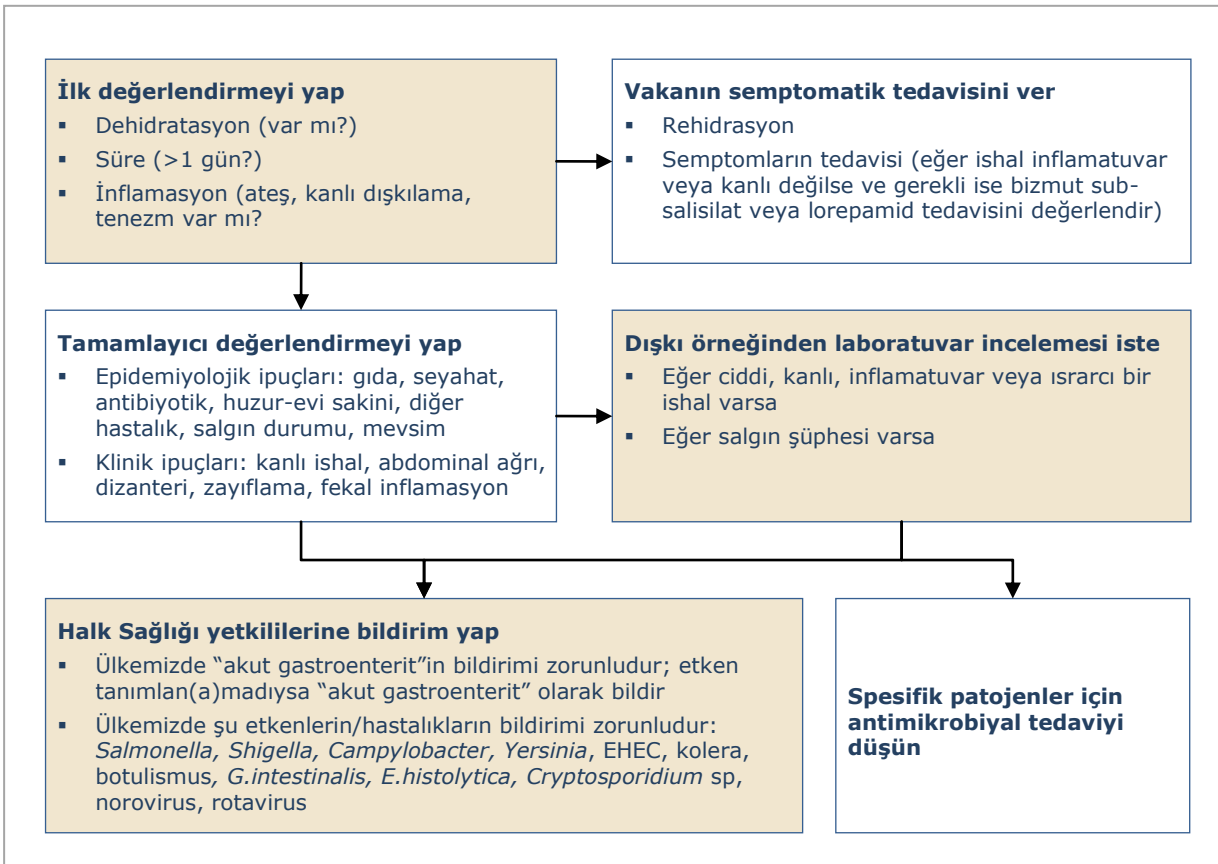
- (a) Ateş, kanlı veya mukuslu ishal, ileri dehidratasyon, uzamış ishal
- (b) Hasta tedavisinin yönlendirilmesi ihtiyacı (özellikle erişkinde) (Şekil 3)
- (c) Salgın şüphesi (şüpheli gıda tüketimi, kreş, yurt, bakımevi vb. ile ilişki)



Şekil 1. Akut enfeksiyöz ishallerden sorumlu olabilen etkenler (2).



Şekil 2. Akut gastroenterilerde belli başlı semptomlar ve ilişkili olabileceği etkenler. EHEC, enterohemorajik *E.coli*; ETEC, enterotoksijenik *E.coli* (2 no.lu kaynaktan uyarlanmıştır).



Şekil 3. Akut ishalleri bir erişkinine klinik yaklaşım (2 no.lu kaynaktan uyarlanmıştır).

3 Laboratuvara gönderilecek örnek türü

Dışkı öncelikle tercih edilir. Rektal sürüntü işbirliği yapılamayan, dışkı veremeyen hastalarda ve bebeklerde tercih edilen bir örnek türüdür. Parazit incelemesi (mikroskopisi) için uygun değildir. Endoskopik, sigmoidoskopik örnekler – bazı parazitler ve bakteriyel etkenlerin tanısı için kullanılır (ayrıca *bkz.* Ek-1).

İnceleme örneklerinin seçimi, özellikleri, alınması, gönderilmesi ve laboratuvara kabulü ile ilgili kriterler ve bilgi için "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"ne başvurulmalıdır.

Örneklerin gönderilmesinde *paketleme* ve *taşıma* kesinlikle biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (8) (ayrıca *bkz.* UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).

4 Laboratuvardan istenecek tetkikler

Her zaman dışkı örneklerinden ilk olarak direkt mikroskopik inceleme (direkt taze bakı) yapılması ve hücre durumunun (eritrositlerin, lökositlerin varlığı vb.) değerlendirilmesi ideal bir yaklaşımdır. İshalin karakterini ortaya koyar ve inceleme kapsamının belirlenmesini sağlar. Örneğin; eritrositlerin görüldüğü ancak lökositlerin gözlenmediği bir durumda mutlaka EHEC de araştırmaya dahil edilmelidir ve bu bulgu laboratuvarcıyı dışkı örneğinden uygun besiyerlerine EHEC'i de göz önüne alarak kültür ekimlerini yapmaya yönlendirecektir.

Direkt taze bakı, etkene özgü kültür, parazit tanısı için boyama prosedürleri, viral antijen saptama testleri genel olarak birinci basamak testleri oluşturmaktadır.

Parazit EIA ve DFA teknikleri, bakteriyel, viral ve parazitler moleküler yöntemler ve bakteriyel toksinlerin aranması genellikle ikinci basamak testleri oluşturmaktadır.

Laboratuvar incelemeleri istenirken, olası etkenlere göre Ek-2'de (sporadik vaka) ve Ek-3'de (salgın durumunda) verilen akış diyagramlarından yararlanılabilir.

Ekler

Ek-1 İnkübasyon süresine ve eşlik eden semptomlara göre olası etkenler⁷

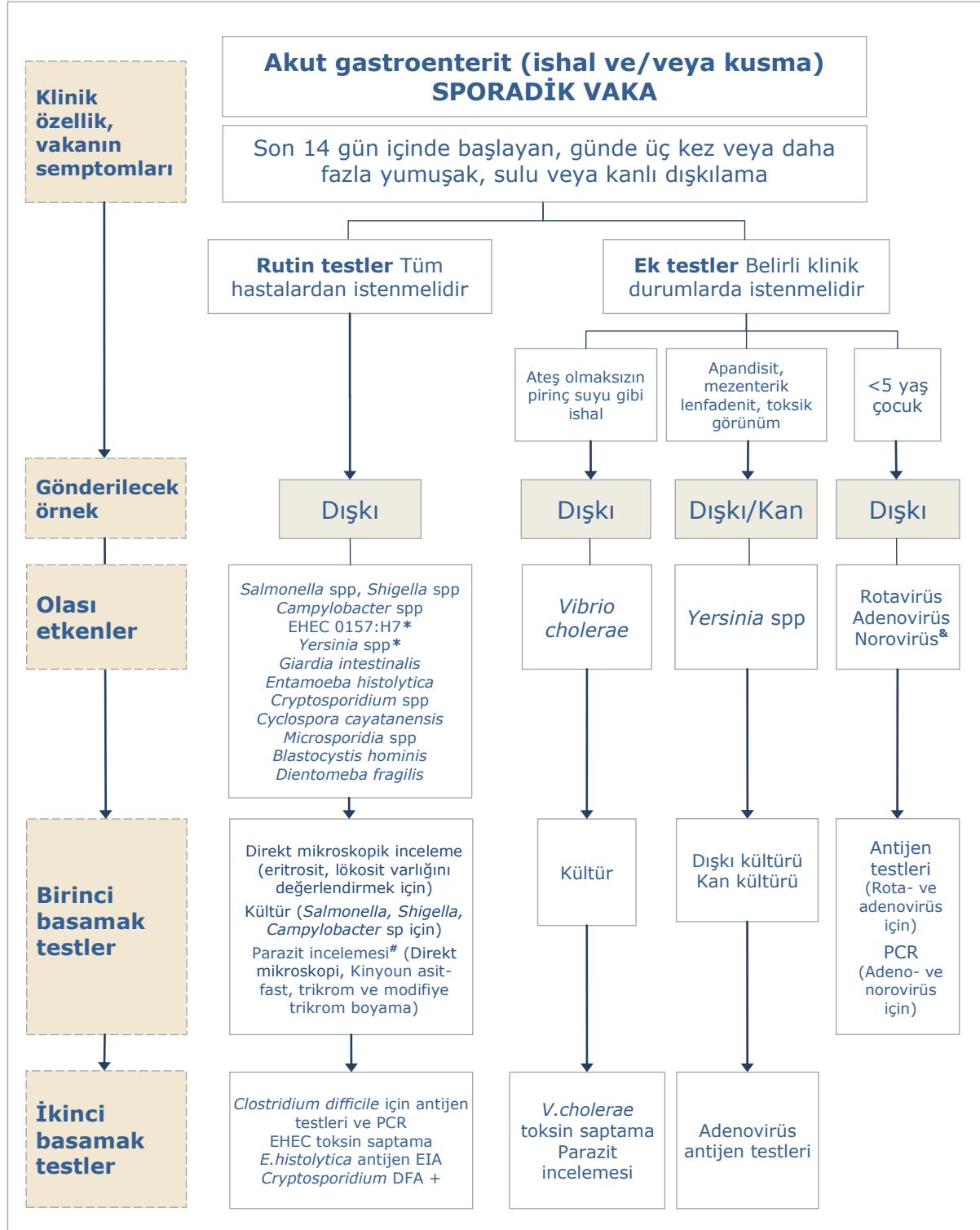
Akut enfeksiyöz gastroenteritler ile diğer etiyolojilere bağlı gastrointestinal olaylar için sendromik tanı yaklaşımında yardımcı bir tablo aşağıda verilmektedir.

İnkübasyon süresi	Semptomlar	Etken organizma veya toksin	Uygun örnek türü
0.5-2 s	Karıncaalanma, yanma hissi, uyuşukluk, uyku hali, tutarsız konuşma, respiratuvar paralizi.	Kabuklu deniz ürünleri ile (paralitik) (saksi toksinler) - midyeler	Mide yıkama suyu
2-5 dk ile 3-4 s	Sıcak ve soğuk duyusunun tersine çevrilmesi, karıncaalanma; dudak, boğaz ve boyunda hissizlik; kas ağrıları, baş dönmesi, ishal, kusma	Kabuklu deniz ürünleri ile (nörotoksik) (breve toksinler)	Mide yıkama suyu
30 dk ile 2-3 s	Bulantı, kusma, ishal, karın ağrısı, titreme, ateş.	Kabuklu deniz ürünleri (ishalli) (dinofizis toksin, okadaik asid, pekteno-toksin, yessotoksin)	Mide yıkama suyu
<1 s	Bulantı, kusma, ağızda değişik tat ve yanma hissi	Metalik tuzlar	Kusmuk, idrar, kan, dışkı
<1 s	Tükürük artışı, terleme, gastroenterit, düzensiz nabız, küçülmüş pupiller, astmatik solunum	Muskarya tipi mantarlar	Kusmuk
<1 s	Nörolojik ve/veya gastrointestinal semptomlar	Kabuklu deniz hayvanı toksinleri	Mide yıkama suyu
<1 s	Gastroenterit, sinirlilik, bulanık görme, göğüs ağrısı, siyanoz, kas seğirmeleri, konvülsiyonlar	Organik fosfat	Kan, idrar, yağ dokusu biyopsisi
1-2 s	Bulantı, kusma, siyanoz, baş ağrısı, baş dönmesi, dispne, titreme, halsizlik, şuur kaybı	Nitritler	Kan
1-6 s (2-4 s)	Bulantı, kusma, kusmaya çalışma, ishal, karın ağrısı, bitkinlik	<i>Staphylococcus aureus</i> ve enterotoksinleri	Kusmuk (burun sürüntüsü, deri lezyonları)
1-6 s	Bulantı, kusma, karıncaalanma hissi, baş dönmesi, anoreksi, kilo kaybı, konfüzyon	Klorin hidrokarbonlar (insektisitler, peptisitler)	Kan, idrar, dışkı, mide yıkama suyu
8-16 s (2-4 s*)	Kusma, karın ağrısı, ishal, bulantı (* kusma ön planda ise)	<i>Bacillus cereus</i>	Rektal sürüntü, dışkı, kusmuk
6-24 s	Bulantı, kusma, ishal, susuzluk hissi, pupillerin genişlemesi, kollaps, koma	Mikotoksinler (<i>Amanita</i> sp)	İdrar, kan (SGOT, SGPT), kusmuk
12-48 s (~36 s)	Bulantı, kusma, sulu, kansız ishal, dehidratasyon	Norovirus	Dışkı
2 s ile 6 gün, (en sık 12-36 s)	Baş dönmesi, çift veya bulanık görme, ışık refleksi kaybı, yutma, konuşma ve soluma güçlüğü, ağız kuruluğu, halsizlik, solunum felci. Karakteristik sendrom kraniyal sinirlerle ve korunmuş duyu merkezi ile başlayan, giderek azalan, iki taraflı gevşek paralizi	<i>Clostridium botulinum</i> ve toksinleri	Kan, dışkı, mide yıkama suyu
2-36 s (6-12 s)	Abdominal kramplar, ishal, putrifiye ishal (<i>C.perfringens</i>), bazen bulantı ve kusma	<i>Clostridium perfringens</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> , <i>S. faecium</i>	Rektal sürüntü, dışkı

İnkübasyon süresi	Semptomlar	Etken organizma veya toksin	Uygun örnek türü
24 s (GIS), 48 s (nörolojik)	Kusma, ishal, karın ağrısı, konfüzyon, hafıza kaybı, dezoryantasyon, felç, koma	Deniz ürünleri ile zehirlenme (amnezik) (domoik asit)	Mide yıkama suyu
6-96 s, genellikle 1-3 gün	Ateş, abdominal kramplar, ishal, kusma, baş ağrısı	<i>Salmonella</i> sp, <i>Shigella</i> sp., <i>Aeromonas</i> spp, EPEC	Rektal sürüntü, dışkı
>72 s	Uyuşma hissi, bacaklarda zayıflık, spastik paralizi, görmede bozulma, körlük, koma	Organik civa	İdrar, kan, saç
6 s ile 5 gün	Abdominal kramplar, ishal, kusma, ateş, halsizlik, bulantı, baş ağrısı, dehidratasyon. Bazen kanlı veya mukuslu ishal, <i>Vibrio vulnificusa</i> eşlik eden deri lezyonları.	<i>V.cholerae</i> (O1, nonO1), <i>V.vulnificus</i> , <i>V.parahaemolyticus</i> , <i>V.fluvialis</i>	Dışkı
1-10 gün (ort 3-4 gün)	İshal (genellikle kanlı), karın ağrısı, bulantı, kusma, halsizlik, ateş (<i>E.coli</i> O157 ile seyrek olarak).	EHEC, <i>E.coli</i> O157 dahil, <i>Campylobacter</i> spp	Dışkı, rektal sürüntü
3-5 gün	Kusma, sulu non-inflamatuvar ishal; hafif ateş olabilir.	Rotavirus, astrovirus, enterik adenovirus	Dışkı, kusmuk
3-7 gün	Ateş, ishal, karın ağrısı. Akut apandisit benzeri durum olabilir.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Dışkı
2-14 gün	İshal non-inflamatuvar özellikte bol ve sulu (mukus içerebilir), karın ağrısı, kilo kaybı. Bulantı-kusma görülebilir (immün yetmezliği olanlarda ağır seyir; ileri dehidratasyon bulgusu)	<i>Cryptosporidium</i> spp	Dışkı
1-6 hafta	Mukuslu ishal (yağlı dışkı), karın ağrısı, flatulans, kilo kaybı	<i>Giardia intestinalis</i>	Dışkı
1 ila birkaç hafta	Karın ağrısı, ishal, kabızlık, baş ağrısı, uyuşukluk, ülserler, değişken - çoğu zaman asemptomatik	<i>Entamoeba histolytica</i>	Dışkı
3-6 hafta	Sinirlilik, uykusuzluk, açlık ağrıları, anoreksi, kilo kaybı, karın ağrısı, bazen gastroenterit	<i>Taenia saginata</i> , <i>T.solium</i>	Dışkı, rektal sürüntü
4-28 gün (ort 9 gün)	Gastroenterit, ateş, göz çevresinde ödem, terleme, kas ağrısı, titreme, bitkinlik, solunum zorluğu.	<i>Trichinella spiralis</i>	Serum, kas dokusu (biyopsi)
7-28 gün (ort 14 gün)	Halsizlik, baş ağrısı, ateş, öksürük, bulantı-kusma, kabızlık, karın ağrısı, titreme, gül rengi benekler, kanlı dışkı.	<i>Salmonella typhi</i>	Rektal sürüntü, dışkı
10-13 gün	Ateş, baş ağrısı, miyalji, kızarıklık.	<i>Toxoplasma gondii</i>	Lenf nodu biyopsisi, kan

s, saat; EHEC, enterohemorajik *E.coli*, EPEC, enteropatojen *E.coli*

Ek-2 Sporadik vakada sendromik yaklaşım akış şeması

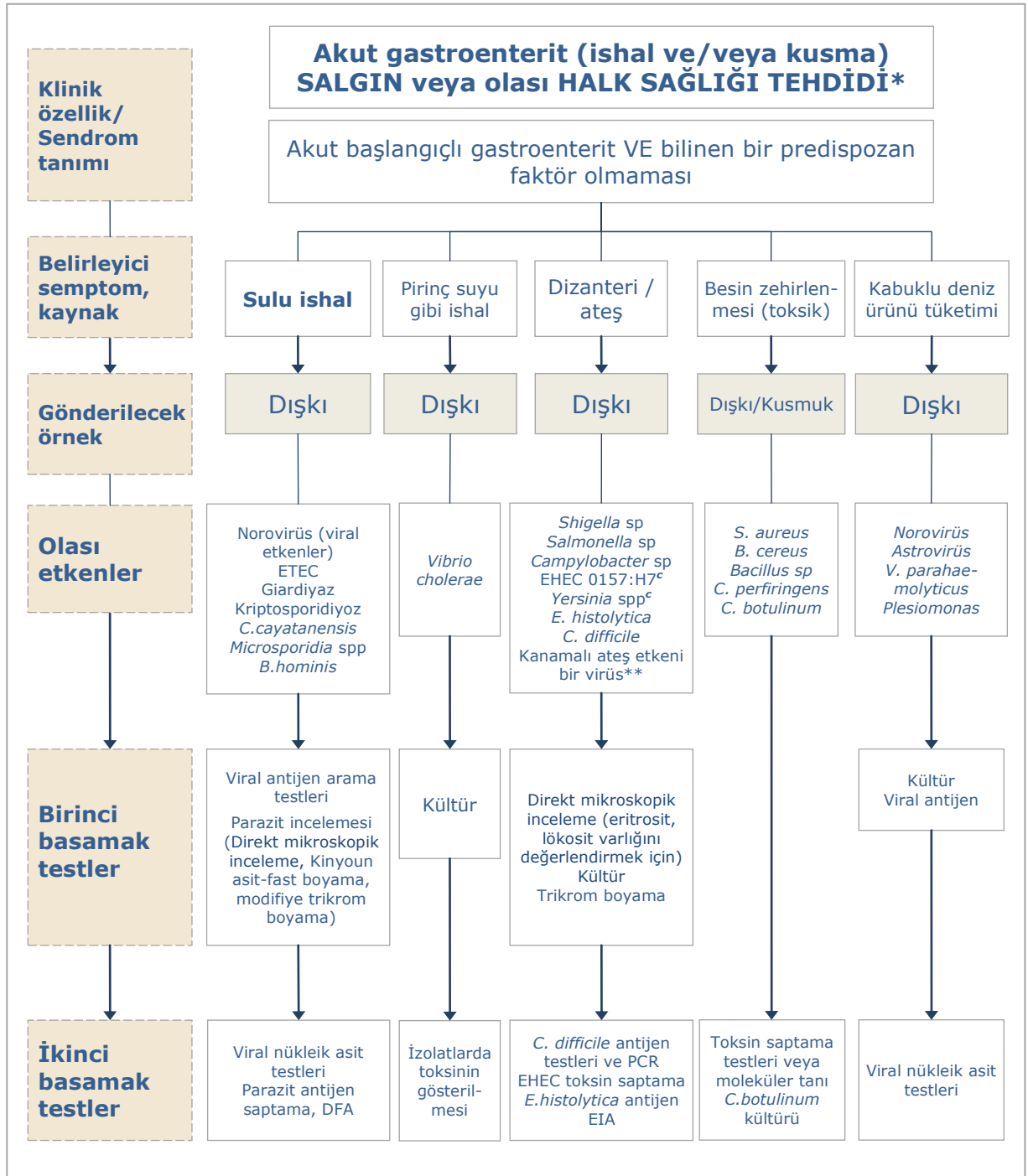


* Direkt bakıda eritrosit var ise bu etkenlerin de kültürü yapılmalıdır.

Dışkıda parazit incelemesi hem direkt hem de konsantrasyon yöntemleri ile yapılmalıdır; boyama yöntemleri lugol, trikrom, modifiye asit-fast, modifiye trikromu içerir.

& Norovirüs pozitif bulunan çocuk hastaların ishali olan erişkin yakınları da norovirüs enfeksiyonu yönünden değerlendirilmelidir.

Ek-3 Salgın durumunda sendromik yaklaşım akış şeması



* Bu akış şeması gıda ve su kaynaklı bir vaka veya salgında olayın enfeksiyöz boyutunu ele almaktadır. Ancak bazen ishalle birlikte bulunan bulantı, kusma gibi GIS belirtileri yanı sıra nörolojik belirti ve bulgular, olayda toksikolojik nedenlerin araştırılmasını gerekli kılar. Olası bütün etkenler için **Ek-1**'e bakınız!

** Kanamalı ateşler kanlı ishal ile başlayabilirler (1). Böyle bir etiolojiden şüpheleniliyorsa, uygun örnek seçimi için "Kanamalı Ateş Sendromu Tanı Yaklaşımı" ile ilgili UMS'ye bakınız.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu belge (Akut Gastroenteritlerde Sendromik Yaklaşım) aşağıda verilen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

UMS, B-MT-08	<i>Salmonella</i> enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı
UMS, B-MT-09	<i>Shigella</i> enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı
UMS, B-MT-10	<i>Campylobacter</i> enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı
UMS, B-MT-11	EHEC enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı
UMS, B-MT-12	Koleranın mikrobiyolojik tanısı
UMS, V-MT-03	Norovirus enfeksiyonunun mikrobiyolojik tanısı
UMS, V-MT-04	Rotavirus enfeksiyonunun mikrobiyolojik tanısı
UMS, P-MT-01	Amibiyazın mikrobiyolojik tanısı
UMS, P-MT-02	<i>Giardia intestinalis</i> 'in tanımlanması
UMS, P-MT-03	<i>Cryptosporidium</i> türlerinin tanımlanması
UMS, P-TP-02	Dışkının direkt mikroskopik incelemesi
UMS, GEN-ÖY-01	Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Guidelines for the collection of clinical specimens during field investigation of outbreaks. World Health Organization/CDS/CSR/EDC/2000.4.
<http://www.who.int/csr/resources/publications/surveillance/whocdscsredc2004.pdf> (son erişim tarihi: 11.01.2014)
- 2 World Gastroenterology Organisation practice guideline: Acute diarrhea. WGO, 2008
http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/en/pdf/guidelines/01_acute_diarrhea.pdf (son erişim tarihi: 11.01.2014)
- 3 İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik, Sağlık Bakanlığı,
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2013/03/20130307-7.htm> (son erişim tarihi: 11.01.2014)
- 4 Koo HL, Ajami N, Atmar RL, Dupont HL. Noroviruses: the principal cause of foodborne disease worldwide. *Discov Med* 2010;10(50):61-70.
- 5 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 6 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (erişim tarihi: 06.01.2014).
- 7 Gıda ve Su Kaynaklı Salgınlar da Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığına Gönderilecek Örnekler için İl Sağlık Müdürlüğü Saha Rehberi. T.C. Sağlık Bakanlığı, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Bakanlık Yayın No: 801, Ankara, 2010, s. 61-62.
- 8 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

AKUT SENDROMİK YAKLAŞIM REHBERİ

Akut Kanamalı Ateş

Hazırlayan Birim	Sendromik Yaklaşım Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Sendromik Yaklaşım
Bölüm	-
Standart No	SY-02
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	4
Sendromun önemi	4
Kırım Kongo kanamalı ateşi (KKKA)	5
Hantavirüs enfeksiyonu	5
Sandfly ateşi (Tatarcık humması)	6
Leptospiroz.....	6
Sıtma	6
SENDROMİK YAKLAŞIM SÜREÇ AKIŞI	7
1 Sendromun tanımı	7
2 Olası hastalıklar/etkenler	8
3 Laboratuvara gönderilecek örnek türü.....	8
4 Laboratuvardan istenecek tetkikler.....	8
EKLER.....	9
Ek-1 Viral kanamalı hastalıklar ve özellikleri ^{4,7,8}	9
Ek-2 Akut kanamalı ateş sendromu - tanı yaklaşımı akış diyagramı	12
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	14
KAYNAKLAR	14

Kapsam ve Amaç

Akut kanamalı ateşler genellikle yüksek mortalite, bazılarının salgın potansiyeli ve etkenlerinin biyolojik tehdit ajanı olarak kullanılabilme olasılığı gibi nedenlerle halk sağlığı önemi yüksek enfeksiyonlardır. Etiyolojide rol oynayan etkenler çoğunlukla akut viral hemorajik ateşe yol açan virüsler olmakla birlikte bazı bakteri ve parazitler de bu tabloda yer alırlar (1,2,3,4) ve ülkemizde hemen hepsi bildirim zorunlu hastalıklardır (5,6).

Türkiye için etiyolojide ilk düşünülmesi gerek enfeksiyonlar arasında Kırım Kongo kanamalı ateşi (KKKA), Hantavirüs kanamalı ateşi ve leptospiroz (Weil hastalığı) yer almaktadır. Ancak giderek artan uluslararası seyahat dünyanın farklı endemik bölgelerinden diğer etkenlere bağlı kanamalı ateş olasılığını da akla getirmelidir.

Ciddi kanamalar ile seyrederek ölümlü sonuçlanabilen bu vakaların erken tanısı prognoz açısından çok önemlidir. Akut kanamalı ateş sendromu ile hekime gelen vaka bir epideminin ilk vakası (habercisi) da olabilir ve zamanında kontrol önlemlerinin alınması etkenin erken tespiti ile mümkündür. Bu nedenlerle bu Belgenin, vakaları ilk görecek hekimlere yol gösterecek bir Rehber olması hedeflenmiştir. Amacı; hekimin semptomlardan ve epidemiyolojik ipuçlarından yola çıkarak -ülkemizde henüz görülmemeyen ancak görülme potansiyeli olan kanamalı ateşler de dahil- *hangi etkenleri öncelikle düşüneceğine ve hangi örnekleri, hangi tanı testleri için, ne zaman göndereceğine* dair izleyebileceği bir **akış şeması** vermektir. Belgenin paralel amaçlarından biri de, laboratuvar sonuçlarının doğruluğu ve güvenilirliği dahil, laboratuvarların tanısız kapasitesinin gelişmesini teşvik etmesidir.

Kanamaya sebep olan enfeksiyon dışı hastalıklar ve benzer tablo ile seyreden sepsis, DİK ve septik şok bu akış şemasının dışında tutulmuştur. Akış şeması, standart tanı ve tedavi gereklerini de kapsamamaktadır.

Kısaltmalar ve Tanımlar

aPTT	Aktive parsiyel tromboplastin zamanı
ARDS	Akut respiratuvar stres sendromu
AST	Aspartat amino transferaz
AST	Alanin amino transferaz
CPK	Kreatin fosfokinaz
DİK	Dissemine intravasküler koagülasyon
INR	International normalized ratio
KKKA	Kırım-Kongo kanamalı ateşi
LDH	Laktat dehidrogenaz
MAT	Mikroskopik aglütinasyon testi
PT	Protrombin zamanı
VHA	Viral hemorajik ateş

Genel Bilgi

Sendromun önemi

Akut kanamalı ateş grubuna giren hastalıklar vücutta birçok sistemi, özellikle de vasküler sistemi tutan ve kanamaların eşlik edebildiği, hafif enfeksiyonlardan yaşamı tehdit eden ağır hastalıklara kadar değişen farklı klinik tablolar oluşturabilirler. Etkenler başta viral kanamalı ateşe neden olan virüsler olmak üzere, bazı bakteri ve parazitler olabilir. Viral etkenler arasında *Arenaviridae* (Lassa ateşi, Junin ve Machupo), *Bunyaviridae* (Kırım-Kongo kanamalı ateşi, Rift Valley ateşi, *Hantaan* kanamalı ateşi), *Filoviridae* (*Ebola* ve *Marburg*) ve *Flaviviridae* (sarı humma, dengue, Omsk kanamalı ateşi, *Kyasanur* orman ateşi) yer alır (1,4,7,8). Bakteri ve paraziter hastalıklar arasında ise leptospirozis ve *falciparum* sıtması sayılabilir (2,3,4).

Başlangıç semptomları genellikle ateş ile birlikte halsizlik, kas ağrıları, iştahsızlık ve aşırı yorgunluktur. Ağır olgularda iç organlarda, deri altında, ağız, burun ve konjonktiva gibi vücut girişlerinde kanamalar görülebilir. Şok, santral sinir sistemi fonksiyon bozukluğu, koma, deliryum, konvülsiyon, karaciğer ve böbrek yetmezliğine yol açabilirler. Ağır klinik tablo ile seyreden olgularda komplikasyon ve ölüm risk de yüksektir. Genellikle klinik bulguların ayırt ettirici özelliği olmadığından akut kanamalı ateşin akla getirilmesinde epidemiyolojik ilişki (endemik bölgede yaşama veya endemik bölgeye seyahat öyküsü gibi) önemlidir. Özgül tanı laboratuvar incelemesi ile konur. Hızlı tanı ve erken tedavi, hastalığın prognozunda önemlidir.

Akut kanamalı ateşe neden olan etkenler sıklıkla zoonotik etkenlerdir. Etkenin yaşamı, hayvan veya vektör konaklara bağlıdır ve konağa bağlı coğrafik dağılım gösterirler. İnsanlar genellikle enfekte konak ile temas sonucu (kemiriciler, kene ve diğer artropodlar) hastalanırlar. Bazı enfeksiyonların insandan insana bulaşma potansiyelleri de vardır. Vakalar genelde sporadiktir. Ancak toplumda yayılarak epidemilere neden olabilmektedirler. Günümüzde artan seyahatler nedeniyle uluslararası halk sağlığı için tehdit olabilecek potansiyelleri de mevcuttur. Bu nedenle, hem enfeksiyonun erken tanınarak mortalitenin azaltılması, hem de bu enfeksiyonların toplumda yayılarak salgınlara yol açmasının önlenmesi amacıyla, 'akut kanamalı ateş sendromu' tanımı içinde yer alan vakalara erken tanı konulması önemlidir.

Türkiye için etiolojide ilk düşünülmesi gerek enfeksiyonlar arasında KKKA, Hantavirüs kanamalı ateşi, Sandfly ateşi ve leptospiroz (Weil hastalığı) yer almaktadır. Bunun yanında uluslararası seyahatler nedeniyle *P. falciparum* sıtması, dengue kanamalı ateşi, chikungunya ateşi ve sarı humma da akılda tutulması gereken enfeksiyonlardır. Nitekim yakın zamanda ülkemizde yurt dışı kaynaklı dengue ateşi ve chikungunya ateşi vakaları bildirilmiştir (9,10). Özellikle Afrika seyahatleri nedeniyle son yıllarda artan *P. falciparum* olguları görülmektedir (11,12). 2009 yılında tespit edilen 84 sıtma vakasının 38'inde etken *P. vivax* iken 46 olguda etken *P. falciparum* olarak saptanmıştır (13,14). Ayrıca Trakya bölgesinde yapılan bir çalışmada, dengue, sarı humma ve chikungunya virüslerinin vektörü olan *Aedes albopictus* cinsi sivrisinekler tespit edilmiştir (15). Bu veriler, daha önceden ülkemizde rastlanmayan bu enfeksiyonlarla ilerde karşılaşabileceğimizi düşündürmektedir.

Kırım Kongo kanamalı ateşi (KKKA)

KKKA ülkemizde ağırlıklı olarak İç Anadolu Bölgesinin kuzeyi, Karadeniz Bölgesinin güneyi ve Doğu Anadolu Bölgesinde görülmektedir. Hastalığın yoğun olarak görüldüğü başlıca iller; Erzurum, Erzincan, Gümüşhane, Bayburt, Tokat, Yozgat, Sivas, Amasya, Çorum, Çankırı, Bolu, Kastamonu, Bartın, Karabük illeridir (16,17,18,19). Endemik bölgelerde KKKA seroprevalansı %10 olarak bulunmuştur (19). Son yıllarda hastalığın görüldüğü alan genişlemiş olup hemen hemen Türkiye'nin her bölgesinden vaka bildirimleri yapılmaktadır. Her yıl ilkbahar ve yaz aylarında (Nisan-Ekim) görülmekte ve Haziran-Temmuz aylarında pik yapmaktadır. Ülkemizde ortalama mortalite hızı %5'tir (16). Hastalık esas olarak *Hyalomma* cinsi kenelerin tutunması ya da çıplak elle ezilmesi ile bulaşır. Diğer bir bulaş yolu da enfekte hasta ya da hayvanın kan ve dokularıyla temastır. En büyük risk grubu endemik bölgelerde kırsal kesimde yaşayan çiftçilerdir (20,21).

İnkübasyon dönemi kene tutunmasından sonra 1-3 gün (maksimum 9), virüsü içeren kan ve dokularla temastan sonra 5-6 gündür (maksimum 14). Hastalığın tipik başlangıç bulguları ateş, iştahsızlık, yaygın kas ağrıları, baş ağrısı, bulantı-kusma ve ishaldir. Bazı hastalarda makülopapüller döküntü, hepatomegali ve splenomegali görülebilir. Hastalığın ilerleyen dönemlerinde peteşi, purpura, hematom, diş eti kanaması, burun kanaması ve iç organ kanamaları gelişebilir. Ağır olgularda şuur değişikliği, konvülsiyon, hepatorenal yetmezlik, ARDS, DİK ve koma gelişerek ölüme kadar gidebilir. Tipik laboratuvar bulguları; lökopeni, trombositopeni, ALT, AST, CPK ve LDH enzimlerinde yükselme, pıhtılaşma testlerinde (PT, aPTT, INR) uzamadır (20,21,22). Tanı PCR ile viral genomun ya da ELISA ile özgül IgM/IgG antikorlarının gösterilmesi ile konulur (20,21,23).

Hantavirüs enfeksiyonu

Türkiye'de ağırlıklı olarak Karadeniz bölgesinde rastlanır. Ülkemizde *Hantaan*, *Dobrova* ve *Puumala* serotiplerinin etken olduğu renal sendromla seyreden formu görülmektedir. Genellikle Zonguldak-Bartın-Giresun-Ordu bölgesinden vakalar bildirilmiştir. Başta Karadeniz Bölgesi olmak üzere sporadik olarak vakalar görülmeye devam etmektedir (24). Yakın zamanda (2009) Zonguldak-Bartın Bölgesi'nde salgın yaşanmıştır. Bu olguların çoğunda etkenin *Puumala* olduğu saptanmıştır (25,26). Risk altındaki popülasyonda yapılan seroprevalans çalışmasında sağlıklı kişilerde %5.2 hantavirüs antikorları tespit edilmiştir (26). Enfekte kemiricilerin idrar ve dışkılarıyla çevresel ortama saçılan virüslerin solunum yolu, deri veya mukozal (orofarinks, konjonktiva) yoldan alınması ile insanlara bulaşır. Kemiricilerin doğal yaşam alanlarında yaşayanlar veya aktivitede bulunanlar risk altındaki popülasyondur (27).

Ateş, trombositopeni ve akut böbrek yetmezliği en belirgin özellikleridir. Periorbital ödem, skleralarda yaygın eritem, ani bulanık görme ve kemozis tipik göz belirtileridir. Hastaların 1/3'ünde kanamalar (peteşi, purpura, iç organ kanaması) ortaya çıkar. Hastalığın en belirgin hasarı böbreklerde görülür. Ölüm çoğunlukla böbrek yetmezliği, DİK, şok ve kanamaya bağlı gelişir (27,28,29). En sık kullanılan tanı testi IFA, ELISA, immünblot ve immünokromatografik yöntemlerle özgül antikorların tespit edilmesidir. PCR ile serum ve idrarda *Hantavirüs* RNA'sı saptanması ise çok değerli bir tanı yöntemidir (29,30).

Sandfly ateşi (Tatarcık humması)

Sandfly ateşi genellikle asemptomatik seyreder. Bu grupta yer alan 'Sandfly fever Sicilian virus' ve 'Sandfly fever Naples virus' türleri ateş, halsizlik, kas ağrıları ile seyreden febril hastalığa yol açarken, *Toscana virüs* aseptik menenjit ve ensefalite neden olmaktadır (4). Hastalık tatarcık sineklerinin (*Phlebotomus*) ısırması ile insanlara bulaşmaktadır. Ülkemizde Güney ve Orta Anadolu illerinde epidemiler bildirilmiştir (31,32). Kan donörlerinde Orta, Kuzey, Güney ve Güneydoğu illerinde seropozitiflik tespit edilmiştir (33). Genellikle ateş, miyalji, bulantı, kusma, ishal ile birlikte trombositopeni, lökopeni, CPK ve karaciğer enzim yüksekliği görülmektedir (31,32). Olgular KKKA ile karışabilmektedir. Tanı serumda PCR ile viral nükleik asidin gösterilmesi ya da ELISA ile IgM antikorlarının saptanmasıyla konulmaktadır.

Leptospiroz

Leptospiroz çok yağış alan tropikal ve subtropikal ülkelerde daha çok olmakla birlikte tüm dünyada yaygın olarak görülür. Ülkemizde Çukurova ve Samsun bölgelerinden olgular bildirilmiştir (34,35,36). Çukurova yöresinde hayvancılıkla uğraşanlarda %4.4, Samsun yöresinde riskli meslek grubunda %4.3 seropozitiflik saptanmıştır. En önemli rezervuarı farelerdir. Enfekte hayvanların idrar ve dokularıyla doğrudan temas ya da enfekte nemli toprak veya suya maruziyet sonucu bulaşır. En sık bulaş yolu, enfekte olmuş göl, havuz, kanal suyu, bataklık ve pirinç tarlalarındaki sularla temas sonucu derideki yaralardan, ağız, burun ve konjonktiva mukozasından etkenin alınmasıdır. Sel suları da *Leptospira* için uygun ortamdır. Çeltik tarımı ile uğraşanlar, kanalizasyon işçileri, rafting yapanlar, doğadaki kaynaklardan su içen doğa yürüyüşçüleri, göl ve derelerde yüzenler risk grubunda yer alır (37).

Olguların %10'unda ateş sarılık, kanama, böbrek yetmezliği ve nörolojik bulguların ön planda olduğu Weil hastalığı gelişir. Hastalık, böbrek ve karaciğer fonksiyon bozukluğu (hepatorenal sendrom), kanama, kollaps ve bilinç bozukluğu ile karakterizedir. ALT, AST, üre ve kreatin yüksekliği, bilirubin ve CPK düzeylerinde belirgin artış ve trombositopeni tipik laboratuvar bulgularıdır (2,36). Tanıda serolojik testler tercih edilmektedir. Serolojik referans test mikroskopik aglütinasyon testidir (MAT). Hastalığın erken fazında ise ELISA testi MAT testinden daha duyarlıdır (38).

Sıtma

Sıtma ülkemizde Güneydoğu Anadolu Bölgesi ve Doğu Akdeniz Bölgesi'nde sporadik olarak görülmektedir. *P. vivax* ülkemizde en fazla sıtma oluşturan tür olmakla birlikte son yıllarda artan seyahatler nedeniyle yurt dışı kaynaklı *P. falciparum* sıtmasına sık rastlanmaktadır (11,12,13,14).

P. falciparum Afrika, Yeni Gine, Haiti ve Dominik Cumhuriyeti'nde endemiktir (39). Sıtma esas olarak enfekte dişi anofel türü sivrisineklerin kan emmesi sırasında bulaşmakla birlikte, enfekte kan transfüzyonu veya organ transplantasyonu ile de bulaş olabilir (40).

P. falciparum sıtması en ağır seyreden ve en ölümcül sıtma türüdür. Koma, jeneralize konvülsiyon, sıvı-elektrolit dengesizliği, böbrek yetmezliği, hipoglisemi, hemoglobinüri, şok, DİK, akciğer ödemi ve ölüme yol açabilir. Hastalarda anemi, lökopeni, trombositopeni, karaciğer fonksiyon testlerinde yükselme, indirekt bilirubin artışı, hipoglisemi, hepatosplenomegali, akciğer ve böbrek disfonksiyonu ve nörolojik değişiklikler saptanabilir (39). Tanı, Giemsa ile boyanmış kalın damla ve ince yayma preparatlarında parazitin formlarının gösterilmesi, ELISA, IFA gibi serolojik testlerle özgül antikorların saptanması ya da PCR ile etkenin nükleik asitlerinin tespit edilmesiyle konur. Hızlı antijen tespit yöntemi ('dipstick' test) son yıllarda sık kullanılan tanı testleri arasında yer almaktadır (2,41,42).

Sendromik Yaklaşım Süreç Akışı

1 Sendromun tanımı

Akut kanamalı ateş; kanama için predispozan faktör yokluğunda, 3 haftadan daha kısa süren akut başlangıçlı ateş ile birlikte aşağıdakilerden en az ikisinin olmasıdır:

- Hemorajik ya da purpurik döküntü
- Burun kanaması
- Hematemez
- Hemoptizi
- Kanlı dışkılama
- Diğer hemorajik semptomlar

"Şans hazırlıklı beyinlere güler."

Louis Pasteur o günün bilim adamlarına bu ünlü özdeyiş ile seslenmişti ve bugün halen alışılmadık bir klinik durum ile karşı karşıya olan bir hekim için de bu özdeyiş aynı ölçüde geçerli. Bir VHA'nın teşhis edilmesinde de, yüksek bir klinik şüphe en iyi araçtır. Damar tutulumu bulguları ile ciddi bir ateşli hastalığı olan ve endemik bölgeye seyahat / bölgede yaşama öyküsü olan herhangi biri hekimde bir VHA'yı akla getirmelidir. Hayvan veya arthropod maruziyeti de sorgulanmalıdır. Askeri personelin veya endemik olmayan bir bölgede yaşayan bireylerin VHA belirtileri ile gelmesi ise hekimi biyoterörizm olasılığı bakımından uyarmalıdır.

Adalja A. Viral hemorrhagic fevers. In: Antosia RE, Cahill JD (eds). Handbook of Bioterrorism and Disaster Medicine. Springer Science+Business Media, LLC, New York, NY. 2006, p.119-123

2 Olası hastalıklar/etkenler

Viral etkenler - *Arenaviridae* (Lassa ateşi, Junin ve Machupo), *Bunyaviridae* (Kırım-Kongo kanamalı ateşi, Rift Valley ateşi, *Hantaan* kanamalı ateşi), *Filoviridae* (*Ebola* ve *Marburg*) ve *Flaviviridae* (sarı humma, dengue, Omsk kanamalı ateşi, *Kyasanur* forest disease)

Bakteri ve parazitler - *Leptospira* ve *P. falciparum*

Türkiye’de görülen hastalıklar - Kırım Kongo kanamalı ateşi, Hantavirüs kanamalı ateşi, Sandfly ateşi, Leptospiroz (Weil hastalığı)

Türkiye’de tespit edilen yurtdışı kaynaklı hastalıklar - *Falciparum* sıtması, dengue kanamalı ateşi, chikungunya ateşi

Viral kanamalı ateş grubunda yer alan hastalıklar ve özellikleri Ek-1’de topluca verilmiştir.

Akut hemorajik ateş şüpheli vakanın tanısında izlenecek yol için bir akış diyagramı da Ek-2’de verilmiştir.

3 Laboratuvara gönderilecek örnek türü

Kan, serum, idrar (Hantavirüs için), doku örneği/otopsi materyali, Kalın damla ve periferik yayma (sıtma için).

Seçilecek inceleme örnekleri, özellikleri, alınması ve gönderilmesi ile ilgili bilgi için *bkz.* “Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi”

Şüpheli vakaya ait örnekler kesinlikle biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun bir şekilde *paketlenmeli* ve *taşınmalıdır* (43) (ayrıca *bkz.* UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).

4 Laboratuvardan istenecek tetkikler

Olası etkenlere göre incelenecek örnekler ve önerilen testler için *bkz.* Ek-1. Şüpheli vakaların tanısında izlenecek **akış şeması** için *bkz.* Ek-2.

Ekler

Ek-1 Viral kanamalı hastalıklar ve özellikleri^{4,7,8}

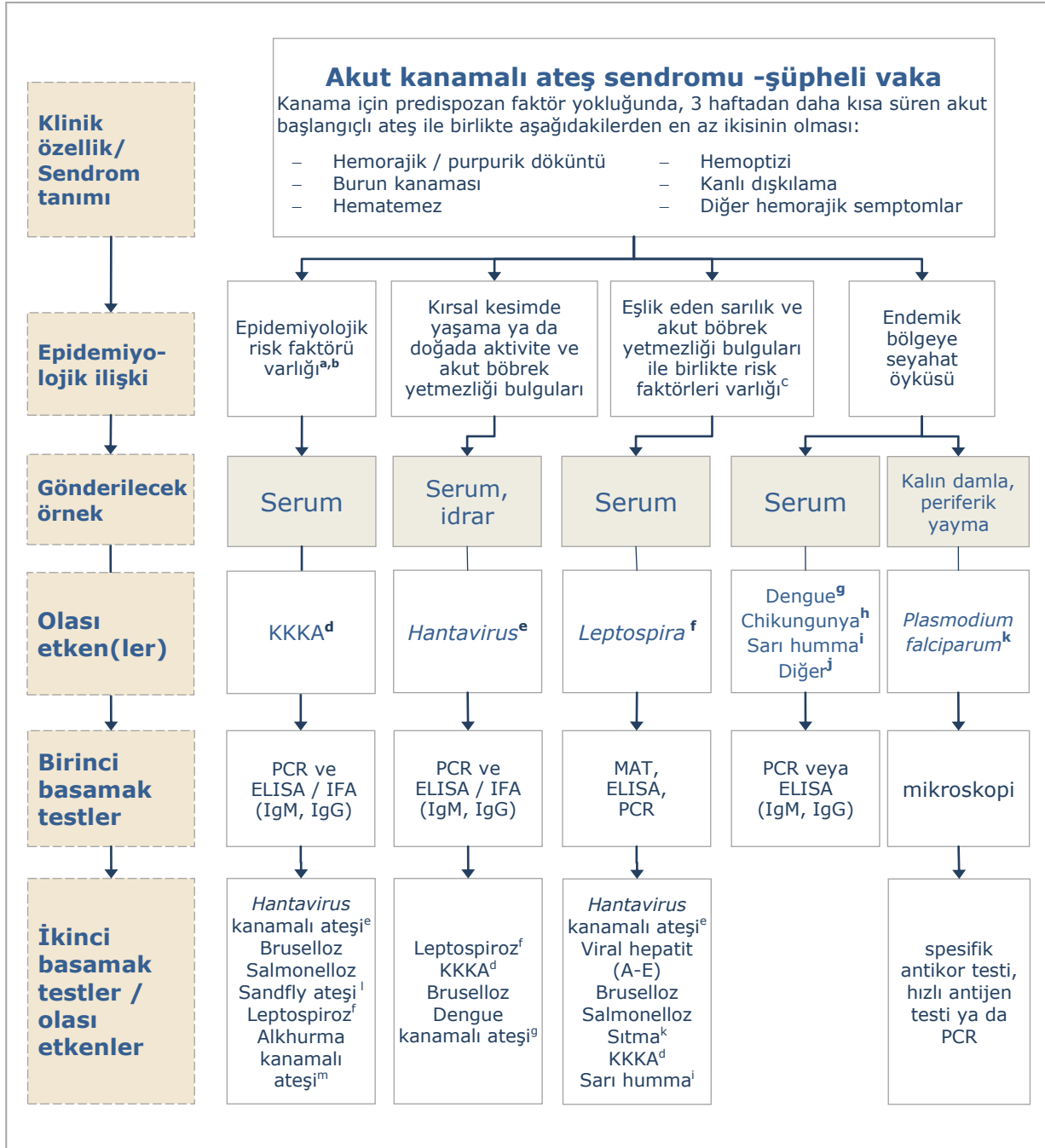
Hastalık	Vektör	Bulaş yolları	Görüldüğü bölgeler	İnkübasyon süresi	Önemli klinik* ve laboratuvar bulguları	Tanı yöntemleri	Mortalite oranı
Kırım Kongo kanamalı ateşi	<i>Hyalomma</i> cinsi keneler	Enfekte kene tutunması, enfekte kenelerin çıplak el ile ezilmesi, viremik hayvanların kan ve dokuları ile temas, viremik hastaların kan ve diğer vücut sıvıları ile temas, kan içeren damlacık yolu ile bulaş	Dünyada / Asya, Orta Doğu, Afrika, Doğu Avrupa Türkiye'de/ İç Anadolu Bölgesinin kuzeyi, Karadeniz Bölgesinin güneyi ve Doğu Anadolu Bölgesi	Kene tutunması 1-3 gün (maks. 9 gün) Kan/doku ile temas 5-6 gün (maks. 13 gün)	Makülopapüler döküntü, peteşi, purpura, ekimoz, diş eti kanaması, burun kanaması, iç organ kanamaları, hepatosplenomegali, depresyon, somnolens, yüz ve gövdede flushing, konjonktivit, kemozis, yumuşak damak ve uvulada hemorajik ekzantem, ağır olgularda hepatorenal ve pulmoner yetmezlik, DİK ve şok, trombositopeni, lökopeni/lökositoz, lenfopeni, ALT, AST, CPK, aPTT, PT ve INR yüksekliği	Serum ya da dokuda PCR ile virüsün tespiti; Serumda IgM/IgG antikorlarının gösterilmesi (ELISA/IFA); Kan ve dokulardan virüs izolasyonu ya da viral antijen tespiti (ELISA)	% 5-30
Renal sendrom ile seyreden Hanta virüs kanamalı ateşi	Kemiriciler (fareler)	Enfekte kemiricilerin idrar, dışkı ve diğer sekresyonları ile çevresel ortama saçılan virüslerin solunum, deri veya mukozal (orofarinks, konjonktiva) yolla alınması. İnsandan insana direkt bulaş bilinmiyor	Dünyada: Orta/Güney Çin, Kore, Japonya, Rusya, İskandinavya, Doğu/Güney ve Orta Avrupa Türkiye'de: Karadeniz Bölgesi	5-42 gün (çoğunlukla 12-16 gün)	Akut böbrek yetmezliği, kanama (peteşi, purpura, iç organ kanaması) konjonktivit, periorbital ödem, skleralarda yaygın eritem, ani bulanık görme, kemozis, bazen konfüzyon, meningismus, konvülsiyon, ağır vakalarda DİK, hipotansiyon, şok, trombositopeni, lökositoz, kan üre ve kreatin seviyesinde yükselme, proteinüri	Serum ve idrarda PCR ile virüsün tespiti; Serumda ELISA/IFA ile IgM/IgG antikorlarının gösterilmesi	<i>Hantaan</i> ve <i>Dobrava</i> %3-10 <i>Seoul</i> 1% <i>Puumala</i> <0.1
Sandfly ateşi	<i>Phlebotomus papatasi</i> , <i>Phlebotomus perniciosus</i> , <i>Phlebotomus perfiliewi</i>	Tatarcık tarafından ısırılma. İnsandan insana direkt bulaş bilinmiyor	Dünyada: Orta Doğu, Nil Vadisi, Asya, Bazı Avrupa ülk. Türkiye'de: Kuzey / Orta / Güney / Güneydoğu Anadolu	3-14 gün	<i>Toscana</i> virüs ile aseptik menenjit/ensefalit kliniği, diğerlerinde (<i>Scilian, Naples</i>) febril ateş kliniği, trombositopeni, lökopeni, CPK ve karaciğer enzim yüksekliği	Serum ya da BOS'ta PCR ile viral nükleik asitin tespiti ya da virüs izolasyonu; Serum ya da BOS'ta IgM/IgG antikorlarının saptanması	Benign seyirli
Dengue kanamalı ateşi	<i>Aedes aegypti</i> ve <i>Aedes albopictus</i>	Sivrisinek tarafından ısırılma. İnsandan insana direkt bulaş bilinmiyor	Dünyada: Afrika, Orta ve Güney Amerika, Güneydoğu Asya, Güney ve Orta Pasifik Adaları, Avustralya	3-14 gün (genellikle 5-7 gün)	Ateşle birlikte trombositopeni, plazma kaçağı, hemokonsantrasyon (Htc>%20), ileri dönemlerde dolaşım yetmezliği bulguları (hipotansiyon, zayıf ve hızlı nabız), nötropeni, daha sonra lenfositoz, ALT ve özellikle AST yüksekliği, DİK bulguları	Semptomların ilk 5 gününde serumda PCR ile viral genom tespiti ya da virüsün üretilmesi; Semptomlardan 4-5 gün sonra serumda ELISA ile IgM/IgG tespiti	Yetersiz tedavi ile %40-50
Sarı humma	Sivrisinek	Sivrisinek tarafından ısırılma. İnsandan insana direkt bulaş bilinmiyor	Dünyada: Tropikal Afrika ve Güney Amerika	3-10 gün	Sarılık, konjonktival kızarıklık, koyu renkli idrar, oligüri/anüri, proteinüri, hematüri, peteşi, ekimoz, iç organ kanaması, relatif bradikardi, böbrek yetmezliği, şok, erken lökopeni, albüminüri	Kanda virüs izolasyonu ya da PCR ile virüsün tespiti; ELISA/IFA ile spesifik IgM/IgG antikorların tespiti, dokuda viral antijenin gösterilmesi	%10-50

Hastalık	Vektör	Bulaş yolları	Görüldüğü bölgeler	İnkübas-yon süresi	Önemli klinik* ve laboratuvar bulguları	Tanı yöntemleri	Mortalite oranı
Chikungunya ateşi	<i>Aedes</i> cinsi sivrisinek	Sivrisinek tarafından ısırılma. İnsandan insana direkt bulaş bilinmiyor (vertikal bulaş ?)	Dünyada: Afrika, Güneydoğu Asya, Pasifik, Arap Yarımadası ve Avrupa (İtalya, Fransa)	2-12 gün (genellikle 3-7 gün)	Artralji (tipikolarak diz, ayak bileği ve küçük eklemler), makülopapüler döküntüler, bukkal enanem, ekstremelerde ödem, özellikle çocuklarda hafif kanama (dişeti/burun)	Serumda ELISA ile IgM/IgG antikorlarının tespiti; PCR ya da viral kültür ile virüsün gösterilmesi; (viremi süresi kısa)	Benign seyirli
Ebola kanamalı ateşi	Doğal vektörü bilinmiyor (maymun ve şempanze)	İnsandan insana direkt temas (kan, doku vücut sıvıları, semen), seksüel temas, nadiren aerosol, enfekte hayvanlarla temas (maymun, şempanze, yaras vb)	Afrika	7 gün (2-21 gün)	Morbiliform döküntü, konjonktivit, peteşi, ekimoz, burun kanaması, dış eti kanaması, iç organ kanamaları, enjeksiyon yerlerinden kanama, disfaji, boğazda inflamasyon, mental durum değişikliği, ciddi trombositopeni, lökopeni, erken lenfopeni, geç nötrofil, ALT ve AST yüksekliği	Kan, serum / dokuda PCR ile virüsün tespiti / virüsün izolasyonu; Serumda ELISA ile viral antijen tespiti; ELISA/IFA ile spesifik IgM/IgG tespiti; Dokuda histo-kimyasal boyama	Virüs türüne bağlı olarak %53-90
Lassa kanamalı ateşi	Kemiciciler	Kemicicilerin çıkartıları ile direkt ya da indirekt temas, hastaların kan, doku ve vücut sıvıları ile direkt temas, cinsel temas, hava yolu ile insandan insana bulaş (yüksek viral yükü olanlarda)	Batı Afrika	6-21 gün	Persistan ya da intermitant yüksek ateş, persistan ishal ve kusma, konjonktivit, ciddi vakalarda hipotansiyon, şok, dolaşım yetmezliği, plevral/perikardiyal efüzyon, asit, pnömonitis, relatif bradikardi, kanlı balgam, kanamalar, yüz ve boyunda ödem, epilepsi, ensefalopati, deride döküntü/ peteşi/ekimoz olmaması, karaciğer yetmezliğinin olmaması, lökopeni, albüminüri, erken lenfopeni, geç nötrofil, hemokonsantrasyon, orta düzeyde trombositopeni	Serum ya da dokuda PCR ile virüsün tespiti; Kan ve idrardan virüsün izolasyonu; Serumda ELISA ile viral antijen tespiti; Serumda ELISA/IFA ile IgM/IgG antikor tespiti; Dokuda immünohisto-kimyasal boyama	%2-16, 15 yaş üstünde %15-20, gebelerde %87'ye kadar
Marburg kanamalı ateşi	Doğal vektörü bilinmiyor (Afrika yeşil maymunları ve yarasalar)	İnsandan insana direkt temas (kan, doku vücut sıvıları, semen), seksüel temas, enfekte hayvanlarla temas (Afrika yeşil maymunu vb)	Orta Afrika	3-9 gün	Morbiliform döküntü, peteşi, ekimoz, burun kanaması, dış eti kanaması, iç organ kanamaları, enjeksiyon yerlerinden kanama, boğazda inflamasyon, yumuşak damakta küçük transparan lezyonlar, konjonktivit, mental durum değişikliği, ciddi trombositopeni, lökopeni, erken lenfopeni, geç nötrofil, ALT ve AST yüksekliği	Kan, serum ya da dokuda PCR ile virüsün tespiti; Kan ve dokulardan virüs izolasyonu; Serumda ELISA ile viral antijen tespiti; Serumda ELISA ile IgM/IgG antikor tespiti; Dokuda histo-kimyasal boyama	%30-70
Rift Valley ateşi	Sivrisinek	Sinek ısırığı, enfekte kan ile direkt temas, enfekte hayvan materyalleri ile temas, enfekte çiğ süt tüketimi. İnsandan insana bulaş bilinmiyor	Afrika (Doğu Afrika, Güney Afrika, Moritanya, Mısır), Arabistan Yarımadası'nın güneyi (Yemen, Suudi Arabistan)	2-6 gün	Oküler formu: Retinit, görme bozukluğu Ensefalit formu: Baş ağrısı, bilinç bulanıklığı, konvülsiyon, koma Hemorajik ateş formu: Karaciğer yetmezliği, kanama Dokümante edilmemiş olmamasına rağmen hepatik ve hematolojik anormallikler görülebilir	Semptomların başlangıcından ilk 3-4 gün içinde PCR ya da viral kültür ile serumda virüsün tespiti; Semptomların başlangıcından 5 gün sonra serumda ELISA ile IgM/IgG antikorlarının saptanması	Kanamalı ateş formunda %50

Hastalık	Vektör	Bulaş yolları	Görüldüğü bölgeler	İnkübasyon süresi	Önemli klinik* ve laboratuvar bulguları	Tanı yöntemleri	Mortalite oranı
Omsk kanamalı ateşi	Kemirici, misk faresi, kene	Enfekte misk faresi kanı ile temas, enfekte kene ya da hayvan tarafından ısırılma, kontamine su ve süt. İnsandan insana bulaş bilinmiyor	Rusya	3-8 gün	Burun kanaması, konjonktivit, bronkopnömoni, yumuşak damakta papüloveziküler döküntü, servikal LAP, %30-50 vakada 2. febril faz (kanamalar ve şok), lökopeni, trombositopeni	Kan ve BOSTa virüsün izolasyonu veya PCR ile virüsün tespiti; ELISA ile serum ve BOS'ta IgM tespiti	%0.5-3
Junin kanamalı ateşi ve Machupo kanamalı ateş	Kemiriciler	Enfekte kemiricilerin çıkartıları ile temas, kontamine yiyeceklerin tüketimi, kontamine aerosol inhalasyonu, insandan insana (Machupo: emzirme ile) bulaş mümkün	Junin: Arjantin Machupo: Bolivia	Junin: 7-14 gün (3 haftaya kadar uzayabilir) Machupo: 5-19 gün	Retroorbital ağrı, fotofobi, konjonktivit, hiperestezi, peteşi, diş eti kanaması, faktör eksikliği, PT uzaması, iç organ kanaması, kapiller kaçak sendromu, hipovolemik şok, renal yetmezlik, nörolojik bulgular	Serum ve boğaz çalkantı suyundan virüs izolasyonu; Serum, plazma, idrar, boğaz çalkantı suyu ve dokuda PCR ile virüs tespiti; ELISA ile antijen / antikor tayini	Tedavi edilmez ise %20, tedavi edilirse %1
Kyasanur orman hastalığı	Kene	Kene teması, enfekte hayvan (maymun vb) ile temas	Hindistan (Karnatakas-tate)	3-8 gün	Kanama, dehidratasyon bulguları, hipotansiyon, bifazik seyir (2. fazda ensefalit), trombositopeni, anemi, lökopeni,	Virüsün kandan izolasyonu; Seroloji (ELISA)	%3-5
Alkhurma kanamalı ateşi	Kene	Kene teması, enfekte kan ile temas, enfekte hayvan (deve) ürünlerinin tüketimi	Suudi Arabistan (Mekke ve Najran)	3-8 gün	Retroorbital ağrı, hepatit, kanama (%55), ensefalit (%20), lökopeni, trombositopeni	Virüsün kültür ya da PCR ile tespiti; Serolojik yöntemle IgM tespiti	%25

*Hemen tüm hastalıklarda görülen ateş, üşüme/titreme, halsizlik, baş ağrısı, baş dönmesi, iştahsızlık, miyalji, bulantı, kusma, ishal, karın ağrısı, artralji gibi nonspesifik semptomların dışındaki klinik semptomlar verilmiştir.

Ek-2 Akut kanamalı ateş sendromu - tanı yaklaşımı akış diyagramı



a. Epidemiyolojik risk faktörleri:

- Endemik bölgede yaşayan tarım ve hayvancılık ile uğraşan çiftçiler, çobanlar, kasaplar, mezbaha çalışanları
- Endemik bölgede kene teması ya da hayvanların kan ve dokularıyla temas
- Endemik bölgeye son iki hafta içinde seyahat
- Veteriner hekimler
- Laboratuvar çalışanları
- Enfekte hastalarla temas eden sağlık personeli
- Askerler
- Kamp yapanlar
- Hasta yakınları

b. Endemik bölgeler: İç Anadolu Bölgesinin kuzeyi, Karadeniz Bölgesinin güneyi ve Doğu Anadolu Bölgesi

En çok görüldüğü iller: Tokat, Yozgat, Sivas, Amasya, Çorum, Çankırı, Bolu, Kastamonu, Erzurum, Erzincan, Gümüşhane, Bayburt, Bartın, Karabük. Bununla birlikte diğer illerden de sporadik bildirimler mevcuttur.

- c. Risk faktörleri:**
- Enfekte olmuş sularla temas (göl, havuz, kanal suyu, bataklık, piriç tarlaları, sel suları)
 - Çiftçiler
 - Çeltik tarımı ile uğraşan işçiler
 - Mezbaha işçileri, avcılar, veterinerler
 - Gemiciler, kanalizasyon işçileri, askeri personel
 - Rafting ile uğraşanlar
- d. KKKA PCR ve ELISA/IFA:** Serumda PCR ilk 2 hafta pozitifdir. IgM ve IgG antikorları 1. haftada pozitifleşirler. IgM 4 ay kadar pozitif kalırken IgG pozitifliği en az 5 yıl sürer. IgM pozitifliği akut enfeksiyon tanısı koydururken, tek başına IgG pozitifliği akut enfeksiyonu göstermez. Ancak daha sonra alınan serum örneğinde antikor titresinde 4 kat artış yeni ya da geçirilmiş enfeksiyonu gösterir.
- e. Hantavirus PCR ve ELISA/IFA (IgM, IgG):** PCR ile serum veya idrarda *Hantavirus* RNA'sının gösterilmesi hastalığın başlangıcında tanı koydurucudur. Ancak viremik dönem çok kısa olduğu için viral RNA birkaç günde dolaşımdan kaybolur. Hastalığın başladığı dönemde henüz IgM negatif iken PCR ile *Hantavirus* RNA'sı saptanabilir. Tek serum örneğinde IgM tipi antikorların gösterilmesi veya hastalığın akut ve konvalesan döneminde alınan iki ayrı serum örneğinde IgG titresinde en az 4 kat artış saptanması *Hantavirus* enfeksiyonu tanısı için yeterlidir.
- f. Leptospira MAT, ELISA ve PCR:** Mikroskopik aglütinasyon testi (MAT) serolojik referans testidir. Klinik uyumlu ise MAT ile 1/800 pozitiflik saptanması tanı koydurucudur. Hastalığın başlangıç döneminde 1/200 titre şüphe uyandırır; 3-4 hafta sonra test tekrarlandığında 4 kat titre artışı tanı koydurur. Erken dönemde ELISA (IgM), MAT'tan daha duyarlıdır.
- g. Dengue kanamalı ateşi:** Özellikle endemik bölgelere seyahat öyküsü olanlarda düşünülmelidir. Görüldüğü bölgeler Afrika, Orta ve Güney Amerika, Güneydoğu Asya, Güney ve Orta Pasifik Adaları, Avusturalya'dır. Semptomların ilk 5 gününde serumda PCR ile viral RNA tespiti ya da en az 4-5 gün sonra serumda ELISA ile IgM tespiti tanı koydurur.
- h. Chikungunya ateşi:** Görüldüğü bölgeler Afrika, Güneydoğu Asya, Pasifik, Arap Yarımadası ve Avrupa'nın bazı ülkeleri (İtalya, Fransa)'dır. Artralji (tipik olarak diz, ayak bileği ve küçük eklemler), makülopapüler döküntüler, enanitem, hafif kanamalar varsa düşünülmelidir. ELISA ile spesifikIgM antikorların tespiti ile tanı konur.
- i. Sarı humma:** Endemik bölgeye seyahat varsa düşünülmelidir. Görüldüğü bölgeler Tropikal Afrika ve Güney Amerika'dır. Tanı kanda PCR ile viral genomun gösterilmesi ya da ELISA ile spesifik IgM antikorların tespiti ile konur.
- j. Diğer:** bkz. Tablo 1 (diğer viral kanamalı ateş etkenleri ve görüldüğü bölgeler Tablo 1'de verilmiştir)
- k. Falciparum sıtması:** Afrika, Yeni Gine, Haiti ve Dominik Cumhuriyeti'nde endemiktir. **Tanısı için** kalın damla ve periferik yaymaya bakılır. *Plasmodium* görülemez ise ve risk varsa spesifik antikor testi, hızlı antijen testi ya da PCR istenir.
- l. Sandfly ateşi (Tatarcık humması):** Ateş, miyalji, bulantı, kusma, ishal, karın ağrısı, trombositopeni, lökopeni, CPK ve karaciğer enzim yüksekliği varsa düşünülmelidir. Serumda spesifik IgM pozitifliği ya da PCR ile viral genomun gösterilmesiyle tanı konulur.
- m. Alkhurma kanamalı ateşi:** Suudi Arabistan'a seyahat öyküsü olanlarda düşünülmelidir. PCR ya da IgM pozitifliği ile tanı konur.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu belge (Akut Kanamalı Ateş Sendromu) aşağıda verilen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

UMS, V-MT-11	Viral hemorajik ateş sendromunda mikrobiyolojik tanı
UMS, V-MT-12	Kırım-Kongo kanamalı ateşinin mikrobiyolojik tanısı
UMS, V-MT-13	Hanta virus enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı
UMS, V-MT-14	Sarı Hummanın mikrobiyolojik tanısı
UMS, V-MT-16	Chikungunya ateşinin mikrobiyolojik tanısı
UMS, P-MT-06	Sıtmanın mikrobiyolojik tanısı
UMS, B-MT-08	<i>Salmonella</i> enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı
UMS, B-MT-19	Brusellozun mikrobiyolojik tanısı
UMS, B-MT-23	Leptospirozun mikrobiyolojik tanısı
UMS, B-MT-25	Epidemik tifüsün mikrobiyolojik tanısı
UMS, GEN-OY-01	Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Hemorrhagic fevers, viral. http://www.who.int/topics/haemorrhagic_fevers_viral/en/ (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 2 WHO Recommended Surveillance Standarts. WHO/CDC/CSR/ISR/99.2 <http://www.who.int/emc> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 3 Surveillance System for Emergency Phase, World Health Organization 2005
- 4 Viral Hemorrhagic Fever. http://www.enivd.de/FS/fs_encdiseases.htm (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 5 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 6 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004. <http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 7 Kyasanur Forest Disease. <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dispages/kyasanur.htm> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 8 Alkhurma haemorrhagic fever. Fact sheet for health professionals. http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/Alkhurma_haemorrhagic_fever/Pages/factsheet-health-professionals.aspx (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 9 Uyar Y, Aktaş E, Yağcı Çağlayık D, Ergönül O, Yüce A. An imported dengue fever case in Turkey and review of the literature. *Mikrobiyol Bul* 2013;47(1):173-80

- 10 Yağcı Çağlayık D, Uyar Y, Korukluoğlu G, Ertek M, Unal S. An imported Chikungunya fever case from New Delhi, İndiato Ankara, Turkey: the first imported case of Turkey and review of the literature. *Mikrobiyol Bul* 2012;46(1):122-8
- 11 Güven T, Eser FC, Yılmaz GR, Güner R, Taşyaran MA. *P. falciparum* malaria related with travel: four cases. *Türkiye Parazitoloj Derg* 2013;37(3):225-8. doi: 10.5152/tpd.2013.51
- 12 Cetinkol Y, Yıldırım AA. The epidemiology of malaria in Ordu between 2002 and 2011. *Türkiye Parazitoloj Derg*. 2013;37(2):69-72. doi: 10.5152/tpd.2013.18
- 13 Ozbilgin A, Topluoglu S, Es S, Islek E, Mollahaliloglu S, Erkoc Y. Malaria in Turkey: Successful control and strategies for achieving elimination. *Acta Tropica* 2011; 120: 15-23
- 14 T.C. Sağlık Bakanlığı, Sıtma Savaşı Dairesi Başkanlığı 2010. (Yayınlanmamış veri).
- 15 Oter K, Gunay F, Tuzer E, Linton YM, Bellini R, Alten B. First record of *Stegomyia albopicta* in Turkey determined by active ovi trap surveillance and DNA barcoding. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2013;13(10):753-61
- 16 Yılmaz GR, Buzgan T, Irmak H, Safran A, et al. The epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey, 2002-2007. *Int J Infect Dis* 2009;13:380-386.
- 17 Bodur H, Akinci E, Ascioğlu S, Öngürü P, Uyar Y. Subclinical infections with Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Turkey. *Emerg Infect Dis* 2012;18(4):640-2
- 18 Leblebicioğlu H. Crimean-Congo haemorrhagic fever in Eurasia. *Int J Antimicrob Agents* 2010;36 Suppl 1:S43-46
- 19 Bakir M, Ugurlu M, Dokuzoguz B, Bodur H, Tasyaran MA, Vahaboglu H, Turkish CCHF Study Group. Crimean-Congo haemorrhagic fever outbreak in Middle Anatolia: a multicentre study of clinical features and outcome measures. *J Med Microbiol*. 2005;54(Pt 4):385-9
- 20 Whitehouse CA. Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Res* 2004;64(3):145-60
- 21 Ergönül O. Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Lancet Infect Dis* 2006;6(4):203-14
- 22 Cevik MA, Erbay A, Bodur H, Gülderen E, et al. Clinical and laboratory features of Crimean-Congo hemorrhagic fever: predictors of fatality. *Int J Infect Dis* 2008;12:374-379
- 23 Yapar M, Aydoğan H, Pahsa A, Besirbellioğlu BA, Bodur H, Basustaoglu AC, et al. Rapid and quantitative detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus by one-step real-time reverse transcriptase-PCR. *Jpn J Infect Dis*. 2005;58(6):358-62.
- 24 Kayaaslan BU, Bodur H. Viral kanamalı Ateşler. In: Kurt H, Gündeş S, Geyik MF (eds). *Enfeksiyon Hastalıkları*. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 2013, p.452-55
- 25 Çelebi G. Hantavirüs Enfeksiyonları. *Klinik Gelişim Derg* 2010;23(3):40-4
- 26 Ertek M, Buzgan T. An outbreak caused by hantavirus in the Black Sea region of Turkey, January-May 2009. *Euro Surveill* 2009;21;14(20)
- 27 Çelebi G. Hantavirüs Enfeksiyonları. *Klimik Derg* 2011;24(3):139-49
- 28 Çelebi G, Sözen M. Türkiye'de Hantavirüs enfeksiyonları. *Flora* 2009;14 (4):145-152
- 29 Jonsson CB, Figueiredo LT, Vapalahti O. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clin Microbiol Rev* 2010;23(2):412-41
- 30 Mir MA Hanta viruses. *Clin Lab Med* 2010;30(1):67-91
- 31 Kocak Tufan Z, Weidmann M, Bulut C, Kinikli S, Hufert FT, Dobler G, Demiroz AP. Clinical and laboratory findings of a sandfly fever Turkey Virus outbreak in Ankara. *J Infect* 2011;63(5):375-81. doi: 10.1016/j.jinf.2011.07.011. Epub 2011 Jul 29
- 32 Guler S, Guler E, Çağlayık DY, Kokoglu OF, Ucmak H, Bayrakdar F, Uyar Y. A sandfly fever virus outbreak in the East Mediterranean region of Turkey. *Int J Infect Dis* 2012;16(4):e244-6. doi: 10.1016/j.ijid.2011.12.001. Epub 2012 Jan 30
- 33 Ergunay K, Aydoğan S, İlhami Özcebe O, Cilek EE, Hacıoğlu S, Karakaya J, Ozkul A, Us D. Toscana virus (TOSV) exposure is confirmed in blood donors from Central, North and South/Southeast Anatolia, Turkey. *Zoonoses Public Health* 2012;59(2):148-54

- 34 Saltoglu N, Aksu HZ, Tasova Y, et al. Leptospirosis: twelve Turkish patients with the Weil syndrome. *Acta Med Okayama* 1997;51:339-42
- 35 Lelebicioglu H, Sencan I, Sunbul M, et al. Weil's disease: report of 12 cases. *Scand J Infect Dis* 1996;28:637-9
- 36 Esen S, Sunbul M, Lelebicioglu H, Eroglu C, Turan D. Impact of clinical and laboratory findings on prognosis in leptospirosis. *Swiss Med Wkly* 2004;134(23-24):347-52
- 37 Sünbül M. Leptospiroz. www.ekmud.org/dosya/zoo06/09-msunbul.pdf (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 38 Bedir O, Kilic A, Atabek E, Kuskucu AM, Turhan V, Basustaoglu AC. Simultaneous detection and differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Leptospira* spp. by multiplex real-time PCR (TaqMan) assay. *Pol J Microbiol* 2010;59(3):167-73
- 39 Epidemiology, prevention, and control of malaria in endemic areas. <http://www.uptodate.com/contents/epidemiology-prevention-and-control-of-malaria-in-endemic-areas> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 40 Celik T, Kölgelir S. Malaria cases detected by active and passive surveillance in Adiyaman between 2000-2008. *Turkiye Parazitol Derg* 2012;36(4):204-7. doi: 10.5152/tpd.2012.49
- 41 Wilson ML. Laboratory diagnosis of malaria: conventional and rapid diagnostic methods. *Arch Pathol Lab Med* 2013;137(6):805-11
- 42 Özbilgin A, Tamay AT. Sıtma Tanısında Yenilikler. *ANKEM Derg* 2000;14(3):260-265
- 43 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 - 27710.

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

AKUT SENDROMİK YAKLAŞIM REHBERİ

Enfeksiyöz Nörolojik Bozukluklar (Akut Nörolojik Sendrom)

Hazırlayan Birim	Sendromik Yaklaşım Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Sendromik Yaklaşım
Bölüm	-
Standart No	SY-03
Sürüm No	1.0
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
Menenjit.....	4
Ensefalit, meningoensefalit	4
Akut enfeksiyöz myelit, radikülomyelit	5
Olası hastalıklar, etkenler	5
EKLER.....	8
Ek-1 Akut nörolojik sendrom tanı akış şeması ^{8,9,10}	8
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	9
KAYNAKLAR.....	9

Kapsam ve Amaç

Enfeksiyöz nörolojik bozukluklar (ENB); enfeksiyöz etkenlerin neden olduğu nörolojik bozukluklardır. ENB'nin tanı ve tedavisi, yüksek mortalite nedeniyle hızla ve dikkatle ele alınmalıdır. Nörolojik enfeksiyonların klinik sunumları karmaşık olabilir; belli bir etkeni işaret etmeyebilir; etkenin izolasyonu zor olabilir. Buna karşın akut nörolojik enfeksiyonların hızla ve doğru şekilde ele alınması, etkene yönelik en uygun tedavinin, en hızlı şekilde uygulanması gereklidir.

Bu belge ile, nörolojik bulgularla başvuran kişilerde buna neden olan ve halk sağlığı açısından tehdit oluşturabilecek enfeksiyöz etkenlerin erken dönemde tanınabilmesi için hastaları ilk görececek olan hekimlere rehberlik etmek amaçlanmıştır. Bu amaçla hekimin ana semptomlardan yola çıkarak hangi etkenleri öncelikle düşünmesi gerektiği, hangi örnekleri hangi laboratuvar testleri için, hangi aşamada göndermesi gerektiği ile ilgili olarak bir akış şeması oluşturulmuştur. Böylelikle sinir sistemini tutan bulaşıcı hastalıklara yönelik laboratuvar hizmetlerinin preanalitik (klinik sendrom) evresinin doğru işlemesi ve aynı zamanda mikrobiyoloji laboratuvarlarının tanısız kapasitesinin geliştirilebilmesine dayanak oluşturulması sağlanabilecektir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

BOS	Beyin omurilik sıvısı
ENB	Enfeksiyöz nörolojik bozukluklar
SSS	Santral sinir sistemi

Genel Bilgi

Enfeksiyöz nörolojik bozukluklar (ENB); beyin, spinal kord, santral sinir sistemindeki (SSS) membranöz ya da vasküler yapıların enfeksiyonu sonucu ortaya çıkar. ENB; bakteriyel, viral, fungal, protozoal, helmintik ya da prionlara bağlı olabilir (1).

SSS enfeksiyonları şu belirtilerle ortaya çıkabilir; ateş, baş ağrısı, bulantı-kusma, ense sertliği/meningeal irritasyon bulguları, mental durum değişikliği, fokal nörolojik bulgular (ör., pareziler, kraniyal sinir tutulumu, papilödem), üveit ve epileptik nöbetler. Spinal kord enfeksiyonu varsa; paraparezi/quadriparezi, sırt ağrısı, mesane fonksiyon bozukluğu, spinal dağılıma uyan duyu kusuru, refleks değişiklikleri ve kas tonusunda azalma görülür.

Genellikle hangi nörolojik belirtilerin birlikte görüldüğü ya da bulguların derecesine göre etken patojeni belirlemek mümkün değildir. Ancak, klinik tabloya eşlik eden diğer belirtiler (enterit, otit, sinüzit, pnömoni, rinore, deri döküntüsü, eklem ağrıları) ve öykü (seyahat, kafa travması, geçirilmiş intrakraniyal ya da spinal operasyon, immün baskılayıcı bir hastalık ya da tedavi vb.) ile olası etken patojenler farklılaşabilir. Ayrıca yaş grubu da etken patojenler için önemli bir yol göstericidir.

Nörolojik bulgular, SSS'nin ağırlıkla hangi komponentinin tutulduğuna bağlı olarak, farklı derecelerde ya da farklı kombinasyonlarda ortaya çıkabilirler. Örneğin, piamater ve araknoidin enfeksiyöz tutulumu "menenjit" tablosuna neden olurken, damarsal yapıların enfeksiyonu SSS "vaskülit"ine neden olur. Beyin parankiminin inflamasyonu varsa "ensefalit"ten söz edilir.

ENB; beyin ve/veya spinal kordun tutulumuna bağlı olarak, şu klinik tablolarla ortaya çıkabilirler: Menenjit, ensefalit, myelit, radikülit, ventrikülit, serebrit, serebral ya da spinal apse, kist, ekstradural apse, diskrit, granulom, postenfeksiyöz ensefalit /serebellit/ myelit ya da radikülönöropati. Unilateral multipl kranyal sinir tutulumu, kavernöz sinüsün septik trombozuna bağlı olarak ortaya çıkabilir (1,2,3)

Menenjit

Menenjit; etken patojenin neden olduğu, pia-araknoid ve subaraknoid aralıktaki beyin omurilik sıvısının (BOS) enfeksiyonudur. Bu enfeksiyonun serebral vasküler yapılara yayılması, vaskülit ve venöz sinüs trombozuna yol açabilir. Subaraknoid aralıktaki enfeksiyon sıklıkla ventrikülite neden olur.

Klinik tabloda; ateş, baş ağrısı, ense sertliği ile birlikte değişen derecelerde mental durum değişiklikleri, bulantı-kusma, fotofobi ve bazen de epileptik nöbetler olur. Makülopapüler, peteşial deri döküntüleri eşlik edebilir. Rinore, otore varsa, etken konusunda yönlendirici olabilir.

Ense sertliği ve meningismus, meningeal irritasyonun bulgularıdır. Kafa içi basınç artışı nedeniyle mental durum değişiklikleri ve papilödemi ortaya çıkar. Serebral damarsal yapıların (arter, ven) enfeksiyonu ve trombozları ise fokal nörolojik bozukluklar ve epileptik nöbetlere neden olur (2,3).

Ensefalit, meningoensefalit

Ensefalit; etken patojenin ya da etkene karşı gelişen immün yanıtın neden olduğu beyin dokusunun inflamasyonudur. Bakteriyel, viral, protozoal, fungal patojenler dışında, enfeksiyonlara bağlı gelişen immün yanıtlar da ensefalit nedeni olabilir.

Riskli bölgelere seyahat öyküsü, vektör ya da hayvanlarla teması, immün sistemi baskılayan durumlar, organ transplantasyonu öyküsü alınması tanı ve etkenler yönünden yol gösterici olur.

Klinik tabloda; ateş, baş ağrısı, ense sertliği ile birlikte değişen derecelerde mental durum değişiklikleri, kişilik ve davranış değişiklikleri, afazi, hareket bozuklukları, halüsinasyonlar, bulantı-kusma, fotofobi, epileptik nöbetler ve denge bozukluğu olur. Genellikle bilişsel ve davranışsal bozukluklar ve fokal nörolojik bulgular ensefalitte menenjite göre daha fazla sıklıkla görülürler. Beyin sapı ensefaliti; alt kranyal sinir tutulumu, kilitleme (locked-in) sendromu, myoklonus, otonomik bulgularla kendini gösterir. Görüntüleme bulguları ayırt edicidir.

Enterovirüsler, flavivirüsler, listeriyoz, tüberküloz, bruselloz, Lyme ya da paraneoplastik sendromlar beyin sapı ensefalitine neden olabilirler. Herpes ensefalitinde temporal lob tutulumu ayırt edicidir. Görüntüleme (CT/MR) ve EEG bulguları, temporal lob tutulumunu destekler.

Progresif multifokal lökoensefalopati; immün sistemin baskılandığı durumlarda (ör., HIV enfeksiyonu, immün baskılayıcı tedavi), JC virüsün neden olduğu demyelinizan bir ensefalopati tablosudur.

Kuduz ensefalitinde virüs, periferik sinirlerden SSS'ne yukarı doğru yayılımla ulaşır. Klinik bulgulara ek olarak yutma güçlüğü bulunur. Kuduz ensefalit tablosu ölümcüldür.

Kızamık virüsü, post enfeksiyöz ensefalite neden olur. Mental değişiklikler ön plandadır (3,4,5).

Akut enfeksiyöz myelit, radikülomyelit

Akut Enfeksiyöz Myelit; primer, sekonder ya da postenfeksiyöz olabilir. Primer enfeksiyöz myelit, spinal kordun enfeksiyonudur. Sekonder enfeksiyöz myelit; spinal kanaldaki enfeksiyöz durumlar (apse), komşu intratekal yapıların (granulomatöz lezyonlar) enfeksiyonudur. Spondilit ve paraspinal apse formasyonu (Pott hastalığı/tüberküloz) da myelit kliniğine neden olabilir. Postenfeksiyöz myelit ise, bakteriyel ve viral enfeksiyonlar sonrasında gelişen spinal kordun inflamasyonudur. Myelit ile radikülit birlikte olabilir.

Ensefalomyelitin komponenti olarak, postenfeksiyöz ve postvaksinal gelişebilir. Guillain-Barre sendromu; alt ekstremitte distalinden başlayan duyu ve motor bozukluğa neden olan, akut postenfeksiyöz otoimmün bir radikülönöropatidir. Spinal epidural absede paraparezi daha sık görülür. Çünkü apse, torakal ve lumbosakral bölgede daha sık yerleşir. Spinal epidural apse direkt bası yapabilir ya da vasküler yapılara bası yaparak tromboza neden olabilir.

Klinik tabloda; ateş, sırt ağrısı, paraparezi, quadriparezi, mesane fonksiyon bozukluğu, refleks değişiklikleri, spinal myoklonus, duyu defisiti olabilir. Deri döküntüleri olabilir ve etkene göre yol gösterici değeri vardır: Bukkal mukoza ve el/ayakta veziküler döküntü – Enterovirus71, dermatomal dağılımlı – Herpes zoster, eritema kronikum migrans – Lyme (4,6,7).

Olası hastalıklar, etkenler

Menenjit

Meningokok, pnömokok, tüberküloz, sifiliz, *Haemophilus influenzae*, stafilokok, Lyme nöroborelyoz, enterovirüsler, kabakulak, herpes virüs, HIV, funguslar, *Listeria* spp.

Ensefalit

HSV, varicella zoster, CMV, diğer viral ensefalitler (Parvovirus, kızamık, herpes virus 6 ve 7), Arbovirüsler (Batı Nil virusu, Japon ensefaliti, Dengue, kuduz), PMLE, sifiliz, *Clostridium tetani/botulinum*, *Brucella* spp, sepsise bağlı ensefalopati, diğer bakteriyel nedenler (Whipple, leptospiroz, *Mycoplasma* spp, klamidyalar, riketsiyalar), sıtma, tripanozomiyaz ve diğer parazitler, prion hastalığı, antikora bağlı ensefalit, post enfeksiyöz ensefalit ve ensefalopati, *Plasmodium falciparum*.

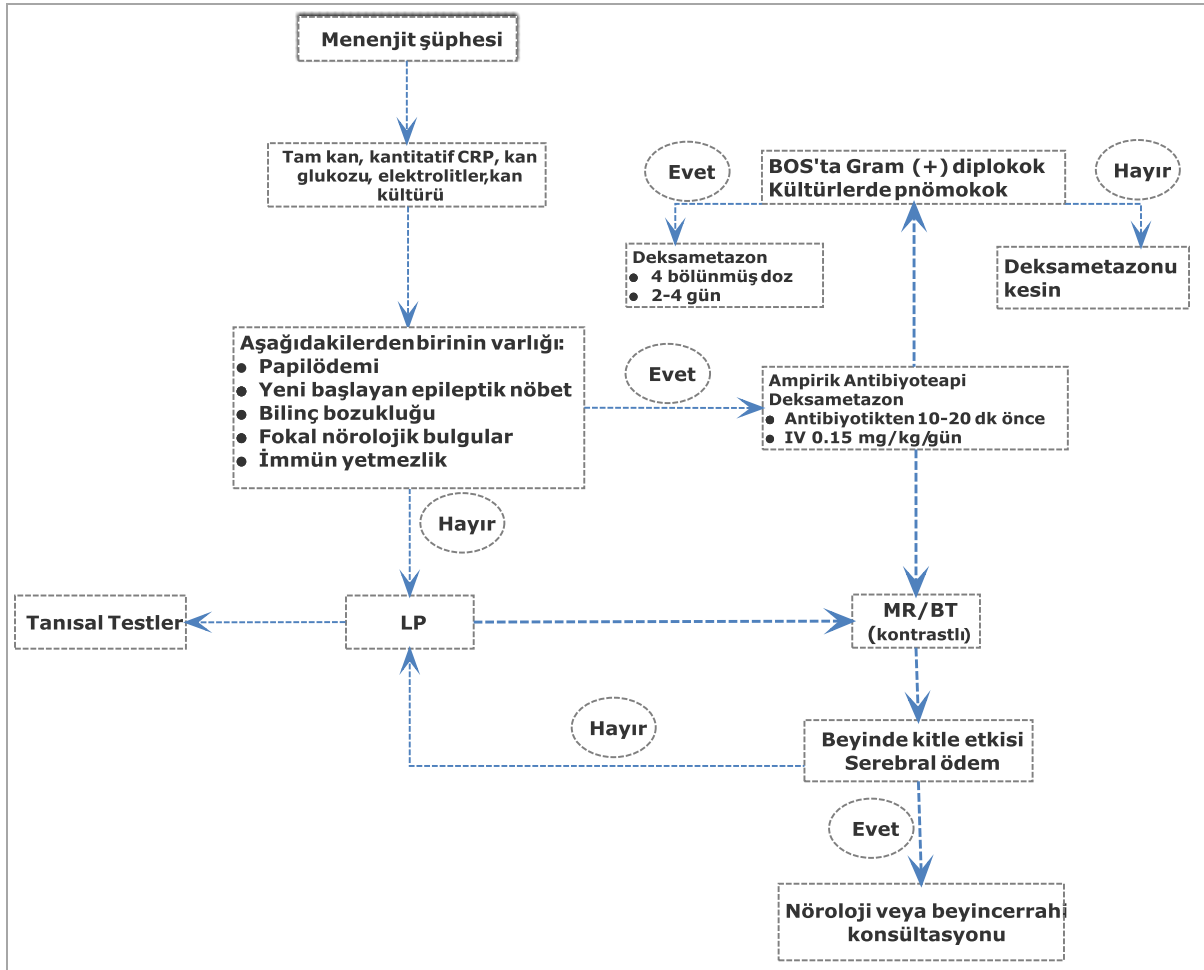
Enfeksiyöz myelit etkenleri; entreovirüsler (polio, coxsacki, echovirus), herpes virüs, CMV, EBV, HIV, HTLV, kuduz, *Brucella* spp, *Borellia* spp, *Treponema* spp, *Mycoplasma* spp, hepatit virüsleri, rubella, varicella, klamidya, şistozomiyaz ve tüberküloz.

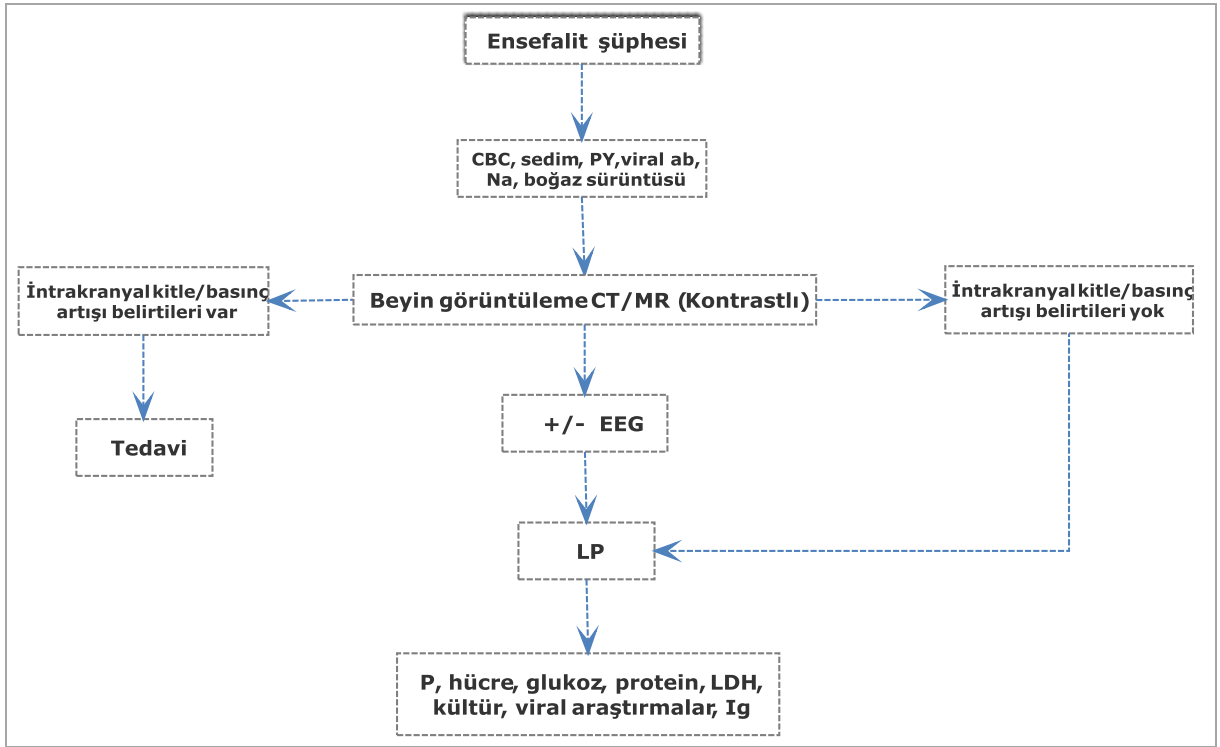
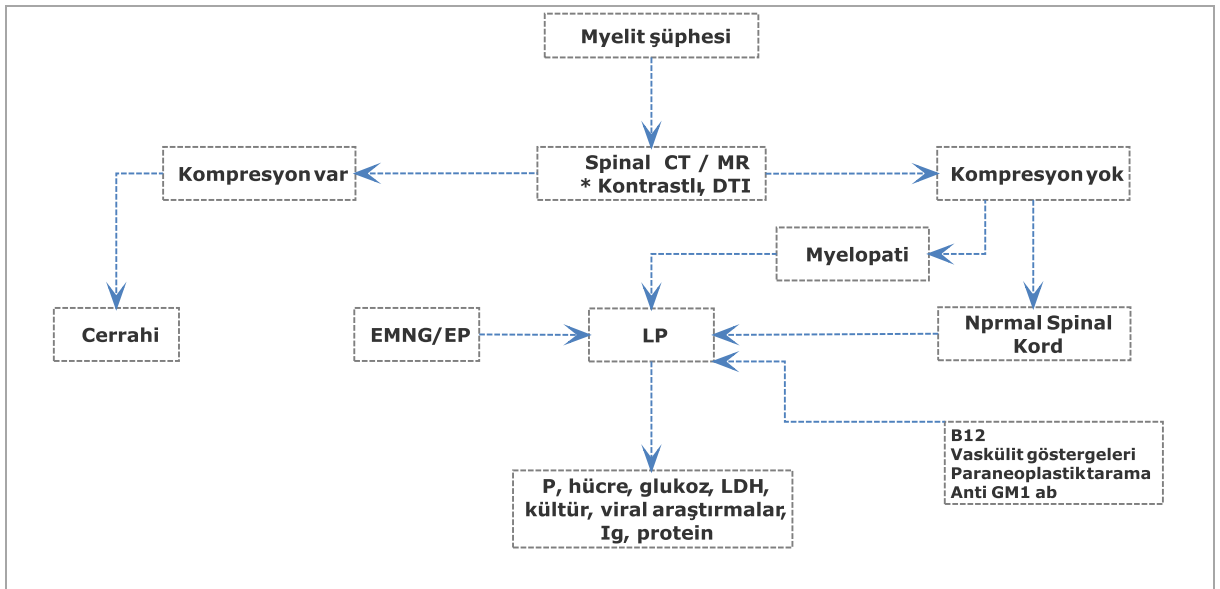
Ülkemizde olası etkenler

Ankara TF, Haydarpaşa Numune EA, GATA Haydarpaşa AH, Ümraniye EA, Kartal Lütfi Kırdar EA, Erzurum TF, Trabzon TF, Dicle TF, Diyarbakır EA, Harran TF, Şişli Etfal EA hastanelerinden aldığımız kümülatif verilere göre 2013 yılında bu hastanelerde 172 SSS enfeksiyonlu erişkin hasta tedavi görmüştür.

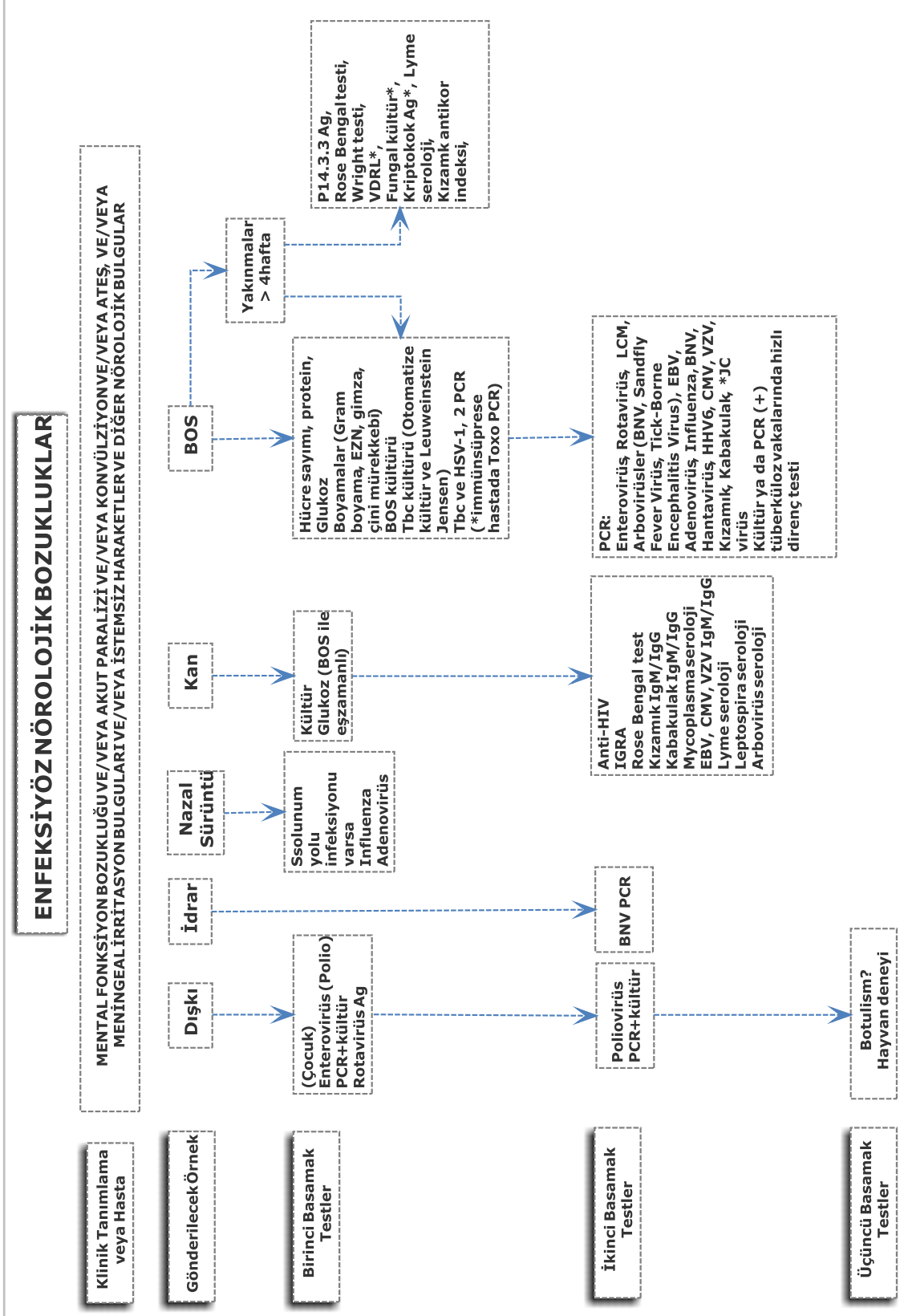
Bunlardan %15'i tüberküloz menenjit, %14'ü pürülan menenjit (17 pnömokok, 3 *Listeria monocytogenes*, 2 *Neisseria meningitidis*, 1 *Moraxella* spp, 1 stafilokok), 6 nörobruselloz, 1 nörosifiliz, 1 kriptokok, 1 HSV ve 1HH6'dır. Beş vakada beyin apsisi saptanmış olup, 107 (%62) vakada ise etiyolojik ajan saptanamamıştır (8,9,10).

Şekil 1. Menenjit klinik yaklaşım algoritması (11,12).



Şekil 2. Ensefalit klinik yaklaşım algoritması**Şekil 3.** Myelit klinik yaklaşım algoritması

Ekler

Ek-1 Akut nörolojik sendrom tanı akış şeması^{8,9,10}

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu belge (Enfeksiyöz Nörolojik Bozukluklar) aşağıda verilen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

UMS, V-MT-05	Poliomyelitin mikrobiyolojik tanısı
UMS, V-MT-15	Batı Nil Virüsü enfeksiyonunun (WNV) mikrobiyolojik tanısı
UMS, V-MT-17	Kene kaynaklı ensefalitin (TBE) mikrobiyolojik tanısı
UMS, V-MT-20	Kuduzun mikrobiyolojik tanısı
UMS, B-MT-03	<i>Neisseria meningitidis</i> enfeksiyonunun mikrobiyolojik tanısı
UMS, B-MT-04	<i>Haemophilus influenzae</i> invaziv enfeksiyonunun mikrobiyolojik tanısı
UMS, B-MT-05	<i>Streptococcus pneumoniae</i> invaziv enfeksiyonunun mikrobiyolojik tanısı
UMS, B-MT-15	Botulismus
UMS, B-MT-18	Sifilizin mikrobiyolojik tanısı
UMS, GEN-ÖY-01	Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Verma A. Infections of the nervous system. In: Bradley GW. *Neurology in Clinical Practice*. 5 ed Vol. II. Elsevier, Philadelphia. 2008:1417-583
- 2 Roos KL. Merkezi sinir sisteminin akut bakteriyel enfeksiyonları. In: Aminoff MJ. *Neurology and General Medicine*, Türkçe. 4 ed., Güneş Tıp Kitabevi, Ankara. 2010:769-89.
- 3 Parikh V, Tucci V, Galwankar S. Infections of the nervous system. *Int J Crit Illn Inj Sci* 2012; 2(2):82-97.
- 4 Tyler KL. Emerging viral infections of the central nervous system: part 1. *Arch Neurol* 2009; 66(8):939-48.
- 5 Thwaites G, Fisher M, Hemingway C, Scott G, Solomon T, Innes J. British Infection Society guidelines for the diagnosis and treatment of tuberculosis of the central nervous system in adults and children. *J Infect* 2009;59(3):167-87.
- 6 West TW, Hess C, Cree BA. Acute transverse myelitis: demyelinating, inflammatory, and infectious myelopathies. *Semin Neurol* 2012;32(2):97-113.
- 7 Jacob A, Weinshenker BG. An approach to the diagnosis of acute transverse myelitis. *Semin Neurol* 2008;28(1):105-20
- 8 Erdem H, Elaldi N, Oztoprak N, et al. Mortality indicators in pneumococcal meningitis: therapeutic implications. *Int J Infect Dis* 2014;19:13-9.
- 9 Erdem H, Kilic S, Sener B, et al. Diagnosis of chronic brucellar meningitis and meningoencephalitis: the results of the Istanbul-2 study. *Clin Microbiol Infect* 2013;19(2): E80-6.
- 10 Erdem H, Ozturk-Engin D, Elaldi N, et al. The microbiological diagnosis of tuberculosis meningitis: Results of Haydarpaşa-1 study. *Clin Microb Infect* DOI: 10.1111/1469-0691.12478 2013
- 11 Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, et al. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis* 2004;39(9):1267-84.
- 12 <http://www.ekmud.org/dosya/sepsisklavuz/menenjitRehber%5B1%5D.pdf>



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

AKUT SENDROMİK YAKLAŞIM REHBERİ

Akut Respiratuvar Sendrom

Hazırlayan Birim	Sendromik Yaklaşım Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Sendromik Yaklaşım
Bölüm	-
Standart No	SY-04
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	4
İnfluenza.....	5
Coronavirüs enfeksiyonları	6
SENDROMİK YAKLAŞIM SÜREÇ AKIŞI	7
1 Sendromun tanımı	7
2 Olası hastalıklar/etkenler	7
3 Laboratuvara gönderilecek örnek türü.....	7
4 Laboratuvardan istenecek tetkikler	7
EKLER.....	8
Ek-1 Akut respiratuvar sendrom tanı yaklaşımı akış şeması....	8
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	10
KAYNAKLAR.....	10

Kapsam ve Amaç

Akut respiratuvar sendrom (ARS) solunum yoluyla bulaşabilen çok sayıda farklı mikroorganizmanın neden olabildiği, toplum içerisinde hızla yayılma potansiyeli ile halk sağlığı açısından tehdit oluşturan bir klinik tablodur. Özellikle virüslerin neden olduğu akut respiratuvar sendrom, ölümlerin yanı sıra hastane yatışlarına, iş gücü kaybına, SARS ve pandemik H1N1 salgınlarında da görüldüğü gibi sosyal-ekonomik ciddi sorunlara neden olabilmektedir.

Tüm bu olumsuz sonuçların önünü alabilmek erken ve doğru tanı konulabilmesi ile yakından ilişkilidir. Örneğin, ölümlerle sonuçlanabildiği göz önüne alındığında ARS'de vakaların erken tanısı prognoz açısından çok değerli olabilir. ARS ile hekime gelen vaka bir salgının da ilk vakası (habercisi) olabilir ve zamanında kontrol önlemlerinin alınması etkenin erken tespiti ile mümkündür.

Bu nedenlerle bu belgenin, hastaları ilk görececek hekimlere yol gösterecek bir Rehber olması hedeflenmiştir. Amacı; hekimin belli başlı semptomlardan ve epidemiyolojik ipuçlarından yola çıkarak *hangi etkenleri öncelikle düşüneceğine ve hangi örnekleri, hangi tanı testleri için, ne zaman göndereceğine* dair izleyebileceği bir **akış şeması** vermektir.

Belgenin paralel amaçlarından biri de, -sendromik yaklaşımın iyi bir şekilde işlemesi halinde ARS tanısında preanalitik süreçlerin de iyileşmesi sağlanmış olacağından, bunun- laboratuvar sonuçlarının doğruluğu ve güvenilirliği dahil, laboratuvarların tanısız kapasitesinin gelişmesini teşvik etmesidir.

Belge, hastanede yatarak akut respiratuvar enfeksiyon gelişen hastaları ve enfeksiyon dışı nedenlere (entoksikasyon, travma, kalp damar hastalıkları, yapısal akciğer hastalıkları vb.) bağlı solunum hastalıklarını kapsamamaktadır. Akış şeması, standart tanı ve tedavi gereklerini de kapsamamaktadır.

Kısaltmalar ve Tanımlar

ARS	Akut respiratuvar sendrom
BAL	Bronkoalveoler Lavaj
DTA	Derin trakeal aspirat
EZN	Ehrlich-Ziehl-Nielsen
HPAI	Highly pathogenic avian influenza (yüksek patojeniteli kuş gribi)
MERS-CoV	Orta Doğu Solunum Yetmezliği Sendromu- Coronavirus
RSV	Respiratuvar sinsisyal virus
SARS-CoV	Ciddi Akut Solunum Yetmezliği Sendromu-Coronavirus
Tbc	Tüberküloz

Genel Bilgi

Akut respiratuvar sendrom (ARS); bir hastada ateş olsun veya olmasın, ani başlangıçlı öksürük veya solunum sıkıntısı veya takipne olması ve bu bulgulara neden olabilecek enfeksiyon dışında bir predispozan faktör bulunmaması olarak tanımlanmıştır.

Alt solunum yollarının akut enfeksiyonları nedeniyle çoğunluğu 5 yaş altında olmak üzere yılda yaklaşık 4 milyon kişinin hayatını kaybettiği bildirilmektedir (1). Bu enfeksiyonlar arasında en ölümcül olanı pnömonidir. Her yıl 450 milyon kişide pnömoni gelişmekte ve bunların yaklaşık 155 milyonunu çocuklar oluşturmaktadır (1,2). Sadece 2010 yılında Dünya genelinde 14.9 milyon 5 yaş altı çocuğun ağır ve çok ağır alt solunum yolu enfeksiyonları nedeniyle hastaneye yatırıldığı, toplamda %99'u gelişmekte olan ülkelerde olmak üzere 1.4 milyon çocuğun hayatını kaybettiği hesaplanmaktadır (3).

ARS'ye neden olan enfeksiyöz etkenler arasında çok sayıda bakteri ve virüs yer almaktadır. Bu etkenler kişide hastalık ve ölüm nedeni olmakla kalmayıp aynı zamanda bazıları, solunum yoluyla yayılma özellikleri nedeniyle, halk sağlığı açısından da tehdit oluştururlar. Biyolojik tehdit ajanı olarak tanımlanmış patojenlerin büyük kısmının da ortak özellikleri toplum içinde solunum yolu ile hızla yayılabilmeleridir.

Klinikte, ateşle birlikte öksürük, solunum sıkıntısı, balgam çıkarma ve yan ağrısı gibi akut başlangıçlı solunum semptomlarının varlığı pnömoniyi düşündürür. Pnömoninin özgül koşullarda ortaya çıkmış olması etiyolojik etken için bazı ipuçları sağlayabilir.

Bakteriyel etiyoloji açısından, örneğin, *Mycoplasma pneumoniae* ve *Chlamydomphila* (eskiden *Chlamydia*) *pneumoniae* (4) yatılı okullar ve askeri kışlalar gibi yarı kapalı topluluklardaki salgınlarda; *Klebsiella pneumoniae* huzurevlerinde ortaya çıkan pnömonilerde akla gelmesi gereken etkenlerdir. *M.pneumoniae* ev halkına okul çağındaki çocuklar aracılığıyla bulaşır ve duyarlı tüm bireyleri etkiler.

Mevsim pnömoni etiyolojisi yönünden önemlidir. Grip sonrası gelişen bakteriyel pnömonilerde *Streptococcus pneumoniae*'nin yanı sıra *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* ve *Streptococcus pyogenes* de etken olur.

Risk grubu bireylerde (>50 yaş, sigara bağımlılığı, alkol tüketimi, şeker hastalığı, transplantasyon, immünsupresyon...) seyahat, merkezi havalandırma sistemi ile havalandırılan ortamlarda bulunma, kaplıcaya gitme öyküsü söz konusu ise *Legionella* pnömonisi akla gelmelidir.

Altta yatan hastalık da özgül bir pnömoniyeye sebep olabilir. Örneğin kronik obstrüktif akciğer hastalığı olan bireylerde pnömokokun yanı sıra *H. influenzae* ve *Moraxella catarrhalis*'e bağlı pnömoni gelişebilir. Bronşiyal obstrüksiyon varlığında bu etkenlere ilave olarak anaeroblar ve *S. aureus* da sorumlu olabilir.

Biyoterörizmle ilişkili olabilecek durumlarda ise *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* ve *Francisella tularensis* ilk sıralarda akla gelmelidir (5,6,7).

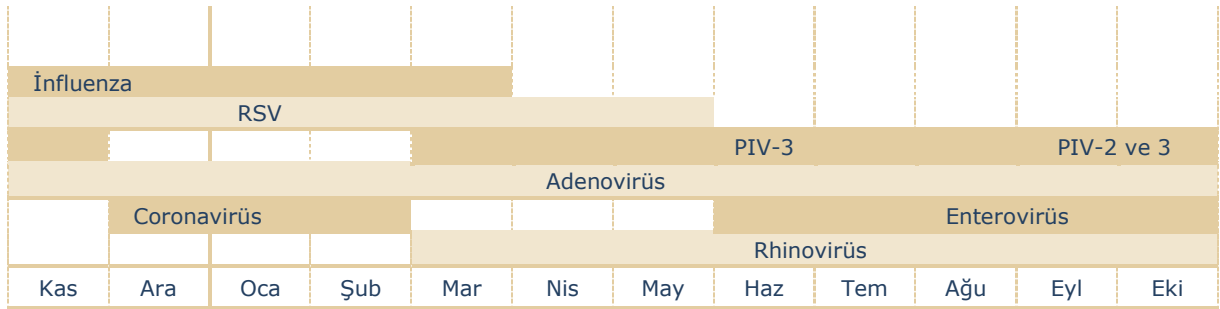
Bazı klinik özellikler bazı etiyolojik ajanları özellikle çağırıştırır; bunlara, solunum yolu virüsleri, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *Chlamydomphila psittaci* (psittakoz etkeni) ve *Coxiella burnetii*'yi (Q ateşi etkeni) yol açtığı atipik pnömonileri örnek vermek mümkündür.

Bu patojenlerin yol açtığı atipik pnömoniler; ateş, kuru öksürük, titreme, baş ağrısı ve kırıklıkla birlikte sinsi bir biçimde başlar (8). Hekime başvurmadan önce hastanın yakınmaları birkaç gün sürmüştür. Ateş 37.7-39.5°C arasındadır ve titreme ile birlikte. Pnömonik pnömonisindeki gibi gerçek bir titreme olmaz. Birkaç gün sonra hasta öksürükle birlikte az miktarda beyaz mukoid ya da sulu bir balgam çıkarmaya başlar. Pnömoninin başlangıcındaki fizik bulgular, hastalığın şiddetinden beklenmeyecek kadar azdır. Burun akıntısı, kas ağrısı, göğüs ağrısı, boğaz ağrısı ve ses kısıklığı olabilir.

Viral etkenlerin neden olduğu alt solunum yolu enfeksiyonu tablolarının ise klinik olarak hangi etkene bağlı olduğu ayırt edilemez. Şekil 1’de görüldüğü gibi yılın belli ayları belli bazı virüslerle enfeksiyon için predispozisyon yaratabilir. Bazıları (ör., adenovirüsler) yıl boyunca enfeksiyona yol açıyor olsalar da, viral solunum yolu enfeksiyonları daha çok -sonbahardan ilkbahara kadar- soğuk aylarda görülür.

Çocuklarda toplumdan-edinilmiş pnömonilerin %43-67’sinin, erişkinde ise %25-56’sının virüslerden kaynaklandığı düşünülmektedir (6).

Şekil 1. Viral solunum yolu enfeksiyonlarından en sık sorumlu etkenlerin mevsimsel dağılımları.



PIV, Parainfluenza virüs; RSV, Respiratuvar sinsiyal virüs

ARS’ye neden olan virüsler arasında RSV, rhinovirus, influenza A, B ve C virüs, parainfluenza tip 1, 2, 3 ve 4, insan metapnömovirüsü, insan bocavirus, coronavirüsler, adenovirus, enterovirüsler, varicella zoster virus, kızamık virusu, Epstein-Barr virüs ve cytomegalovirüs sayılabilir (9).

Aralarından influenza virüsleri ve coronavirüsler hem neden oldukları hastalığın ağır seyredebilmesi, hem de hızlı yayılma özellikleriyle halk sağlığını tehdit eden etkenler olduklarından aşağıda daha geniş ele alınmışlardır.

İnfluenza

Grip etkeni influenza virüsleri üç cinsten oluşurlar: Influenza A virüs, Influenza B virüs ve Influenza C virüs. Influenza A virüsleri, iki ana yüzey glikoproteininin, (hemaglütinin [HA] ve nöraminidaz [NA]) özelliklerine ve kombinasyonlarına göre alt tiplere ayrılır. Bugüne kadar 16 HA ve 9 NA alt tipi tanımlanmıştır.

Influenza virüsleri dünyanın her yerinde enfeksiyon oluştururlar (10).

Ilıman iklim kuşağında influenza virüsleri yıllık salgınlar (epidemi) yaparlar. Tropikal iklimde tüm yıl boyunca enfeksiyona yol açarlar. Kuzey yarımkürede salgın Aralık-Mart ayları arasında, güney yarımkürede Mayıs-Ağustos ayları arasında görülür. Damlacık enfeksiyonu ile insandan insana yayılır. Kontamine solunum yolu sekresyonları ile direkt ve indirekt temas sonucu da bulaşır. İnfluenza virüslerinin bulaşıcılığı çok fazladır ve her yaştan herkesi etkileyebilir. İnfluenza, toplumda yüksek risk gruplarında ciddi seyirli hastalığa ve ölümlere neden olabildiğinden önemli bir halk sağlığı problemidir. Mevsimsel salgınlar yaparak kısa sürede çok sayıda bireyi etkilerken ciddi iş gücü kaybı ile ekonomik kayıplara ve sağlık hizmetlerinin zorlanmasına neden olabilir (11).

Pandemiler 20-30 yılda bir ortaya çıkar ve sadece Influenza A virüsleri ile görülür. Pandemi yeni HA taşıyan ve insandan insana kolaylıkla bulaşan bir Influenza A virüsünün ortaya çıkışı ile gelişir. Pandemi suş, duyarlı konağın insan ve kuş virüsleri ile koenfeksiyonunu takiben gelişen 'reasortman' (yeniden karışma) yoluyla ya da kuş virüslerinin memeli konağa yavaş yavaş adaptasyonu sonucunda oluşur. Yeni virüs, toplumda bağışık kişilerin oranının çok düşük olması sayesinde farklı kıtalardan çok sayıda kişiyi etkiler. Tarihin en ağır salgınlarından biri olan 1918 H1N1 salgını sırasında dünya üzerinde yaşayan herkesin virüsle karşılaştığı, yarısının hastalandığı ve yaklaşık 50 milyon insanın öldüğü bildirilmektedir (12).

2009 yılında yepyeni bir Influenza A (H1N1) virüsü orta düzeyde ağır bir pandemiye yol açmıştır. Bu pandemi sırasında hastanede yatış sıklığı %7 influenzaya bağlı pnömoni gelişme sıklığı ise %0.4 olarak bildirilmiştir (13).

Yüksek patojen kuş (avian) influenza virüsleri (HPAI), esas olarak kuşlarda hastalık yapan, yakın temasla insanlara bulaşarak insanda (ağır seyirli veya hafif) hastalık yapabilen ancak insandan insana bulaşabilme yeteneği kazanamamış virüsleri tanımlayan bir terimdir. Bu virüsler, insandan insana kolay bulaşabilme yeteneği kazanma olasılıkları nedeniyle dikkatle takip edilirler. İlk defa 1997 yılında Hong Kong'da ortaya çıkan H5N1 bu güne kadar 15 ülkede 641 kişiyi etkilemiş, ülkemizde de 2005 yılında 4 kişinin ölümüne neden olmuştur (14). En son ortaya çıkan HPAI, H7N9 virüsü 2013 yılı Şubat ayından beri Çin'de görülmekte olup 25 Ekim itibari ile 45'i ölümle sonuçlanan 137 insan olgusuna neden olmuştur (15).

Coronavirüs enfeksiyonları

Genellikle özgül bir canlıyı enfekte eden farklı tipleri olan Corona virüsler 1960 yılında keşfedilmişlerdir. İnsanda hastalık yapan altı tipten dördü (HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43 ve HKU1-CoV) genellikle hafif seyirli üst solunum yolu enfeksiyonlarına sebep olurken, SARS-CoV ve MERS-CoV ölümcül seyreden pnömoniye neden olmuşlardır (16).

2004-2005 yıllarında görülen SARS-CoV salgını dünya genelinde 8.096 olgu ve 774 ölüme yol açmış, hastalığı kontrol altına alabilmek için 30 milyar Amerikan dolarından daha fazla harcama yapmak gerekmiştir. Benzer bir coronavirüs olan MERS ise 2012 yılında Arap yarım adasında ortaya çıkmış, 22 Kasım 2013 itibariyle 176 kanıtlanmış olgu ve 69 ölüme neden olmuştur. MERS CoV olası salgın riski nedeniyle DSÖ tarafından yakından izlenmektedir (17).

Sendromik Yaklaşım Süreç Akışı

1 Sendromun tanımı

“Akut Respiratuvar Sendrom” bir hastada ateş olsun veya olmasın, ani başlangıçlı öksürük veya solunum sıkıntısı veya takipne olması ve bunlara neden olacak enfeksiyon dışı nedenler olmaması, olarak tanımlanır.

2 Olası hastalıklar/etkenler

Virüsler - İnfluenza A ve B virüsleri, RSV, adenovirus, parainfluenza virus, SARS coronavirus, MERS coronavirus

Bakteriler - *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Legionella pneumophila* (Lejyoner hastalığı etkeni), *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Chlamydomphila psittaci* (psittakoz etkeni), *Bordetella pertussis* (boğmaca), *Corynebacterium diphtheriae* (difteri), *Coxiella burnetii* (Q ateşi), *Mycobacterium tuberculosis* (TB)

Biyoterör olasılığında - *Bacillus anthracis* (şarbon, solunum yolu ile alınması halinde akciğer şarbonu), *Yersinia pestis* (veba etkeni), *Francisella tularensis* (tularemi etkeni), *Coxiella burnetii*

3 Laboratuvara gönderilecek örnek türü

Balgam, indüklenmiş balgam, nazofaringeal sürüntü, orofaringeal sürüntü, DTA, BAL, plevra sıvısı, kan ve idrar.

Şüpheli vakaların tanısında izlenecek **akış şeması** için bkz. Ek-1.

Seçilecek inceleme örnekleri, özellikleri, alınması ve gönderilmesi ile ilgili bilgi için bkz. “Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi”.

Örneklerin gönderilmesinde *paketleme* ve *taşıma* kesinlikle biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (18) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).

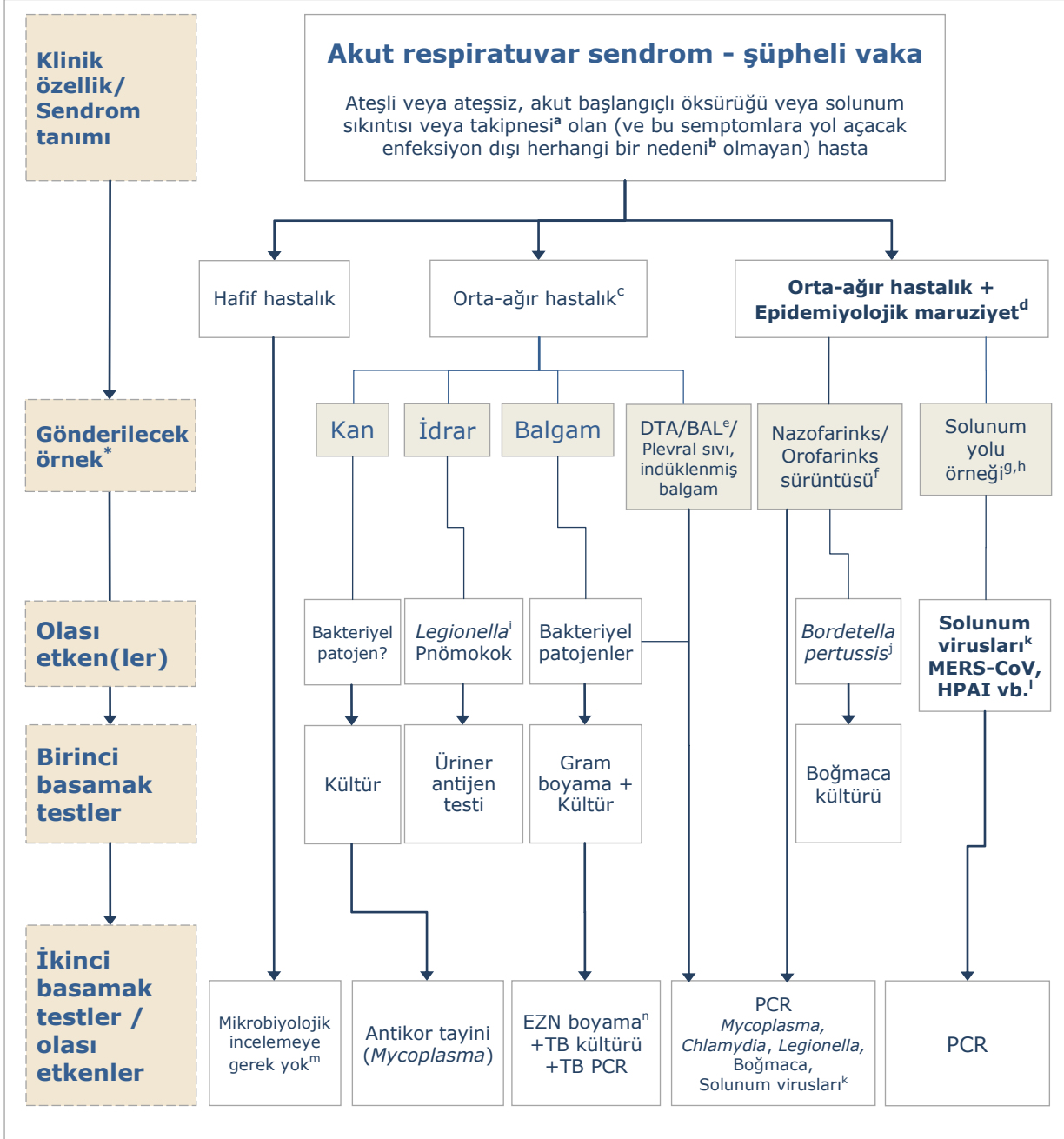
4 Laboratuvardan istenecek tetkikler

Birinci basamak testler - Gram boyama, balgam kültürü, kan kültürü, nazofaringeal sürüntü kültürü (boğmaca düşünülüyor ise), boğaz kültürü, idrarda antijen tayini (öncelikle *Legionella* düşünülüyor ise), PCR (epidemiyolojik maruziyet söz konusu ise), EZN-boyama incelemesi (öncelikle tüberküloz düşünülüyor ise)

İkinci basamak testler - PCR (solunum virüsleri için), *Legionella* kültürü, kanda antikör tayini (*Mycoplasma* için), EZN-boyama incelemesi / TB kültürü / TB PCR

Ekler

Ek-1 Akut respiratuvar sendrom tanı yaklaşımı akış şeması



* Örnekler mümkün olduğunca antibiyotik tedavisi başlanmadan önce alınmalıdır.

^a **Erişkin hastada takipne:** Solunum sayısının 20/dk'nin üzerinde olmasıdır. Solunum sayısı >30/dk üzerinde olan hastalar orta-ağır hasta olarak değerlendirilmelidir.

Çocuk hastada takipne: Solunum sayısının, 0-2 ay arası bebeklerde >60/dk, 2-12 ay bebeklerde >50/dk, 1-5 yaş arası çocuklarda >40/dk ve 5 yaş üstü çocuklarda >20/dk olmasıdır.

^b Akut respiratuvar sendrom vaskülitler, alveoler hemorajik sendromları, akut interstisyel akciğer hastalıkları (eozinofilik pnömoni gibi), ilaç reaksiyonlarına bağlı diffüz alveoler hasar, kalp böbrek yetmezliği ve sıvı yüklenmesi gibi hidrostatik ödeme bağlı solunum sıkıntısı ile karşılanabilir.

- c. **Erişkin hastada ağırlık kriteri:** CURB-65 (konfüzyon, kan üre azotu yüksekliği >20mg/dL, solunum sayısı ≥30/dk, kan basıncı düşüklüğü sistolik <90 mmHg, diyastolik ≤60 mmHg, ve yaş ≥65) skorlama sisteminde vakanın ≥2 puan alması esas alınabilir (19). Ancak 30 yaş altında CURB-65'in hatalı sonuç verebileceği unutulmamalıdır.

İnfiltrasyonların yaygınlığı ve hipoksemi hastalığın ağırlığının belirlenmesi ve yoğun bakım endikasyonu açısından önemli olduğundan en azından PA akciğer grafisi ve pulse oksimetri ile bakılacak oksijen saturasyonunu bir an önce görmeye çalışmak önemlidir.

Çocuk hastada ağırlık kriterleri: Hastaneye yatırılması gereken hastalar orta-ağır kabul edilir. Çocuklarda hastaneye yatış kriterleri; 2-3 ayın altında olan tüm bebekler, solunum sıkıntısı bulgularının varlığı, takipne varlığı (süt çocuğunda >70/dk, büyük çocukta >55/dk, göğüste çekilmeler (interkostal, subkostal, suprasternal), burun kanadı solunumu, apne, bilinç değişikliği, ağızdan beslenememe, dehidratasyon, toksik görünüm, oda havasında nabız oksimetre ile oksijen saturasyonunun %92 ve altında olması, oral antibiyotiklere yanıtızlık (20).

- d. **Epidemiyolojik maruziyet:** Olgunun başvurduğu dönemde akut halk sağlığı tehditi olarak tanımlanmış olan hastalıklarla ilgili olarak bilimsel kuruluşların ve ulusal sağlık otoritesinin belirlemiş olduğu maruziyet kriterleri (ör., Aralık 2013 itibarıyla MERS-CoV için maruziyet kriteri: vaka görülen ülkelere son 14 gün içerisinde seyahat etme ve/veya vaka görülen ülkelere seyahat öyküsü bulunan bir kişiyle seyahat dönüşünden sonraki 14 gün içerisinde yakın temasta bulunma)
- e. **DTA/BAL** hasta entübe ise veya yoğun bakım ünitesinde takip gerekecek kadar ağır hasta ise önerilir. Ağır durumda, ancak henüz entübe olmamış hastalar BAL işlemi sonrasında işleme bağlı olarak entübe edilmek zorunda kalınabilir. **Viral PCR için** tercih edilecek örnekler mümkün olduğunca indüklenmiş balgam, DTA, BAL gibi alt solunum yolu materyali olmalıdır. Bu olamıyorsa burun ve boğaz sürüntüleri kabul edilebilir.
- f. Öncelikli olarak şüphelenilen etkene göre nazofarengeal ve orofarengeal sürüntüden biri veya her ikisi birden seçilebilir. *Ör., Chlamydia spp.* ve *Mycoplasma spp* için orofarenks sürüntüsü tercih edilir.
- g. Epidemiyolojik maruziyet nedeniyle şüphelenilen etken için belirlenmiş en uygun solunum yolu örneği (balgam, BAL, DTA, orafarenks veya nazofarenks sürüntüsü) seçilir. *Ör.,* MERS-CoV için alt solunum yolu örnekleri tercih edilmelidir.
- h. Epidemiyolojik maruziyet nedeniyle şüphelenilen etkenin tanısı için belirlenmiş solunum sistemi örneklerinden başka materyal (serum, idrar vb) söz konusu ise alınmalıdır. *Ör.,* serolojik tanı için kan alınması.
- i. Klinik, rutin laboratuvar ve epidemiyolojik özellikleri nedeniyle *Legionella* enfeksiyonu ön planda düşünülüyorsa üriner antijen birinci basamak test olarak çalışılır.
- j. Boğmaca akut respiratuvar sendrom kapsamında olmamakla birlikte toplum sağlığı açısından taşıdığı önem nedeniyle şüpheli durumlarda en kısa zamanda incelemeye alınmalıdır. Standart vaka tanımının klinik kriterlerine uyan hastalardan kültür için nazofarinks sürüntüsü veya aspirat örneği alınıp gönderilir. Klinik kriter "bir kişide en az 2 hafta süren öksürüğe şu durumlardan (öksürük nöbetleri; iç çekmeli öksürük; öksürükten hemen sonra kusma; ya da pnömoni, sinüzit, plörezi gibi öksürüğe yol açacak başka neden olmaması) en az birinin eşlik etmesi ile karakterize hastalık." <3 ay bebeklerde klinik atipik seyirli olabilir (apne görülebilir).
- k. İnfluenza A, İnfluenza B, RSV, Adenovirus ve Parainfluenza virüsleri mutlaka araştırılmalı. Bununla birlikte hastanın başvurduğu dönem ve coğrafyaya göre panel gerekirse genişletilebilir. Henüz tanımlanmamış bir etkenin bu tabloya neden olabileceği unutulmamalıdır.
- l. Hastanın başvurduğu dönemde akut halk sağlığı tehditi olarak tanımlanmış veya olası tehdit oluşturan virüsler.
- m. Hafif hastalığı olanlarda, "**d**" maddesinde bahsi geçen epidemiyolojik maruziyet söz konusu ise toplum sağlığı açısından olası tehditlerin tanınabilmesi amacıyla "**g**" ve "**h**"de belirtilen örneklerden "**k**" ve "**l**" için belirtilen testler çalışılır.
- n. Klinik, laboratuvar, radyolojik ve epidemiyolojik özellikleri nedeniyle tüberkülozun ön planda düşünüldüğü hastalarda birinci basamak test olarak çalışılmalıdır.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu belge (Akut Respiratuvar Sendromda Tanı Yaklaşımı) aşağıda verilen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

- UMS, B-MT-01 Boğmacanın mikrobiyolojik tanısı
- UMS, B-MT-02 Difterinin mikrobiyolojik tanısı
- UMS, B-MT-06 Lejyoner hastalığının mikrobiyolojik tanısı
- UMS, B-MT-05 *Streptococcus pneumoniae* invaziv enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı
- UMS, B-MT-20 Şarbonun mikrobiyolojik tanısı
- UMS, B-MT-21 Tulareminin mikrobiyolojik tanısı
- UMS, B-MT-22 Q ateşinin mikrobiyolojik tanısı
- UMS, B-MT-26 Vebanın mikrobiyolojik tanısı
- UMS, V-MT-10 İnfluenza ve avian influenzanın mikrobiyolojik tanısı
- UMS, V-MT-18 Akut solunum yetmezliği sendromunun (SARS-CoV, MERS-CoV) mikrobiyolojik tanısı
- UMS, GEN-ÖY-01 Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 WHO Recommended Surveillance Standards WHO/CDS/CSR/ISR/99.2, p.131.
- 2 WHO. Revised global burden of disease 2002 estimates. 2004.
http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates_regional_2002_revised/en/
(son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 3 Nair H, Simoes EAF, Rudan I, Gessner BD ve ark. Global and regional burden of hospital admissions for severe acute lower respiratory infections in young children in 2010: a systematic analysis. *Lancet* 2013;381:1380-90
- 4 Eraksoy H. Pnömonili hastaya yaklaşım. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, eds. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Kitabında, 3. Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri. 2008; s. 788-804
- 5 Welch D. Bioterrorism: Q fever. In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed update, ASM Press, Washington D.C, 2010. p.16.12.1
- 6 Artenstein AW. Bioterrorism and biodefense. In: Cohen J, Opal SM, Powderly WG, et al, eds. *Infectious diseases*. 3rd ed., Elsevier Ltd. 2010, p. 747-58
- 7 Prescott LM, Harley JP, Klein DA eds. Global Travel and Health Considerations: The Emerging Threat of Bioterrorism. Chapter 37. In: *Microbiology*. 5th ed., The McGraw-Hill Companies, USA. 2002, p. 863.
- 8 Schimmer B, Dijkstra F, Vellema P, et al. Sustained intensive transmission of Q fever in the south of the Netherlands, 2009. *Euro Surveill* 2009;14:3.
- 9 Ruuskanen O, Lahti E, Jennings LC, Murdoch DR. Viral pneumonia. *Lancet* 2011; 377: 1264–75

- 10 Treanor JJ. Influenza viruses including avian influenza and swine influenza. *In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases.* Churchill Livingstone, 2010, p. 2265-88
- 11 WHO. Influenza (Seasonal). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/> (son erişim tarihi: 20.01.2014)
- 12 Taubenberger JK, Morens DM. 1918 Influenza: The mother of all pandemics. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(1):15-22
- 13 Amato-Gauci A, Zucs P, Snacken R, Ciancio B et al. Surveillance trends of the 2009 influenza A(H1N1) pandemic in Europe. *Euro Surveill* 2011;16(26). pii: 19903
- 14 http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/avian_influenza/en/ (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 15 http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/influenza_h7n9/10u_ReportWebH7N9Number.pdf (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 16 Cesario TC. Viruses associated with pneumonia in adults. *Clin Infect Dis* 2012;55(1): 107-13
- 17 WHO Global Alert Response- Coronavirus infections. http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/en/index.html (erişim tarihi: 19.12.2013)
- 18 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.
- 19 Türk Toraks Derneği. Erişkinlerde toplumda gelişen pnömoni tanı ve tedavi uzlaşısı raporu. *Türk Toraks Dergisi* 2009;10(Ek 9):6-7
- 20 Bradley JS, Byington CL, Shah SS, et al. The management of community-acquired pneumonia in infants and children older than 3 months of age. Clinical Practice Guidelines by the Pediatric Infectious Diseases Society and the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2011;53(7):25-76



T.C. Sağlık Bakanlığı

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

AKUT SENDROMİK YAKLAŞIM REHBERİ

Akut Sarılık/Hepatit Sendromu

Hazırlayan Birim	Sendromik Yaklaşım Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Sendromik Yaklaşım
Bölüm	-
Standart No	SY-05
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
SENDROMİK YAKLAŞIM SÜREÇ AKIŞI	6
1 Sendromun tanımı	6
2 Olası hastalıklar/etkenler	6
3 Laboratuvara gönderilecek örnek türü	7
4 Laboratuvardan istenecek tetkikler	7
EKLER.....	8
Ek-1 Akut sarılık sendromu tanı yaklaşımı akış şeması	8
Ek-2 Yenidoğan sarılığında tanı yaklaşımı akış şeması	9
Ek-3 Akut sarılık ile seyreden salgın durumunda tanı yaklaşımı akış şeması	10
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	11
KAYNAKLAR.....	11

Kapsam ve Amaç

Akut sarılık/hepatit sendromu; cilt ve skleralarda akut başlayan sarılık, idrar renginde koyulaşma, ağır hastalık tablosu veya sarılık olmaksızın ani bulantı, kusma, halsizlik, iştahsızlık, karın ağrısı ve ateşin eşlik ettiği (etmeyebilir) ve normalin en az 2 katı üzerinde ALT yüksekliği ile seyreden ve predispozan faktörlerin olmadığı klinik tablo olarak tanımlanabilir.

Enfeksiyöz nedenlerin yol açtığı akut sarılık tabloları, bazıları aşı veya diğer yöntemlerle kontrol edilebilir olmalarına karşın bulaş yollarının çeşitliliği, kronik hastalığa yol açarak morbiditeyi arttırabilmeleri ya da fulminan seyredebilmeleri nedeniyle önem kazanırlar. Leptospiroz, sarı humma gibi bazı enfeksiyonların da salgın riski veya yüksek ölüm oranları ile birlikte olması akut sarılık sendromunun halk sağlığı tehdidi olarak ele alınmasında belirleyici gerekçelerdir.

Akut sarılık sendromu ile hekime gelen vaka bir epideminin ilk vakası (habercisi) olabileceği gibi -seyahat sırasında edinilmiş- uluslararası ihbarı zorunlu bir hastalık (ör., sarı humma) da olabilir ve zamanında kontrol önlemlerinin alınması etkenin erken tespiti ile mümkündür. Bu nedenlerle bu Belgenin, vakaları ilk görececek hekimlere yol gösterecek bir Rehber olması hedeflenmiştir. Amacı; hekimin semptomlardan ve epidemiyolojik ipuçlarından yola çıkarak -ülkemizde henüz görülmeyen ancak görülme potansiyeli olan etkenler de dahil- *hangi etkenleri öncelikle düşüneceğine ve hangi örnekleri, hangi tanı testleri için, ne zaman göndereceğine* dair izleyebileceği bir **akış şeması** vermektir. Belgenin paralel amaçlarından biri de, laboratuvar sonuçlarının doğruluğu ve güvenilirliği dahil, laboratuvarların tanılal kapasitesinin gelişmesini teşvik etmesidir.

Bu Belgede akut sarılık/hepatit sendromuna neden olan enfeksiyon dışı nedenler kapsam dışı bırakılmıştır.

Kısaltmalar ve Tanımlar

ALT Alanin aminotransferaz

CMV Cytomegalovirus

EBV Epstein-Barr virüs

Genel Bilgi

Sarılık (ikter) kandaki bilirubin düzeyinin artması sonucu deri, sklera ve mukozaların sarı renk alması durumudur. Sarılık bir semptom olup çeşitli nedenleri olabilir ve tek bir hastalığa işaret etmez. **Hepatit** bir anlamda karaciğerin iltihabıdır. Hepatitlerin ayırıcı tanısı pek çok diğer hastalığı göz önüne almayı gerektirir. Bunlar, klasik hepatotropik virüslere (Hepatiti A, B, C, D ve E virüs) ek olarak bir takım virüsleri, viral olmayan enfeksiyöz ajanları, ilaçların indüklediği karaciğer hasarını, iskemik hepatit ("şok karaciğer"), şiddetli otoimmün kronik aktif hepatit, akut Budd-Chiari sendromu, Wilson hastalığı, gebeliğin akut yağlı karaciğeri ve HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets) gibi gebeliğe özgü sendromları içermektedir (*bkz.* Tablo 1).

Sarılıklı bir hastada en sık rastlanan belirtiler, halsizlik, iştahsızlık, mide bulantısı, karnın sağ üst kadranında ağrı, cilt ve skleraların sararması ve idrarın koyulaşmasıdır. Kısa süren ateş olabilir. Hastaların bazıları enfeksiyonu sararmadan halsizlik eklem ağrıları ve hafif ateş ile gribal enfeksiyon tarzında geçirirler.

HAV ve HEV dışı ile atılırlar. Bu virüsler ile oluşan hepatitler başlıca, virüs içeren dışkıyla kirlenmiş su ve gıdaların tüketilmesi sonucu bulaşır.

Hepatit B, C ve D virüsleri ise en sık kan yoluyla olmak üzere vücut sıvıları ve cinsel yolla bulaşır. Hastalığın, bu virüsleri taşıyan anneden bebeğe geçişi de mümkündür.

A ve E hepatit enfeksiyonları tam şifa ile iyileşirken, B, C, D hepatitler ise kronikleşebilirler.

Serolojik kanıta dayalı olarak bildirimlerin yapılmaya başlandığı 2005 yılından günümüze Sağlık Bakanlığına yapılan akut HAV enfeksiyonu bildirimleri incelendiğinde; HAV ile karşılaşmanın küçük yaşlardan, itibaren söz konusu olduğu, anneden geçen antikolar nedeniyle bebeklerde olgu bildirimlerinin çok az olduğu, bununla birlikte 1-4 yaş grubundan itibaren bildirimlerin artış gösterdiği dikkati çekmektedir. En yüksek olgu sayısı 5-9 yaş arasındadır ve ikinci sıklıkta 10-14 yaş gelmekte, bunu sırasıyla 1-4 yaş ve 15-19 yaş grubu izlemektedir (*Kaynak: Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri İstatistikleri, Alınma tarihi: Nisan 2012*).

Sağlık Bakanlığının yürüttüğü Türkiye Beslenme ve Sağlık araştırmaları çalışmasına göre hepatit A enfeksiyonu için toplumda seropozitiflik oranı >%99 olarak bildirilmektedir. Hepatit A, 2012 yılından itibaren zorunlu aşılama kapsamına alınmıştır.

Gelişmekte olan ülkelerde hepatit B hala önemli bir sorundur. Türkiye'de hepatit B prevalansı son yıllarda kitlesel aşılama sonucu belirgin bir düşüş göstermiştir. Bölgelere göre değişmekle beraber ülkemizde HBsAg prevalansı %3-6 civarındadır. Aşılama sorunu çözülmüş gelişmiş ülkelerde bu oran çok düşüktür. Hepatit C'nin aşısı henüz yoktur. Hepatit B ve C hastalarının bir kısmı kronikleşebilmekte ve siroz, ileri dönemde karaciğer kanserine dönüşebilmektedir. Hepatit D ise hepatit B ile süperenfeksiyon veya koinfeksiyon olarak görülebilir.

Hepatit C'nin toplumumuzdaki yaygınlığı %1'in altındadır (1). C virüsü hepatiti özellikle hemodiyaliz hastaları ve sık kan nakli yapılan hastalar için ciddi bir tehlike oluşturabilir.

Hepatit E de Hepatit A gibi fekal-oral yolla bulaşan bir virüstür. Ülkemizde anti-HEV IgG seroprevalansı %10'un altındadır. Hepatit E'ye bağlı fulminan hepatit gebeler dışında oldukça nadirdir. Zaman zaman bölgesel salgınlar oluşturduğu bilinmektedir (2).

Tablo 1. Akut hepatitin ayırıcı tanısında hepatit A-E virüslerinin dışında olası nedenler

Enfeksiyöz	Enfeksiyöz olmayan
<ul style="list-style-type: none">Epstein-Barr virusCytomegalovirusHerpes simplex virusSarı hummaLeptospirozQ ateşiHIVBrusellozLyme hastalığıSifiliz	<ul style="list-style-type: none">İlaçların indüklediği hepatitOtoimmün kronik aktif hepatitİskemik hepatitAkut Budd-Chiari sendromuWilson hastalığıGebeliğin akut yağlı karaciğeriHELLP (hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets)

Daha az sıklıkta farklı virüsler, bakteriyel ve paraziter etkenler de sarılık/hepatit nedeni olabilirler. Nadir görülen sarılık nedenleri içinde; sarı humma, Kırım-Kongo kanamalı ateşi, Batı Nil virüsü, Dengue virüsü, tatarcık humması, enterovirüsler, kabakulak, EBV, CMV, kızamık, varicella virüs, adenovirüs, HIV, rotavirüs ve Parvovirus B19 enfeksiyonu gibi viral enfeksiyonlar; fasiyolaz, askariyaz, Kala-azar gibi parazitler enfeksiyonlar ve leptospiroz, bartonelloz, tularemi, Lyme hastalığı, Q ateşi, sifiliz, bruselloz gibi bakteriyel enfeksiyonlar sayılabilir.

Bruselloz ülkemizde önemli bir halk sağlığı sorunudur (3). Karaciğer retikülo-endotelyal sistemin en büyük organı olması sebebi ile brusellozda da hedef organlardan birisidir (4). Dolayısı ile sıklıkla hafif orta düzeyde karaciğer enzim yükselmelerine neden olabilmektedir. Bunun dışında, bruselloz seyrinde granülomatöz hepatit ve akut kolesistit de gözlenebilir (4,5,6).

Sarı humma orta Afrika, Orta Amerika ve Güney Amerika'da endemiktir. Vakaların %90'ından fazlası Afrika'da görülmektedir. Sarı humma 3-7 gün gibi, hepatit A, B ve C virüslerinininkinden daha kısa bir inkübasyon periyodu ile karakterizedir. Hastalık şiddetli bir hepatitle seyredebilir. Serum aspartat aminotransferaz (AST; iskelet kası ya da miyokard zedelenmesine, muhtemelen her ikisine birden bağlı) karakteristik olarak ALT'den daha yüksektir. Şiddetli vakalarda 2000 IU'den daha yüksek olabilmektedir. Serum bilirubin düzeyleri sıklıkla 5- 10 mg/dL aralığındadır (7). Son 15 gün içinde endemik bölgeye seyahat öyküsü olan ve aşılanmamış ya da yeterli immünize olmamış kişilerde sarı humma'dan şüphelenilmelidir. Sarı hummada ölüm oranı %50 kadar yüksek olabilmektedir (ayrıca bkz. UMS, V-MT-14 Sarı hummanın mikrobiyolojik tanısı).

Leptospirozda hastalar ani başlangıçlı ateş, üşüme titreme, kas ağrısı ve baş ağrısı ile başvururlar. Bu hastalarda sarılık olabilir. Fizik muayenede sıklıkla belirgin konjonktival kızarıklık görülür. Akut viral hepatitlerde sık görülmeyen lökositöz öne çıkabilir ve bunun üriner sistem bulgularından proteinüri, hematüri ve anüriyle birlikte olması leptospiroz şüphesini artırır. Hastaların %50'sinde serum kreatin fosfokinaz yükselmiştir. Lökositozu olan ateşli bir hastada belirgin sarılığın eşlik ettiği renal yetmezlik leptospirozun şiddetli bir formu olan Weil sendromu olasılığını akla getirmelidir (7) (ayrıca bkz. UMS, B-MT-23 Leptospirozun mikrobiyolojik tanısı).

Q ateşi de sarılık ile seyredebilen enfeksiyonlardan biridir. Hastalık riketsiyal bir ajan olan *Coxiella burnetii* ile meydana gelir. Hastalık genellikle ateş, üşüme titreme ve pnömonitis ile başlar. Hastaların %85'inde ALT ve AST'de hafif yükselme (normalin 2 ile 5 katı) izlenir. Hiperbilirubinemi ve serum alkalin fosfatazda belirgin yükselme söz konusu olabilir. Çiftlik veya vahşi hayvan maruziyeti ile ilişkili epidemiyolojik özellikler ve tek hepatik granülomlar (fibrin halkası granülomlar şüphe ettirir fakat patognomonik değildir) klinisyenin Q ateşinden şüphe etmesine yol açmalıdır (7) (ayrıca bkz. UMS, B-MT-22 Q ateşinin mikrobiyolojik tanısı).

Yeni doğan sarılığı ise tamamen fizyolojik olabileceği gibi pek çok farklı nedene bağlı olarak da gelişebilir. Bulguların varlığı hemen detaylı araştırma gerektirir. Biliyer atrezi tanısı mümkün olduğunca hızlı bir şekilde dışlanmalıdır. Radyolojik ve histopatolojik değerlendirmelere ek olarak enfeksiyöz etkenlere yönelik testler planlanmalıdır. Yenidoğanda sarılığa neden olan en sık etkenler TORCH grubu etkenlerdir. Anneden de alınan örneklerin tanıya katkısı önemlidir.

Sendromik Yaklaşım Süreç Akışı

1 Sendromun tanımı

Akut sarılık/hepatit sendromu; akut başlayan cilt ve skleralarda sarılık, idrar renginde koyulaşma, ağır hastalık tablosu veya sarılık olmaksızın ani başlangıçlı bulantı, kusma, halsizlik, iştahsızlık, karın ağrısı, ateşin eşlik ettiği veya etmediği ve normalin en az 2 katı üzerinde ALT yüksekliği ile seyreden ve predispozan faktörlerin olmadığı klinik tablo olarak tanımlanabilir.

2 Olası hastalıklar/etkenler

Hepatitlerin enfeksiyöz etkenleri viral, bakteriyel ve paraziter olarak 3 ana başlıkta incelenebilir. Olası enfeksiyöz etkenler Tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2. Sarılığın enfeksiyöz nedenleri (8 no.lu kaynaktan uyarlanmıştır).

Patojen	Yorum
Viral	
HAV, HBV, HCV, HDV, HEV EBV, CMV HIV Kırım-Kongo kanamalı ateşi Sarı humma virüsü Batı Nil Virüsü Dengue Tatarcık ateşi	HDV, HBV ile ko-enfeksiyon gerektirir
Bacterial	
<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Coxiella burnetti</i> (Q ateşi) <i>Rickettsia conori</i> <i>Treponema pallidum</i> <i>Chlamydia</i> spp. <i>Brucella</i> spp. <i>Leptospira</i> spp. <i>Salmonella enterica</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Ağır sepsis gibi yaygın enfeksiyonlarında görülür. Ağır sepsis gibi yaygın enfeksiyonlarında görülür. Ağır sepsis gibi yaygın enfeksiyonlarında görülür. Granülomatöz hepatite neden olur; ancak sarılık nadirdir. Sekonder sifilizde sarılık görülebilir. Primer sifiliz asemptomatik seyretmiş veya lezyon atlanmış olabilir. Fitz-Hugh-Curtis sendromu ile Tifo ve Paratifo A Granülomatöz hepatitin dünyadaki en yaygın sebebi
Parasitic	
<i>Entamoeba histolytica</i> <i>Falciparum</i> spp. <i>Leishmania</i> spp. <i>Fasciola hepatica/gigantica</i>	Eğer safra kanalları apse nedeniyle baskıya uğramışsa Sarılık varlığı şiddetli sıtmaya işaret eder. Granülomatöz hepatite neden olabilir, sarılık nadirdir. Akut hastalıkta anormal karaciğer enzimleri söz konusudur, sarılık yerleşmiş enfeksiyonun bir özelliği olabilir.

3 Laboratuvara gönderilecek örnek türü

Kan/serum, dışkı, safra ve nazal sekresyonlar

Kan kültürü için kan örneği

Karaciğer biyopsi / otopsi örneği (sarı humma ya da diğer bazı etkenlerden şüphelenildiğinde)

Seçilecek inceleme örnekleri, özellikleri, alınması ve gönderilmesi ile ilgili bilgi için *bkz.* "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"

Şüpheli vakaya ait örnekler kesinlikle biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun bir şekilde *paketlenmeli* ve *taşınmalıdır* (9) (ayrıca *bkz.* UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).

4 Laboratuvardan istenecek tetkikler

Birinci basamak testler

Anti-HAV IgM, HbsAg, Anti-Hbc IgM

Kan kültürü,

Brucella tüp aglütinasyonu

EBV VCA IgM, CMV IgM

T. gondii serolojisi

P. falciparum/vivax kalın damla – ince yayma

Sifiliz serolojisi

İkinci basamak testler

Anti-HEV, Anti-HDV

Q ateşi serolojisi

Leptospiroz MAT testi

Visseral leişmanyaz serolojisi

P. falciparum/vivax ELISA/PCR

E. granulosus/multilocularis serolojisi

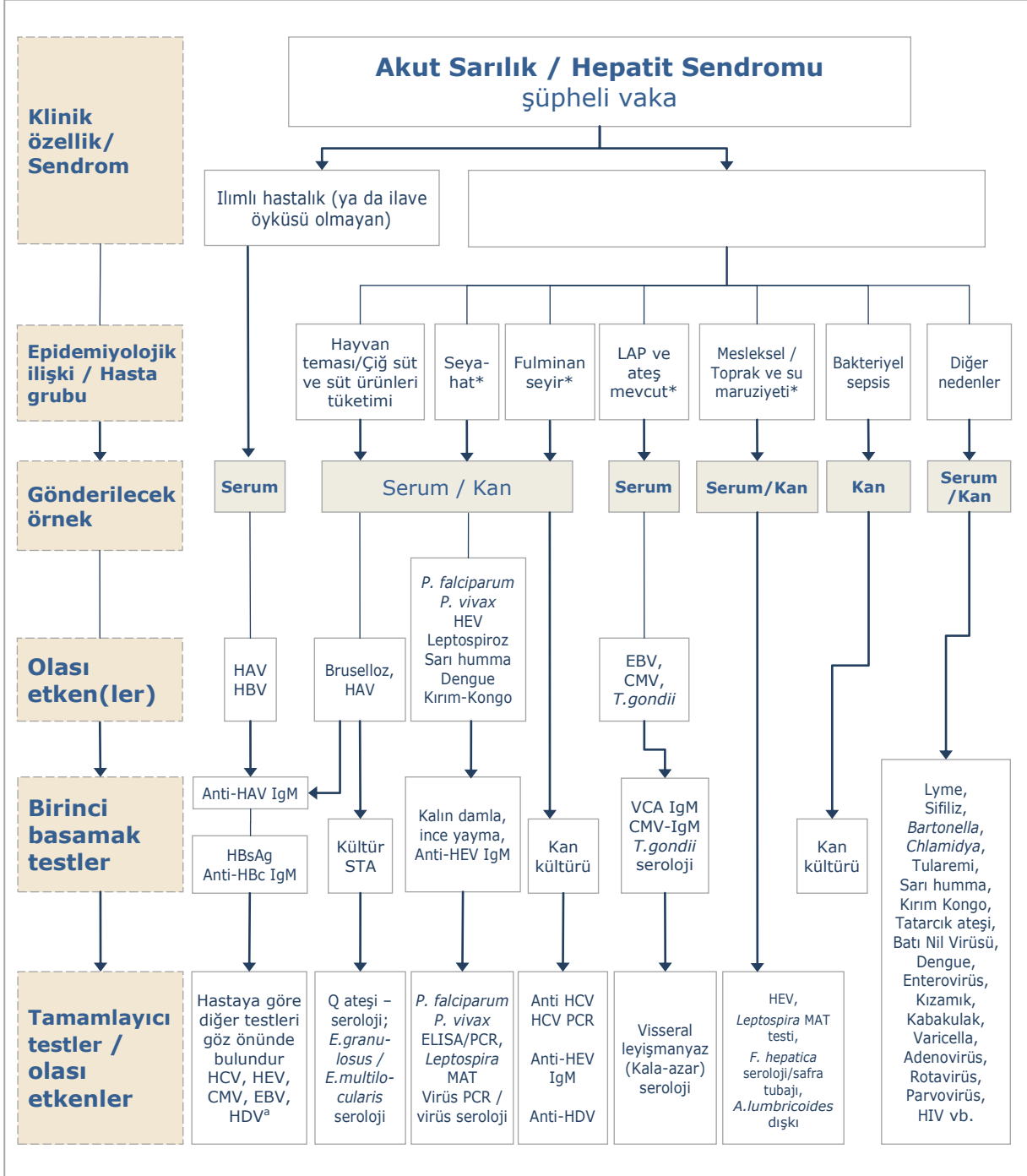
F. hepatica serolojisi

Dışkıda *Ascaris lumbricoides*

ve diğer nadir nedenlere yönelik serolojik testler

Ekler

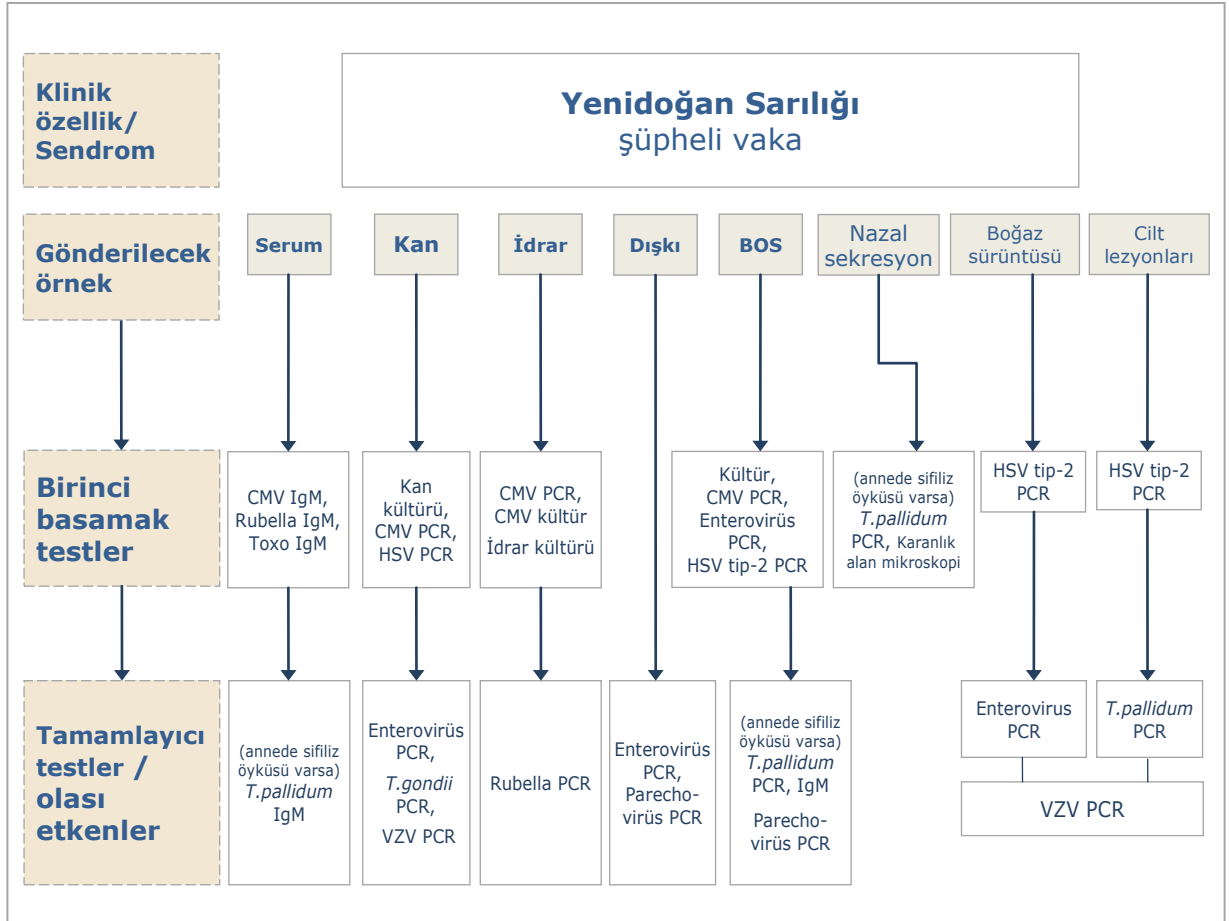
Ek-1 Akut sarılık sendromu tanı yaklaşımı akış şeması



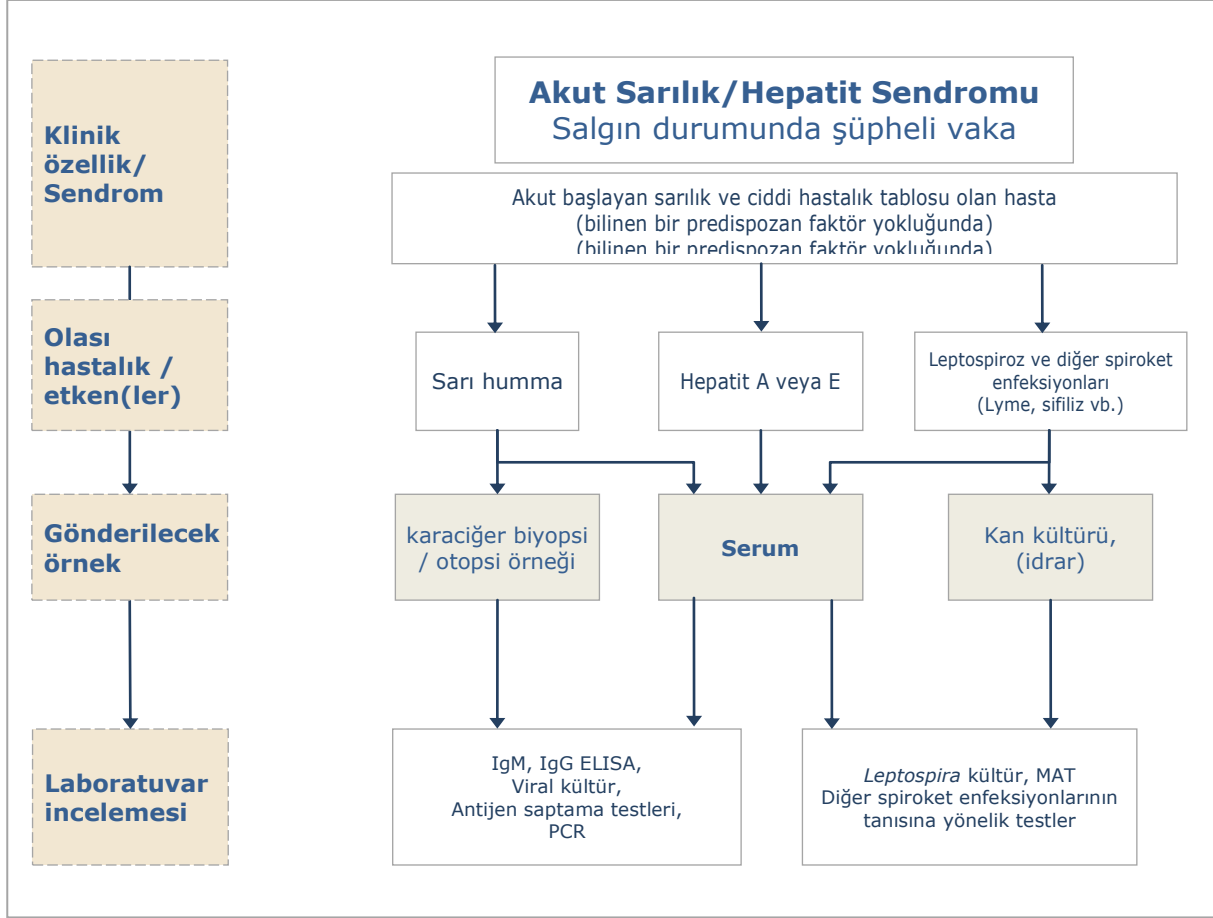
STA, standart tüp aglütinasyonu (Wright); MAT, mikroskopik aglütinasyon testi; VCA, viral capsid antigen

^a HBsAg pozitif olgularda göz önünde bulundurulmalıdır. * bu vakalarda her zaman Anti-HAV IgM, HBsAg ve Anti-HBc IgM de bakılmalıdır.

Ek-2 Yenidoğan sarılığında tanı yaklaşımı akış şeması



Ek-3 Akut sarılık ile seyreden salgın durumunda tanı yaklaşımı akış şeması



İlgili diğer UMS belgeleri

Bu belgede (Akut Sarılık/Hepatit Sendromu) geçen hastalıklar veya konularla ilgili ilave bilgi için aşağıda listelenen UMS belgelerine de başvurunuz:

- UMS, B-MT-19 Brusellozun mikrobiyolojik tanısı
- UMS, B-MT-22 Q ateşinin mikrobiyolojik tanısı
- UMS, B-MT-23 Leptosirozun mikrobiyolojik tanısı
- UMS, P-MT-04 Kala azarın mikrobiyolojik tanısı
- UMS, P-MT-06 Sıtmanın mikrobiyolojik tanısı
- UMS, V-MT-11 Viral hemorajik ateş sendromunda mikrobiyolojik tanı
- UMS, V-MT-12 Kırım-Kongo kanamalı ateşinin mikrobiyolojik tanısı
- UMS, V-MT-14 Sarı Hummanın mikrobiyolojik tanısı
- UMS, GEN-OY-01 Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Coskun O, Erdem H, Besirbellioglu BA, et al. Distribution of hepatitis C virus infection in the male Turkish population. *Int J Infect Dis* 2006;10:481
- 2 Çakaloğlu Y. E Hepatiti. *Ankem Derg* 2003;17:220
- 3 Erdem H, Akova M. Leading infectious diseases problems in Turkey. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:1056-1067
- 4 Albayrak A, Albayrak F. Hepatic granulomas associated with brucellosis: Hepatic granulomas and brucellosis. *Hepat Mon* 2011;11:1-2
- 5 Al-Otaibi FE. Acute acalculus cholecystitis and hepatitis caused by *Brucella melitensis*. *J Infect Dev Ctries* 2010;4:464-467
- 6 Erdem I, Cicekler N, Mert D, et al. A case report of acute hepatitis due to brucellosis. *Int J Infect Dis* 2005;9:349-350
- 7 Curry MP, Chopra S. Acute Viral Hepatitis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed., Churchill Livingstone, Chapter 111; 2005.
- 8 Day J. Practice point: Jaundice in a returned traveler from Nepal. Chapter 51. In: Cohen J, Opal SM, Powderly WG, et al, eds. *Infectious diseases*. 3rd ed., Elsevier Ltd, 2010, p. 1085.
- 9 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.