



Bu Proje Avrupa Birliđı ve Türkiye Cumhuriyeti
tarafından finanse edilmektedir

Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi (TR0802.16)

Ulusal Mikrobiyoloji Standartları

ULUSAL TÜBERKÜLOZ TANI REHBERİ (UTTR)

Tüberkülozun laboratuvar tanısı için örneklerin alınması, laboratuvara gönderilmesi,
laboratuvar işlemleri ve biyogüvenlik önlemleri

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





Bu Proje Avrupa Birliđı ve Türkiye Cumhuriyeti
tarafından finanse edilmektedir

Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi
(TR0802.16)

Ulusal Mikrobiyoloji Standartları

ULUSAL TÜBERKÜLOZ TANI REHBERİ (UTTR)

Tüberkülozun laboratuvar tanısı için örneklerin alınması, laboratuvara gönderilmesi,
laboratuvar işlemleri ve biyogüvenlik nlemleri

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 Tüberküloz Referans Laboratuvarı

“Ulusal Tüberküloz 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 Tüberküloz Tanı Rehberi. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 935, Ankara, 2014” şeklinde olmalıdır. Ücretsizdir. Parayla satılamaz. Dokümanın içeriği hiçbir şekilde Avrupa Birliği’nin görüşlerini yansıtmamaktadır.

ISBN: 978-975-590-486-3

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 935

Yayın tarihi: 15.04.2014

Baskı sayısı: 500

Basım yeri: Ankara

Basım yılı: 2014

Baskı: Aydoğdu Ofset Matbaacılık Ambalaj San. ve Tic. Ltd. Şti

Tel: 0312 395 81 44

Ulusal Mikrobiyoloji Standartları

ULUSAL TÜBERKÜLOZ TANI REHBERİ (UTTR)

Editör grubu*

Nurhan ALBAYRAK	THSK, Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı
Gönül ASLAN	Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
İsmail CEYHAN	Atatürk Göğüs Hastalıkları Hastanesi
Aydan ÖZKÜTÜK	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Nuri ÖZKÜTÜK	Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi
Dilek ŞATANA	İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi
S. Nilay UÇARMAN	THSK, Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı

*Soyadına göre alfabetik dizin

THSK Yayın komisyonu

Hasan IRMAK	THSK, Tüketici ve Çalışan Güvenliği Başkan Yardımcısı
Mustafa Bahadır SUÇAKLI	THSK, Erken Uyarı-Cevap ve Saha Epidemiyolojisi Daire Başkanı
Nazan YARDIM	THSK, Obezite, Diyabet ve Metabolik Hastalıklar Daire Başkanı
Kanuni KEKLİK	THSK, Toplum Sağlığı Hizmetleri Daire Başkanı

Yayın koordinatörleri

Nurhan ALBAYRAK	THSK, Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı
S. Nilay UÇARMAN	THSK, Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı

"Gücün, bilgiden geldiğine

Bilmenin, kendinden başladığına inananlara" atfedilmiştir.

Yazarlar*

Ali ALBAY	Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Nurhan ALBAYRAK	THSK, Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı
Ahmet ARSLANTÜRK	THSK, Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı
Gönül ASLAN	Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Orhan BAYLAN	Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Haydarpaşa Hastanesi
Can BİÇMEN	Suat Seren Göğüs Hastalıkları Hastanesi
İsmail CEYHAN	Atatürk Göğüs Hastalıkları Hastanesi
Rıza DURMAZ	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi
Nuran ESEN	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Özgül KISA	Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Aydan ÖZKÜTÜK	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Nuri ÖZKÜTÜK	Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mustafa ÖZYURT	Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Haydarpaşa Hastanesi
Zeynep SARIBAŞ	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Engin SEBER	İstanbul Taksim Bölge TB Laboratuvarı
Dilek ŞATANA	İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi
Hülya ŞİMŞEK	THSK, Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı
Gülnur TARHAN	Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi
S. Nilay UÇARMAN	THSK, Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı

*Soyadına göre alfabetik dizin

Katkıda Bulunanlar*

Hakan ABACIOĞLU	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dünya Sağlık Örgütü
Efsun AKBAŞ	Serbest Danışman
Derya CENGER	Yedikule Göğüs Hastalıkları Hastanesi
Cengiz ÇAVUŞOĞLU	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Varalakshmi ELANGO	Dünya Sağlık Örgütü
Şeref ÖZKARA	Atatürk Göğüs Hastalıkları Hastanesi
Figen SEZEN	THSK, Erken Uyarı Cevap ve Saha Epidemiyolojisi DB
Cemile SÖNMEZ	THSK, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları DB
Sultan YOLBAKAN	THSK, Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı

*Soyadına göre alfabetik dizin

Teşekkür

T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu bu Rehberin hazırlanmasında görev alan yazarlara ve diğer emeği geçenlere teşekkür eder.

Önsöz

Tüberküloz (verem) insanlık tarihinin en eski ve en bulaşıcı hastalıklarından biridir. Tüberküloz (TB) hala tüm dünyada yüksek morbidite ve mortaliteyle seyreden enfeksiyonlar arasında yer almaktadır. Dünya nüfusunun yaklaşık üçte biri tüberküloz ile enfektedir. Dünyada her yıl, %95'i gelişmekte olan ülkelerde olmak üzere yaklaşık olarak 8,7 milyon yeni tüberküloz olgusunun geliştiği ve yılda 1,3 milyon kişinin tüberküloz nedeni ile öldüğü tahmin edilmektedir.

Ülkemizde tüberküloz hastalığı, 20. yüzyılın ilk yarısında çok büyük bir salgın yapmış, o yıllarda her yıl bin kişiden 2-3'ü verem nedeniyle ölmekteydi. Özellikle yirminci yüzyılın üçüncü çeyreğinde yürütülen yoğun verem savaşı çabaları sonucunda durum değişmiştir. Ülkemizde son Verem Savaşı Raporuna göre kayıtlı hastalar yüz binde 22'dir.

TB laboratuvarları, TB kontrolünün temel bileşenlerinin sağlanmasında kritik öneme sahiptir. Bulaştırmacılığı yüksek TB olgularının hızlı tespiti ve ilaç direnç durumunun belirlenmesi, enfeksiyon zincirinin kırılması, tedavinin ve koruyucu faaliyetlerin (tarama vb.) başlatılmasına olanak sağlamaktadır. TB laboratuvarlarının aynı zamanda vakaların epidemiyolojik olarak izlenmesi ve laboratuvara dayalı ilaç direnç surveyansı açısından da önemli görevleri bulunmaktadır.

Tüberküloz tanısında ve tedavi takibinde son derece önemli olan tüberküloz bakteriyolojisi, Ulusal Tüberküloz Kontrol Programının önemli bir bileşenidir. Ulusal Tüberküloz Kontrol Programının amaç ve hedeflerine ulaşmak için, ülkemizdeki tüberküloz laboratuvarlarının ulusal-uluslararası kabul görececek nitelikte kalite güvence sistemine sahip laboratuvarlar olması gereklidir.

Bu nedenle tüberküloz laboratuvarlarının sahip olması gereken minimum standartların tespit edilmesi ve bu standartların uygulanabilmesi için ulusal bir rehberin hazırlanması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bu doküman, alanında uzman akademisyenler tarafından kanıta dayalı olarak hazırlanmış, tüm sahada kullanılması öngörülen bir rehberdir.

Tüm emeği geçenleri kutlar, başarılarının devamını dilerim.

Prof. Dr. Seçil Özkan

THSK Başkanı

"Ancak başkaları için yaşanan bir hayat, yaşamaya değer bir hayattır."

A. Einstein

İÇİNDEKİLER

EDİTÖR GRUBU	1
YAYIN KOMİSYONU	1
YAYIN KOORDİNATÖRLERİ	1
YAZARLAR	3
KATKIDA BULUNANLAR	3
TEŞEKKÜR	4
ÖNSÖZ	5
İÇİNDEKİLER	7
REHBER BÖLÜMLERİ	7
KISALTMALAR VE TANIMLAR	8
TABLO DİZİNİ	10
ŞEKİLLER DİZİNİ	11
ÖZET BİLGİ	12
REHBERİN HAZIRLANMASI	12
KAPSAM VE AMAÇ	13
HEDEF GRUPLAR	13
ULUSAL TÜBERKÜLOZ KONTROL PROGRAMI	14

REHBER BÖLÜMLERİ

UTTR-1 BİYOGÜVENLİK

UTTR-2 ÖRNEK YÖNETİMİ

UTTR-3 MİKROSKOPİ

UTTR-4 KÜLTÜR

UTTR-5 TÜR TAYİNİ

UTTR-6 MOLEKÜLER TANI

UTTR-7 İLAÇ DUYARLILIK TESTİ

UTTR-8 İNTERFERON GAMA SALINIM TESTİ

UTTR-9 "ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇ DİRENCİ LABORATUVAR
SÜRVEYANS AĞI" REHBERİ

Kısaltmalar ve Tanımlar

AMS	Açlık mide suyu
ARB	Aside dirençli bakteri
BAL	Bronkoalveolar lavaj
BCG	Bacille Calmette-Guerin
BGD	Biyogüvenlik Düzeyi
BGK	Biyogüvenlik Kabini
bkz.	Bakınız
BOS	Beyin omurilik sıvısı
BTL	Bölge Tüberküloz Laboratuvarı
CDC	"Centers for Disease Control and Prevention" (Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi, ABD)
CE	Conformite Europeene (Avrupa Direktiflerine Uygunluğu)
CFP10	"Culture Filtrate Protein 10" (Kültür filtrat proteini 10)
CO₂	Karbondioksit
ÇİD	Çok İlaç Direnç
dk.	Dakika
DGT	Doğrudan Gözetimli Tedavi
DGTS	Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi
DKD	Dış Kalite Değerlendirme
DO	Direnç oranı
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
E	Etambutol
ECDC	"European Centre for Disease Prevention and Control" (Avrupa Hastalıkları Önleme ve Kontrol Merkezi)
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
ELISA	"Enzyme linked immunosorbent assay" (Enzim ilişkili İmmun test)
ELISPOT	"Enzyme linked immunosorbent spot" (Enzim ilişkili İmmunospot test)
EMB	Etambutol
ESAT-6	"Early Secretory Antigenic Target-6" (Erken sekreter antijenik hedef 6)
EZN	Erlich Ziehl-Neelsen
FDA	"Food and Drug Administration" (Gıda ve İlaç yönetimi)
GHH	Göğüs Hastalıkları Hastanesi
gr	Gram
GU	"Growth Unit" (büyüme birimi)
H	İzoniiazid
H₂O	Su
HCl	Hidroklorik asit
HEPA	High Efficiency Particulate Air (Yüksek etkinlikli partikül hava)
HPLC	High-performance liquid chromatography (Yüksek performanslı sıvı kromatografisi)
IFNγ	İnterferon gamma
INH	İzoniazid
IS	"Insertion Sequence" (İnsersiyon dizileri)
IUATLD	"International Union Against Tuberculosis and Lung Disease"
İDT	İlaç duyarlılık testi

İGST	İnterferon Gama Salınım Testi
KH₂PO₄	Potasyum dihidrojen fosfat
KKD	Kişisel koruyucu donanım
LCR	"Ligaz chain reaction" (Ligaz zincir reaksiyonu)
LED	"Light Emitting Diode"
LJ	Löwenstein Jensen
LTBE	Latent Tüberküloz Enfeksiyonu
LPA	"Line Probe Assay" (Ters hibridizasyon testi)
MB	Middlebrook
MGIT	"Mycobacteria Growth Indicator Tube"
MgSO₄	Magnezyumsülfat
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleks
NAAT	"Nucleic Acid Amplification Test" (Nükleik asit çoğaltma testi)
NALC	N asetil L sistein
NaOH	Sodyum hidroksit
n-NEDD	β-N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride
OADC	Oleik asit-albümin-dekstroze-katalaz
QFT-GIT	QuantiFERON-TB Gold In-Tube Test
NACl	Sodyum klorid
PBS	"Phosphate buffered saline" (Fosfat tamponu)
PCR	"Polimerase chain reaction" (Polimeraz zincir reaksiyonu)
PNB	Paranitrobenzoik asit
PPD	Purifiye Protein Derivesi
PRA	Polimeraz zincir reaksiyonu restriksiyon analizi
PZA	Pirazinamid
R	Rifampisin
RD-1	"Region of difference-1" (Farklılaşma bölgesi 1)
RIF	Rifampisin
SDA	"Strand Displacement Amplification" (Zincir ayrıştırma amplifikasyon)
SF	Serum fizyolojik
S	Streptomisin
SM	Streptomisin
SPS	"Sodyum polyanethol sulfonate"
SRNLN	"Supranational Reference Laboratory Network" (Supranasyonel Referans Laboratuvar Ağı)
TB	Tüberküloz
TDM	Tüberküloz Dışı Mikobakteri
TDT	Tüberkülin Deri Testi
TMA	"Transcription Mediated Amplification" (Transkripsiyon aracılı çoğaltma)
ULGR	Ulusal Laboratuvar Güvenlik Rehberi
UTRL	Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı
UMS	Ulusal Mikrobiyoloji Standartları
UTTR	Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi
UV	Ultraviyole
VSD	Verem Savaş Dispanseri
YİD	Yaygın İlaç Dirençli
Z	Pirazinamid

Tablo dizini

Bölüm	Tablo no	Tablo adı
UTTR-1	Tablo 1.	Tüberküloz laboratuvarlarında yapılan işleme göre alınması gereken önlemler
	Tablo 2.	Etki düzeyine göre mikobakterilere etkili dezenfektanlar
UTTR-2	Tablo 1.	Akciğer tüberkülozu tanısında kullanılan örneklerin alınmasına ilişkin özellikler
	Tablo 2.	Akciğer-dışı tüberkülozun tanısında kullanılan örneklerin alınmasına ilişkin özellikler
	Tablo 3.	Örnek türlerine göre uygunsuzluk durumları
	Tablo 4.	Örnek işleme sırasında alınması gereken önlemler
UTTR-3	Tablo 1.	Boyama yöntemlerinin karşılaştırılması
	Tablo 2.	Mikroskopi ve boyama işlemleri sırasında alınması gereken önlemler
	Tablo 3.	Yaymaların değerlendirme kriterleri
	Tablo 4.	Mikroskopide yanlış pozitiflik nedenleri ve öneriler
	Tablo 5.	Mikroskopide yanlış negatiflik nedenleri ve öneriler
	Tablo 6.	Laboratuvar kaite göstergeleri
UTTR-4	Tablo 1.	Kültür yöntemlerinin özellikleri
	Tablo 2.	Kültür ile ilgili işlemler sırasında alınması gereken önlemler
	Tablo 3.	Verifikasyon ve validasyon için yapılması gereken asgari çalışmalar
UTTR-5	Tablo 1.	Tür tayini işlemleri sırasında alınması gereken önlemler
	Tablo 2.	Biyokimyasal testlerde kullanılması gereken kalite kontrol suşları
UTTR-6	Tablo 1.	Moleküler tanı işlemleri sırasında alınması gereken önlemler
	Tablo 2.	Moleküler sonuçların raporlanması
	Tablo 3.	Verifikasyon ve validasyon için yapılması gereken asgari çalışmalar
	Tablo 4.	Pozitif ve düşük pozitif kontrollerin özellikleri
	Tablo 5.	Yöntemlerin Geçerli Kılınması için kullanılması gereken kontrol sayıları
UTTR-7	Tablo 1.	Kültüre dayalı yöntemlerin karşılaştırması
	Tablo 2.	Kültüre dayalı yöntemlerin moleküler yöntemlerle karşılaştırması
	Tablo 3.	İlaç duyarlılık testi uygulamaları sırasında alınması gereken önlemler
	Tablo 4.	Middlebrook 7H10 agar besiyerine eklenecek ilaçların stok ve çalışma konsantrasyonları, besiyerine eklenen miktarları ve önerilen konsantrasyonlar
	Tablo 5.	Proporsiyon yönteminde Löwenstein Jensen besiyerine eklenmek üzere hazırlanan ilk seçenek ilaçların stok ve çalışma konsantrasyonları, besiyerine eklenen miktarları ve besiyeri içindeki final konsantrasyonları
	Tablo 6.	Verifikasyon ve validasyon için yapılması gereken asgari çalışmalar
	Tablo 7.	Kategorik hata türleri
	Tablo 8.	Hata oranlarının hesaplanması
	Tablo 9.	Agar plaklarındaki kolonilerinin üreme yönünden kantitasyonu

UTTR-8	Tablo 1.	İnterferon gama salınım testi sonuçlarının raporlanması
	Tablo 2.	İnterferon gama salınım testi işlemleri sırasında alınması gereken önlemler
UTTR-9	Tablo 1.	Göğüs hastalıkları hastanesi tüberküloz laboratuvarlarının dağılımı
	Tablo 2.	Bölge tüberküloz laboratuvarlarının dağılımı

Şekiller dizini

Bölüm	Şekil no	Şekil adı
UTTR-1	Şekil 1.	Davlumbaz tipi bağlantı
	Şekil 2.	Tek kullanımlık önlük
	Şekil 3.	Solunum maskesi
	Şekil 4.	Nitril eldiven
	Şekil 5.	Tüberküloz laboratuvar personelinin işe giriş tarama algoritması
	Şekil 6.	Biyogüvenlik kabini çalışma düzeneği örneği
	Şekil 7.	Eldiven giyme ve çıkarma basamakları
UTTR-2	Şekil 1.	Klinik örnek için üçlü taşıma kabı örneği
	Şekil 2.	Üremiş kültür için üçlü taşıma kabı örneği
	Şekil 3.	Örneklerin işlenmesi akış diyagramı
UTTR-3	Şekil 1.	Erlich Ziehl-Neelsen boyalı preperat
	Şekil 2.	Erlich Ziehl-Neelsen boyama basamakları
	Şekil 3.	Yaymaların incelenmesi
	Şekil 4.	Karbol fuksin boyama görüntüsü
	Şekil 5.	Florokrom boyama görüntüsü
UTTR-4	Şekil 1.	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleks kültürü için kullanılan besiyerleri
	Şekil 2.	Löwenstein Jensen besiyerinde üreme
	Şekil 3.	Katı besiyerinde üreme olması durumunda değerlendirme ve raporlama algoritması
	Şekil 4.	Sıvı besiyerinde üreme olması durumunda değerlendirme ve raporlama algoritması
UTTR-7	Şekil 1.	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleks ilaç duyarlılık test yöntemleri
UTTR-9	Şekil 1.	Laboratuvar bazlı hedef ağacı
	Şekil 2.	Antitüberküloz İlaç Direnci Laboratuvar Sürveyans Ağı yapısı
	Şekil 3.	Antitüberküloz İlaç Direnci Laboratuvar Sürveyans Ağı örnek / izolat işlem algoritması

Özet Bilgi

Tüberkülozun kesin tanısı erişkinlerde bakteriyolojik olarak konulur. Hastalığının etkeni olan *Mycobacterium tuberculosis* kompleks ilk kez 1882 yılında Robert Koch tarafından gösterilmiştir. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks, 1-4 µm uzunluğunda ve 0,3-0,6 µm eninde, ince, hafifçe kıvrık bazen de dallanmış yapıda, hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz basillerdir. Bakteri yüksek oranda lipid içeren hücre duvarına sahiptir. Bakterilerin üreme süreleri (18-24 saat) oldukça uzundur ve bu nedenle besiyerlerinde bakteriyi tespit etmek için uzun zamana ihtiyaç duyulmaktadır.

Tüberküloz solunum yolu ile bulaşan, en sık akciğerleri tutan bir hastalıktır. Hastaların öksürmesi, hapsirması ve konuşması ile çevreye yayılan ve basil içeren damlacıklarının solunması ile insandan insana geçerek enfeksiyon oluşturmaktadır. Enfekte olan her kişide mutlaka hastalık gelişmez. Alınan basiller kişiyi hastalandırmaksızın vücutta bağışık yanıtın hücrelerinin oluşturduğu granülom formasyonu içerisinde latent (dormant basil) kalabilmekte ve vücut direncinin düştüğü bir anda hastalık oluşabilmektedir.

Mycobacterium tuberculosis kompleks, tüberküloza neden olan bir grup mikobakteriye verilen addır. Bu rehberde esas olarak, alt tür tanımlamasına girmeden *M. tuberculosis* kompleksin tanısına yönelik işlemlerden bahsedilmiştir.

***M. tuberculosis* kompleks;**

- *M. africanum*
- *M. bovis*
- *M. bovis* BCG suşu
- *M. canetti*
- *M. caprae*
- *M. microti*
- *M. pinnipedii*
- *M. tuberculosis*

Rehberin hazırlanması

TB laboratuvarları, TB kontrolünün temel bileşenlerinin sağlanmasında kritik öneme sahiptir. TB laboratuvarlarının aynı zamanda vakaların tespiti, izlenmesi ve laboratuvara dayalı ilaç direnç surveyansı açısından da önemli görevleri bulunmaktadır.

TB kontrolünün temel bileşenleri

- Erken olgu tespiti
- Erken tedavi
- Tedavi tamamlama
- Temaslı taraması ve profilaksi tedavisinin uygulanmasıdır.

Tüberküloz laboratuvarlarında kalite güvence sisteminin sağlanabilmesi için bu rehber alanında uzman akademisyenler tarafından kanıta dayalı olarak hazırlanmıştır. Laboratuvarda kalite güvence sistemi; tekniklerin standardizasyonu, dolayısıyla sonuçların duyarlılığı ve özgüllüğünün arttırılması anlamına gelmektedir.

“Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi” (UTTR) çalışmaları, Temmuz 2012’de Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı koordinasyonunda başlatıldı. Sahada kullanılabilir, kolay okunur ve anlaşılır, uygulanabilir, etkin, karşılaştırmalı tabloların ve akış çizelgelerinin olduğu görsel bir rehber hazırlamak üzere yola çıkıldı. Yazıcı ekibi ve konu başlıklarının dağıtımı tamamen gönüllülük esasasına göre yapıldı. Mayıs 2013’te 20 kişilik yazıcı ekibi ile gözden geçirme çalıştay yapıldı. Aralık 2013’te yedi kişilik editör grubu ile UTTR gözden geçirildi ve taslak rehber oluşturuldu.

Elinizde bulunan Taslak rehber, ilgili kurum ve kuruluşlara görüşe sunulmuş olup, geri bildirimler doğrultusunda belgede ilgili değişiklikler yapıldıktan sonra “Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi”nin son hali THSK web sitesinden (www.thsk.gov.tr) duyurulacaktır.

Kapsam ve Amaç

Türkiye genelinde tüberküloz laboratuvarlarının geçerli, yinelenabilir ve doğru bir hizmet sunabilmeleri açısından, her düzey (Düzyey 1, 2 ve 3) tüberküloz laboratuvarında kullanılabilecek, anahtar tanı metotlarının yer aldığı, kanıta dayalı, sahada uygulaması kolay ve tüm çalışanların kolaylıkla anlayabileceği bir başvuru dökümanı hazırlanmıştır. Tüberkülozun mikrobiyolojik tanısının zamanında, doğru ve güvenilir bir şekilde yapılmasının sağlanması amaçlanmıştır.

Rehber, tüberküloz laboratuvarlarında uygulanması gereken tüm biyogüvenlik hususlarını, analiz öncesi süreçleri (örnek seçimi, alınması, taşınması ve laboratuvarında örneğin mikroskopi ve kültür için hazırlanmasını) ve analiz süreçlerini (mikroskopi, kültür, ilaç duyarlılık testleri, tür tayini ve interferon gama salınım testleri) kapsamaktadır.

UTTR'nin kapsamı

- *Biyogüvenlik uygulamaları*
- *Örnek yönetimi*
- *Tanı algoritması ve standartlar*
- *Kalite kontrol*
- *İlaç direnci surveyansı*

Hedef Gruplar

UMS'nin hizmet edeceği kabul edilen hedef gruplar aşağıdaki gibi öngörülmektedir:

- 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 – halk sağlığını yakından ilgilendiren enfeksiyon vakalarının ya da salgınların araştırılmasında, bir yandan olması gereken asgari laboratuvar kapasitesi hakkında bir yandan da kesin tanıya ulaşılması süreç ve süreleri hakkında bilgi sağlayan bir kaynak olarak;
- 4 Ödeme kurumlarına – kesin tanıya ulaşılmasında asgari standart mikrobiyolojik işlem paketleri hakkında bilgi sağlayan ve ücretlendirmelerin rasyonel bir çerçeveye içinde yapılmasına destek olan bir kaynak olarak.

UTTR'nin hedefi

- *Tüm TB tanı hizmeti veren tıbbi laboratuvarlardır.*

Ulusal Tüberküloz Kontrol Programı

Uzm. Dr. Seher MUSAONBAŞIOĞLU

Tüberküloz, insanlık tarihi kadar eski bir hastalık olmasına rağmen günümüzde tüm dünyada bir halk sağlığı sorunu olarak önemini korumaktadır. Hava yoluyla bulaşan bir hastalık olması nedeniyle toplum sağlığını korumak açısından tüberkülozun kontrolü önemlidir.

Dünyada her yıl yaklaşık 9 milyon yeni tüberküloz hastası ortaya çıkmakta, 1,3 milyon insan tüberkülozdan hayatını kaybetmektedir. Dünya genelinde 2006 yılından günümüze tüberkülozlu yeni vaka sayısı düzenli olarak azalmaktadır. Tüberküloz nedeniyle ölüm oranlarında 1990 yılından bu yana %41 oranında düşüş olmuş ve küresel olarak 2015 yılına kadar %50 azalma oranına ulaşılması hedeflenmiştir.

Tüberküloz kontrolü; tüberküloz insidansı, prevalansı, morbiditesi ve mortalitesinde azalmanın sağlanması ve bu azalma eğiliminin sürekli kılınması olarak ifade edilebilir. Tüberküloz kontrolünde, hastalara erken ve doğru tanı konulması, doğru ve etkili tedavi başlanması, tedavinin düzenli olarak doğrudan gözetimli tedavi ile verilmesi ve tedavinin kür sağlanarak tamamlanması çok önemlidir. Hastalık kontrolü ile ilgili diğer seviye ise hastalık eliminasyonudur.

Tüberkülozda eliminasyon, TB insidansının milyonda bir vakanın altında olması şeklinde tanımlanmaktadır. Dünya geneli için eliminasyon hedefi 2050 yılı olarak belirlenmiştir. TB olgu hızı yüz bin nüfusta 20'nin altında olan ve son 5 yılda olgu hızı düşme trendinde olan ülkelerin TB eliminasyon fazında olduğu kabul edilmektedir.

Tüberküloz kontrolü için DSÖ tarafından küresel bir kontrol programı, ülkemizde ise aynı standartlarda ve paralelde bir Ulusal Tüberküloz Kontrol Programı uygulanmaktadır. Ulusal Tüberküloz Kontrol Programı çalışmaları "Tüberkülozsuz Bir Dünya" oluşturmak amacıyla kurulan "Tüberkülozu Durdurma Stratejisi" (Stop TB Stratejisi) çerçevesinde kamunun yanında özel sektör ve gönüllü kuruluşlarla birlikte yürütülmektedir.

Dünya Sağlık Örgütü'nün önerilerini içeren ve tüm ülkeler tarafından 2007 yılında kabul edilen "Berlin Deklarasyonu" kapsamında "Tüberkülozu Durdurma Stratejisi"ni Türkiye de uygulamayı taahhüt etmiş ve strateji gerekleri ülkemizde de uygulanmaya başlanmıştır. Tüberkülozu Durdurma Stratejisi'nin Bileşenleri;

- Kaliteli Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi (DGTS) uygulanması ve yaygınlaştırılması,
- Çok ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD-TB), TB/HIV birlikteliği ve diğer konuların gündeme alınması,
- Sağlık sisteminin güçlendirilmesine katkıda bulunulması,
- Bütün hizmet sunanların verem mücadelesine dahil edilmesi,
- TB hastalarının ve toplumun verem mücadelesine katılımlarının artırılması,
- TB ile ilgili bilimsel araştırmaların yapılmasının sağlanması ve geliştirilmesidir.

Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisinin bileşenleri ise aşağıda yer almaktadır;

- Sürekliliği olan finansman ile birlikte politik kararlılık,
- Kalitesi sağlanmış bakteriyoloji ile olgu bulma

- Standart tedavi; denetim ve hasta desteği ile yürütülen doğrudan gözetimli tedavi uygulaması,
- Etkin bir ilaç ikmali ve yönetim sistemi,
- İzleme ve değerlendirme ile raporlama sistemi.

Tüberküloz kontrolünde; Binyıl Kalkınma Hedefleri, Dünya Sağlık Asamblesi Kararları, Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi ve Stop TB Stratejisi kapsamında belirlenmiş hedefler ve bu hedefler açısından ülkemizin içinde bulunduğu durum aşağıda yer almaktadır:

- 2015 yılına kadar insidans hızı artışının durdurularak geriye çevrilmiş olması: İnsidans hızı, azalmakta olup 1990 yılında yüz binde 52 iken 2011 yılında yüz binde 24 ve 2012 yılında da yüz binde 22 olarak hesaplanmıştır.
- 2015 yılına kadar tüberküloz prevalansını 1990 seviyesinin yarısına düşürmek: Tüberküloz kontrol programları için en önemli göstergelerden biri olan prevalans, 1990 yılında yüz binde 51 iken 2012 yılında ise yüz binde 23 olarak hesaplanmıştır.
- 2015 yılına kadar tüberkülozdan ölüm hızını 1990 seviyesinin yarısına düşürmek: Tüberkülozdan ölüm hızı 1990 yılında yüz binde 6,2 iken 2012 yılında ise yüz binde 0,52 olarak hesaplanmıştır.
- Yeni yayma (+) olgularda tedavi başarısını 2005 yılına kadar %85'in üzerine çıkarma: Bu hedefe 2004'te ulaşılmıştır. 2011 yılı yeni yayma (+) tüberküloz olgularında tedavi başarısı oranı %90'dır (6).
- 2050 yılına kadar küresel tüberküloz insidansını 1/1 milyonun altına düşürmek. Tüberkülozda eliminasyon, TB insidansının milyonda bir vakanın altında olmasıdır. Bu konuda dünya geneli için belirlenen hedef, 2050 yılıdır.

Ülke genelinde 177 verem savaşı dispanseri (VSD) ve 22 bölge tüberküloz laboratuvarında verem şüpheli kişilerin, verem hastalarının ve temaslılarının muayene, radyolojik inceleme ve laboratuvar tetkikleri ücretsiz olarak yapılmaktadır. Verem savaşı dispanserlerine 2011 yılında kaydedilen tüberküloz hastalarında tedavi başarısı %89,4; yeni olgularda %91,1; önceden tedavi görmüş hastalarda %69,6 olarak tespit edilmiştir. Ölüm oranı; tüm hastalarda %3,1, yeni hastalarda %3,0 ve önceden tedavi görmüş hastalarda %4 olarak saptanmıştır. Tedavi terk oranları; tüm hastalarda %2,7, yeni hastalarda %2,1 ve önceden tedavi görmüş hastalarda %9,8 olarak saptanmıştır.

Ülkemizde yürütülen Ulusal Tüberküloz Kontrol Programının bileşenleri aşağıda yer almaktadır:

- Politik kararlılık,
- Kalite kontrollü bakteriyolojik muayene ile vaka bulmak,
- Denetimli ve hasta merkezli Doğrudan Gözetimli Tedavi (DGT) uygulaması,
- Etkin ilaç temini ve yönetim sistemi,
- İzleme ve değerlendirme ile kayıt ve raporlama sistemi,
- Çok İlaça Dirençli Tüberküloz, TB/HIV birlikteliği ve diğer risk gruplarının sorunlarının öne çıkartılması,
- Sağlık hizmeti veren tarafların verem mücadelesine dahil edilmesi,
- Tüberküloz hastalarının ve toplumun verem mücadelesine katılımlarının artırılması,
- Tüberküloz ile ilgili bilimsel araştırmaların yapılmasının sağlanması ve desteklenmesi.

Ülkemizde tüberküloz kontrolü için gerekli altyapı, insan kaynakları, bütçe ve program Bakanlık olarak sağlanmaktadır. Tüberküloz ile ilgili yürütülen mücadeleye ülkemizde yeterli bir bütçe ayrılmaktadır. Ülke genelinde yaygın olarak dağılım gösteren toplum sağlığı merkezi verem birimlerinde (VSD) verem şüpheli kişilerin, verem hastalarının ve temaslılarının muayene, radyolojik inceleme ve laboratuvar tetkikleri ücretsiz olarak yapılmaktadır.

Ülkemizde tüberküloz kontrolü konusunda ulusal ve uluslararası bilimsel gelişmeler izlenerek rehberler ve programlar yenilenmektedir. Tüberküloz kontrolü uygulamaları, tanı ve tedavi standartları, kullanılacak kayıt ve raporlama sistemi için rehberler bu amaçla hazırlanmakta, ülke genelinde uyumlu ve standart bir yaklaşımı sağlamaktadır.

Tanı konulan her TB hastasının bildirimini yapmak, bu bildirimlerin kaydını tutmak ve yapılan bildirimleri sonuçlandırmak tüberküloz kontrolü uygulamalarından biridir.

Ülkemizde tüberküloz için zenginleştirilmiş sürveyans uygulaması (*enhanced surveillance*) yürütülmektedir. Sadece kayıt ve hastalığı raporlama değil, tedavi sonucu takibini de içeren bir sistem uygulanmaktadır. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu ulusal TB sürveyansının takibini yapmakta ve her yıl "Dünya Sağlık Örgütü Tüberküloz Ağı"na veri göndermektedir. Bu veriler DSÖ Küresel Tüberküloz Raporlarında yer almaktadır. Ayrıca analiz edilen bu veriler 2007 yılından itibaren ulusal yıllık raporlar halinde basılmakta ve dağıtılmaktadır.

Ülkemizde veri kalitesi ve tamlığını arttırmak, programın izleme ve değerlendirmesinin anlık olmasını sağlamak ve bu sayede ulusal tüberküloz kontrol programını güçlendirmek amacıyla Bakanlığımızca *Elektronik Tüberküloz Yönetim Sistemi* (e-TYS) kurulması çalışmaları tamamlanmış ve Mart 2012'den itibaren Türkiye genelinde uygulamaya geçilmiştir.

TB hastalarına erken tanı koymak tüberküloz kontrolünün önemli basamaklarından biridir. Tüberküloz semptomları ile başvuran bireylerde pasif yolla, risk gruplarında da aktif yolla vaka bulmak için gerekli uygulamalar ülkemizde yapılmaktadır. Aktif vaka bulmada özellikle tanı konulan hastaların temaslılarına temaslı muayenelerinin yapılması önemlidir.

Akciğer tüberkülozunun kesin tanısı bakteriyolojiktir. TB hastalarına tanıyı kalite kontrollü bakteriyolojik muayene ile koymak önemlidir. Yayma mikroskopisi yapılan her materyali yayma negatif de olsa kültüre ekmek ve kültürde üreyen ilk materyalde ilaç duyarlılık testini yapmak bu konuda takip ettiğimiz stratejidir.

Ülkemizde tüberküloz tanı laboratuvarları ile ilgili standartların belirlenmesi ve Tüberküloz Tanı Laboratuvar Ağı oluşturulması çalışmaları yürütülmektedir. Verem hastalığının teşhisi ve tedavi sürecinde önemli rol oynayan tüberküloz tanı laboratuvarlarının; uluslararası kabul edilebilir standartlara sahip, kalite kontrollü, sisteme veri akışı sağlayan laboratuvarlardan oluşması önemlidir.

Standart rejimle, yeterli süre ve düzenli tedavi uygulamak, doğrudan gözetimli tedaviyi standart olarak uygulamak, saptanan her bir TB hastasının kür ya da tedavi başarısı sağlanana kadar tedavisini izlemek tüberküloz kontrol programlarının başarısını artırmada önemli unsurlardır.

Tüberküloz ilaçlarının kesintisiz ikmalini yapmak ve hastalara ücretsiz vermek tüberküloz kontrolünde önemlidir. Ülkemizde etkin bir ilaç temini ve yönetimi sistemi vardır. Ülkemizde veremli hasta ve temaslıları için herhangi bir sosyal güvencesi olup olmadığına bakılmaksızın tüm sağlık kurum ve kuruluşlarına tüberküloz ilaçları Bakanlığımızca temin edilip dağıtılmaktadır.

Ülkemizde özellikle 1947 yılından itibaren çeşitli etkinlikler düzenlenen Verem Eğitim ve Propaganda Haftası ile 24 Mart Dünya Tüberküloz Gününde olmak üzere tüm yıl boyunca eğitim ve farkındalık artırıcı faaliyetler yürütülmektedir.

Ülkemizde HIV/AIDS kontrol programları ile TB arasında ortak çalışmalar yürütülmektedir. Bu açıdan, TB'li kişilerde HIV'e yönelik uygulamalar ile HIV'li kişilerde TB'ye yönelik koruyucu ve tedavi edici uygulamalar büyük önem taşımaktadır.

Tüberkülozdan korunma; bulaştırıcı hastaların tedavisi, koruyucu ilaç tedavisi, BCG aşısı uygulaması ve TB bulaşmasının önlenmesi konusunda gerekli tedbirlerin alınması ile gerçekleştirilmektedir.

Koruyucu ilaç tedavisi, kemoprofilaksi olarak da adlandırılır. Koruyucu ilaç tedavisinin amacı, TB hastası ile teması olan kişide enfeksiyon gelişimini ya da TB enfekte kişide TB hastalığı gelişimini önlemektir.

Sağlık kurumlarında TB bulaşmasının önlenmesi için bir dizi önlemler alınması gereklidir. Bu önlemler; yönetsel önlemler, mühendislik önlemleri ve kişisel koruyucu ekipman kullanımıdır.

Tüberküloz konusunda sağlık personelinin düzenli hizmet içi eğitimleri yapılmaktadır. Toplum sağlığı merkezi verem birimlerinde yeni göreve başlayan hekimlere sertifikalı tüberküloz eğitim programları düzenlenerek gerekli teknik ve bilgi donanımları artırılmaktadır. Bu mesleki gelişim eğitiminin amacı, tüberküloz kontrolünde görevli hekimlerin mesleki bilgi ve becerisini arttırarak hizmet kalitesini yükseltmek ve standardizasyonu sağlamaktır.

Sonuç olarak; ülkemizde tüberküloz kontrolü, tarihsel süreçte hep öncelikli bir sağlık sorunu olarak ele alınmış olup Dünya Sağlık Örgütü'nün önerdiği doğrudan gözetimli tedavi stratejisinin temel unsurları önemli çabaların sonucunda uygulanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Global Tuberculosis Report 2013. Geneva: World Health Organization, 2013.
2. Progressing Towards TB Elimination, A Follow-up to the Framework Action Plan to Fight Tuberculosis in the European Union. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control, 2010.
3. The Stop TB Strategy. Building on and Enhancing DOTS to Meet the TB-related Millennium Development Goals. Geneva: World Health Organization, Stop TB Partnership, 2006.
4. United Nations. <http://www.un.org/millenniumgoals/>
5. Resolution WHA 44.8. Forty-fourth World Health Assembly. Geneva: World Health Organization, 1991 (WHA44/1991/REC/1).
6. Global Health Observatory Data Repository. <http://apps.who.int/gho/data/node.main>
7. Tüberküloz Tanı ve Tedavi Rehberi. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı, 2011.
8. Türkiye’de Verem Savaşı 2012 Raporu. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2013.



ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

ULUSAL TÜBERKÜLOZ TANI REHBERİ (UTTR)

Biyogüvenlik

Hazırlayan Birim	Tüberküloz Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Tüberküloz
Bölüm	Biyogüvenlik
Standart No	UTTR-1
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2014
Geçerlilik tarihi	01.01.2016

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

TEKNİK BİLGİLER.....	3
1 Standart mikrobiyolojik güvenlik önlemleri	3
2 Laboratuvar kazaları ve koruyucu önlemler	11
3 Sterilizasyon ve dezenfeksiyon	12
4 Çalışan güvenliği ve iş sağlığı	14
EKLER	16
Ek-1 Biyolojik tehlike işareti.....	16
Ek-2 Laboratuvar Tasarım Örnekleri	18
Ek-2a. Düzey I tüberküloz laboratuvarı	18
Ek-2b. BGD-3 laboratuvarı.....	18
Ek-2c. Düzey III tüberküloz laboratuvarı	19
Ek-3 İyi Laboratuvar Uygulamaları Yönergesi.....	20
Ek-4 Biyogüvenlik Kabini Kullanım Yönergesi	22
Ek-5 Kişisel Koruyucu Donanım (KKD) Kullanım Yönergesi ...	23
Ek-6 Eldiven Kullanım Yönergesi	24
Ek-7 Biyolojik Dökülme Saçılma Yönergesi	25
Ek-8 Laboratuvar Yüzey Dezenfeksiyonu Yönergesi.....	27
Ek-9 Enfeksiyöz Atıkların İmhası Yönergesi	27
Ek-10 Laboratuvar Personeli Takip Formu	29
Ek-11 Kaza Uyarı Formu Örneği	30
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	31
KAYNAKLAR	32

"Yalnız yaptıklarımızdan değil, yapmadıklarımızdan da sorumluyuz."

Moliere

Kapsam ve Amaç

Bu Rehberin amacı; tüberküloz laboratuvarlarında güvenli mikrobiyolojik uygulamaların yapılabilmesi için gerekli olan ulusal normları tanımlamaktır. Bu normlar tüberküloz laboratuvarlarında yapılan işlemlere göre olması gereken minimum koşulları, risk seviyelerine göre uygun donanım ve kişisel koruyucu donanım kullanımını ve iyi laboratuvar uygulamalarının yapılması konularını kapsamaktadır. Bu bölüm, tüberküloz laboratuvarlarında uygulanan tüm biyogüvenlik hususlarını kapsamaktadır.

Teknik Bilgiler

Mycobacterium tuberculosis kompleks solunum yolu ile bulaşmaktadır. Laboratuvarlarda gerçekleştirilen çoğu işlemin enfeksiyöz aerosol oluşumuna, dolayısıyla laboratuvar kaynaklı enfeksiyonlara neden olduğu bilinmektedir. Bu nedenle korunmanın esası enfeksiyöz partiküllerin (aerosol) elimine edilmesi veya azaltılmasıdır. Bu amaçla tüberküloz (TB) laboratuvarlarında biyogüvenlik kavramının üç önemli adımı bulunmaktadır:

1. Mühendislik önlemleri (laboratuvar fiziki tasarımı); havadaki enfekte partikül yoğunluğunu azaltmaya yönelik havalandırma ile uygun mimari tasarımı,
2. İdari önlemler; düzenlemeler ve kurallar ile biyogüvenlik için gerekli donanım ve sarfların sağlanmasını,
3. Kişisel önlemler; kişisel koruyucu donanım (KKD) ve güvenli mikrobiyolojik tekniklerin kullanımını tanımlar.

1 Standart mikrobiyolojik güvenlik önlemleri

TB laboratuvarları uygulanan işlemlerin potansiyel aerosol oluşturma risklerine uygun olarak pratikte 3 farklı düzeyde değerlendirilmekte ve alınması gereken önlemler de bu risk düzeylerine göre belirlenmektedir.

- Düşük riskli TB laboratuvarı; balgamdan yayma mikroskopisi yapan,
- Orta riskli TB laboratuvarı; mikroskopi, kültür ve moleküler testler için klinik örneği işleyen (dekontaminasyon, homojenizasyon ve konsantrasyon uygulayan),
- Yüksek riskli TB laboratuvarı; tür tayini, ilaç duyarlılık testleri veya moleküler test için üremiş kültürden işlem yapan laboratuvarlardır.

Standart mikrobiyolojik güvenlik önlemleri risk düzeylerine göre aşağıdaki başlıklarda alınması gereken önlemler açısından farklılıklar gösterir;

- Laboratuvar fiziki tasarımı
- Biyogüvenlik donanımı
- Kişisel koruyucu donanım

1.1. Laboratuvarın fiziki tasarımı

Risk düzeylerine göre TB laboratuvarlarının fiziki tasarım özellikleri aşağıda verilmiştir.

Genel özellikler

Her düzey laboratuvar en az;

- Yeterli fiziki alana sahip olmalıdır (bkz. ULGR).
- Laboratuvarda en az bir lavabo olmalı, el yıkama lavabosu çıkışa yakın olmalıdır.
- Çalışma yüzeyleri ve zemin düzgün, kolaylıkla toz ve kir tutmayan, parlama ve yansıma yapmayan, su, kimyasal ve dezenfektanlara dayanıklı malzemeden yapılmış ya da bu tür bir madde ile kaplı olmalıdır.
- Hava dezenfeksiyonu için 18 m²'ye 30 W'lık (1,87 W/m²) reflektörlü/doğrudan ışımalı UV lamba (253,7 nm dalga boyunda) bulunmalı ve kullanım saati düzenli takip edilmelidir.

Düşük riskli laboratuvarın fiziki koşulları

"Genel özellikler"e ek olarak;

- Çalışılan laboratuvar alanı BGD-2'ye (bkz. ULGR) uygun olarak tasarlanmış olmalıdır.
 - Laboratuvar genel kullanım alanlarından ayrı olmalıdır.
 - Laboratuvara girişler kontrollü olmalı, sadece sorumlu kişilerle sınırlı olmalı,
 - Kapı kendiliğinden kapanan özellikte olmalı,
 - Girişte biyolojik tehlike işareti ve biyogüvenlik düzeyini gösteren güvenlik logoları bulunmalıdır (Ek-1. Biyolojik tehlike işareti). Geniş bilgi için bkz. 11 Eylül 2013 tarih, 28762 sayılı Sağlık ve Güvenlik İşaretleri Yönetmeliği.
- Laboratuvar kayıt-kabul, çalışma alanı olmak üzere ayrı bölümlere ayrılmalıdır.
- Alanın havalandırması yeterli olmalıdır; bu işlem iklim koşulları uygun olan yerlerde doğal havalandırma ile de sağlanabilir.
- Balgam çıkarmaya yönelik negatif basınçlı havalandırma sistemli kabin tipi özel bir alan/oda tasarlanmalıdır. Mümkün değilse örnekler açık havada alınmalıdır.
- Pencerelere sinek, böcek girmesini önleyecek sineklik takılmalıdır.

Orta riskli laboratuvarın fiziki koşulları

"Genel özellikler"e ek olarak;

- Çalışılan laboratuvar alanı BGD-2'ye (bkz. ULGR) uygun olarak tasarlanmış ayrı bir alan olmalıdır.
 - Laboratuvar genel kullanım alanlarından ayrı olmalıdır.
 - Laboratuvara girişler kontrollü olmalı, sadece sorumlu kişilerle sınırlı olmalı,
 - Kapı kendiliğinden kapanan özellikte olmalı,

- Girişte biyolojik tehlike işareti ve biyogüvenlik düzeyini gösteren güvenlik logoları bulunmalıdır (Ek-1. Biyolojik tehlike işareti).
- Temiz alandan kirli alana doğru tek yönlü hava akımı olan ve saatte 6-12 kez temiz hava değişimi sağlayan mekanik havalandırma sistemli bir çalışma alanı oluşturulmalıdır.
- Pencere tercihan açılmayan tipte olmalı, eğer açılır tipte ise sineklik takılmalıdır.
- Laboratuvar içerisinde ya da çabuk ulaşılabilecek bir mesafede personel için duş ve göz duşu olmalıdır.
- Sterilizasyon ünitesi olmalıdır.

Yüksek riskli laboratuvarın fiziki koşulları

“Genel özellikler”e ek olarak;

- Genel kullanım alanlarından uzak, koridor sonunda konuşlanmış, ayrı bir laboratuvar olmalıdır.
- Laboratuvarın kendiliğinden kapanan şifreli / kilitli kapıya sahip bir giriş odası olmalıdır.
- Laboratuvara çift aşamalı giriş olmalıdır.
- Kapıların yönü laboratuvar dışına açılır olmalıdır.
- Laboratuvar alanı dışarıdan izlenebilmelidir.
- Laboratuvar alanı izlenebilir negatif basınçlı olmalıdır.
 - Temiz alandan kirli alana doğru tek yönlü hava akımı olan
 - Saatte 6-12 kez temiz hava değişimi sağlayan mekanik havalandırma sistemli bir çalışma alanı oluşturulmalıdır.
- Laboratuvarın havalandırma sistemi, taze hava ile beslenen ve genel havalandırma sisteminden bağımsız hava akışına sahip olarak tasarlanmalı veya laboratuvarın havasının genel havalandırma sistemine dönüşü engellenmelidir.

Uyarı!

Sert iklim koşullarına sahip bölgelerde, havalandırma sistemine sahip tesislerde enerjiyi korumak amacıyla temizlenmiş/dezenfekte edilmiş hava tekrar kullanılabilir. Bu durumda sistem performansı sertifikaya edilmeli ve düzenli valide edilmelidir.

- Havalandırma sisteminin bakım ve kontrolleri düzenli olarak yapılmalıdır.
- Bütün pencereler kapalı (açılmaz) olmalıdır.
- Genel kanalizasyona karışan lavabolar kullanılmamalıdır.
- Atık depolama sistemine sahip lavabo mevcutsa çeşmeleri dirsek veya ayak kontrollü ya da optik-sensörlü olmalıdır.
- Asma tavan kullanımı tercih edilmemeli, varlığı durumunda sızdırmazlığı sağlanmalıdır.

- Atıklarının dekontaminasyonu için gerekli ünite veya cihazların laboratuvarın içinde olması tercih edilmelidir. Sterilizasyon ünitesi ayrı bir alanda ise atıkların transportunun güvenli bir şekilde yapılması sağlanmalıdır.

Uzman Görüşü

Kontamine havanın atmosfere atılmadan önce "High Efficiency Particulate Air" (HEPA) filtrasyonu yapılarak tahliyesi önerilir.

1.2. Biyogüvenlik Kabini ve Diğer Güvenlik Donanımları

TB laboratuvarlarında kullanılmakta olan donanımları, doğrudan biyolojik risk oluşturanlar ve riski önlemeye yönelik olanlar olarak incelemek mümkündür.

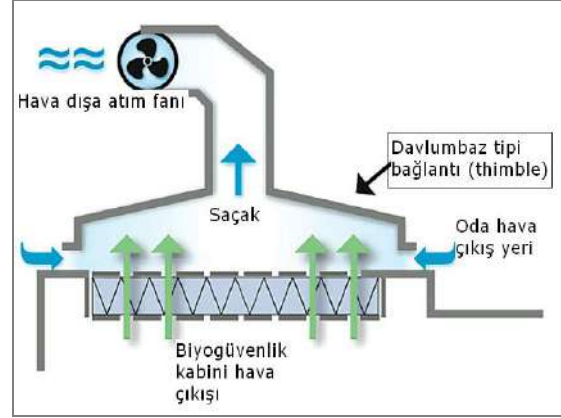
Biyolojik risk oluşturabilecek donanımlar kullanılırken aerosol oluşumu açısından dikkatli olunmalıdır (*bkz.* Ek-3. İyi Laboratuvar Uygulamaları Yönergesi).

- Biyogüvenlik ile ilişkili donanım
 - BGK
 - UV lamba
 - İnsineratör
 - Otoklav
- Biyolojik risk oluşturan donanım
 - Aerosol korumalı santrifüj (tercihen soğutmalı)
 - Vorteks, manyetik karıştırıcılar ve sonikatörler
 - Preparat kurutucu
 - Mikropipetler, dispenser
 - Etüv
 - Koagülatör
 - Buzdolabı
 - Derin dondurucu
 - Mikroskop
 - pH metre

Risk düzeylerine göre TB laboratuvarlarında bulunması gereken biyogüvenlik donanımları

- Düşük riskli laboratuvar;
 - BGK tercihen kullanılabilir ancak zorunlu değildir.
- Orta riskli laboratuvarlar;
 - Sınıf IIA Biyogüvenlik Kabini (BGK) bulundurulmalı, aerosol oluşumuna neden olan tüm işlemler BGK'de yapılmalıdır.
 - Ünite içerisinde otoklav olmalıdır.

- Yüksek riskli laboratuvarlar;
 - Dış ortama bağlantılı sınıf IIA BGK bulundurulmalıdır. BGK;
 - (a) ya laboratuvar egzoz sistemine davlumbaz tipi bağlantı ile bağlanabilir. Bu bağlantının avantajı oda içerisinde negatif basınç ve hava akımı dengelenmesinin kolay olmasıdır (Şekil 1).



Şekil 1. Davlumbaz tipi bağlantı

- (b) ya da doğrudan dış ortam bağlantısı ('hard duck') ile kontamine havanın doğrudan dış ortama verilmesi sağlanabilir.
 - Laboratuvar alanında otoklav olmalıdır.

Biyogüvenlik kabini

Biyogüvenlik kabini (BGK), TB laboratuvarlarında çalışanın, materyal ve çevrenin güvenliği açısından en kritik donanımlardan birisidir. TB laboratuvarında Sınıf I veya Sınıf IIA BGK kullanılabilir.

- Sınıf I BGK'ler çalışanı ve çevreyi korur. En önemli dezavantajı, sıvı kültüre inokülasyon yapan laboratuvarlarda kontaminasyon oranını arttırabilme ihtimalidir.
- Sınıf II BGK'ler çalışanı ve çevreye ilave olarak çalışılan materyali de koruduğundan tercih edilmelidir.

Kabinler, hava menfezlerinden, kapı, pencere, mekanik ventilasyon ve personel trafiğinin olduğu yerlerden mümkün olduğunca uzak olmalıdır. Biyogüvenlik kabini kullanım kuralları Ek-4 (BGK Kullanım Yönergesi)'de verilmiştir.

Ultraviyole (UV) Lambalar

Tüm TB laboratuvarlarında UV lambaları kullanılabilir. Ancak UV'nin laboratuvar alanına uygun seçilmesi, uygun konumlandırılması ve kullanım takibinin yapılması gerekmektedir. Kullanılan UV lambalarında dikkat edilecek noktalar;

- Direkt ve üst hava ışımalı olarak kullanılabilir.
- Üst hava ışımalı UV lambalar hava dezenfeksiyonu, direkt ışımalı olanlar ise hem hava hem de yüzey dezenfeksiyonu yapar.
- En etkili UV'ler dalga boyu 254 nanometre olan UV-C tipleridir.
- Kullanım ömürleri teknik özelliklerinde belirtilmemiş ise yaklaşık 8000-9000 saat arasında değişir.
- UV lambaları diğer dezenfeksiyon işlemleri ile birlikte kullanılmalıdır.
- Lambalar reflektör içinde tavana veya yerden 210 cm yukarıda duvara monte edilmiş olmalıdır.
- Bir odaya yerleştirilecek UV lamba sayısı odanın boyutlarına göre değişir, 1,87 W/m² olarak gerekli adet hesap edilmelidir.

- Lambalar kısa zamanda toz tuttuğu için en az ayda bir alkollü bez ile silinmelidir.

Santrifüj

TB laboratuvarlarında santrifüj işlemi aerosolizasyona neden olma ihtimali en yüksek olan işlemler arasında yer almaktadır. Bu nedenle çalışmalar sırasında aşağıda belirtilen hususlara dikkat edilmelidir.

- İşlemler sırasında kullanılan santrifüj, aerosol koruması için godelerin ayrı ayrı kapakları olmalıdır.
- Godeler, santrifüj ve rotordan ayrılabilmelidir.
- Godeler, BGK içerisinde açılmalıdır.

1.3. Kişisel Koruyucu Donanım (KKD)

Çalışmalar sırasında kullanılması gereken kişisel koruyucu donanımlar (KKD), yapılan işlemin risk düzeyine göre belirlenir.

- Düşük ve orta risk düzeyinde;
 - Eldiven
 - Önlük
- Yüksek risk düzeyinde;
 - Eldiven
 - Tek kullanımlık veya otoklavlanabilir önü tek parça önlük / tulum
 - Solunum maskesi (N95 / FFP2 / FFP3 maske) kullanılmalıdır.

Uyarı!

Düşük ve orta risk düzeyi laboratuvarlarda güvenliği arttırmak için örnek işleme sırasında da solunum maskesi kullanılması önerilmektedir.

Tulum ve önlükler

- Düşük ve orta risk düzeyinde;
 - Önlük, el bileklerini örtecek şekilde uzun kollu ve dizleri örtecek boyda olmalıdır.
- Yüksek risk düzeyinde buna ilave olarak;
 - Dayanıklı, hafif ve yumuşak kumaştan üretilmiş
 - Su bazlı sıvıların ve aerosollerin geçişine izin vermeyen
 - Anti-statik özellikte
 - Arkadan düğmelenen/bağlanan tek kullanımlık (Şekil 2) veya otoklavlanabilir özellikte olmalıdır.



Şekil 2. Tek kullanımlık önlük

Kutu 1. Önlük kullanırken dikkat edilmesi gereken hususlar

- Önlüklerin düğme / bağları her zaman kapalı tutulmalıdır.
- Çalışma sırasında mikroorganizma bulaşı olması durumunda önlük hemen çıkarılmalı, temiz önlük giyilmelidir.
- Kirlenen önlük dış yüzüne dokunmadan dış yüzü içe gelecek şekilde çıkarılmalı ve eller yıkanmalıdır.
- Önlükler, laboratuvar veya kurum içerisinde yıkanmalı, asla eve götürülmemelidir.
- Elbiselerin çıkarılıp önlüklerin giyilmesi ve çıkarılması işlemleri çalışma alanı dışında, laboratuvar giriş alanında yapılmalıdır.
- Laboratuvarda kullanılan tulum ve önlükler ile laboratuvar dışına çıkılmamalıdır.

Solunum maskesi (Şekil 3)

N-95 (United States Standart NIOSH N95) / FFP2 veya FFP3 (European Standart EN149:2001) tipi yüksek koruyuculu HEPA filtreli maskeler önerilmektedir.

- Maskelerin ventilsiz (valfsiz) olması tercih edilmelidir.
- Kullanılacak maskeler kişiye özel olmalı ve yüze uyum testi (fit testi) yapılmalıdır.
- Sakal maskenin yüze uygun şekilde yerleşmesine engel olabildiğinden sakal tıraşı önemlidir.
- Her kullanım sonrası temiz, kuru, hijyenik ve uygun bir ortamda, muhafaza edilmeli ve laboratuvar dışı ortamda kullanılmamalıdır.
- Maskeler ıslandığında değiştirilmelidir.
- Maskeler, üzerinde gözle görülür herhangi bir hasar (ezilme veya yırtılma) olmadığı veya ıslanmadığı sürece ya da nefes alıp verme zorlaşana kadar aynı kişi tarafından kullanılabilir.



Şekil 3. Solunum maskesi

Uzman Görüşü

- Solunum maskeleri, hasar ve ıslanma olmadığı sürece iş yoğunluğuna göre ortalama 1-2 hafta kullanılabilir.

Eldiven

- Tüm laboratuvar işlemleri sırasında mutlaka eldiven kullanılmalıdır.
- Kullanım için steril olmayan lateks veya nitril eldiven yeterlidir (Şekil 4).
- Eldivenin kullanım öncesi yırtık olup olmadığı



Şekil 4. Nitril Eldiven

kontrol edilmelidir.

- Eldivenlerle laboratuvar dışına çıkılmamalı, temiz yüzeylere dokunulmamalıdır.
- İşlem tamamlandıktan sonra eldivenler tıbbi atık torbasına atılmalı ve eller yıkanmalı veya alkol bazlı antiseptikler kullanılmalıdır.

KKD'nin giyilmesi ve çıkarılması uygulaması Ek-5 (KKD Kullanım Yönergesi)'de eldivenin giyilmesi ve çıkarılması uygulamaları Ek-6'de (Eldiven Kullanım Yönergesi) verilmiştir.

Tablo 1. Tüberküloz laboratuvarlarında yapılan işleme göre alınması gereken önlemler

		Laboratuvar tasarımı		Laboratuvar donanımı		Kişisel koruyucu donanım		
		Havalandırma	Laboratuvar giriş sınırlaması	BGK	Otoklav	Eldiven	Önlük	Maske
Hazırlık	Boya çözeltisi hazırlama	Doğal havalandırma	BGD-2 işaretli giriş sınırlaması	-	-	✓	✓	-
	Besiyeri hazırlama	-		-	✓	✓	✓	-
Örnek işleme (HDK)	Örnek pipetleme	Saatte 6-12 hava değişimi	BGD-2 işaretli giriş sınırlaması	✓	Opsiyonel	✓	✓	Opsiyonel
	Vorteksleme			✓				
	Santrifüjleme			Godenin açılması				
Yayma hazırlama	Direkt örnekten	Doğal havalandırma	BGD-2 işaretli giriş sınırlaması	Opsiyonel	Opsiyonel	✓	✓	Opsiyonel
	İşlenmiş örnekten	Saatte 6-12 hava değişimi		✓				
Mikroskopi	Boyama	Doğal havalandırma	BGD-2 işaretli giriş sınırlaması	-	-	✓	✓	-
	Yayma inceleme			-				
Kültür	İşlenmiş örneğin kültür besiyerine ekimi	Saatte 6-12 hava değişimi	BGD-2 işaretli giriş sınırlaması	✓	Kültür pozitifler	✓	✓	Opsiyonel
	Kültür değerlendirme			-				✓
Tür tayini	Üremiş kültürden yapılan her işlem	Negatif basınçlı mekanik havalandırma	BGD-3 işaretli kilitli çift kapılı giriş	✓	✓	✓	✓	✓
Fenotipik İDT	Üremiş kültürden yapılan her işlem	Negatif basınçlı mekanik havalandırma	BGD-3 işaretli kilitli çift kapılı giriş	✓	✓	✓	✓	✓
Moleküler test	Direkt örnekten ekstraksiyon	Doğal havalandırma	BGD-2 işaretli giriş sınırlaması	-	-	✓	✓	Opsiyonel
	İşlenmiş örnekten ekstraksiyon	Saatte 6-12 hava değişimi	BGD-2 işaretli giriş sınırlaması	✓	Opsiyonel	✓	✓	Opsiyonel
	Üremiş kültürden ekstraksiyon	Negatif basınçlı mekanik havalandırma	BGD-3 işaretli kilitli çift kapılı giriş	✓	✓	✓	✓	✓
	DNA'dan yapılan işlemler	Doğal havalandırma	BGD-2 işaretli giriş sınırlaması	-	-	✓	✓	-
İnterferon gama salınım testi		Doğal havalandırma	BGD-2 işaretli giriş sınırlaması	-	-	✓	✓	-

2 Laboratuvar kazaları ve koruyucu önlemler

Her laboratuvar personeli hem kendisinin hem de yakın çalışma arkadaşlarının güvenliğinden sorumludur. Bu maksatla;

- Tüm laboratuvar çalışanları;
 - Gerekli önlemleri almalı ve uygulamalı
- Yönetim (ayrıca bkz. Kutu 2);
 - Mevzuat kapsamında otoritesini ortaya koyabilmeli
 - Sürekliliği sağlamak amacıyla gerekli her tür desteği sağlamalıdır.

Kutu 2. Yönetim tarafından takip edilmesi gerekli standart önlemler

- Risk düzeyine uygun laboratuvar fiziki tasarım ve alt yapısını oluşturmak ve devamlılığını sağlamak
- Yeterli biyogüvenlik donanımların temini ve bakımını sağlamak
- Personelin çalışan güvenliği açısından kaydının ve takibinin yapılmasını sağlamak
- Personelin yeterli biyogüvenlik eğitimi almasını sağlamak, uygulamaları denetlemek
- Laboratuvar prosedürlerinin oluşturulması ve uygulanmasının sağlanması

Bütün laboratuvarlarda herhangi bir kaza anında hemen kullanılabilecek “Biyolojik Dökülme Saçılma Kiti” hazırda bulundurulmalıdır (bkz. Kutu 3).

Enfekte materyalin dökülmesi-saçılması durumunda;

- Gerekli önlemler alınarak enfekte materyal temizlenir (bkz. Ek-7).
- En kısa sürede laboratuvar biyogüvenlik sorumlusu bilgilendirilir.
- Olay bildirim formu doldurulur ve laboratuvar sorumlusu olaydan haberdar edilir.

Kesici-delici yaralanma olması durumunda;

- Maruz kalan kişinin koruyucu donanımı çıkarılır, maruz kalan bölge bol su ile yıkanır.
- Tıbbi yardım için kişi yönlendirilir.
- Olay bildirim formu doldurulur ve laboratuvar sorumlusu olaydan haberdar edilir.

Kutu 3. Biyolojik Dökülme Saçılma Kiti

- Tüm malzemelerin yerleştirileceği plastik kilitli, kapaklı kutu
- N95 veya FFP3 maske (2-4 adet)
- Eldiven (2-4 çift)
- Laboratuvar giysisi (tulum, önlük vb) tek kullanımlık (2-4 adet)
- Koruyucu gözlük
- Klor tabletleri veya 50 mL saf çamaşır suyu
- Klor tableti veya saf çamaşır suyu sulandırımı için yeterli miktarda distile su
- Emici kâğıt havlular / 50 x 50 cm boyutlarında 4 kat gazlı bez (2-4 adet)
- Kesici delici atık / taşıyıcı kabı
- Faraş ve fırça (1 adet)
- Otoklav poşeti (2 adet)
- “Kaza uyarı formu”

3 Sterilizasyon ve dezenfeksiyon

Dekontaminasyonun amacı, kontamine yüzeylerin veya materyalin bir sonraki işlem için hazır hale getirilmesi, bulaşın engellenmesi; çalışan, materyal ve çevrenin biyolojik ajandan korunması ve enfekte atıkların güvenli bir şekilde bertaraf edilmesidir.

3.1. Dezenfektanların TB laboratuvarında kullanımı

Mikobakteriler kimyasal dezenfeksiyona diğer vejetatif bakterilerden daha dirençlidir. Antibiyotiklere karşı kazanılmış çoklu ilaç direnci, dezenfektanlara olan direnci etkilememektedir.

MTBC'ye etkili dezenfektanlar

- %5'lik fenol ve %5'lik formaldehit 10 dakikada
- %2'lik glutaraldehit ≥ 20 dakikada
- %5'lik sodyum hipoklorit 1 dakikada
- %70'lik etanol yüzey dezenfektanı olarak ≤ 10 dakikada etkili olmaktadır.
- Yüksek konsantrasyonlardaki etil alkol ve izopropil alkol genellikle mükemmel mikobakterisidal ajanlar olarak kabul edilir.
- Formaldehit buharı ise biyogüvenlik kabinlerinin ve tesislerin dezenfeksiyonunda tercih edilebilir.
- MTBC'ye etkili dezenfektanlar için ayrıca bkz. Tablo 2.

Çamaşır suyu (sodyum hipoklorit)

- 500-1000 mg/L klor konsantrasyonları orta seviyeli germisit aktivite gerektiren kullanım için uygun konsantrasyondur.
- Daha yüksek konsantrasyonlar;
 - tahriş edici ve koroziv etkili olabilir,
 - ortamda organik madde miktarının aşırı olduğu, ya da organizma yoğunluğunun oldukça yüksek olduğu durumlarda kullanılmalıdır.

Alkol (%70'lik etanol)

- Hızlı tüberkülosittir.
- Hızla buharlaşır ve bu nedenle temas kısa süreli olduğundan organik maddelere nüfuz edemezler.
- Dezenfekte edilecek maddeler ön temizlemeye tabi tutulmalı, daha sonra uygun bir süre boyunca tamamen alkole temas ettirilmelidir.

TB laboratuvarlarında çalışma alanları ve yüzeyler gün bitimi ve çalışma bitiminde dezenfekte edilmelidir. Yüzeylerin dezenfeksiyonu işlemleri Ek-8'de (bkz. Laboratuvar Yüzey Dezenfeksiyonu Yönergesi) verilmiştir.

Ayrıca klinik örnek ile çalışırken kullanılacak atık kabına son konsantrasyonu 1/10 olacak şekilde yeni hazırlanmış çamaşır suyu konmalı, klinik örnek atıkları bu kaplar içerisinde dekontamine edilmelidir.

Tablo 2. Etki düzeyine göre mikobakterilere etkili dezenfektanlar

Yüksek etkili	Orta etkili	Düşük
Glutaraldehit Orto-fitelaldehit Formaldehit Hidrojen peroksit Sodyum hipoklorit Perasetik asit	Etil veya izopropil alkol Fenoller İyodoforlar	Kuaterner amonyum bileşikler

3.2. TB laboratuvarında atık yönetimi

Mikobakteri laboratuvarlarının tıbbi atıklar için ayrıntılı bir planı olmalıdır. "Atık Yönetimi Planı", enfeksiyöz potansiyeli olan materyali tanımlayıp bu materyalin doğru biriktirilmesi ve taşınması, depolanması ve bertarafını içermelidir. Tıbbi atık olarak atılmadan önce dekontamine edilmesi gerekli materyal;

Uyarı!

**Tüm üremiş kültürler
otoklavlandıktan sonra
bertaraf edilmelidir!**

- Kuşkuyla hasta örneklerini içeren kaplar – otoklavlanarak veya kimyasal dekontaminasyon sonrası bertaraf edilmelidir.
- Bulaş riski yüksek kültürler,
- Kültür ile kontamine olmuş tek kullanımlık malzemeler,
- Kültür çalışmasında kullanılan KKD'ler – otoklavlandıktan sonra bertaraf edilmelidir.

Birim içinde ayrı bir sterilizasyon ünitesi varsa, atıklar kontamine malzeme ve atıkların dekontaminasyonu için, otoklava dayanıklı, sızdırmaz plastik poşetlerde ve biyogüvenlik kurallarına uygun olarak bu üniteye nakledilmelidir.

- Otoklavlama; enfekte atıkların dekontaminasyonu amacıyla nüfuz etme gücü bakımından kuru ısıdan daha etkili olduğu için en güvenli metottur.
- Atıklar, polipropilenden yapılmış, otoklava dayanıklı plastik poşetlere, kapasitesinin 2/3'sine kadar doldurularak ağzı kapatılmalı ve otoklavlama işlemine kadar bu poşetler, laboratuvarında uygun bir alanda bulunan, kimyasal veya fiziksel dekontaminasyona uygun materyalden yapılmış atık konteynirlerinde tutulmalı ve üzerlerine "tehlikeli biyolojik atık" etiketi yapıştırılmalıdır.
- İdeal olarak, kontamine materyalin sterilizasyonu için bir otoklav laboratuvar içinde veya yakınında olmalıdır.
- Kültürlerin ve kültür ile temas etmiş materyalin dekontaminasyonu laboratuvarın dışında gerçekleşecekse, sızdırmaz veya dayanıklı poşetlerde toplanmış olan enfekte atıklar laboratuvardan çıkartılmadan önce dış kısmı dezenfekte edilmeli, sızdırmaz plastik kaplarla dekontaminasyon alanına taşınmalıdır.

- Enfekte materyal içeren bu atıkların bulunduğu kapların üzeri uluslararası biyolojik tehlike işareti yanı sıra dekontaminasyon öncesi açılmalarını önlemek amacıyla dışarıdan kolayca görülebilecek uyarılarla etiketlenmelidir.
- Uygulamalar için yazılı prosedürler hazırlanmalı ve uygulanmalıdır (bkz. Ek-9. Enfeksiyöz Atıkların İmhası Yönergesi).

Uyarı!

Mikobakteri laboratuvarlarında önceden bir işleme maruz kalmamış, biyolojik atıkları içeren enfekte atık torbalarından sızıntı olması halinde, Biyolojik Dökülme Saçılma Yönergesi (bkz. Ek-7) uygulanmalıdır.

4 Çalışan güvenliği ve iş sağlığı

TB laboratuvarları, çalışma koşulları ve faaliyetleri kapsamında çalışanları için her zaman ciddi risk alanlarıdır. Bu alanlarda çalışırken laboratuvarında görevli tüm personel, her zaman kendisi ve çevresi için nasıl bir riskle karşı karşıya olduklarını bilme ve önlemini alma sorumluluğunu taşımaktadır. Bu amaca yönelik olarak çalışan sağlığı ve güvenliği kapsamında 30 Haziran 2012 tarihinde yayımlanarak yürürlüğe giren 6331 sayılı kanun ve ilgili yönetmelikler ile 663 sayılı Kanun Hükmünde Kararname (HKK), çalışan ve yöneticilere (işverene) çalışma alanları ile ilgili sorumluluklar yüklemektedir.

Tüberküloz laboratuvarları ve ilişkili alanlarda çalışan/çalışacak personel için sağlık taramaları; mevzuat hükümlerine, Ulusal ve Uluslararası standartlara uygun olarak yapılmalıdır.

Bağışıklık sistemi önemli derecede baskılanmış olan (kanser hastası, HIV enfeksiyonlu hastalar, immunsupresif ilaç kullananlar, vb.) kişiler tüberküloz laboratuvarında çalıştırılmamalıdır.

Personel tüberküloz hakkında bilgilendirilmeli ve yeterli biyogüvenlik eğitimi alması sağlanmalı, bu konuda bir "biyogüvenlik el kitabı" kullandırılarak çalışanların okuması sağlanmalı, mevcut uygulamalar denetlenmelidir.

Laboratuvar çalışanları; işe girişte ve yıllık olarak taranır (Kutu 4). İşe girişte uygulanması önerilen tarama algoritması Şekil 5'te verilmiştir.

İşe ilk girişte yapılan taramalar, periyodik taramalar ve klinik değerlendirmeleri içeren personele ait uygulama programı; "Tüberküloz Laboratuvarı Personel Takip Formu (Ek-10)"na kayıt edilmeli, bu işlemler sırasında çalışanların test sonuçlarının gizliliği sağlanmalı ve kişisel mahremiyete önem verilmelidir.

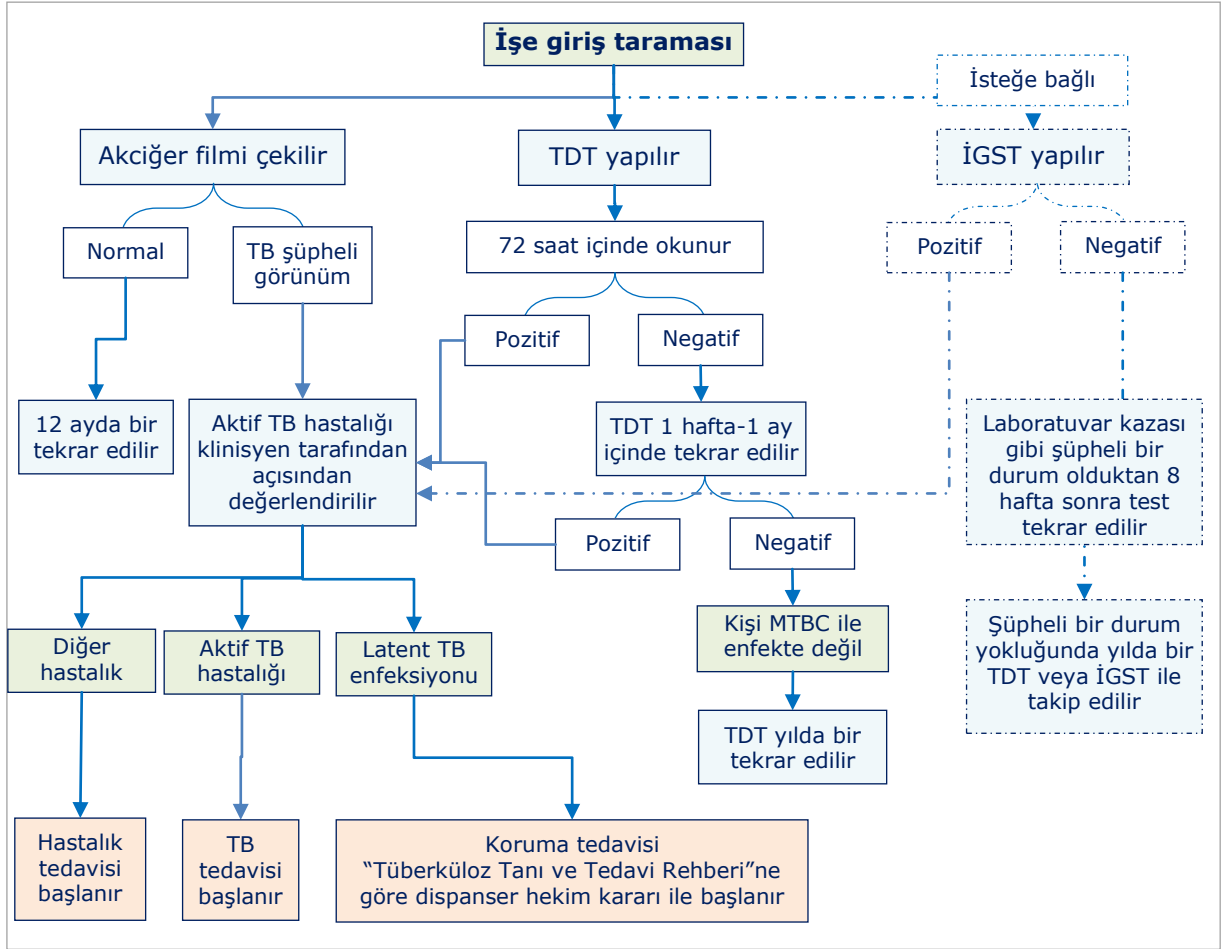
Başlangıç testleri ve periyodik tarama;

- Başlangıç test sonuçları tercihen laboratuvar çalışanlarının işe başlamasını takip eden 10 gün içinde tamamlanmalı

Kutu 4. Tarama programı

- Başlangıç testleri
 - TDT veya tek bir İGST
 - Akciğer filmi
- Klinik değerlendirme
 - Semptomatik değerlendirme
 - Radyolojik değerlendirme
 - Gerektiğinde ARB, kültür

- Kaydını bu işte görevlendirilmiş bir sağlık personeli yapmalı
- Tarama zamanı gelen laboratuvar çalışanını görevli personel çağırır ve taramasının yapılmasını sağlar.



Şekil 5. Tüberküloz laboratuvar personelinin işe giriş tarama algoritması

Kutu 5. Laboratuvar ilişkili ofis çalışanları

- Başlangıç testleri yapılır.
- Periyodik taramalarda yıllık semptom izlemesi yapılmalıdır. TB semptomları gelişmediği ve/veya bir klinisyen önermediği sürece tekrar akciğer filmi çekilmesine gerek yoktur.

Bir laboratuvar çalışanının TB hastası olduğu belirlenirse;

- Potansiyel kaynağı belirlemek, bulaştırma olasılığı olan kişileri ve bunlardan enfekte olan ya da hastalanan olup olmadığını belirlemek için temaslı taraması yapılır. Gerekirse ofis çalışanları da taramaya dâhil edilir.
- Laboratuvarın uygunluğu, fiziki şartlardaki değişiklik, çalışma yöntemlerinden sapma, biyogüvenlik önlemlerine uyum, rapor edilmeyen olay, vb. değerlendirilir.
- Kaynak olgu/olay tespit edildiğinde, elde varsa MTBC izolatının ilaç duyarlılık testi veya moleküler yöntemlerle ilişki araştırılabilir.

Ekler

Ek-1 Biyolojik tehlike işareti

Düşük ve **orta riskli laboratuvar** girişinde bulunması gereken asgari bilgileri içeren "Biyolojik tehlike işareti" örneği

DİKKAT  BİYOLOJİK RİSK İZİNSİZ GİRMEYİNİZ! BGD-2 Çalışılan Enfeksiyöz Ajan(lar): <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleks Laboratuvar Çalışanları: Sorumlu Uzman: Gündüz (Ofis Tel): Gece (Ev Tel): Gerekli Kişisel Koruyucu Donanım: ✓ Eldiven ✓ Önlük ✓ Laboratuvar Terliği
--

Yüksek riskli laboratuvar girişinde bulunması gereken asgari bilgileri içeren "Biyolojik tehlike işareti" örneği

DİKKAT



BİYOLOJİK RİSK
İZİNSİZ GİRMEYİNİZ!

BGD-3

Çalışılan Enfeksiyöz Ajan(lar): *Mycobacterium tuberculosis* kompleks

Laboratuvar Çalışanları:

Sorumlu Uzman:

Gündüz (Ofis Tel):

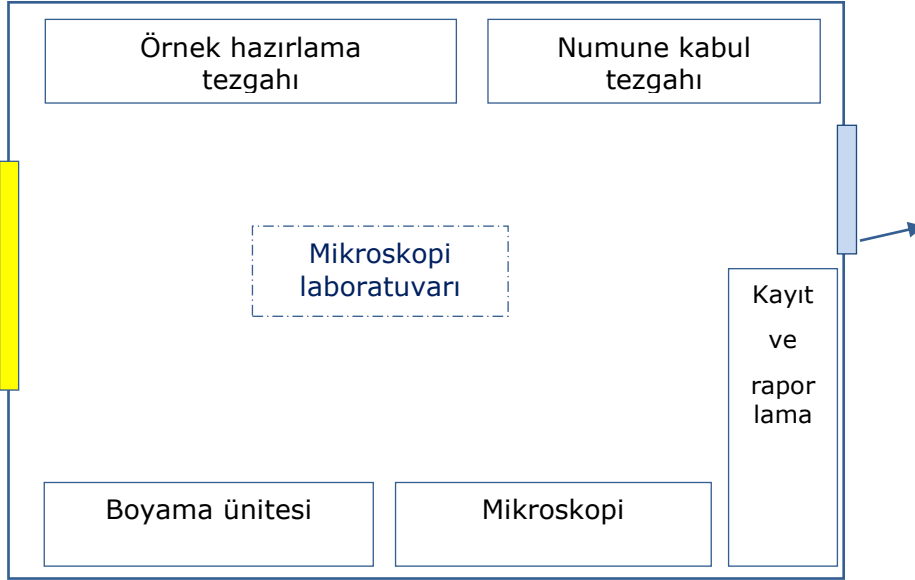
Gece (Ev Tel):

Gerekli Kişisel Koruyucu Donanım:

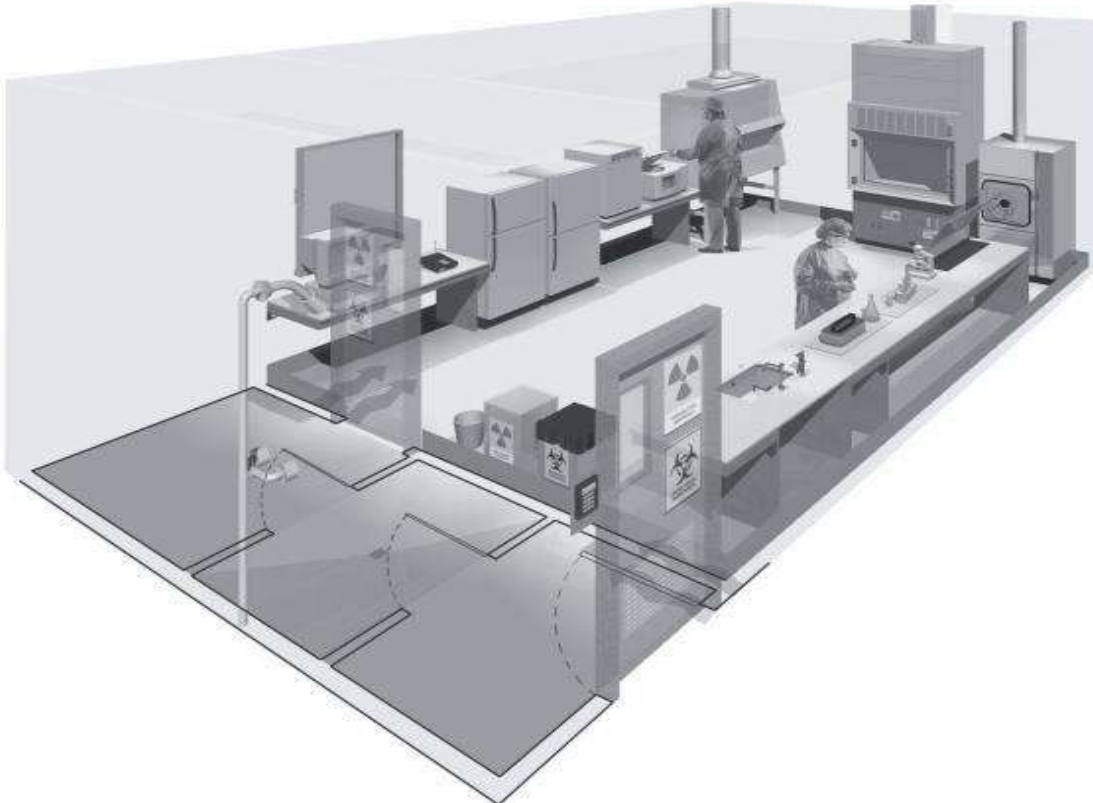
- ✓ Eldiven
- ✓ Önlük
- ✓ Solunum maskesi
- ✓ Laboratuvar Terliği

Ek-2 Laboratuvar Tasarım Örnekleri

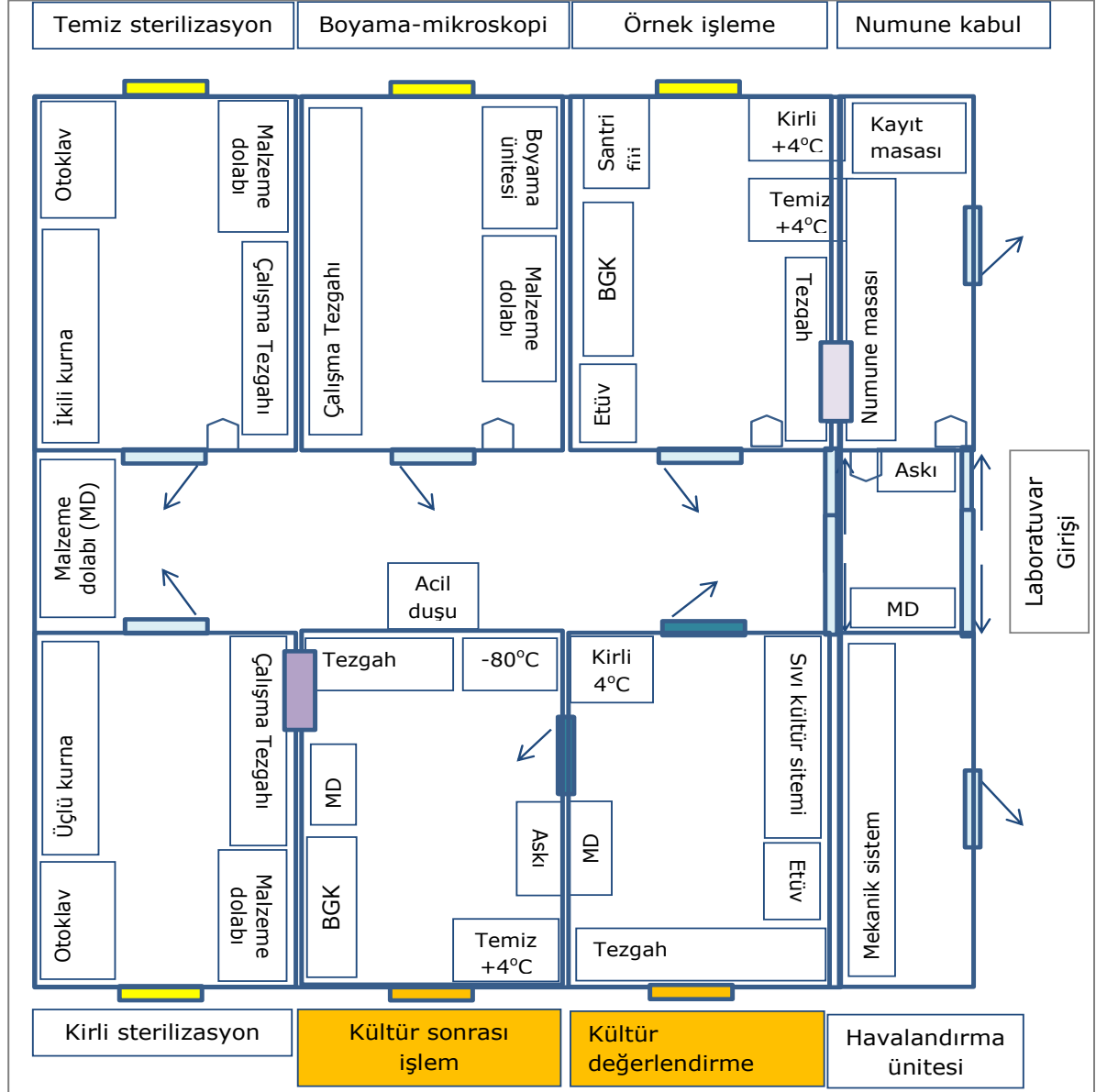
Ek-2a. Düzey III tüberküloz laboratuvarı tasarım örneği



Ek-2b. BGD-3 laboratuvarı tasarım örneği



Ek-2c. Düzey III tüberküloz laboratuvarı tasarım örneği



İşaret açıklamaları

Odalar	Negatif basınçlı odalar
Kapı	Sızdırmaz kapı
Kapı açılma yönleri	Sızdırmaz passbox
Passbox (geçiş kutusu)	Sızdırmaz pencere
Pencere	Mikroskop
El yıkama lavabosu	

Ek-3 İyi Laboratuvar Uygulamaları Yönergesi

Biyogüvenlik yönetimi

- İşe başlamadan önce mutlaka risk değerlendirmesi yapınız
- Çalışanlar için "Laboratuvar Biyogüvenlik El Kitabı" hazırlayın
- Laboratuvar çalışanlarını biyogüvenlikle ilgili olarak eğitin
- Çalışmalara uygun koruyucu önlemler alınız.

Genel kurallar

- Laboratuvar alanlarında yiyecek, içecek bulundurmeyin ve tüketmeyin
- Çocukların ve yetkili olmayan kişilerin laboratuvar alanına girişine izin vermeyin
- Her zaman temiz ve düzenli olun
 - Çalışma tezgâhında fazla ve gereksiz malzeme bulundurmeyin
 - Çalışma alanlarında ihtiyaç olmayan donanım, sarf ve kimyasalları bulundurmeyin
- Tüm maruziyetleri en aza indirecek önlemleri alın
 - Dolapları aşırı yüklemeyin
 - Dolap ve çekmeceleri kapalı tutun
 - Ağır malzemeleri dolapların alt kısımlarında depolayın
 - Sivri ve keskin malzemeleri çekmecelerde ayrı bir kutu içerisinde saklayın
 - Kimyasalları uygun saklama depolarında, tehlike sınıflarına ve geçimliliklerine göre saklayın
 - Kaygan zemine, gevşek döşemeye veya yerdeki objelere dikkat edin
 - Uygun ve yeterli miktarda aydınlatma sağlayın
- Santrifüj godeleri, biyolojik güvenlik kabininde açılmalıdır.
- Soğutucular, derin dondurucular ve katı karbon dioksit (kuru-buz) kutularının buzunu periyodik olarak çözün ve temizleyin
- Enfeksiyöz materyallerle çalışılan her laboratuvarda "Biyolojik Dökülme Saçılma Kiti" bulundurun (bkz. Ek-5.).
- Kazalarınızı kayıt altına alınız ve bildiriniz.
- Çalışmalar sırasında;
 - Tüm işlemler sırasında **kişisel koruyucu donanım** giyin (bkz. Ek-5 ve Ek-6)
 - Çalışma yüzeyinde emici kâğıt kullanın
 - Dezenfektan maddeyi kullanıma hazır olarak bulundurun
 - Hasta materyali ile çalışırken ortamda mutlaka içerisinde son konsantrasyonu 1/10 olacak şekilde çamaşır suyu bulunan bir atık kabı bulundurun
 - Sıvıların sıçrama ve dökülmelerinden sakının; tüp ve şişeleri kapak veya tıpalı ile kapalı tutun, kapakları açarken aerosol oluşturmamaya dikkat edin
 - Kesici-delici malzeme kullanmaktan sakının; kullanımı gerekiyorsa çalışırken dikkatli olun; enjektör kapağını kesinlikle tekrar kapatmayın
 - İşlemler sırasında ağızla pipetleme yapmayın
 - Kalem, etiket vb. laboratuvar malzemelerini ağzınıza sokmayın
 - İşlemler sırasında tek kullanımlık öze ya da insineratör kullanın

- Santrifüjlerde uygun güvenlik kapları kullanın (burgu kapaklı ve plastik olmalı, kullanım öncesi hasarlı olup olmadıkları kontrol edilmeli)
- Aerosol oluşturma olasılığı olan tüm işlemleri BGK'de gerçekleştirin (bkz. Ek-4)
- İncelenen yaymaları saklama periyotlarının sonunda biyolojik tehlike işaretli kesici-delici atık kaplarına atın
- Her çalışma sonunda alanın temizliğini yapın (bkz. Ek-7)
- Çalışma sırasında enfekte materyalle direkt temaslarda ve çalışma bittikten sonra mutlaka ellerinizi su ve sabun ile yıkayın.

Balgam örneğinin alınması

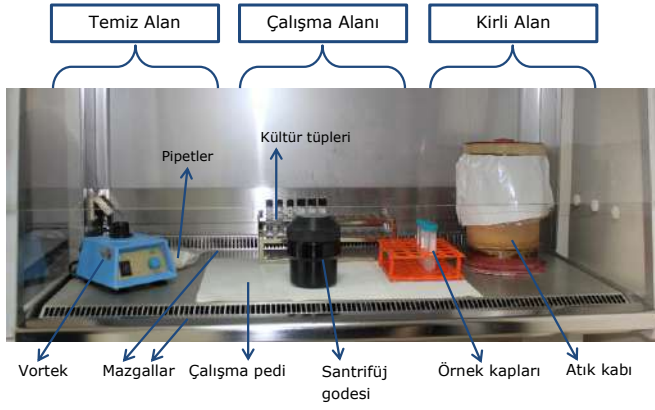
- Balgam örneğinin alınması asla laboratuvarda yapılmamalıdır.
- En ideal olan; kurumda, hastaların balgam örneklerini toplamaları için biyogüvenlik açısından özel olarak tasarlanmış, negatif basınçlı özel havalandırma sistemi bulunan, yüksek etkinlikli partikül hava (HEPA) filtreli, ultraviyole lambaların bulunduğu, hava dezenfektan cihazı içeren kabin veya odaların bulunmasıdır.
- Bu mümkün değilse klinik ve laboratuvar dışında, balkon veya bahçe gibi açık havada, تنها bir yerde, diğer insanlardan uzak bir mesafede ve mümkünse bol güneşli bir ortamda alınmalıdır.
- Klinik içindeki oda veya tuvalet gibi yerlerde hastadan balgam çıkarmasını istemek sakıncalıdır. Eğer hasta kendi evinde balgam çıkaracak ise bu işlemi; bol güneş alan bir balkonda veya varsa bahçede yapmalıdır.

Biyogüvenlik Uyarısı!

- *Balgam örneğini alınması enfekte aerosol oluşturan bir işlemdir!*

Ek-4 Biyogüvenlik Kabini Kullanım Yönergesi

Kabini çalışmaya hazırlama



Şekil 6. BGK kabini çalışma düzeneği örneği

- Önce kabinin fanını açın, güvenli hava akımının oluşmasını sağlayın
- Kabini çalışmaz durumda ve güvenli hava akımı oluşmadığı/olmadığı durumlarda kullanmayın
- Kabin ön cam açıklığını güvenli pozisyondan daha az veya daha çok açmayın
- Çalışma yüzeyine dezenfektan emdirilmiş çalışma pedi yerleştirin
- Çalışma başlamadan önce çalışmanın tüm ayrıntılarını gözden geçirin ve gerekli malzemeleri önceden hazırlayın ve gerekli bütün malzemeyi kabine yerleştirin
- Çalışma düzenini oluşturun, malzemeler temiz ve kirli malzemeler ayrı olacak şekilde yerleştirin (Şekil 6)

Kabinde çalışma

- Çalışmalar sırasında çalışma yüzeyindeki hava deliklerini kapatmayın ve hava akımını bozacak gereğinden fazla malzemeyi kabin içerisine koymayın
- Kabinde çalışma yapılırken etrafta dolaşılmasını engelleyin, kapı ve pencereleri kapalı tutun
- Çalışma sırasında kabine el ve kolları sıkça sokup çıkarmayın, bu işlemi en aza indirgeyin
- Kabin içerisinde bunzen beki kullanmayın, insineratör veya tek kullanımlık öze kullanın
- Kirlileri dezenfektan içeren kaplara atın
- Çalışma sırasında aerosol oluşumuna neden olacak davranışlardan kaçının
- Çalışma bittikten sonra, kullanılan donanımı dezenfekte edin ve dışarı çıkarın
- Atık poşetlerini bantlayarak imha edileceği alana götürün
- Kabini çalışma bitiminden sonra en az 5 dakika daha çalıştırın
- Kabin içini dezenfekte edin (bkz. Ek-7. Laboratuvar Yüzey Dezenfeksiyonu Yönergesi)
- Sodyum hipoklorid ile dezenfeksiyon yapıldığında, aşındırıcı olduğu için çalışma yüzeyini %70'lik alkol veya su ile durulayın.

Ek-5 Kişisel Koruyucu Donanım (KKD) Kullanım Yönergesi

KKD'nin giyilmesi

- Enfekte materyal ile çalışırken uygun **kişisel koruyucu donanımı** (KKD) giyin
- Laboratuvar girişinde KKD'yi giyin
- Koruyucu önlük / tulumu giyin
 - Önlüğü düğmeleyin veya düzgünce bağlayın
 - Önlüğün önünü, çalışmalar sırasında daima kapalı tutun
- Eldivenleri kontrol edin ve giyin (*bkz.* Ek-6. Eldiven Kullanım Yönergesi)
- N95 / FFP3 maskenizi takın
 - Maskeyi metal kısmı üste gelecek şekilde iki üst şeridinden tutup, burun üzerinde sıkıca kapatın
 - Üst şeritleri kafanın üst arka kısmında ve kulakların üzerinden bağlayın
 - Alt şeritleri ensede bağlayın
 - Metal şeridi tutarak burun kenarları üzerinde sıkıştırın
 - Ağız ve burunun tam olarak kapatılıp, kapatılmadığını kontrol edin
 - Laboratuvar terliği giyin
- Yüksek hacimler ile çalışma yaparsanız özel göz koruyucu kullanın

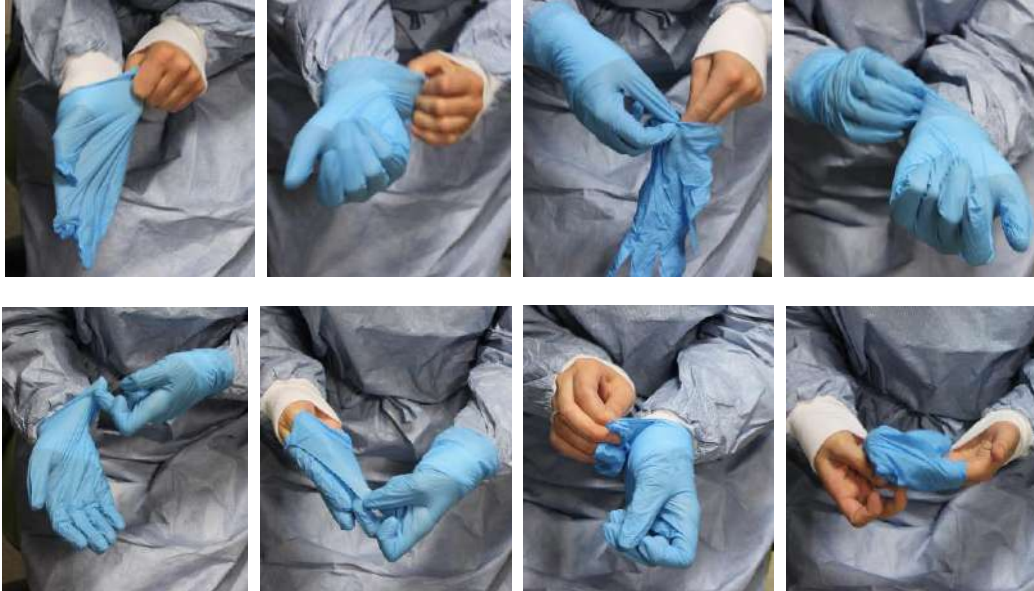
KKD'nin çıkarılması

- Çalışma tamamlandıktan sonra önce kirli eldivenleri çıkarın (*bkz.* Ek-6)
- Önlüğünüzü dış yüzeyine dokunmadan çıkarın
 - İç kısımdan tutarak, iç kısmı dışa gelecek şekilde katlayın ve tıbbi atık kutusuna atın veya tekrar kullanılacaksa uygun bir yere etrafı kirletmeyecek ve kirlenmeyecek şekilde asın
- Maskenizi dış yüzeyine dokunmadan çıkarın
 - Önce alttaki maske bağlarını çözün
 - Bağlarından tutularak tıbbi atık kutusuna atın veya tekrar kullanılacaksa (ortalama 1 hafta aynı maske kullanılabilir) temiz ve kuru ortamda etrafı kirletmeyecek ve kirlenmeyecek şekilde koyun
 - Her kullanımdan sonra tekrar kullanılacaksa hasarlı olup olmadığını kontrol edin
- KKD'yi çıkardıktan sonra el temizliği yapın
- Asla laboratuvar dışına KKD ile çıkmayın
- Asla önlüklerinizi yıkamak üzere evinize götürmeyin

Ek-6 Eldiven Kullanım Yönergesi

Eldiven kullanımı (Şekil 7)

- Kullanım öncesi eldivenlerin sağlam olup olmadığını (yırtık, delik vb.) kontrol edin
- Önlükten sonra el büyüklüğüne uygun eldivenleri giyin
 - Bilek kısmından tutarak birinci eldiveni giyin
 - İkinci ele eldiveni giyin
 - Parmaklarınızı birbiri arasına geçirerek eldivenin iyice yerleşmesini sağlayın
 - Önlüğün kol manşetlerinin üzerine çekin
- Çalışma sırasında;
 - Kirli eldivenler ile temiz alanlara dokunmayın
 - Eldivenler kirlendiğinde veya kontamine olduğunda değiştirin
- Çalışma tamamlandıktan sonra önce kirli eldivenleri çıkarın
 - Sağ el ile sol eldeki eldivenin dış kısmından tutarak eldivenleri bilek kısmından içe doğru katlayın ve çıkarın
 - Sol el ile sağ eldeki eldivenin dış kısmından tutarak eldivenleri bilek kısmından içe doğru katlayın ve çıkarın
 - İkinci eldiveni birincinin içine alın
 - İşlemler sırasında çıplak elinize eldivenin kirli dış yüzeyine dokunmayın
- Eldivenleri atık kabına atın
- Ellerinizi yıkayın



Şekil 7. Eldiven giyme ve çıkarma basamakları

Ek-7 Biyolojik Dökülme Saçılma Yönergesi

- Herkes tarafından bilinen ve ulaşılabilir bir noktada “**Biyolojik Dökülme Saçılma Kiti**” bulundurun
- Biyolojik dökülme saçılma durumunda yapılacak işlemler, aerosol oluşma ve aerosol içerisinde ekenin bulunma miktarına göre farklılıklar göstermektedir. Burada esas olarak dökülme saçılma durumunda yapılacaklar iki grupta değerlendirilmiştir:
 - Tüberküloz şüpheli örnek tüpünün kırılması / dökülmesi (düşük bakteri yükü)
 - Tüberküloz kültür tüpünün kırılması / dökülmesi (yüksek bakteri yükü)

Tüberküloz şüpheli örnek tüpünün kırılması / dökülmesi

- Kaza alanında kazayı yapan personel hariç herkes alanı terk etmeli
- “Biyolojik Dökülme Saçılma Kiti”ni alın
- Solunum maskeniz takılı değilse, solunum maskesini takın
- Gazlı bez / kağıt havlu ile dökülen materyalin üzerini ve çevresini kapatın
- 50 mL saf çamaşır suyunu 450 mL distile su ile sulandırın
- %10'luk çamaşır suyunu havluların üzerine dökün
- Kaza alanının UV lambasını açıp terk edin
- Alanın kapısını kapatın ve kapının dışına “Kaza Uyarı Formu (Ek-11)”nu asın
- Kirlenmiş KKD’yi çıkarın ve otoklav poşetine atın
- Laboratuvar sorumlusuna kazayı haber verin
- 30 dk sonra yeni KKD’yi giyip laboratuvara girin
- UV’yi kapatın
- Dökülen materyalin mekanik temizliğini yapın
 - Bez ya da kağıt havluları pens yardımıyla kaldırın
 - Ardından dökülmüş materyali temizleyin
 - Kırık cam parçalarını fırça ve faras yardımı ile toplayın ve kesici-delici atık kabına atın; asla kırık cam parçalarını el ile toplamayın
- Temizlik için kullanılan bezleri, kâğıt havluları ve farasları otoklav poşetine doldurun ve otoklavlayın
- Kontamine olmuş alanı dezenfektan ile tekrar dekontamine edin
- Tüm zemin ve tezgahları tekrar dezenfektanla silin
- Eğer laboratuvar formları ya da diğer basılı ya da yazılı evraklar kontamine olmuş ise, içerdiği bilgileri başka forma aktardıktan sonra otoklavlayın
- “Olay Bildirim Formu”nu doldurun
- Kazaya maruz kalan kişileri, tıbbi yardım almak üzere ilgili servise yönlendirin

Kültür besiyerinin kırılması / dökülmesi

- Kaza alanındaki tüm personel alanı hemen terk etmeli
- Kaza alanının UV lambasını açıp terk edin
- Alanın kapısını kapatın ve dışına alana girişin yasaklandığını belirten "Kaza Uyarı Formu (Ek-11)"nu asın
- Kirlenmiş KKD'yi çıkarın ve otoklav poşetine atın
- Laboratuvar sorumlusuna kazayı haber verin
- 1 saat sonra yeni KKD'yi giyip laboratuvara girin
- "Biyolojik Dökülme Saçılma Kiti" alın
- Gazlı bez / kağıt havlu ile dökülen materyalin üzerini ve çevresi kapatın
- 50 mL saf çamaşır suyunu 450 mL distile suya dikkatle katın
- %10'luk çamaşır suyunu havluların üzerine dökün
- Dökülen materyalin mekanik temizliğini yapın
 - Bez ya da kağıt havluyu pens yardımıyla kaldırın
 - Ardından dökülmüş materyali temizleyin
 - Kırık cam parçalarını fırça ve faras yardımı ile toplayın ve kesici-delici atık kabına atın; asla kırık cam parçalarını el ile toplamayın
- Temizlik için kullanılan bezleri, kâğıt havluları ve farasları otoklav poşetine doldurun ve otoklavlayın
- Kontamine olmuş alanı dezenfektan ile tekrar dekontamine edin
- Tüm zemin ve tezgahları tekrar dezenfektanla silin
- Eğer laboratuvar formları ya da diğer basılı ya da yazılı evraklar kontamine olmuş ise, içerdiği bilgileri başka forma aktardıktan sonra otoklavlayın
- "Olay Bildirim Formu"nu doldurun
- Kazaya maruz kalan kişileri, tıbbi yardım almak üzere ilgili servise yönlendirin

Santrifüj sırasında enfekte materyal içeren tüplerin kırılması

Santrifüj işlemi sırasında tüp kırıldığında veya kırıldığından şüphelenildiğinde;

- Santrifüjü kapatın, 30 dk süreyle santrifüjü kapalı tutun
- Uyarı yazısı asın
- Laboratuvar sorumlusuna haber verin
- KKD (eldiven, önlük ve maske) giyin ve santrifüjü temizleyin;
 - Cam kalıntılarını pens ile toplayın
 - Santrifüj tüplerinin yerleştirildiği kısımlardaki enfekte materyali, pens ile tutulmuş pamuklarla toplayın
- Tüm kırık tüpler, cam parçaları ve kapları %10'luk çamaşır suyu içine koyun
- Kırılmamış olan kapalı tüpleri ayrı bir kaptaki dezenfektan içerisinde dezenfekte edin
- Santrifüj kabı ve santrifüje ait diğer parçaları, koroziv etkisi olmayan dezenfektan ile muamele edin, su ile durulayın ve kurulayın
- İşlem sırasında kullanılan tüm malzemeleri otoklavlayın
- "Olay Bildirim Formu"nu doldurun
- Kazaya maruz kalan kişileri, tıbbi yardım almak üzere ilgili servise yönlendirin

Ek-8 Laboratuvar Yüzey Dezenfeksiyonu Yönergesi

TB Laboratuvarında günlük dekontaminasyon faaliyetleri

- Laboratuvar ve çalışma yüzeylerini gün bitiminde ve potansiyel tehlikeli bir biyolojik ajanla çalışma sonrasında %10'luk çamaşır suyu ile dekontamine edin, sonra distile su veya %70'lik alkol ile durulayın
- Güvenlik kabinleri dâhil tüm çalışma yüzeylerini çalışma tamamlandıktan sonra dekontamine edin

Ek-9 Enfeksiyöz Atıkların İmhası Yönergesi

Enfeksiyöz atıkların ayrıştırılması

- Laboratuvarda üretilen enfeksiyöz atıklar şu şekilde sınıflandırılarak ayrıştırılır:
 - kesici-delici atık,
 - tek-kullanımlık (disposable) malzeme atığı,
 - geri dönüşümlü (cam vb.) kirli ve
 - sıvı enfeksiyöz atık
- Kesici-delici atıklar, sızdırmaz, delinme, yırtılma ve kırılmaya dayanıklı, açılması ve karıştırılması mümkün olmayan bir **kesici-delici atık kabında** toplanır
- Tek-kullanımlık enfeksiyöz atık için atık kovasına uygun büyüklükte **otoklav poşeti** yerleştirilir ve atıklar bu kovada biriktirilir; kova en fazla $\frac{3}{4}$ 'üne kadar doldurulur.
- Geri dönüşümlü kirli cam doğrudan atık kovası içinde biriktirilir; aşırı doldurulmaz
- Sıvı enfeksiyöz atıklar otoklav poşeti konmuş masa üstü biriktirme kabında toplanır

Atıkların imhası

- Kesici-delici atıklar:
 - Kesici-delici atık kabı en fazla $\frac{3}{4}$ oranında dolduğunda ağzı kapatılır.
 - Otoklav torbasına yerleştirilerek otoklavlanır.
- Tek kullanımlık enfeksiyöz atıklar:
 - İçine uygun büyüklükte otoklav poşeti yerleştirilmiş atık kovasında biriktirilir.
 - Kova aşırı doldurulmadan otoklavlanır.
- Geri dönüşümlü kirli malzeme:
 - Doğrudan (poşetsiz) atık kovası içinde biriktirilir.
 - Kova aşırı doldurulmadan otoklavlanır.
- Tek-kullanımlık enfeksiyöz atık veya geri dönüşümlü kirli malzeme kovaları:
 - $\frac{3}{4}$ oranında dolduğunda dikkatlice 250-500 mL su eklenir.
 - Su koyarken sıçratmamaya dikkat edilir.
 - Poşetin ağzı toplanır çok sıkı olmayacak şekilde bağlanır ve otoklavlanır.

- Sıvı enfeksiyöz atıklar:
 - Sıvı enfeksiyöz atıklar asla lavaboya boşaltılmaz,
 - Sıvı kültürler için asla pamuk tıkaçlı tüp kullanılmaz; sıvı kültürler yalnızca sızdırmaz, burgu kapaklı tüplerde veya şişelerde biriktirilir,
 - Hücre kültürü ya da serolojik çalışmalarda olduğu gibi enfeksiyöz sıvıyı boşaltmak gerektiğinde; sıvı, içine otoklav poşeti konmuş bir masa üstü atık toplama kabında biriktirilir; dolması beklenmeden iş bitiminde toplama kabı ile birlikte otoklavlanır.
 - İş biten sıvı kültür tüpü kirli kovasına atılır ve otoklavlanır.

Otoklavlama

- Kovalardaki otoklav poşetinin ağzı toplanır, bağlanmaz!
- Otoklav poşeti asla kovasından çıkarılmaz! Kovanın üzeri otoklav bandı ile etiketlenerek üzerine ait olduğu laboratuvar ve içerdiği kirlinin niteliği yazılır.
- Atık kovası otoklav müsait olduğunda laboratuvar çalışanı tarafından (teknik eleman, asistan veya uzman) otoklav odasına götürülür ve otoklava konur. Kirli kovası ASLA TEKNİK OLMAYAN PERSONELE (hizmetli, ofis elemanı v.b) TAŞITILMAZ!
- Otoklav poşetleri ve kovaları ASLA sıra beklemek üzere otoklav odasına bırakılmaz.
- Tıbbi atıklar 121°C'de 1 saat otoklavlanmalıdır.
- Otoklavlama sonrasında;
 - geri dönüşümlü malzeme yıkanmaya gönderilir.
 - tek-kullanımlık atıklar laboratuvarın tıbbi atık sorumlusunun gözetiminde belediyenin tıbbi atık sistemine gönderilir.

Otoklav etkinliğinin izlenmesi

- Kullanım sıklığına bağlı olarak haftada en az 1 kez sterilizasyonun etkin bir şekilde sağlanıp sağlanmadığı biyolojik indikatörler ile kontrol edilir.
- Biyolojik indikatörün üzerine uygulama tarihi ve yüklemenin yapılacağı otoklav numarası ve markası yazılır.
- Dekontamine edilecek malzeme ile birlikte, biyolojik indikatör otoklavın kapak, köşeler ve vakum çıkışları gibi sterilizasyon işleminin en zor gerçekleştiği düşünülen bölgelerine yerleştirilir.
- Otoklavlama süresi tamamlandıktan sonra indikatör içerisinde yer alan besiyeri tüpü penset aracılığı ile kırılmalı ve bakteri sporu içeren şeritin besiyerini emmesi sağlanır.
- İndikatör 60°C'lik etüvde 48 saat inkübe edilir.
- İnkübasyon sonrasında renk değişimi olup olmadığı değerlendirilir.
- Sterilize edilmiş ve evsel atık karakteri kazanmış atıklar, atık bertaraf sahasında depolanmadan önce, sterilizasyon ünitesinin bulunduğu alanın uygun bir yerinde çevreye zarar vermeyecek şekilde kapalı kaplar içinde, biyolojik indikatör testleri sonuçlanıncaya kadar muhafaza edilmeli ve bekletilmelidir.
- Üretici firmanın önerileri doğrultusunda değerlendirme yapılmalıdır.
- Otoklav etkinliği uygun ise atık depolanmak üzere depolama sahasına gönderilir. Otoklav etkinliği uygun değil ise otoklav etkinliği tam olan başka bir otoklav ile atıklar dekontamine edilir.

Ek-10 Laboratuvar Personeli Takip Formu

Personel Takip Formu							
Laboratuvarın adı:							
Personelin Adı ve Soyadı:							
Doğum yılı:							
BCG aşısı var mı?				Varsa tarihi:			
Çalışmaya başlama tarihi:							
Daha önce antitüberküloz tedavisi gördü mü?							
Personel Takip Çizelgesi							
	Değer	İşe giriş	Takip	Takip	Takip	Takip	Takip
Tarih	Gün / Ay / Yıl						
TDT	mm						
TDT tekrarı (booster)	Tarih / mm		-	-	-	-	-
İGST	Negatif / Pozitif		x	x	x	x	x
Akciğer filmi	Normal / Bulgu						
Balgam yayması	Negatif / Pozitif						
Balgam kültürü	Negatif / Pozitif						
Klinik	Öksürük	Var / Yok					
	Halsizlik	Var / Yok					
	Göğüs ağrısı	Var / Yok					
	Yorgunluk	Var / Yok					
	Gece terlemesi	Var / Yok					
	İştahsızlık	Var / Yok					
	Kilo kaybı	Var / Yok					
Kilo	Kg						
İşlem	Tedavi / koruma / takip						
Açıklama							

Ek-11 Kaza Uyarı Formu Örneği

**!!! BİYOLOJİK DÖKÜLME
SAÇILMA UYARISI !!!**

- Oda içerisinde biyolojik dökülme saçılma olmuştur.
- Gerekli biyogüvenlik işlemleri tamamlanıncaya kadar kesinlikle içeri girmeyin.
- UV lambalarını kapatmayın.
- Gerekli bilgi için biyogüvenlik sorumlusu / sorumlu kişi ile görüşün.

Kaza bilgisi	Yeri:
	Tarih ve Saati:
	Türü:
Alınan Önlemler	
Yapılacak İşlemler	
Kaza İle İlgili Kişi	Adı-Soyadı:
	Dahili Tel:
	Cep Tel:
Sorumlu Kişi	Adı-Soyadı:
	Cep Tel:

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesinde (UTTR-1 [Bölüm 1] Biyogüvenlik) geçen bazı hususlar için daha ayrıntılı veya ilave bilgi için aşağıda listelenen UMS belgelerine başvurunuz:

UMS, ULGR	Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi
UMS, UTTR-2 [Bölüm 2]	Örnek Yönetimi
UMS, UTTR-3 [Bölüm 3]	Mikroskopi
UMS, UTTR-4 [Bölüm 4]	Kültür
UMS, UTTR-5 [Bölüm 5]	Tür Tayini
UMS, UTTR-6 [Bölüm 6]	Moleküler Tanı
UMS, UTTR-7 [Bölüm 7]	İlaç Duyarlılık Testi
UMS, UTTR-8 [Bölüm 8]	İnterferon Gama Salınım Testi

Kaynaklar

1. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual, 3rd Edition. Geneva: World Health Organization, 2012.
2. World Health Organization. Tuberculosis Laboratory Biosafety Manual, 1st ed. Italy, 2012.
3. Center for Disease Control and Prevention (CDC). Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories. *MMWR* Supplement / Vol.61 Atlanta, GA 30333, 2012.
4. Center for Disease Control and Prevention (CDC). Interim Biosafety Guidance for all Individuals Handling Clinical Specimens or Isolates Containing, 2009.
5. Centers for Disease Control and Prevention. Primary containment for biohazards: selection, installation and use of biological safety cabinets. Washington, DC: U.S. Government Printing Office, 2000.
6. ECDC Technical Report. Mastering the basics of TB control, 2011.
7. Akbaş E. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında biyogüvenlik ve iyi laboratuvar pratiği: Bulaşıcı hastalıkların ihbarı ve bildirim sistemi. Sağlık Bakanlığı, Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü. Ankara, 2004.
8. American Society for Microbiology. Sentinel Level Microbiology Laboratory Guidelines. Washington, DC, 2010.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Clinical Laboratory Waste Management; Approved Guideline- third edition (CLSI document GP05-A3). Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.
10. Fleming DO, Richerdson JH, Tulis JJ, Vesley D (eds) Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (Appendix-I). Laboratory Safety. Principles and Practices, 4th edition. ASM Press, Washington, DC. 2006.
11. Laboratory Standards and Guidelines. Phoenix Controls Corporation. Massachusetts: Newton; 2002, p. 4-14.
12. National Cancer Institute Office of Research Safety and the Special Committee of Safety and Health Experts. Laboratory safety monograph, a supplement to NIH guidelines for recombinant DNA research. NIH, Bethesda, MD. 1979.
13. NSF International. NSF listings — field certifier accreditation. NSF International, Ann Arbor, Michigan. 2000.
14. Occupational Safety AND Health Administration. Occupational Safety and Health Standards. I. Personel Protective Equipment. Standard no.1910, 132.
15. Stuart DG. Primary barriers: biological safety cabinets, fume hoods, and glove boxes. In: Fleming DO, Hunt DL. *Biological safety principles and practices*. ASM Press, Washington, DC. 2000, p. 313-30.
16. İş Sağlığı ve Güvenliği Kanunu (No. 6331). Resmî Gazete; 30.06.2012-28339 <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2012/06/20120630-1.htm> (son erişim tarihi: 10.01.2014)



ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

ULUSAL TÜBERKÜLOZ TANI REHBERİ (UTTR)

Örnek Yönetimi

Hazırlayan Birim	Tüberküloz Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Tüberküloz
Bölüm	Örnek Yönetimi
Standart No	UTTR-2
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2014
Geçerlilik tarihi	01.01.2016

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
ÖRNEK YÖNETİMİ - TEKNİK BİLGİLER	3
1 Örneklerin alınması	3
2 Örneklerin taşınması ve saklanması	6
3 Örnek kabulü ve ret kriterleri	9
4 Örneklerin işlenmesi	10
5 İşlenmiş örneğin saklanması	13
6 Kalite kontrol	14
TANI AKIŞ DİYAGRAMI	15
EKLER.....	16
Ek-1 Klinik örnek / Üremiş kültür paketleme ve gönderme yönergesi.....	16
Ek-2 NALC-NaOH uygulama yönergesi	17
Ek-3 NaOH (Petroff) uygulama yönergesi	18
Ek-4 Oksalik asit uygulama yönergesi.....	19
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ	20
KAYNAKLAR.....	20

"Kalite, ürünün gerekliliklerine uygunluk derecesidir."

"Kaliteye, önlem alarak ulaşılır."

P. Crosby

Kapsam ve Amaç

Bu Rehberin amacı; tüberkülozun mikrobiyolojik tanısının doğru yapılabilmesi için uygun örneğin seçilmesi, uygun şartlarda ve miktarda alınması, alınan örneklerin laboratuvara belirli kurallara uyularak taşınması ve laboratuvarda uygun işlenmesinin sağlanmasıdır.

Bu Bölüm, tüberküloz laboratuvarlarında analiz öncesi (preanalitik) süreçleri; örnek seçimi, alınması, taşınması ve laboratuvarda örneğin mikroskopi ve kültür için hazırlanmasını kapsamaktadır.

Örnek Yönetimi - Teknik Bilgiler

Tüberkülozun mikrobiyolojik tanısının doğru bir şekilde konulmasında tanı yöntemlerinin duyarlılığı kadar incelenecek örneklerin seçilmesi, bu örneklerin hastalardan uygun şartlarda, uygun yöntemlerle ve yeterli miktarlarda alınması, örneklerin laboratuvara belirli kurallara uyularak taşınması ve laboratuvarda en kısa zamanda işlenmesi gerekir.

Test sonuçlarının kalitesini etkileyen en önemli basamak analiz öncesi (preanalitik) evredir. Bu yüzden örneğin seçimi, alınması, laboratuvara ulaştırılması ve gerektiğinde uygun koşullarda saklanması ile ilgili kurallara uyulması son derece önemlidir.

Genel kurallar;

- Örnek tercihen antitüberküloz tedavi başlamadan önce alınmalıdır.
- Örnek endojen flora ve çevresel kontaminasyonu en aza indirmek için olabildiğince aseptik şartlarda alınmalıdır.
- İzolasyon şansını artırmak için örnek uygun kalitede, yeterli miktarda ve sayıda olmalıdır.
- Örnek uygun zamanda alınmalı, en kısa sürede ve uygun taşıma koşullarında laboratuvara gönderilmelidir.

1 Örneklerin alınması

Tüberküloz, değişik organ ve sistemleri etkileyebilen sistemik bir enfeksiyon hastalığıdır. Tanı amaçlı laboratuvara gönderilecek örnek çeşidi, hastalığın etkilediği organ dikkate alınarak seçilmelidir. Hastalığın tanısında **akciğer** veya **akciğer dışı** olmak üzere ve **floralı** veya **steril** alanlardan farklı tipte örneklerden yararlanılmaktadır.

Örneklerin alındığı kaplar, tek kullanımlık, steril, vida kapaklı sızdırmaz kaplar olmalıdır. Akciğer tüberkülozunun tanısında kullanılan örnekler ve bu örneklerin alınmasında dikkat edilecek hususlara ilişkin bilgiler Tablo 1’de özetlenmiştir.

Tablo 1. Akciğer tüberkülozu tanısında kullanılan örneklerin alınmasına ilişkin özellikler

Örnek Türü	Endikasyon	Örnek Alma Özelliği
Balgam	Akciğer tüberkülozu şüphesinde ilk tercih edilen ve basil saptama oranı en yüksek örnek türüdür	Hastalardan aç karnına derin ve kuvvetli bir öksürükle akciğerlerden gelen kıvamlı, sabah ilk balgam örneğini vermeleri istenmelidir (Kutu-1). Tercihen üç ardışık günde* sabah aç karnına 3-5 mL alt solunum yollarından gelen örnek alınmalıdır
Uyarılmış (indüklenmiş) balgam	Balgam çıkaramayan ayaktan hastalar	Nebülizatör yardımı ile aerosol haldeki 10 mL %3-10'luk hipertonic tuzlu su 15-30 dk boyunca hastaya yavaşça solutulduktan sonra, derin ve kuvvetli öksürük ile yaklaşık 10 mL balgam örneği alınır
BAL Bronş lavajı veya bronşiyal fırçalama örneği Trakeal aspirat	Hiçbir şekilde balgam veya uyarılmış balgam örneği veremeyen tanı konulamamış olgular	5-10 mL bronş lavajı / BAL örneği 5 mL serum fizyolojik içerisine alınan fırçalama örneği En az 3 mL trakeal aspirat alınır
Endotrakeal aspirat	Başka şekilde örnek veremeyen yoğun bakım hastaları	En az 3 mL endotrakeal aspirat alınır
AMS	Nörolojik hastalık, koma hali vb. nedenlerle uyum gösteremeyen hastalar 10 yaşından küçük çocuklar Uyarılmış balgam alınamayan hastalar	Üç ardışık günde, sabah 8-10 saatlik açlığı takiben, hasta yatağından kalkmadan, gastrik tüp ile 25-50 mL steril su veya serum fizyolojik (SF) verilip aspire edildikten sonra en az 5 mL örnek alınır
Akciğer doku örneği	İnvazif olmayan teknikler ile tanı konulamayan akciğer tüberkülozu şüphesi olan olgular	Aseptik şartlarda kazeöz lezyondan alınan en az 1 gr doku biyopsisi veya ince iğne aspirasyonu Açık akciğer biyopsi doku örneği 2-3 mL'lik steril SF içine alınır.
Larinks sürüntüsü	Çocuklarda ve diğer akciğer örneklerinin hiçbirisinin elde edilemediği hastalar	Larinks sürüntü örneği silgi ile alınıp 2-3 mL'lik steril SF içine konur

* En uygun balgam örneği **üç gün üst üste sabah** alınan **ilk balgam** örneğidir! Ancak hasta, üç gün üst üste sabah ilk balgam örneğini verecek durumda değil ise,
 – İlk balgam örneği; klinik başvuru sırasında (anlık),
 – İkinci balgam örneği; ikinci gün sabahı (evde),
 – Üçüncü balgam örneği; ikinci balgam örneğini getirdiğinde (anlık) veya üçüncü gün sabahı (evde) alınır.

Akciğer tüberkülozu tanısında biri sabah balgamı olmak üzere en az iki balgam örneğinin incelenmesi önerilmektedir.

Kutu 1. Balgam örneği alma talimatı (Balgam Çıkarma Talimatı)

- Hastaya **üç adet** steril örnek kabı verilir.
Hastaya bir kap verip ertesi gün örneği getirdiğinde yeni kabı vermek daha uygun olabilir.
- Sabah aç karnına önce dişlerini fırçalaması veya ağzını iyice çalkalaması istenir.
Yiyecek artıkları, ağız florası, tükürük ve oral ilaçlar ile balgamın kontaminasyonunu önlemek için hastaya balgam çıkarmadan önce ağzını bol suyla (mümkünse şehir şebekesi harici su ile) çalkalaması gerektiği hatırlatılmalıdır.
- Bir bardak ılık su içmesi önerilir.
Kendiliğinden balgam çıkaramayan hastalara öncelikle bol sıvı alması ve kültürel hareketleri yapması veya merdiven inip çıkması tavsiye edilebilir.
- Örnek kabının ağzını dikkatli bir şekilde açması, kapağı uygun, temiz bir yere koyması söylenir.
- İzolasyon odasının olmadığı yerlerde açık havada örnek vermesi istenir.
- Derin bir nefes alıp bir süre nefesini tuttuktan sonra derin ve kuvvetlice öksürük ile balgamını doğrudan kabın içine çıkartması istenir.
Balgam ve tükürük farkını tam olarak bilmeyen hastalar yanlışlıkla balgam çıkarmadan kaba tükürmesinler diye, hastaya "balgamını kaba tükür" denmemelidir. Hastalara tükürük veya nazofaringeal sekresyonların (burun ve yutak kaynaklı sıvıların) balgam olmadığı ve bu nedenle laboratuvar test için uygun örnek olarak kabul edilmediği anlatılmalıdır.
- Örnek kabının kapağını dikkatli bir şekilde sıkıca kapatması ve bu şekilde, her örnek için ayrı örnek kabı kullanması söylenir.
- Her kabı aynı gün en geç iki saat içerisinde laboratuvara getirmesi istenir

Uyarı! - Uyarılmış (indüklenmiş) balgam

Uyarılmış balgam, sulu özellikte olduğundan görünüm açısından tükürüğe benzer. Örneğin tükürük zannedilerek reddedilmemesi için istem kâğıdına mutlaka "uyarılmış balgam" notu eklenmelidir.

Uyarı! – Örnek alma sırasında oluşabilecek biyolojik riskler

- Balgam çıkarılması
- Nebulizatör ile uyarılmış balgam alınması
- Bronkoskopi işlemi
- İnvaziv işlemler sırasında hastadan çevreye bulaş olabilir.

Bu işlemler;

- Enfeksiyon kontrol önlemlerinin alındığı yerlerde,
- Uygun güvenlik standartları altında,
- Eğitimli personel (balgam hariç) tarafından
- İşlemler sırasında eldiven, önlük ve solunum maskesi kullanılarak yapılmalıdır.

Akciğer-dışı tüberkülozunun tanısında kullanılan örnekler ve bu örneklerin alınmasında dikkat edilecek hususlara ilişkin bilgiler Tablo 2’de özetlenmiştir.

Tablo 2. Akciğer-dışı tüberkülozun tanısında kullanılan örneklerin alınmasına ilişkin özellikler

Örnek Türü	Endikasyon	Örnek Alma Özelliği
İdrar	Üriner sistem tüberkülozu şüphesi	Ardışık en az üç gün üst üste dış ürogenital bölge temizlendikten sonra en az 40 mL sabah idrarı alınır İdrar veremeyen hastalardan mesaneden kateter ile ya da suprapubik aspirasyon ile alınabilir
BOS	Santral sinir sistemi tüberkülozu şüphesi	Aseptik şartlarda en az 2 mL (optimal 10 mL) alınır
Doku biyopsi örneği	İnvaziv olmayan teknikler ile tanı konulamayan akciğer-dışı tüberküloz şüphesi	Aseptik şartlarda kazeöz kısımlardan en az 1 gr kadar doku biyopsi örneği alınır
Steril vücut sıvıları (plevra, periton, perikard, eklem vb.)	Akciğer dışı tüberküloz şüphesi	Aseptik şartlarda en az 10 mL alınır*
Apse ve yara örneği	Akciğer dışı tüberküloz şüphesi	Aseptik şartlarda yüzeysel eksuda uzaklaştırıldıktan sonra apse içeriği ve aspire edilen sıvı alınır
Kemik iliği	Yaygın tüberküloz şüphesi ve nedeni bilinmeyen ateşte	Aseptik şartlarda heparin, SPS içeren steril tüplere ve/veya ticari mikobakteriyel kan kültür besiyerlerine alınır
Kan	Yaygın tüberküloz şüphesi ve nedeni bilinmeyen ateşte	Aseptik koşullarda, 5-10 mL kan SPS veya heparin içeren steril tüplere veya ticari mikobakteriyel kan kültür besiyerlerine önerilen miktarda alınır
Dışkı**	İntestinal tüberküloz şüphesi	3-5 gr dışkı örneği alınır

* Steril vücut sıvıları; periton, perikard ve plevral biyopsinin mikobakteriyolojik tanı değeri, vücut sıvılarından daha yüksektir ve bu yüzden tanı için biyopsi örneği tercih edilmelidir.

** Dışkı örneği; tüberküloz tanısında dışkıdan yapılan mikroskopi ve kültür işlemleri, klinik yarar açısından tartışmalıdır.

2 Örneklerin taşınması ve saklanması

Tüberkülozun laboratuvar tanısının doğru yapılabilmesi için uygulanan yöntemlerin duyarlılığının yanı sıra, örneklerin laboratuvara gönderilmesinde belirli kurallara uyulması gerekmektedir.

2.1. Etiketleme

Örnek kabında ve istem formunda yer alması gereken asgari bilgiler Kutu 2 ve 3'te verilmiştir. Hasta bilgilerinin kabin üzerine etiketlenmeyip sadece kapakta bulunması, işlem esnasında kapakların açılması ile örneklerin karışabilmesi bakımından sakıncalıdır.

2.2. Taşıma ve saklama

Hastalardan alınan örnekler aşırı sıcak ve soğuk, ani basınç değişikliği veya aşırı kuruma gibi olumsuz koşullardan korunarak laboratuvara en kısa sürede ulaştırılmalıdır. Örneklerin taşınması ve saklanması ilişkin hususlar Kutu 4'de verilmiştir.

Başka bir kuruma gönderilecek klinik örnek veya üremiş kültürler;

- Uygun tüp içerisinde ağızları sıkıca kapatılmış olarak kendinden fermuarlı naylon poşete konulmalı
- Taşıma kutusunun içinde ayrılmış gözlere iyice yerleştirilmelidir.
- Uygun üçlü taşıma kabı ile (Şekil 1 ve 2) taşıma kurallarına uygun olarak laboratuvara yollanmalıdır (*bkz.* Ek-1 Klinik örnek / üremiş kültür paketleme ve gönderme yönergesi).

Kutu 2. Örnek kabında yer alması gereken asgari bilgiler

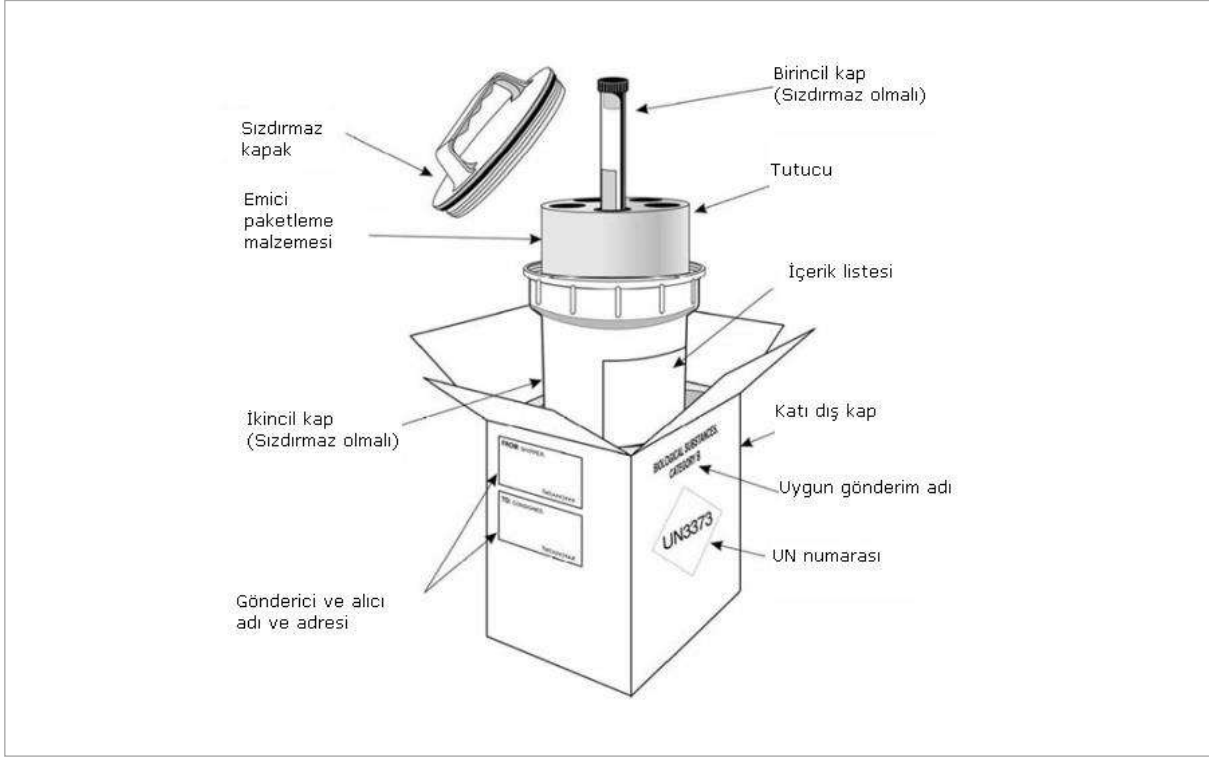
- Hasta adı-soyadı
- Dosya / örnek numarası
- Örnek alınma tarih ve saati
- Örnek türü

Kutu 4. Tüberküloz tanısında kullanılan örneklerin taşınması ve saklanması

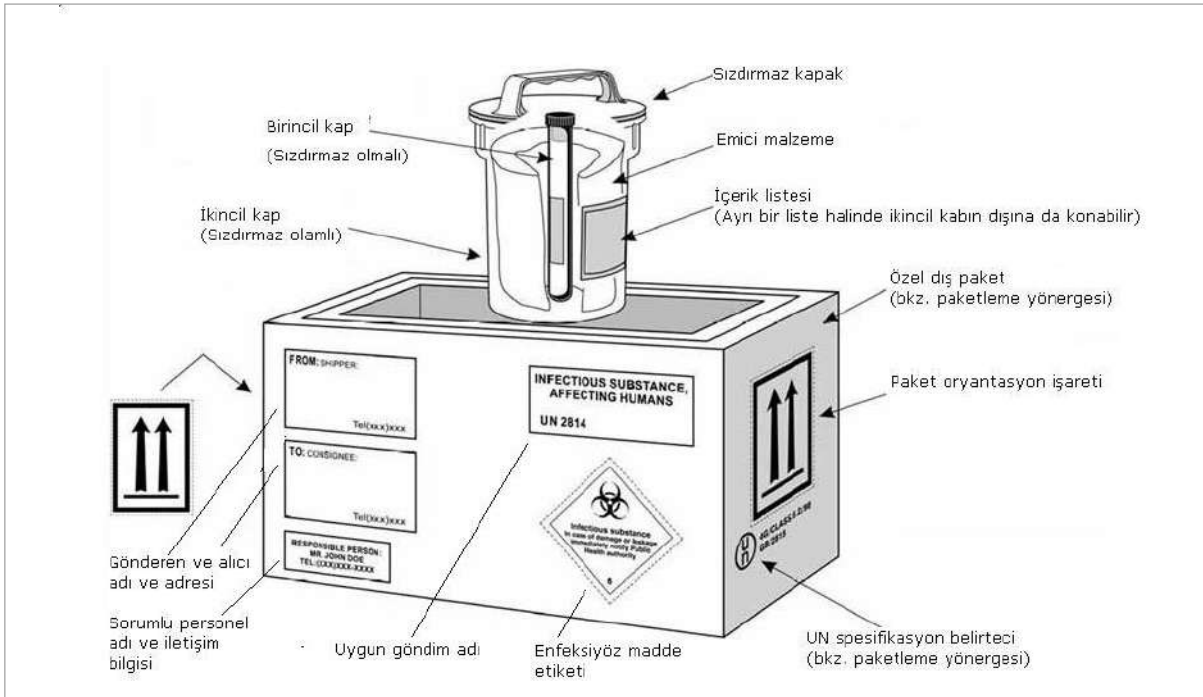
- Kurum içinde örnek gönderimi ikincil kap ile kurum dışına örnek gönderimi üçlü taşıma kapları ile yapılmalıdır (*bkz.* Enfeksiyöz Madde ile Enfeksiyöz Tanı ve Klinik Örneği Taşıma Yönetmeliği).
- Örnekler, oda ısısında mümkün olan en kısa süre içerisinde laboratuvara ulaştırılmalıdır.
- Örneklerin laboratuvara ulaştırılması 1 saati geçecek ise 24 saate kadar +4°C'de bekletilebilir.
- BOS, kemik iliği, kan örnekleri **kesinlikle** buzdolabına konulmaz.
- **AMS örnekleri** 5-10 mL örnek başına 100 mg sodyum karbonat veya %4'lük NaOH ile nötrale edilir ve en kısa sürede laboratuvara ulaştırılır.

Kutu 3. Laboratuvar istem formunda bulunması gereken asgari bilgiler

- **Sağlık merkezi bilgisi**
 - Merkez adı
 - Doktor adı-soyadı, imzası
 - İletişim bilgisi
- **Hasta kimlik bilgileri**
 - Adı-soyadı
 - T.C. kimlik numarası
 - Doğum tarihi
 - Baba adı
 - Adres
- **Hastalık bilgisi**
 - Ön tanı
 - Tedavi öyküsü
- **Örnek bilgisi**
 - Örnek türü
 - Örnek alınma tarih ve saati
- **İstenen tetkik**



Şekil 1. Klinik örnek için üçlü taşıma kabı örneği – işaret ve etiketleme özellikleri ile birlikte



Şekil 2. Üremiş kültür için üçlü taşıma kabı örneği – işaret ve etiketleme özellikleri ile birlikte

3 Örnek kabulü ve ret kriterleri

3.1. Örnek kabulü

Uygun şekilde alınmış ve laboratuvara ulaştırılmış örnekler, laboratuvarın örnek kabul birimi tarafından kabul edilir. Kabul sırasında değerlendirilecek hususlar; hasta kimlik bilgileri, istem formu, istem formu ile örnek kabı üzerindeki bilgilerin uyumu, uygun örnek, uygun miktar, uygun kap, uygun taşıma ve saklamadır.

Yukarıdaki hususların uygun olmaması durumunda ilgili sağlık personeline durum bildirilir. Eksik bilgi varlığında bu bilgilerin tamamlanması ve uygun olmayan örnek gönderilmesi durumunda yeni örnek göndermesi istenir.

3.2. Örneklerin ret kriterleri

Örnek türlerine göre uygunsuzluk durumları ve bu durumlarda yapılması gerekenler Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Örnek türlerine göre uygunsuzluk durumları

Örnek türü	Uygunsuzluklar	Öneri
Balgam	- Örneğin tükürük olması 24 saat süre ile biriktirilen balgam örnekleri - İçinde yiyecek artıkları olan balgam örnekleri - Şehirlerarası taşıma süresinin 3 günü geçmesi	Hastadan tekrar balgam almanın olanaksız olduğu durumlarda, miktar ve kalite açısından uygun olmayan örnek kabul edilip işleme alınmalı, ancak sonuç negatif bulunduğu bu durum "yetersiz/uygun olmayan örnek" şeklinde raporda belirtilmelidir
BAL, Bronş lavajı Endotrakeal / trakeal aspirat	Yetersiz hacimde örnek	Örnek, 1 mL gibi çok az miktarda bile olsa kabul edilmeli; fakat örnek miktarının yetersiz olduğu raporda belirtilmelidir
Larinks sürüntüsü	Eküvyon ile alınan sürüntü örnekleri	Başka örneklerin alınamadığı durumlarda işlenmeli; ancak bakterilerin hidrofobik özellikleri ve yeterli örnek içermemelerinden dolayı örneğin uygun olmadığı raporda belirtilmelidir
AMS	Nötralize edilmeden 4 saatten daha uzun süre bekletilmiş örnekler	Yalancı negatif sonuçlara yol açabileceğinden işleme alınmamalı
İdrar	24 saatlik biriktirilmiş, bekletilmiş idrar - Kateter torbasından alınan idrar örnekleri	İdrar içeriğinin basillerin canlılığını olumsuz yönde etkilemesi, klinik örneğin seyrilmesi, TDM ve diğer mikroorganizmalar ile kontamine olma ihtimalleri nedeniyle kabul edilmemeli
BOS	Yetersiz hacimde örnek	BOS, diğer örneklerle göre daha sınırlı hacimde alınabildiğinden miktarı ne olursa olsun laboratuvar tarafından kabul edilmeli; yetersiz miktar olduğu raporda belirtilmeli
Doku biyopsi örneği	- Yetersiz miktarda örnek - Gazlı bez, pamuk gibi materyale sarılmış örnek	Kabul edilmeli; fakat örnek miktarının yetersiz olduğu veya uygunsuz olduğu raporda belirtilmeli
Steril vücut sıvıları Kan, kemik iliği	Pıhtılaşmış örnek	Kabul edilmeli; fakat örneğin uygunsuz olduğu raporda belirtilmeli

Ayrıca;

- Formaldehit ve balmumu gibi herhangi bir koruyucu veya antimikrobiyal madde içeren kaplarda gönderilmiş örnekler,
- Dondurulmuş / çözündürülmüş örnekler,
- Kurumuş örnekler,
- Jel içeren tüplerde gelen örnekler,
- Süzöntü örnekleri,
- EDTA'lı tüpte gelen kan, kemik iliğı, steril vücut sıvısı ve BOS örnekleri (PCR testleri dışında) kesinlikle reddedilir.

4 Örneklerin işlenmesi

4.1. Temel prensip

Örneklerin işlenmesi, kontamine veya steril alan örnekleri olmalarına göre farklılık göstermektedir. Örneklerin işlenmesinde uygulanan basamaklar aşağıda sıralanmıştır. Örneklerin işlenmesinde kullanılan yöntemlerin uygulama basamakları Ek-2, Ek-3 ve Ek-4'de verilmiştir.

Dekontaminasyon

Kontamine örneklerin içerisindeki mikobakterilerin canlılığı korunurken, kontaminant mikroorganizmaların NaOH, oksalik asit vb. kimyasal maddeler ile uzaklaştırılması ve sayıca azaltılması işlemidir. Steril örnekler dekontamine edilmeden işleme alınır (Kutu 5).

Homojenizasyon

Örneklerde bulunan mukoz, epitel ve diğer şekilli elemanlar arasında gizlenmiş olan basilleri ortaya çıkarmak ve mukus yapıları eriterek santrifüjde çökmesini ve basillerin örnek içinde homojen bir şekilde dağılmasını sağlamak için uygulanır. Bu amaçla NaOH ya da N asetil L sistein (NALC) gibi kimyasal maddeler kullanılır.

Kutu 5. Dekontamine edilmesi gerekmeyen örnekler

- BOS, eklem sıvıları veya diğer steril vücut sıvıları
- Kan ve kemik iliğı
- Aseptik şartlarda cerrahi olarak çıkarılmış doku / biyopsi örnekleri (otopsi örnekleri hariç)

Nötralizasyon

Mikobakteriler en iyi pH 6,8'de ürediğı için homojenizasyon-dekontaminasyon işlemleri sırasında kullanılan kimyasal maddeler nedeni ile asidik ya da alkali hale gelen örneklerin nötrale edilmesi işlemidir.

Konsantrasyon

Klinik örnekteki basillerin yoğunlaştırılması ve tüberküloz basilinin izolasyon oranını arttırmak için yapılan santrifüjleme işlemidir.

4.2. Yöntem çeşitleri ve avantaj-dezavantajları

Ölü basil sayısını en aza indirmek için dekontaminasyon işlemi belirlenen standartlara uygun olarak yapılmalıdır. Örneklerin işlenmesinde kullanılan yöntemler aşağıda verilmiştir.

4.2.1. NALC-NaOH yöntemi

- NALC-NaOH yöntemi örneklerin işlenmesinde en sık kullanılan yöntemdir. NaOH mukolitik ve dekontaminant özellikte olup tüberküloz basili üzerine de toksik etkili (%30) olabilir. NALC mukolitik özellikte olup, homojenizasyona yardımcı olarak kullanılır.
- Sodyum sitrat ise, örnekte bulunabilecek ağır metal iyonlarını bağlayarak NALC'nin inaktive olmasını önlemek amacıyla kullanılır.
- Bu yöntemde çözeltiler hazırlanırken konsantrasyona dikkat edilmeli ve hazırlanmış olan NALC solüsyonu 24 saatten fazla bekletilmemelidir.
- Santrifüj işlemi sırasında ortaya çıkabilecek ısı artışı tüberküloz basilinin ölümüne neden olabileceği için soğutmalı santrifüj kullanılması önerilir.
- NALC-NaOH yöntemi uygulama yönergesi Ek-2'de verilmiştir.

4.2.2. NaOH (Petroff) yöntemi

- Basit, ucuz ve etkili bir dekontaminasyon yöntemidir. NaOH, mukolitik ve dekontaminant özelliktedir. Süre ve konsantrasyona bağlı olarak yaklaşık mikobakterisidal etki %60'a çıkabilmektedir. NaOH hazırlandıktan sonra 1-2 hafta içerisinde kullanılmalıdır.
- NaOH yöntemi uygulama yönergesi Ek-3'de verilmiştir.

4.2.3. Oksalik asit yöntemi

- Azaltılmış mikobakterisidal etkinliğe sahiptir. *Pseudomonas* türleri ile kontamine olduğu bilinen örnekler için NALC-NaOH yöntemi ile birlikte kullanılır.
- Oksalik asit yöntemi uygulama yönergesi Ek-4'de verilmiştir.

4.2.4. Zefiran-trisodyum fosfat yöntemi

- İşlem süresi önemli değildir. Dekontaminasyon süresinin takip edilemediği durumlarda kullanılabilir.
- Tüberküloz basili üzerine az aktivite gösterirken birçok kontaminant için selektif toksisiteye sahiptir.

4.3. Asgari laboratuvar koşulları

4.3.1. Laboratuvar güvenliği önlemleri

- Laboratuvarın fiziki tasarımında şu asgari koşullar sağlanmış olmalıdır;
 - Temiz alandan kirli alana doğru tek yönlü hava akımı olan,
 - Saatte 6-12 kez temiz hava değişimi sağlayan mekanik havalandırma sistemli, ve
 - Giriş kontrollü bir çalışma alanı.
- Kişisel koruyucu donanım (KKD) olarak asgari gerekler (şüpheli örneklerin incelenmesinde bütün süreçlerde giyilmesi gereken) eldiven ve önlüktür (Tablo 4).

Ayrıntılı bilgi "UTTR-1 Biyogüvenlik" başlığı altında verilmiştir.

Tablo 4. Örnek işleme ve yapılan işleme göre alınması gereken önlemler

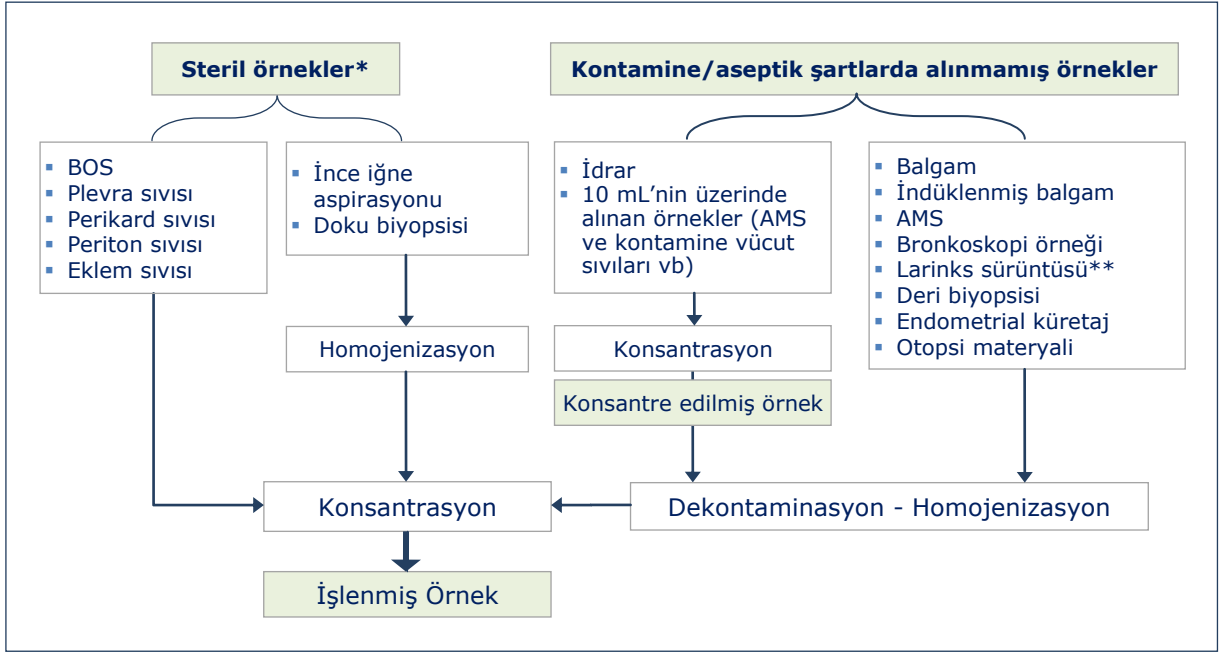
		Laboratuvar tasarımı		Laboratuvar donanımı		Kişisel koruyucu donanım		
		Havalandırma	Laboratuvar giriş sınırlaması	BGK	Otoklav	Eldiven	Önlük	Maske
Örnek işleme (HDK)	Örnek pipetleme	Saatte 6-12 hava değişimi	BGD-2 işaretli giriş sınırlaması	✓	Opsiyonel	✓	✓	Opsiyonel
	Vorteksleme			✓				
	Santrifüjleme			-				
Yayma hazırlama	İşlenmiş örnekten	Saatte 6-12 hava değişimi	BGD-2 işaretli giriş sınırlaması	✓	Opsiyonel	✓	✓	Opsiyonel
Kültür	İşlenmiş örneğin kültür besiyerine ekimi	Saatte 6-12 hava değişimi	BGD-2 işaretli giriş sınırlaması	✓	Opsiyonel	✓	✓	Opsiyonel
Moleküler test	İşlenmiş örnekten ekstraksiyon	Saatte 6-12 hava değişimi	BGD-2 işaretli giriş sınırlaması	✓	Opsiyonel	✓	✓	Opsiyonel

4.3.2. Gerekli donanım

- Sınıf-IIA biyogüvenlik kabini
- İnkübatör
- Otoklav

4.4. Örneğin işlenmesi

Tüberküloz kültürü öncesi kan ve kemik iliği örnekleri hariç tüm örneklerin işlenmesi gerekmektedir. Örnek çeşitlerine göre yapılması gereken işlemler farklılık göstermekte olup akış diyagramı Şekil 3'te verilmiştir.



Şekil 3. Örneklerin işlenmesi akış diyagramı

* Kan ve kemik iliği örnekleri işleme alınmadan ekilir.

** Larinks sürüntü örneği; steril bir santrifüj tüpüne aktarılır ve 2 mL steril distile su ilave edildikten sonra balgam örneği gibi işleme alınır.

Kutu 6. Doku biyopsi örneklerinin homojenizasyon işlemi

- Dokular steril bir bisturi veya makas ile küçük parçalara ayrılır.
- Steril porselen bir havan/kap veya doku parçalayıcısı içinde 2-5 mL steril SF veya steril % 0,2'lik sıgır serum albümini ile biyopsi örneği homojenize edilir.

5 İşlenmiş örneğin saklanması

- İşlenmiş örnek iki gün +4°C'de saklanır; kültürde kontaminasyon görülürse yeniden dekontamine edilerek kültürü yapılır.
- Mümkünse, steril 2-5 mL'lik burgu kapaklı bir tüpte -20°C'de kültür sonucu çıkana kadar saklanabilir.

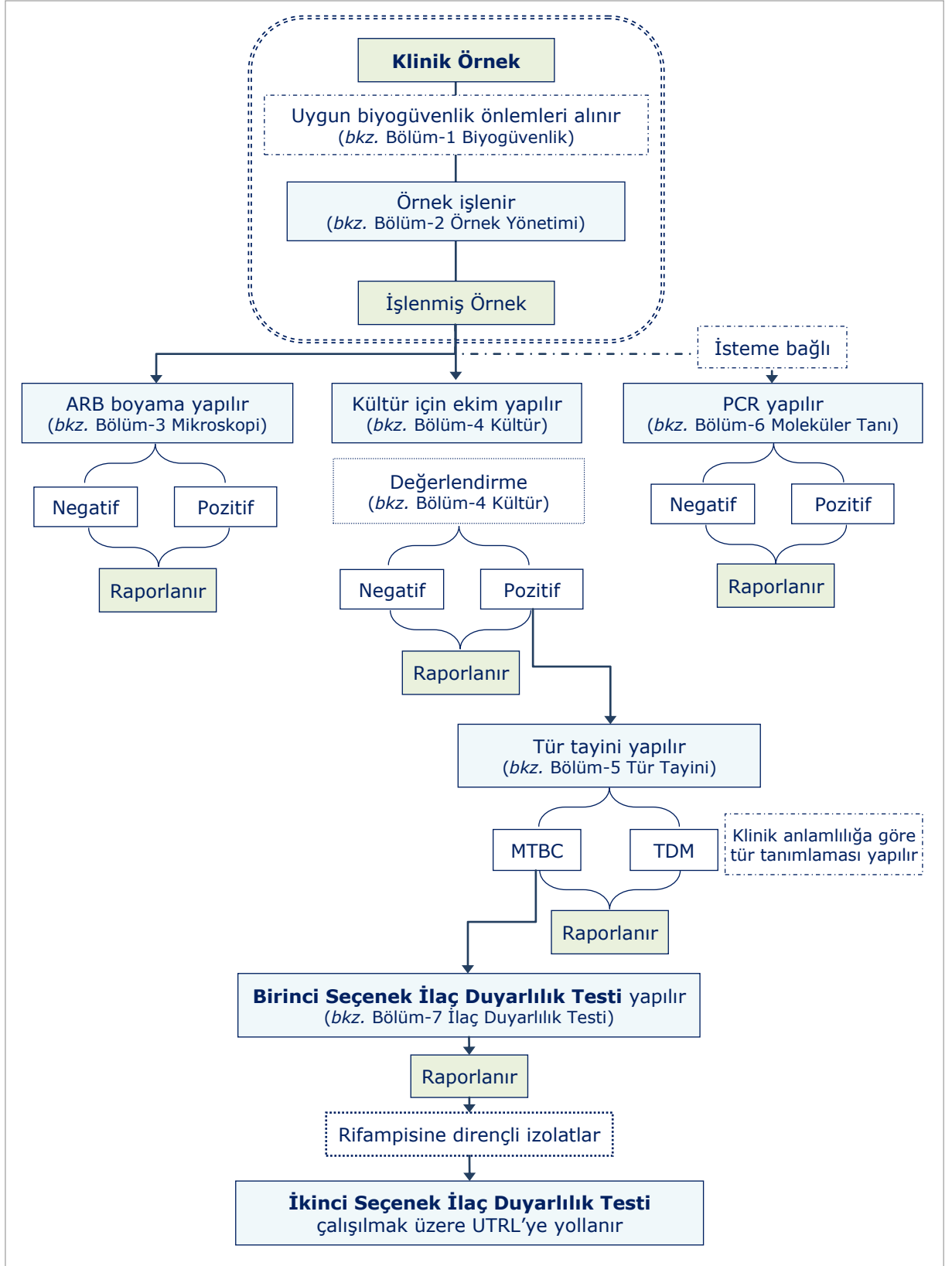
6 Kalite kontrol

- Örneklerin işlenmesi sırasında oluşabilecek hatalar laboratuvarın kültür kontaminasyon oranları ile takip edilir.
 - Katı besiyerlerinde %3-5 kontaminasyon,
 - Sıvı besiyerlerinde %5-10 kontaminasyon kabul edilebilir oranlardır.
- Ayrıca yaygın bir kontaminant olan *M. gordonae* üreme oranı dekontaminasyonun etkinliğinin önemli bir göstergesi olabilir.
- Bu oranların dışına çıktığında, dekontaminasyon işleminin tüm basamakları gözden geçirilmelidir.
- Kontaminasyon oranının **yüksek** olması, işlemin yetersiz olduğunun göstergesidir.
 - Dekontaminasyon süresini uzatmak yerine NaOH final konsantrasyonunun %4'e kadar arttırılması önerilir.
 - Örneklerin laboratuvara ulaştırılması için geçen süre uzadığında (birkaç gün) kontaminasyon oranı artabilir.
- Kontaminasyon oranının **düşük** olması; dekontaminasyon işleminin fazla olduğunun göstergesidir.
 - Konsantrasyon düşürülmeli veya işlem süresi kısaltılmalıdır.

Uyarı! – Örnek alımından kaynaklanabilecek yanlış pozitiflikler

- *Musluk suyundaki saprofit TDM'ler, mikroskopik incelemede ve kültürde yabancı pozitif sonuçlara yol açabilir;*
 - *Tuzlu su hazırlarken,*
 - *Bronkoskopi işlemi sırasında,*
 - *Nebulizatör, bronkoskop ve benzeri örnek almada kullanılan malzemeleri dezenfekte ederken musluk suyu kullanılmamalı*
- *Örnek kapları musluk suyu ile temas etmemelidir.*
- *AMS örneklerinde sıklıkla saprofit mikobakteriler bulunabileceği için, hastalardan mümkünse öncelikle uyarılmış balgam elde etmeye çalışılmalıdır.*
- *Bronkoskopi yapılan daha önceki hastalardan çapraz kontaminasyonu önlemek için, bronkoskopların temizliği ve dezenfeksiyonuna özen gösterilmelidir.*
- *İdrar örneklerinde saprofit mikobakterilerin bulunabileceği akılda tutulmalıdır.*

Tanı Akış Diyagramı



Ekler

Ek-1 Örnek / kültür gönderme yönergesi

Klinik örnek paketlenme ve gönderme

Klinik örnekler “**biyolojik materyal**” taşıma kurallarına uygun gönderilmelidir. Buna göre;

- Birincil kap (klinik örnek tüpü) ve ikincil kap sızdırmaz nitelikte olmalıdır.
- Klinik örnek tüpünün ağzı sıkıca kapatılmalı ve kendinden fermuarlı naylon poşete konulmalıdır.
- Her bir klinik örnek tüpü, yeterince absorban madde (gazlı bez, kâğıt havlu, süzgeç kâğıdı vb.) bulunan ikincil kabın içerisine kapağı üst tarafa gelecek şekilde dik olarak konmalıdır.
- Ya ikincil kap ya da dış kap mutlaka sert (fiber, kalın mukavva, köpük vb.) olmalıdır.
- İkincil kabın kapağı kapatıldıktan sonra dış kabın içerisine konmalıdır.
- Klinik örneklerle ait ‘içerik listesi’ şeffaf dosya içinde ikincil kap ile dış kap arasına konmalı ve dış kabın kapağı kapatılmalıdır.
- Birincil veya ikincil kap 95 kPa basınç testinden geçmiş ve dış kap en az 1,2 m’den düşmeye dayanıklı özellikte olmalıdır.
- Dış kabın üzerinde (i) gönderici adı ve adresi; (ii) alıcı adı ve adresi; (iii) uygun gönderi adı (“Biyolojik madde, Kategori B”); ve (iv) UN kod numarası (UN3373) bulunmalıdır (bkz. Şekil 1).

Biyogüvenlik Uyarısı!

- **Eldiven ve önlüğünüzü giyiniz!**
- **İkincil ve dış kabı kirletmediğinizden emin olunuz.**

Üremiş kültür paketlenme ve gönderme

Tüberküloz izolatları, “**enfeksiyöz materyal**” taşıma kurallarına uygun gönderilmelidir. Buna göre;

- Birincil kap (kültür tüpü) ve ikincil kap sızdırmaz nitelikte olmalıdır.
- Kültür tüpünün ağzı sıkıca kapatılmalı ve kendinden fermuarlı naylon poşete konulmalıdır. Sıvı kültür gönderilecekse poşetin içerisine emici malzeme konulmalıdır.
- Birincil kap, kapağın kapatma yönünün tersi yönde Parafilm veya elektrik bandı ile bantlanmalıdır.
- Her bir tüp, absorban madde (gazlı bez, kâğıt havlu, süzgeç kâğıdı vb.) bulunan ikincil kabın içersine kapağı üst tarafa gelecek şekilde dik olarak konulmalıdır.
- İkincil kap, kapağı kapatıldıktan sonra üçüncü kabın içerisine konulmalı ve suşlara ait ‘içerik listesi’ şeffaf dosyaya konularak kapağı kapatılmalıdır.
- Dış kap mutlaka sert olmalıdır. Ayrıca bu kap 95 kPa’da basınç testi, 9 m’den düşme testi, 7 kg’da yırtılma testi ve istifleme testinden geçmiş, bu testlerden geçtiği Birleşmiş Milletler’in (UN) spesifikasyon belirteci (“U/N specification marking”) ile belgelenmiş olmalıdır.
- Dış kabın üzerinde (i) gönderici adı ve adresi; (ii) alıcı adı ve adresi; (iii) acil durumlar için gönderiden sorumlu kişinin adı ve telefon numarası; (iv) uygun gönderi adı (“enfeksiyöz materyal, insanları etkiler”) (v) UN kod numarası (UN2814); (vi) enfeksiyöz materyal etiketi (üzerinde “biyotehlike” sembolü bulunan ve Kategori numarası yazılı olan eşkenar dörtgen) ve; (vii) paketin U/N spesifikasyon belirteci bulunmalıdır (bkz. Şekil 2).

Biyogüvenlik Uyarısı!

- **Eldiven ve önlüğünüzü giyiniz!**
- **Solunum maskenizi takınız!**
- **Biyogüvenlik kabini kullanınız!**
- **İkincil ve dış kabı kirletmediğinizden emin olunuz.**

Ek-2 NALC-NaOH uygulama yönergesi

Malzeme

- %4 NaOH (500 mL)
- %2,9 sodyum sitrat dehidrat veya %2,6 sodyum sitrat anhidroz (500 mL)
- NALC (5 gr)
- pH 6,8 fosfat tampon / steril distile su
- 50 mL'lik burgu kapaklı, konik tabanlı, polipropilen yapıda steril tek kullanımlık tüp
- 3 mL'lik dereceli tek kullanımlık, steril pastör pipeti
- 100-200-500-1000 mL hacimli, burgu kapaklı, kapak dahil otoklavlanabilir şişeler
- 10-20 mL'lik burgu kapaklı şişeler
- 50 mL'lik tüpün yerleştirilmesine uygun mümkünse soğutmalı santrifüj cihazı
- Vorteks cihazı

Biyogüvenlik Uyarısı!

- **Eldiven ve önlüğünüzü giyiniz!**
- **Biyogüvenlik kabinini kullanınız!**

Uygulama

- %4 NaOH ve %2,9 sodyum sitrat dehidrat veya %2,6 sodyum sitrat anhidroz solüsyonları karıştırılarak steril edilir ve saklanır (NaOH final konsantrasyonu %2'dir).
- Kullanmadan önce NALC eklenir. Karışım 24 saatten fazla kullanılmaz.
- Kalıcı bir kalem ile 50 mL'lik plastik tüp üzerine örneğin numarası yazılır.
- 5-10 mL örnek veya konsantre edilmiş örnek tüplere konur.
- Üzerine eşit hacimde NALC-NaOH karışımı ilave edilir.
- Tüplerin ağızları sıkıca kapatılır ve 5-20 saniye vortekslenir.
- Dekontaminasyon için tüpler, 20-25°C'de 15 dk dik konumda bekletilir.
- Bekleme süresinde tüpler ara sıra el ile çalkalanır veya mümkünse mekanik karıştırıcıda çalkalanır.
- Tüpler, üzerindeki 50 mL işareti kadar fosfat tampon çözeltisi veya distile su ile doldurulur.
- Karışım vortekslenir.
- Tüpler, 3000 × g'de 15 dk santrifüj edilir.
- Üst sıvı, uygun bir dezenfektan içeren atık kabına dikkatli bir şekilde dökülür.
- Çökelti üzerine 1-2 mL fosfat tampon solüsyonu veya %0,85 NaCl çözeltisi eklenir.
- Hazırlanan karışım lama yayılır ve uygun besiyerlerine ekilir.

Ek-3 NaOH (Petroff) uygulama yönergesi

Malzeme

- Steril % 2-4 NaOH
- pH 6,8 fosfat tampon / steril distile su
- Fenol kırmızısı indikatörü
- 2N HCl
- 50 mL'lik, burgu kapaklı, konik tabanlı, polipropilen yapıda steril tek kullanımlık tüpler
- 3 mL'lik dereceli tek kullanımlık, steril pastör pipeti
- 100-200-500-1000 mL hacimli, burgu kapaklı, kapak dâhil otoklavlanabilir şişeler
- 10-20 mL'lik burgu kapaklı şişeler
- 50 mL'lik tüpün yerleştirilmesine uygun mümkünse soğutmalı santrifüj cihazı
- Vorteks cihazı

Biyogüvenlik Uyarısı!

- **Eldiven ve önlüğünüzü giyiniz!**
- **Biyogüvenlik kabinini kullanınız!**

Uygulama

- Kalıcı bir kalem ile 50 mL'lik plastik tüp üzerine örneğin numarası yazılır.
- 5-10 mL örnek veya konsantre edilmiş örnek tüplere konur.
- Üzerine eşit hacimde % 2-4 NaOH çözeltisi ilave edilir.
- Tüplerin ağızları sıkıca kapatılır ve 5-20 saniye vortekslenir.
- Dekontaminasyon için tüpler, 20-25°C'de 15 dk dik konumda bekletilir.
- Bekleme süresinde tüpler ara sıra el ile çalkalanır veya mümkünse mekanik karıştırıcıda çalkalanır.
- Tüpler, üzerindeki 50 mL işareti kadar fosfat tampon çözeltisi veya distile su ile doldurulur.
- Karışım vortekslenir.
- Tüpler, 3000 × g'de 15 dk santrifüj edilir.
- Üst sıvı, uygun bir dezenfektan içeren atık kabına dikkatli bir şekilde dökülür.
- Çökelti üzerine birkaç damla fenol kırmızısı indikatörü damlatılır.
- İndikatör sarıya dönünceye kadar 2N HCl çökeltinin üzerine damla damla ilave edilir, her damladan sonra tüp çalkalanır.
- Çökelti üzerine 1-2 mL fosfat tampon solüsyonu veya %0,85 NaCl çözeltisi eklenir.
- Hazırlanan karışım lama yayılır ve uygun besiyerlerine ekilir.

Ek-4 Oksalik asit uygulama yönergesi

Malzeme

- % 5 oksalik asit
- % 4 NaOH çözeltisi
- % 0,85 NaCl çözeltisi
- Fenol kırmızısı indikatörü
- 50 mL'lik, burgu kapaklı, konik tabanlı, polipropilen yapıda steril tek kullanımlık tüpler
- 3 mL'lik dereceli tek kullanımlık, steril pastör pipeti
- 100-200-500-1000 mL hacimli, burgu kapaklı, kapak dahil otoklavlanabilir şişeler
- 10-20 mL'lik burgu kapaklı şişeler
- 50 mL'lik tüpün yerleştirilmesine uygun mümkünse soğutmalı santrifüj cihazı
- Vorteks cihazı

Biyogüvenlik Uyarısı!

- **Eldiven ve önlüğünüzü giyiniz!**
- **Biyogüvenlik kabinini kullanınız!**

Uygulama

- Kalıcı bir kalem ile 50 mL'lik plastik tüp üzerine örneğin numarası yazılır.
- 5-10 mL örnek veya konsantre edilmiş örnek tüplere konur.
- Üzerine eşit hacimde oksalik asit çözeltisi ilave edilir.
- Tüplerin ağzları sıkıca kapatılır ve 30 saniye vortekslenir.
- Dekontaminasyon için tüpler, 20-25°C'de 20-30 dk dik konumda bekletilir.
- Bekleme süresinde tüpler ara sıra el ile çalkalanır veya mümkünse mekanik karıştırıcıda çalkalanır.
- Tüpler, üzerindeki 50 mL işareti kadar % 0,85 NaCl çözeltisi ile doldurulur.
- Karışım vortekslenir.
- Tüpler, 3000 × g'de 15 dk santrifüj edilir.
- Üst sıvı, uygun bir dezenfektan içeren atık kabına dikkatli bir şekilde dökülür.
- Çökelti üzerine birkaç damla fenol kırmızısı indikatörü damlatılır.
- Çökelti soluk pembeye dönüncüye kadar % 4'lük NaOH çökeltinin üzerine damla damla ilave edilir, her damladan sonra tüp çalkalanır.
- Hazırlanan karışım lama yayılır ve uygun besiyerlerine ekilir.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesinde (UTTR-2 [Bölüm 2] Örnek Yönetimi) geçen bazı hususlar için daha ayrıntılı veya ilave bilgi için aşağıda listelenen UMS belgelerine başvurunuz:

- UMS, UTTR-1 [Bölüm 1] Biyogüvenlik
- UMS, UTTR-3 [Bölüm 3] Mikroskopi
- UMS, UTTR-4 [Bölüm 4] Kültür

Kaynaklar

- 1 World Health Organization. Services in tuberculosis control culture. Part III. WHO, Geneva. 1998. <http://wwwn.cdc.gov/dls/ila/documents/lstc3.pdf>
- 2 Soolingen DV, Jarlier V, Drobniewski F. Information for physicians: The laboratory diagnosis of tuberculosis-first steps. In: *Mastering the Basics of TB Control: Development of a Handbook on TB Diagnostic Methods*. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control Technical Report. 2011, p. 96-99. http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1105_TER_Basics_TB_control.pdf
- 3 CLSI. Laboratory detection and identification of *Mycobacteria*. Approved Guideline. CLSI document M48-A, Vol. 28, No. 17, Pennsylvania. 2008.
- 4 Pfyffer GE. *Mycobacterium*: General characteristics, laboratory detection, and staining procedures. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed, ASM Pres, Washington, D.C. 2007, p. 543-72.
- 5 Della-Latta P, Weitzman I. Mycobacteriology, In: Isenberg HD (ed). *Essential Procedures for Clinical Microbiology*. ASM, Washington, D.C. 1998, p. 171-202.
- 6 Tuberculosis – Information for Health Care Providers. 4th ed., Ontario Lung Association. 2009 <http://www.on.lung.ca/document.doc?id=475>
- 7 Ceyhan İ. Tüberkülozda Bakteriyolojik Tanı. Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, Ankara, 2007.
- 8 Tüberküloz Tanı ve Tedavi Rehberi. Başak Ltd. Şti., Ankara, 2011. <http://www.verem.org.tr/pdf/tum-kitap.pdf>
- 9 Tüberküloz. Toraks Kitapları, Türk Toraks Derneği, Sayı: 11, Aves Yayıncılık, İstanbul, 2010. <http://www.toraks.org.tr/uploadFiles/book/file/79201116497-TUBERKULOZ.pdf>
- 10 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmî Gazete 25.09.2010 – 27710.



ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

ULUSAL TÜBERKÜLOZ TANI REHBERİ (UTTR)

Mikroskopi

Hazırlayan Birim	Tüberküloz Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Tüberküloz
Bölüm	Mikroskopi
Standart No	UTTR-3
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2014
Geçerlilik tarihi	01.01.2016

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ	3
MİKROSKOPİ - TEKNİK BİLGİLER	3
1 Temel prensip	3
2 Yöntem çeşitleri ve avantaj-dezavantajları	3
3 Mikroskopi için asgari laboratuvar koşulları	4
4 Yayma hazırlama ve boyama	5
5 Sonuçların değerlendirilmesi ve raporlama	5
6 Saklama	6
7 Kalite kontrol	7
8 Olası sorunlar/kısıtlılıklar	10
TANI AKIŞ DİYAGRAMI	11
EKLER	12
Ek-1 Yayma hazırlama yönergesi	12
Ek-2 EZN boya çözeltisi hazırlama yönergesi	13
Ek-3 Kinyoun boya çözeltisi hazırlama yönergesi	14
Ek-4 Auramine-O boya çözeltisi hazırlama yönergesi	15
Ek-5 Auramine-Rhodamine boya çözeltisi hazırlama yönergesi	16
Ek-6 Karbol fuksin boyama yönergesi	17
Ek-7 Florokrom boyama yönergesi	18
Ek-8 Yayma inceleme yönergesi	19
Ek-9 Laboratuvar kalite göstergeleri	20
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ	22
KAYNAKLAR	22

"Karanlığa ışık tutanlara..."

Kapsam ve Amaç

Bu Rehberin amacı; tüberkülozun hızlı tanısında kullanılan ucuz ve basit bir yöntem olan mikroskopinin standartlara uygun yapılmasının sağlanmasıdır. Bu Bölüm, tüberküloz laboratuvarlarında örneğin yaymasının hazırlanması, boyanması ve mikroskopik değerlendirme sürecini kapsamaktadır.

Mikroskopi - Teknik Bilgiler

Mikroskopik inceleme hem tanı amacıyla, hem de tedavi alan hastaların izleminde kullanılan hızlı, basit, ucuz ve kolay bir yöntemdir. Yöntemin özgülüğü yüksek olmasına karşın, duyarlılığı örneğin türü ve kalitesine, içerdiği bakteri miktarına, uygulanan tekniğe, uygulama ve değerlendirme yapanların deneyimine bağlı olarak %20 ila 85 arasında değişmektedir. Mikroskopik incelemede ARB pozitifliğini saptayabilmek için yayma yapılan örneğin mililitresinde 5.000-10.000 bakteri bulunması gerekmektedir. Tüberküloz şüphesi ile gelen tüm örneklerle, mikroskopinin duyarlılığının düşük olması ve ilaç duyarlılık testi yapılabilmesi için mutlaka altın standart olan kültür işlemi uygulanmalıdır.

1 Temel prensip

Mikobakteriler hücre duvarlarındaki yoğun lipidlerin kazandırdığı hidrofobik özellik nedeniyle suda çözünen boyalarla zor boyanırlar. Mikobakterilerin boyanabilmesi için; boyanın suda kolay eriyen fenol gibi organik bir madde içinde eritilmesi gerekmektedir. Mikobakteriler hücre içine aldıkları boyayı asit-alkol çözeltisi ile bırakmadıkları için "aside dirençli bakteri (ARB)" olarak adlandırılır. Tüberkülozun erken tanısında, mikroskop ile örnekte ARB varlığının aranması, her düzey tanı laboratuvarında uygulanabilen bir yöntemdir.

2 Yöntem çeşitleri ve avantaj-dezavantajları

Mikobakterilerin mikroskopik tanısında 2 farklı boyama yöntemi kullanılır.

- Karbol fuksin yöntemleri
 - Erlich Ziehl-Neelsen (EZN)
 - Kinyoun
- Florokrom (floresan) yöntemleri (Auramin O, auramin-rhodamin)

Rutinde tanı amaçları için en sık karbol fuksinli boyama yöntemleri tercih edilmekle birlikte, daha duyarlı ve hazırlanan preparatların daha hızlı taranmasını sağlayan florokrom boyalar da kullanılmaktadır. Florokrom boyama yöntemleri ile mikroskopta daha küçük objektiflerle* daha geniş alan taranır; böylece preparatın taranması için gereken süre yaklaşık olarak onda bire düşer.

Çok sayıda hasta örneğinin incelendiği laboratuvarlarda florokrom boyama

* Küçük objektifler 25× ve 40× objektiflerdir. 10× oküler ile kullanıldığında ×250 ve ×400 büyütme elde edilir.

yöntemlerinin kullanılması önerilir.

Boyama yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Boyama yöntemlerinin karşılaştırılması

		Karbolfuksin boyama		Florokrom boyama
		EZN	Kinyoun	Auramin O / Auramin-rhodamin
Boyama	Bazik fuksin konsantrasyonu	%0,3	%3,3	yok
	Fenol konsantrasyonu	%4,5	%6,7	%3
	Isıtma	var	yok	yok
Mikroskopi	Büyütme	×1000*	×1000*	×250 - ×400
	Görünüm	Mavi zeminde kırmızı basil	Karanlık zeminde sarı / turuncu flüoresans veren basil	
	Göreceli duyarlılık	Orta	Düşük	Yüksek
	Göreceli özgüllük	Yüksek	Orta	Düşük**

* ×1000 büyütme = 100× objektif (yağlı) X 10× oküler

** Yalancı pozitiflik olasılığı nedeniyle EZN yöntemiyle doğrulanmalıdır.

3 Mikroskopi için asgari laboratuvar koşulları

3.1. Laboratuvar güvenliği önlemleri

Şüpheli örneklerin incelenmesinde bütün süreçlerde kişisel koruyucu donanım (KKD) olarak eldiven ve önlük giyilmelidir (Tablo 2).

Tablo 2. Mikroskopi ve boyama işlemleri sırasında alınması gereken önlemler

		Laboratuvar tasarımı		Laboratuvar donanımı		Kişisel koruyucu donanım		
		Havalandırma	Laboratuvar giriş sınırlaması	BGK	Otoklav	Eldiven	Önlük	Maske
Hazırlık	Boya çözeltisi hazırlama	Doğal / çekercokak		-	-	✓	✓	-
	Besiyeri hazırlama	-	BGD-2 işaretli giriş sınırlaması	-	✓	✓	✓	-
	Vorteksleme			✓				
	Santrifüjleme			-				
Yayma hazırlama	Direkt örnekten	Doğal havalandırma	BGD-2 işaretli giriş sınırlaması	Opsiyonel	Opsiyonel	✓	✓	Opsiyonel
	İşlenmiş örnekten	Saatte 6-12 hava değişimi		✓				
Mikroskopi	Boyama	Doğal havalandırma	BGD-2 işaretli giriş sınırlaması	-	-	✓	✓	-
	Yayma inceleme							

Ayrıntılı bilgi “UTTR-1 Biyogüvenlik” başlığı altında verilmiştir.

3.2. Gerekli donanım

- Işık mikroskobu (binoküler) – 10× veya 25× (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.
- Floresan mikroskobu (opsiyonel) – Objektifleri ve oküleri ışık mikroskopunda önerildiği gibi
- Preparat kurutucu (opsiyonel)
- Boya sehpa
- Bunsen beki veya mikroinsineratör

4 Yayma hazırlama ve boyama

Aside dirençli basil aranması için yayma direkt veya işlenmiş örnekten hazırlanabilir (bkz. Ek-1 Yayma hazırlama yönergesi). Yaymaların hangi yöntem ile boyanacağı laboratuvarın günlük yayma sayısı, personel sayısı ve laboratuvar donanımı varlığına göre belirlenebilir (Ek-2'den Ek-7'ye kadar "Boya çözeltileri hazırlama" ve "Boyama" yönergeleri).

Uzman Görüşü - Yayma hazırlama

Aside dirençli basilin görülme şansını arttırmak amacı ile uygun biyogüvenlik koşulları ve donanım (santrifüj) varlığında, işlenmiş örnekten yayma hazırlanması önerilmektedir.

5 Sonuçların değerlendirilmesi ve raporlama

Değerlendirme;

- Preparatlar tamamen kurumadan incelenmemelidir.
- Bir preparata negatif diyebilmek için; ışık mikroskobu ile en az 300 alan, floresan mikroskop ile $\times 250$ büyütmede en az 30, $\times 400$ büyütmede en az 70 alan incelenmelidir.
- İncelemeyi yapan kişi tecrübeli olmalı, gerek görülüyorsa pozitif yaymalar ikinci bir göz tarafından kontrol edilmelidir.
- Ayrıca hatalı değerlendirme yapılmaması için bir günde karbol fuksin ile boyanmış 30'dan fazla yayma bakılmamalıdır.



Şekil 1. EZN boyama

Yayma değerlendirmesi yarı kantitatif olarak Tablo 3'te tanımlandığı gibi yapılır.

Yaymaların incelenmesi için ayrıca bkz. Ek-8

Tablo 3. Yaymaların değerlendirme kriterleri

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

Raporlama;

- Yayma sonuçları mümkünse aynı gün, en geç 24 saat içinde ilgili birime bildirilmelidir.
- Florokrom yöntemleri ile saptanan pozitifliklerin EZN boyama yöntemi ile doğrulandıktan sonra raporlanması gerekmektedir.
- Yayma pozitifliği *M. tuberculosis* olarak verilmemeli, derecesine göre "ARB pozitifliği" olarak raporlanmalıdır.

Uyarı! - Yayma sonuçlarının raporlanması

- Pozitif yayma sonuçları en geç 24 saat içerisinde raporlanmalıdır.
- Tüm pozitif sonuçlar ilgili hekime ve İl Halk Sağlığı Müdürlüğüne hemen bildirilmelidir.

6 Saklama

İnceleme bittikten sonra yaymalar organik bir yağ çözücü yardımıyla immersiyon yağından arındırılmalıdır. Bunun için;

- Yaymalar ksilol bulunan bir kaba birkaç kez daldırılıp çıkarılmalı,
- Süzülmesi ve kuruması için uygun bir yere dik bir şekilde yaslanmalıdır.

Preparatlar tamamen kuruduktan sonra saklama kaplarına alınmalıdır.

- Preparat saklama kutuları içinde düzenli bir şekilde (tarih veya laboratuvar protokol numarasına göre) en az kültür sonucu çıkana kadar saklanmalıdır.

7 Kalite kontrol

7.1. İç kalite kontrol

Yaymanın hazırlanmasının kontrolü için;

- Kurutulmuş, tespit edilmiş boyanmamış bir yayma bir kitap sayfasının önüne tutulur.
- Yaymanın arkasındaki yazılar rahatlıkla okunabiliyorsa yayma uygun kalınlıkta demektir.

Boyamanın kalite kontrolü her boyamada ve yeni lotta;

- bir **negatif kontrol** (*Escherichia coli* / negatif olduğu bilinen hasta yayması),
- bir **pozitif kontrol** (*M. tuberculosis* H37Ra ATCC 25177 / *M. gordonae* / pozitif olduğu bilinen hasta yayması) kullanılır.

Kontrol preparatları hasta örneklerinden önce incelenir.

- Beklenen sonuçların uyumsuz olması işlemde bir sorun olduğunu gösterir.
- Zeminin tam olarak renksizleşmemesi ve/veya kırmızımsı görünmesi de kalite sorununa işaret eder.
- Kontrollerde sorun olduğunda örnekler raporlanmaz, problem çözüldüğünde örnekler yeniden değerlendirilir.

Laboratuvar donanımının kalite kontrolü kapsamında mikroskopların bakım ve kalibrasyonları periyodik olarak yapılmalıdır.

Yaymaların değerlendirilmesi sırasında oluşabilecek yalancı pozitiflik nedenleri ve olası çözüm önerileri Tablo 4'te, yalancı negatiflik nedenleri ve olası çözüm önerileri Tablo 5'de verilmiştir.

Uyarı! - Mikroskopide kalite göstergeleri

Mikroskopik hata kaynaklarını saptayabilmek için değerlendirme sonuçları periyodik olarak gözden geçirilmelidir. Şu durumlar mikroskopide bir sorun olabileceğinin göstergeleridir:

- Pozitif ya da negatif yayma sayısının beklenen orandan yüksek olması
- Farklı hastalara ait ardışık yayma pozitifliği
- Yayma pozitif örneklerin kültürde ürememesi
- Yayma negatif örneklerin kültürde yoğun olarak üremesi

Ayrıntılı bilgi için bkz. Ek-9. Laboratuvar kalite göstergeleri

7.2. Dış Kalite Değerlendirme

Mikroskopik incelemede laboratuvarın yetkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla ulusal veya uluslararası bir Dış Kalite Değerlendirme programına katılması gerekir.

Bu amaçla Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı tarafından düzenlenen Dış Kalite Değerlendirme programına katılım sağlanabilir.

Tablo 4. Mikroskopide **yalancı pozitiflik** nedenleri ve öneriler

Kaynak	Olası Neden	Çözüm Önerisi
Örnek	Yanlış etiketleme nedeniyle pozitiflik	<i>Etiketlemeyi kontrol edin, teknik personele ve örnek kabul birimine eğitim verin</i>
	Örneğin niteliği nedeniyle saprofit TDM'lerin bulunma ihtimali	<i>AMS ve idrar örneklerinde saprofit TDM'lerin bulunabileceğini unutmayın</i>
	Bronkoskop dezenfeksiyonunun uygun yapılmaması nedeniyle kontamine olmuş örnek	<i>Bronkoskop dezenfeksiyonunu uygun yapın, Enfeksiyon Kontrol Komitesine haber verin</i>
	Musluk suyunda bulunabilecek saprofit TDM'ler ile kontaminasyon	<i>İndükte balgam için hazırlanan tuzlu su ya da nebulizatörün dezenfeksiyonu sırasında musluk suyu kullanmayın</i>
	Yemek artıkları	<i>Yeni örnek isteyin, örnek, ağız iyice çalkalandıktan sonra verilsin</i>
	Çalışma bankoları, BGK, distile su cihazlarının kontaminasyonu	<i>Düzenli olarak çalışma ortamı ve donanımı dekontamine edin, teknik personele eğitim verin</i>
Yayma	Yanlış etiketleme nedeniyle pozitiflik	<i>Etiketlemeyi kontrol edin, teknik personele eğitim verin</i>
	Kullanılmış lamaların tekrar kullanılması	<i>Yeni ve temiz lam kullanın</i>
Boyama	Boyaların / tamponların kontaminasyonu	<i>Tamponlara sterilite kontrolünü yapın, saprofit TDM'ler ile bulaşı engellemek için çözeltilerin hazırlanması sırasında musluk suyu kullanmayın</i>
	Boya artıkları	<i>Taze boya hazırlayın ve her kullanımda boyaları süzün</i>
	Boyama işlemi sırasında çapraz bulaş	<i>Boyama tezgahı kullanın, işlemler sırasında preparatları birbirine temas ettirmeyin ve bir seferde en fazla 12 lamı boyayın, teknik personele eğitim verin</i>
	Yetersiz renksizleştirme	<i>Yeniden renksizleştirme işlemi yapın, asit alkolü kontrol edin, teknik personele eğitim verin</i>
Değerlendirme	ARB (+) diğer yapılar	<i>Nocardia, Rhodococcus, Legionella micadei, Cryptosporidium kistleri, kist hidatik çengelleri, Isospora türlerinin ARB (+) boyanabileceğini unutmayın ve asit alkolü kontrol edin</i>
	İmmersiyon yağının çapraz bulaşı	<i>İmmersiyon yağını preparata değdirmeden damlatın</i>
	Mikroskop objektifinin kirlenmesi	<i>Her preparattan sonra objektifi temizleyin, personele mikroskop kullanma eğitimi verin</i>
	Yanlış okuma, skorum hatası	<i>Yaymaların %20'si deneyimli ikinci bir göz tarafından değerlendirilsin, personele eğitim verin</i>
Raporlama	Yanlış raporlama	<i>Sonuçları kontrol ederek onaylayın</i>

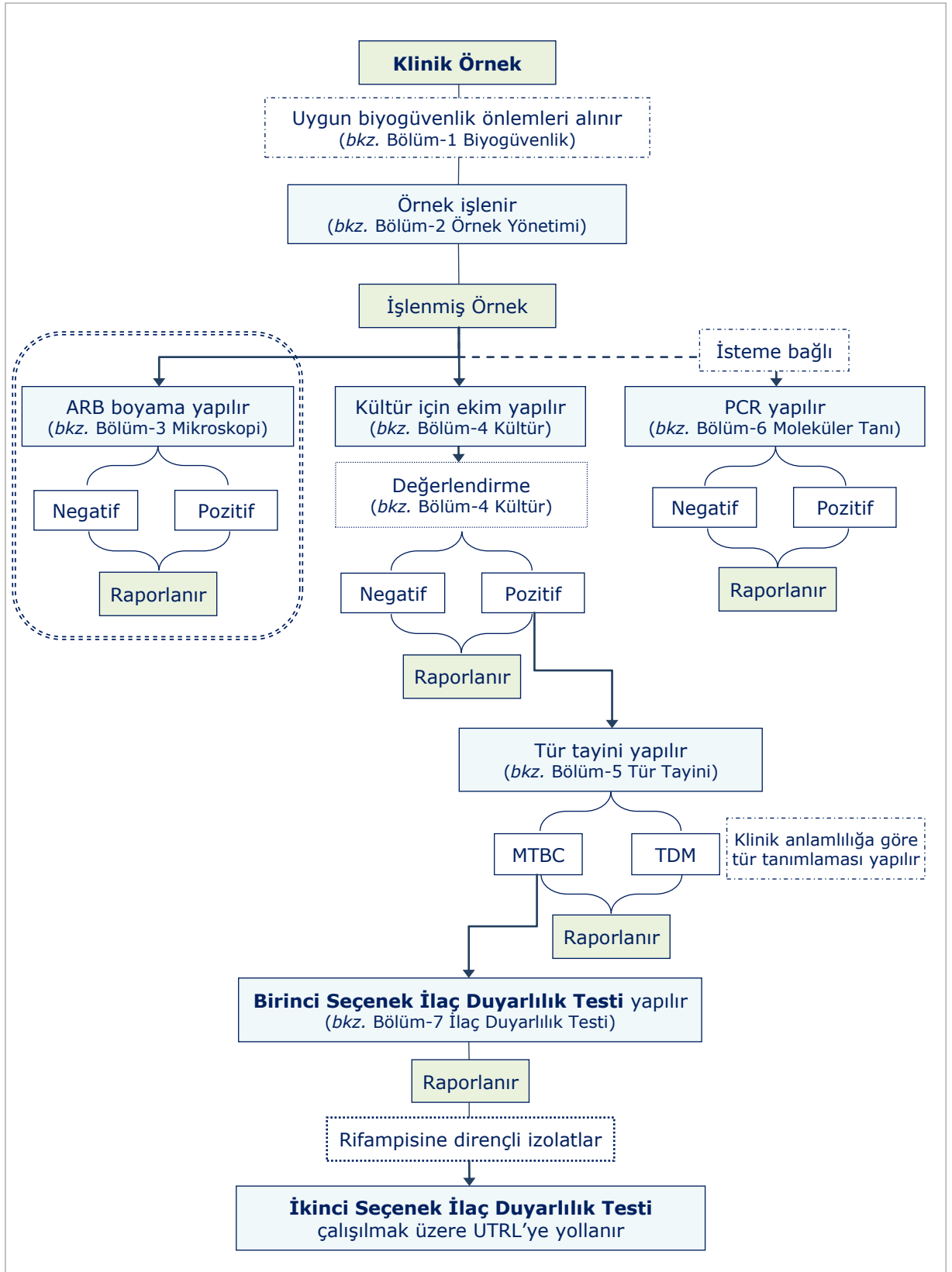
Tablo 5. Mikroskopide **yalancı negatiflik** nedenleri ve öneriler

Kaynak	Olası Neden	Çözüm Önerisi
Örnek	Yanlış etiketleme	<i>Etiketlemeyi kontrol edin, teknik personele ve örnek kabul birimine eğitim verin</i>
	Yetersiz kalite ve/veya hacimde örnek	<i>Her örneğe uygun miktar ve hacimde örnek isteyin, istem yapanlara örnek alımı ile ilgili eğitim verin</i>
	Yetersiz homojenizasyon sonucu yayma alanına basil düşmemesi	<i>İşlem basamaklarını kontrol edin (bkz. Örnek Yönetimi)</i>
Yayma	Yanlış etiketleme	<i>Etiketlemeyi kontrol edin, teknik personele eğitim verin</i>
	Örneğin niteliksiz kısmından yayma hazırlanması	<i>Teknik personele eğitim verin</i>
	Çok ince veya çok kalın hazırlanmış yayma	<i>Örneğin işlenmesini dikkatle yapın ve yaymayı uygun kalınlıkta hazırlayın, eğitim verin</i>
	Yayma alanının çok geniş olması	<i>Yeniden yaymayı 1 × 2 cm² olarak hazırlayın</i>
Boyama	Boyaların son kullanma tarihinin geçmesi, yanlış saklama koşulları	<i>Stok takibi yapın, saklama koşullarını gözden geçirin, sorumlu belirleyin</i>
	Tespit süresi ve sıcaklığın uygun olmaması	<i>Tespit süre ve sıcaklığını kontrol edin</i>
	Slayt ısıtıcısının ısısının yanlış olması	<i>Isıtıcıyı 65-75°C'ye ayarlayın, kullanım öncesi sıcaklığı kontrol edin</i>
	Uygunsuz boyama (boyanmamış veya zayıf boyanmış basiller)	<i>Boyama basamaklarını kontrol edin. Florokrom boyama yapılıyorsa yaymaları UV veya güneş ışığından uzak tutun, gecikmeden inceleyin. Kültürün eskimesine bağlı olabilir, taze pasajdan inceleme yapın</i>
Değerlendirme	Uygun olmayan mikroskop	<i>Mikroskop bakım ve kullanımını kontrol edin</i>
	Yanlış okuma, skrolama hatası	<i>Yaymaların %20'si deneyimli ikinci bir göz tarafından değerlendirilsin, personele eğitim verin</i>
Raporlama	Yanlış raporlama	<i>Sonuçları kontrol ederek onaylayın</i>
	Mikroskop objektifinin kirlenmesi	<i>Her preparattan sonra objektifi temizleyin, personele mikroskop kullanım eğitimi verin</i>
	Yanlış okuma, skrolama hatası	<i>Yaymaların %20'si deneyimli ikinci bir göz tarafından değerlendirilsin, personele eğitim verin</i>

8 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- ARB boyama;
 - Negatif sonuç hastanın tüberküloz olmadığı anlamına gelmez.
 - MTBC/TDM ayrımı yapmaz.
 - Canlı ölü basil ayrımı yapmaz.
 - Duyarlı/dirençli ayrımı yapılamaz.
- Florokrom boyama yöntemi;
 - Floresan mikroskop gereksinimi vardır.
 - Floresan boyanın solması nedeniyle kısa sürede değerlendirilmelidir.
 - Boyamada kullanılan Auromin O gibi florokrom boyalar kanserojendir.
 - Yalancı pozitiflik olasılığı nedeniyle pozitif örneklerin EZN boyama yöntemi ile doğrulanması gerekir.

Tanı Akış Diyagramı



Ekler

Ek-1 Yayma hazırlama yönergesi

Malzeme

- Asetat kalem / kurşun kalem
- Rodajlı lam
- Steril öze
- Steril plastik pastör pipeti
- Penset
- Kağıt havlu
- Preparat kurutucu / bunsen beki

Biyogüvenlik Uyarısı!

- **Eldiven ve önlüğünüzü giyiniz!**

Yönerge

- Yeni ve temiz rodajlı lam alınır.
- Boyama sırasında silinmeyecek bir kalem ile (kurşun kalem ideal) lamın rodajlı kısmına örnek numarası yazılır.
- Örnek, işlem görmüş olup olmamasına göre iki farklı şekilde lama aktarılır.
 - İşlem görmüş örnekte çökeltiden Pastör pipeti ile 1-2 damla (40-50 µL), lamın ortasında yaklaşık 1 x 2 cm'lik alan içinde dairesel hareketler ile yayılır.
 - İşlem görmemiş örneğin mukoid ve pürülan kısımlarından steril öze kullanılarak lamın ortasında yaklaşık 1 x 2 cm'lik alan içinde dairesel hareketler ile yayılır.
 - Hazırlanan yaymalar havada bekletilerek kurutulur.
 - Kurutma işlemi tamamlanan yaymalar açıkta bekletilmemelidir.
- Kurumuş yaymaların lama tespit edilmesinde iki farklı yöntem kullanılabilir.
 - Elektrikli preparat kurutucusunda 65-75°C'de en az 2 saat bekletilir.
 - Bunsen bekinde* alevden geçirme işlemi için;
 - Preparatlar penset ile tutulur.
 - Bekin mavi alev kısmından 3-4 defa yavaşça yayma üstte kalacak şekilde geçirilir.
 - Kurutulmuş, tespit edilmiş, boyanmamış bir yayma kitap sayfasının önüne tutulduğunda yaymanın arkasındaki yazılar rahatlıkla okunabiliyorsa yayma uygun kalınlıkta demektir.

* Bunsen beki ile kurutma biyolojik risk oluşturmaya nedeniyle önerilmemektedir. Bunsen bekinin kullanılması durumunda mutlaka solunum maskesi takılmalıdır.

Ek-2 EZN boya çözeltisi hazırlama yönergesi

Malzeme	Çözeltilerin hazırlanması
Karbol fuksin çözeltisi Çözelti A Bazık fuksin 0,3 g %95'lik etanol 10 mL Çözelti B Kristalize fenol 5 g Distile su 100 mL	Çözelti A - Bazık fuksin bir havana konur. - Üzerine etil alkol azar azar ilave edilerek ezilir. Çözelti B - Kristalize fenol, küçük bir balon içinde, su banyosunda eritilir. - Sıvı fenol yaklaşık 45°C iken üzerine yavaşça distile su eklenir, iyice karışması sağlanır. Karbol fuksin çözeltisi 10 mL çözelti A, 90mL çözelti B ile karıştırılır. - Koyu renkli bir şişeye aktarılır. - İyice çalkalanarak homojenize edilir. - Kullanılmadan önce oda ısısında en az 24 saat bekletilir, filtre kağıdından süzülerek kullanılır.
Asit alkol %95'lik etanol 97 mL Konsantre HCl 3 mL	- Konsantre HCl dikkatlice ve yavaş bir şekilde %90-95'lik alkol içerisine ilave edilir. Asla tersi uygulanmaz, alkol HCl içine eklenmez!
Metilen mavisi Metilen mavisi 0,3 gr Distile su 100 mL	- Distile su içerisinde metilen mavisi eritilir. - Koyu renkli bir şişeye aktarılır. - İyice çalkalanarak homojenize edilir.

Saklama

Hazırlanan boya çözeltileri koyu renk şişelerde etiketlenerek saklanır.

Etiketlerde çözelti adı, kimin tarafından ve ne zaman hazırlandığı ve kullanıma açılma tarihi belirtilir.

Bu şekilde oda ısısında ve güneş ışığından uzakta 6 ay saklanabilir.

Güvenlik uyarısı!

- Etanol parlayıcıdır! Alevden uzak tutulmalıdır.
- Su veya alkol **asla** asit üzerine **eklenmez!**
- Asitler sulandırılmak istendiğinde önce su (ya da alkol) ölçülmeli, asit **yavaş bir şekilde** üzerine eklenmelidir!

Ek-3 Kinyoun boya çözeltisi hazırlama yönergesi

Malzeme	Çözeltilerin hazırlanması
Karbol fuksin çözeltisi Çözelti A Bazik fuksin 4 g %95'lik etanol 20 mL Çözelti B Kristalize fenol 8 g Distile su 100 mL	Çözelti A - Bazik fuksin bir havana konur. - Üzerine etil alkol azar azar ilave edilerek ezilir. Çözelti B - Kristalize fenol, küçük bir balon içinde, su banyosunda eritilir. - Sıvı fenol yaklaşık 45°C iken üzerine yavaşça distile su eklenir, iyice karışması sağlanır. Karbol fuksin çözeltisi 10 mL çözelti A, 90mL çözelti B ile karıştırılır. - Koyu renkli bir şişeye aktarılır. - İyice çalkalanarak homojenize edilir. - Kullanılmadan önce oda ısısında en az 24 saat bekletilir, filtre kağıdından süzülerek kullanılır.
Asit alkol %95'lik etanol 97 mL Konsantre HCl 3 mL	- Konsantre HCl dikkatlice ve yavaş bir şekilde %90-95'lik alkol içerisine ilave edilir. Asla tersi uygulanmaz, alkol HCl içine eklenmez!
Metilen mavisi Metilen mavisi 0,3 gr Distile su 100 mL	- Distile su içerisinde metilen mavisi eritilir. - Koyu renkli bir şişeye aktarılır. - İyice çalkalanarak homojenize edilir.
Saklama Hazırlanan boya çözeltileri koyu renk şişelerde etiketlenerek saklanır. Etiketlerde çözelti adı, kimin tarafından ve ne zaman hazırlandığı ve kullanıma açılma tarihi belirtilir. Bu şekilde oda ısısında ve güneş ışığından uzakta 6 ay saklanabilir.	

Güvenlik uyarısı!

- Etanol parlayıcıdır! Alevden uzak tutulmalıdır.
- Su veya alkol **asla** asit üzerine **eklenmez!**
- Asitler sulandırılmak istendiğinde önce su (ya da alkol) ölçülmeli, asit **yavaş bir şekilde** üzerine eklenmelidir!

Ek-4 Auramine-O boya çözeltisi hazırlama yönergesi

Malzeme

Çözeltilerin hazırlanması

Auramine-O boya çözeltisi

Çözelti 1

Auramine-O* boyası 0,1 g
%95'lik etanol 10 mL

Çözelti 2

Kristalize fenol 3 g
Distile su 87 mL

Biyogüvenlik Uyarısı!

- **Eldiven ve önlüğünüzü giyiniz!**

Çözelti 1

- Auramine-O boyası etil alkol içinde eritilir.

Çözelti 2

- Kristalize fenol, küçük bir balon içinde, su banyosunda eritilir.
- Sıvı fenol yaklaşık 45°C iken üzerine yavaşça distile su eklenir, iyice karışması sağlanır.

Auramine-O boya çözeltisi

- Çözelti 1 ve çözelti 2 karıştırılır.
- Koyu renkli bir şişeye aktarılır.
- İyice çalkalanarak homojenize edilir.

Asit alkol

%95'lik etanol 99,5 mL
Konsantre HCl 0,5 mL

- Konsantre HCl dikkatlice ve yavaş bir şekilde %70'lik alkol içerisine ilave edilir.
- Asla tersi uygulanmaz

Karşıt boya

Potasyum permanganat 0,5 g
Distile su 100 mL

- Distile su içerisinde potasyum permanganat eritilir.
- Koyu renkli bir şişeye aktarılır.
- İyice çalkalanarak homojenize edilir

Saklama

Hazırlanan boya çözeltileri koyu renk şişelerde etiketlenerek saklanır.

Etiketlerde çözelti adı, kimin tarafından ve ne zaman hazırlandığı ve kullanıma açılma tarihi belirtilir.

Bu şekilde oda ısısında ve güneş ışığından uzakta 6 ay saklanabilir.

Güvenlik uyarısı!

* *Auromine-O ve Rhodamine B boyları **kanserojendir!** Hazırlanışı sırasında solunmamalı, boyama sırasında cilde temas etmemelidir.*

- Etanol parlayıcıdır! Alevden uzak tutulmalıdır.

Ek-5 Auramine-Rhodamine boya çözeltisi hazırlama yönergesi

Malzeme	Çözeltilerin hazırlanması
Auramine-Rhodamine boya çözeltisi Auromine-O* boyası 1,5 g Rhodamin B 0,75 g Gliserol 75 mL Sıvı fenol (ısıtılmış) 10 mL Distile su 50 mL	Çözelti 1 - Kristalize fenol, küçük bir balon içinde, su banyosunda eritilir. - Sıvı fenol yaklaşık 45°C iken üzerine yavaşça distile su eklenir, iyice karışması sağlanır. Auramine- Rhodamin boya çözeltisi - Çözelti 1 içine Auramine-O ve Rhodamin B boyası ilave edilerek karıştırılır. - Üzerine en son gliserol ilave edilir. - Koyu renkli bir şişeye aktarılır. - İyice çalkalanarak homojenize edilir.
Asit alkol %95'lik etanol 99,5 mL Konsantre HCl 0,5 mL	- Konsantre HCl dikkatlice ve yavaş bir şekilde %70'lik alkol içerisine ilave edilir. - Asla tersi uygulanmaz
Karşıt boya Potasyum permanganat 0,5 g Distile su 100 mL	- Distile su içerisinde potasyum permanganat eritilir. - Koyu renkli bir şişeye aktarılır. - İyice çalkalanarak homojenize edilir
Saklama Hazırlanan boya çözeltileri koyu renk şişelerde etiketlenerek saklanır. Etiketlerde çözelti adı, kimin tarafından ve ne zaman hazırlandığı ve kullanıma açılma tarihi belirtilir. Bu şekilde oda ısısında ve güneş ışığından uzakta 6 ay saklanabilir.	

Güvenlik uyarısı!

* Auromine-O ve Rhodamine B boya ları **kanserojendir!** Hazırlanışı sırasında solunmamalı, boyama sırasında cilde temas etmemelidir.

- Etanol parlayıcıdır! Alevden uzak tutulmalıdır.

Ek-6 Karbol fuksin boyama yönergesi

Malzeme

EZN / Kinyoun Boyama (Şekil 2)

- Boya çözeltileri
 - Distile su
 - Filtre kağıdı
 - Penset
 - Boya sehpası
 - Işık mikroskobu
- Hazırlanan yaymalar, boya düzeneğinin üzerine, birbirleri ile temas etmeyecek şekilde yerleştirilir.
 - Preparatların üzerine yayma alanını kaplayacak şekilde karbol fuksin dökülür.
 - Karbol fuksin çözeltisinin, ya boyama işleminden hemen önce ya da preparatların üzerine dökme aşamasında kağıt filtrelerden geçirilmesi önerilir.
 - Yaymalar, buhar çıkacak fakat kaynamayacak şekilde 5 dakika boyunca alttan ısıtılır (Kinyounda boyamada alttan ısıtma yoktur).
 - Eğer yayma üzerinde buharlaşma ile boya eksilirse, karbol fuksin eklenir ve ısıtmaya devam edilir (Kinyounda boyamada alttan ısıtma olmadığından bu basamak da yoktur).
 - Yaymalar su ile nazikçe yıkanır.
 - Lamlar eğilerek üzerinde kalan su süzdürülür.
 - Yaymaların üzerine %3'lük asit-alkol çözeltisinden dökülür, renksizleşme işlemi gerçekleşene kadar (1-2 dk) yapılır.
 - Yaymalar su ile nazikçe yıkanır.
 - Lamlar eğilerek yayma üzerinde kalan su süzdürülür.
 - Preparatların üzerine yayma alanını kaplayacak şekilde metilen mavisi çözeltisinden dökülür, 1-2 dk beklenir.
 - Yaymalar su ile nazikçe yıkanır.
 - Lamlar eğilerek yayma üzerinde kalan su süzdürülür.
 - Lamlar dik bir şekilde oda ısısında kurumaya bırakılır.
 - Işık mikroskopunda değerlendirilir (Ek-8.2).

Biyogüvenlik Uyarısı!

- **Eldiven ve önlüğünüzü giyiniz!**



Şekil 2. EZN boyama basamakları

Ek-7 Florokrom boyama yönergesi

Malzeme

- Boya çözeltileri
- Distile su
- Filtre kağıdı
- Penset
- Boya sehpası
- Floresan mikroskop

Biyogüvenlik Uyarısı!

- **Eldiven ve önlüğünüzü giyiniz!**

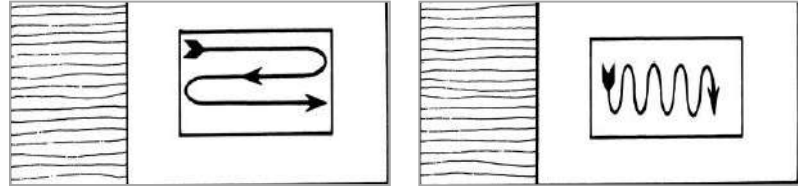
Florokrom boyama

- Hazırlanan yaymalar, boya düzeneğinin üzerine, birbirileri ile temas etmeyecek şekilde yerleştirilir.
- Preparatların üzerine yayma alanını kaplayacak şekilde auramine O / auramine-rhodamine dökülür, 15 dk beklenir.
- Yaymalar distile su ile nazikçe yıkanır.
- Lamlar eğilerek üzerinde kalan su süzdürülür.
- Yaymaların üzerine %0,5'lik asit-alkol çözeltisinden dökülür, 2 dk boyunca renksizleştirme işlemi yapılır.
- Yaymalar distile su ile nazikçe yıkanır.
- Lamlar eğilerek yayma üzerinde kalan su süzdürülür.
- Preparatların üzerine örtecek şekilde potasyum permanganat çözeltisinden dökülür, 2 dk beklenir.
- ÖNEMLİ NOT: Bu basamak 2 dakikayı aşmamalıdır, aşıldığında floresans azalabilir.
- Yaymalar distile su ile nazikçe yıkanır.
- Lamlar eğilerek yayma üzerinde kalan su süzdürülür.
- Lamlar dik bir şekilde oda ısısında kurumaya bırakılır.
- Floresan mikroskopunda değerlendirilir (Ek-8.2).

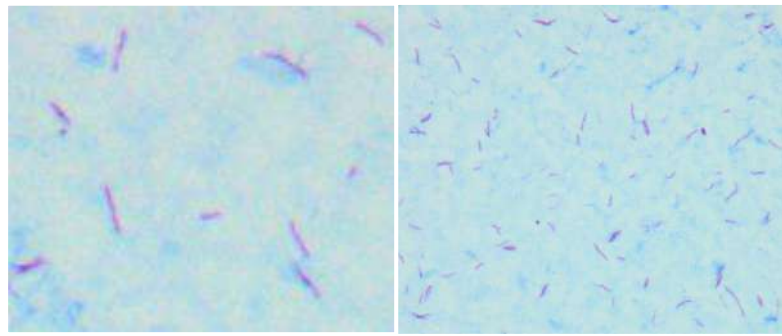
Ek-8 Yayma inceleme yönergesi

8.1 Karbol fuksin ile boyanmış yaymaların incelenmesi

- Yaymanın üzerine bir damla immersiyon yağı damlatılır.
- Yaymalar $\times 1000$ büyütme ($100\times$ objektif ve $10\times$ oküler) ile incelenir.
- Yayma, negatif olarak raporlanmadan önce en az 9 dikey ya da 3 yatay çizgi boyunca (yaklaşık 300 mikroskopi alanı) dikkatli bir şekilde taranır (Şekil 3).
- Mavi zeminde, $0,2-0,6 \times 1-10 \mu\text{m}$ boyutlarında, kırmızı-pembe, düz ya da hafif kıvrık, tek tek veya kümeler halinde basiller aranır (Şekil 4).
- Yaymaların değerlendirilmesi yarı kantitatif olarak yapılır (bkz. Tablo 2).



Şekil 3. Yaymaların incelenmesi



Şekil 4. Karbol fuksin boyama görüntüsü

8.2 Florokrom ile boyanmış yaymaların incelenmesi

- Yaymalar floresan veya LED mikroskop ile $\times 250$ ve $\times 400$ büyütmelerde ($25\times$ ve $40\times$ objektifler ve $10\times$ oküler ile) incelenir.
- Yayma, negatif olarak raporlanmadan önce $\times 250$ büyütmede en az 30 veya $\times 400$ büyütmede en az 70 mikroskopi alanı taranır.
- Karanlık alanda, $0,2-0,6 \times 1-10 \mu\text{m}$ boyutlarında, sarı / turuncu, düz ya da hafif kıvrık, tek tek veya kümeler halinde basiller aranır (Şekil 5).
- Yaymaların değerlendirilmesi yarı kantitatif olarak yapılır (bkz. Tablo 2).



Şekil 5. Florokrom boyama görüntüsü

Biyogüvenlik Uyarısı!

- Eldiven ve önlüğünüzü giyiniz!**

Ek-9 Laboratuvar kalite göstergeleri

Laboratuvar kalite göstergeleri (Tablo 6); en az 3 aylık dönemler halinde, dönem bittikten 2 ay sonra değerlendirilmeli, ani değişikliklere dikkat edilmelidir (Tablo 6.a). Ayrıca bu dönemlere ait laboratuvar iş yükü de eş zamanlı olarak kayıt altına alınmalıdır (Tablo 6.b)

Tablo 6. Laboratuvar kalite göstergeleri

	Parametre	Tanım	Hesaplama
Örnek	Örnek reddi*	Laboratuvara gönderilen tüm örnekler içerisinde reddedilenlerin oranı	$\frac{\text{Reddedilen örnek sayısı}}{\text{Toplam örnek sayısı (Tablo 6.c)}}$
Mikroskopi	Pozitiflik*	Mikroskopi yapılan tüm örneklerde ARB pozitiflik oranı	$(A+B) / (G+H)$ (Tablo 6.c)
	Kültüre göre pozitiflik	Kültür pozitif örneklerdeki ARB pozitiflik oranı	A / E (Tablo 6.c)
	Yalancı pozitiflik*	Kültür negatif örneklerdeki ARB pozitiflik oranı	B / F (Tablo 6.c)
Kültür	Pozitiflik*	Katı ya da sıvı kültüre alınan tüm örneklerde kültür pozitiflik oranı	$(A+C) / (E+F)$ (Tablo 6.c)
	Kontaminasyon	Katı kültürde kontaminasyon oranı	$\frac{\text{Kontamine katı kültür sayısı}}{\text{Katı kültüre alınan örnek sayısı}}$
		Sıvı kültürde kontaminasyon oranı	$\frac{\text{Kontamine sıvı kültür sayısı}}{\text{Sıvı kültüre alınan örnek sayısı}}$
Tür Tayini	TDM	Kültür pozitif örneklerde TDM olarak raporlanan suş oranı	$\frac{\text{Tüberküloz Dışı Mikobakteri sayısı}}{\text{Tür tayini yapılan ARB pozitif suş sayısı}}$
Fenotipik İDT	Tek ilaca direnç	HRSEZ ilaçlarından herhangi birine dirençli izolat oranı	$\frac{\text{Herhangi bir ilaca dirençli izolat sayısı}}{\text{Toplam yapılan İDT sayısı}}$
	Tek R direnci	Sadece R dirençli izolat oranı	$\frac{\text{Rifampisine dirençli izolat sayısı}}{\text{Toplam yapılan İDT sayısı}}$
	Tek E direnci	Sadece E dirençli izolat oranı	$\frac{\text{Etambutole dirençli izolat sayısı}}{\text{Toplam yapılan İDT sayısı}}$
	HR direnci	H ve R'ye dirençli izolat oranı (SEZ direnci olsun ya da olmasın)	$\frac{\text{En az H ve R dirençli izolat sayısı}}{\text{Toplam yapılan İDT sayısı}}$
Moleküler Tanı	Pozitiflik*	Moleküler test yapılan örneklerde MTBC DNA pozitif örnek sayısı	$\frac{\text{MTBC DNA (+) örnek sayısı}}{\text{Moleküler tanı testi yapılan örnek sayısı}}$
	Kültüre göre pozitiflik*	Kültür pozitif örneklerde MTBC DNA pozitif örnek sayısı	A / G (Tablo 6.d)
	Yalancı pozitiflik*	Kültür negatif örneklerde MTBC DNA pozitif örnek sayısı	C / H (Tablo 6.d)
Raporlama süresi	Mikroskopi	Örnek kabulünden itibaren ortalama raporlama süresi	Ortalama (En düşük, en yüksek değer)
	Kültür+tür tayini	Örnek kabulünden itibaren ortalama raporlama süresi	Ortalama (En düşük, en yüksek değer)
	Fenotipik İDT	Örnek kabulünden itibaren ortalama raporlama süresi	Ortalama (En düşük, en yüksek değer)

Tablo 6a. Laboratuvar kalite göstergeleri takip çizelgesi

	Parametre	Dönem 1	Dönem 2	Dönem 3	Dönem 4
Örnek	Örnek reddi*				
Mikroskopi	Pozitiflik*				
	Kültüre göre pozitiflik				
	Yalancı pozitiflik*				
Kültür	Pozitiflik*				
	Katı kültür kontaminasyonu				
	Sıvı kültür kontaminasyonu				
Tür Tayini	TDM				
Fenotipik İDT	Tek ilaca direnç				
	Tek R direnci				
	Tek E direnci				
	HR direnci				
Moleküler Tanı	Pozitiflik*				
	Kültüre göre pozitiflik*				
	Yalancı pozitiflik*				
Raporlama süresi	Mikroskopi				
	Kültür+tür tayini				
	Fenotipik İDT				

*Akciğer ve akciğer dışı örnekler için ayrı ayrı hesaplanabilir.

Tablo 6.b. Laboratuvar iş yükü

	Test Sayısı	Test yapılma %'si	Hesaplama
Örnek		x	x
Mikroskopi			<u>ARB yapılan örnek sayısı</u> Laboratuvara kabul edilen örnek sayısı
Kültür			<u>Katı ya da sıvı kültür yapılan örnek sayısı</u> Laboratuvara kabul edilen örnek sayısı
Tür tayini			<u>Tür tayini yapılan suş sayısı</u> Kültürde üreme tespit edilen suş sayısı
İDT			<u>İlaç duyarlılık testi yapılan suş sayısı</u> Kültürde MTBC / üreme tespit edilen suş sayısı
Moleküler tanı			<u>Moleküler tanı testi yapılan örnek sayısı</u> Laboratuvara kabul edilen örnek sayısı

Tablo 6.c. Mikroskopi ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması

		Kültür		
		Pozitif	Negatif	Toplam
Mikroskopi	Pozitif	A	B	G
	Negatif	C	D	H
	Toplam	E	F	

Tablo 6.d. Kültür ve moleküler tanı sonuçlarının karşılaştırılması

		Kültür		
		Pozitif	Negatif	Toplam
Moleküler Tanı	Pozitif	A	B	G
	Negatif	C	D	H
	Toplam	E	F	

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesinde (UTTR-3 [Bölüm 3] Mikroskopi) geçen bazı hususlar için daha ayrıntılı veya ilave bilgi için aşağıda listelenen UMS belgelerine başvurunuz:

UMS, UTTR-1 [Bölüm 1]	Biyogüvenlik
UMS, UTTR-2 [Bölüm 2]	Örnek Yönetimi
UMS, UTTR-4 [Bölüm 4]	Kültür
UMS, UTTR-5 [Bölüm 5]	Tür Tayini
UMS, UTTR-6 [Bölüm 6]	Moleküler Tanı
UMS, UTTR-7 [Bölüm 7]	İlaç Duyarlılık Testi

Kaynaklar

- 1 World Health Organization. Services in tuberculosis control culture. Part III. WHO, Geneva. 1998. <http://wwwn.cdc.gov/dls/ila/documents/lstc3.pdf>
- 2 Soolingen DV, Jarlier V, Drobniewski F. Information for physicians: The laboratory diagnosis of tuberculosis-first steps. *In: Mastering the Basics of TB Control: Development of a Handbook on TB Diagnostic Methods*. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control Technical Report, 2011. p. 96-99. http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1105_TER_Basics_TB_control.pdf
- 3 Laboratory detection and identification of *Mycobacteria*. Approved Guideline. CLSI document M48-A, Vol. 28, No. 17, CLSI, Pennsylvania. 2008.
- 4 Pfyffer GE. *Mycobacterium*: General characteristics, laboratory detection, and staining procedures. *In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds). Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed, ASM Pres, Washington, D.C. 2007, p. 543-72.
- 5 Della-Latta P, Weitzman I. Mycobacteriology, *In: Isenberg HD (ed). Essential Procedures for Clinical Microbiology*. ASM, Washington, D.C. 1998, p. 171-202.
- 6 Tuberculosis – Information for Health Care Providers. 4th ed., Ontario Lung Association, 2009. <http://www.on.lung.ca/document.doc?id=475>
- 7 Ceyhan İ. Tüberkülozda Bakteriyolojik Tanı. Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Ankara, 2007
- 8 Tüberküloz Tanı ve Tedavi Rehberi. Başak Ltd. Şti., Ankara, 2011. <http://www.verem.org.tr/pdf/tum-kitap.pdf>
- 9 Tüberküloz. Toraks Kitapları, Türk Toraks Derneği, Sayı: 11, Aves Yayıncılık, İstanbul, 2010. <http://www.toraks.org.tr/uploadFiles/book/file/79201116497-TUBERKULOZ.pdf>
- 10 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. *In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). Clinical microbiology procedures handbook*. 2nd ed. update, ASM, Washington, DC. 2007, p. 9.3.2.1 - 4



ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

ULUSAL TÜBERKÜLOZ TANI REHBERİ (UTTR)

Kültür

Hazırlayan Birim	Tüberküloz Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Tüberküloz
Bölüm	Kültür
Standart No	UTTR-4
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2014
Geçerlilik tarihi	01.01.2016

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	2
KÜLTÜR - TEKNİK BİLGİLER	3
1 Temel prensip	3
2 Yöntem çeşitleri ve avantaj-dezavantajları.....	3
3 Kültür için asgari laboratuvar koşulları	5
4 Kültür ekimleri ve inkübasyon	5
5 Sonuçların değerlendirilmesi ve raporlama	6
6 Saklama	8
7 Kalite kontrol	8
8 Olası sorunlar/kısıtlılıklar	9
TANI AKIŞ DİYAGRAMI	10
EKLER.....	11
Ek-1 L-J Besiyeri Hazırlama Yönergesi	11
Ek-2 MB 7H10/11 Besiyeri Hazırlama Yönergesi	12
Ek-3 Kültür Yöntemlerinin Geçerli Kılınması	13
Ek-4 Kültür Ekimi ve Inkübasyon Yönergesi.....	14
Ek-5 Suş Saklama Yönergesi.....	15
Ek-6 Besiyeri Kalite Kontrol Yönergesi	16
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ	17
KAYNAKLAR.....	18

"Kalitenin kontrol edilmesi değil,

sebeplendirilmesi ve temellendirilmesi gerekir."

P. Crosby

Kapsam ve Amaç

Bu Rehberin amacı; tüberkülozun mikrobiyolojik tanısının doğru yapılabilmesi için altın standart olan kültür işleminin standartlara uygun yapılmasının sağlanmasıdır. Bu bölüm, tüberküloz laboratuvarlarında örneğin kültür için besiyerine ekim ve değerlendirme sürecini kapsamaktadır.

Kültür - Teknik Bilgiler

Tüberkülozun tanısında kültür altın standarttır. Kültür yöntemleri; tüberküloz basillerinin üremesine, tanımlanmasına, ilaç duyarlılık testleri ve epidemiyolojik çalışmaların yapılmasına olanak sağlar. Kültürde mikobakterilerin üretilmesi için hasta örneklerinin mililitresinde 10-100 canlı basilin olması yeterlidir.

1 Temel prensip

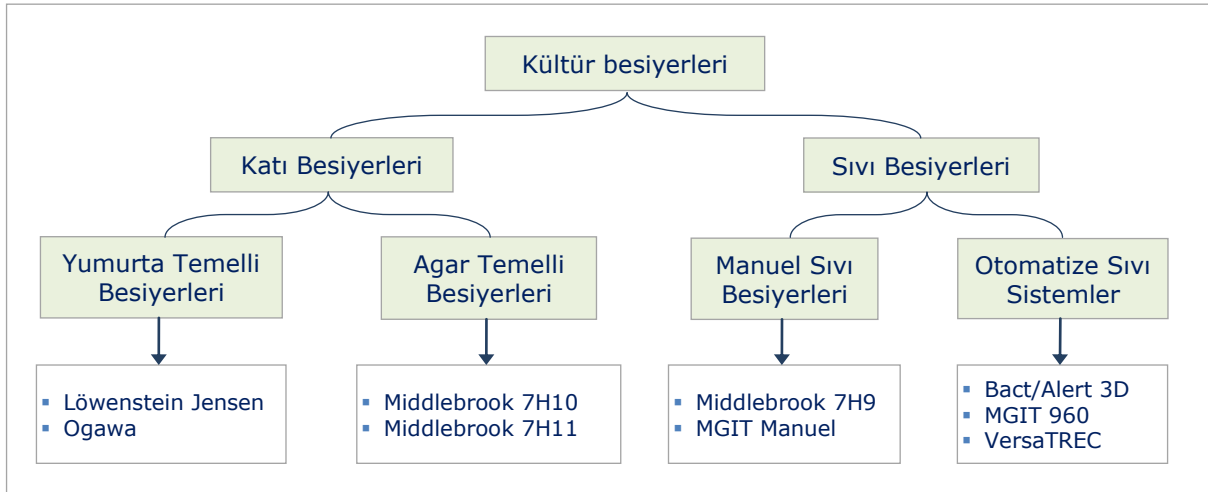
Tüberkülozun kesin tanısı bakterinin **kültür** ortamında üretilmesi ve tanımlanması esasına dayanır. *M. tuberculosis*'in bölünme süresi 18-24 saate kadar uzadığından diğer bakterilere göre kültürde üremesi uzun zaman almaktadır. Bu nedenle kültürde üremenin değerlendirme süresi 6-8 haftaya kadar uzayabilmektedir. Üreme için ortamda özel maddelerin bulunması gerektiğinden *M. tuberculosis* genel üretim besiyerlerinde üretilmez; özgün besiyerlerine ihtiyaç duyulur.

2 Yöntem çeşitleri ve avantaj-dezavantajları

M. tuberculosis kompleksin (MTBC) üretilmesi için sıklıkla gliserol ve asparajin içeren yumurta temelli besiyerleri, agar bazlı besiyerleri, serum ve sığır albümini ile zenginleştirilmiş sıvı besiyerleri kullanılır. Besiyerlerine diğer kontaminant mikroorganizmaların üremesini engellemek için malaşit yeşili gibi inhibitörler veya çeşitli antibiyotikler eklenebilir. Kültür yöntemlerini **kati** ve **sıvı kültür sistemleri** olmak üzere ikiye ayırabiliriz (bkz. Şekil 1).

Uzman Görüşü – *Mycobacterium tuberculosis* izolasyonu için ideal bir besiyerinde bulunması gereken özellikler

- Ekonomik olmalıdır.
- Kolay hazırlanmalıdır.
- Hızlı üreme sağlamalıdır.
- Mikobakteri dışındaki mikroorganizmaların üremesini engellemelidir.
- Örnekte bulunabilecek az sayıdaki bakterinin üremesini desteklemelidir.
- Kati besiyerleri için izolatların koloni morfolojisinden ön tanısı yapılabilmelidir.



Şekil 1. *M. tuberculosis* kompleks kültürü için kullanılan besiyerleri

Tüberkülozun izolasyonunda en sık kullanılan besiyerleri ve özellikleri Tablo 1’de verilmiştir (ayrıca bkz. Ek-1 ve 2 “Besiyeri hazırlama yönergesi”).

Tablo 1. Kültür yöntemlerinin özellikleri

	Yumurta temelli besiyerleri	Agar temelli besiyerleri	Sıvı besiyerleri
Hazırlık	Zahmetli	Kolay	Kolay
Raf ömrü	6 ay	4 hafta	Kullanılan sisteme göre değişir
Besiyeri görünümü	Opak	Şeffaf	Şeffaf
Koloni morfolojisi	Ayırt edilebilir	Ayırt edilebilir	Ayırt edilemez
Ortalama üreme süresi	21-42 gün	18-28 gün	7-14 gün
Sonuçlandırma süresi	8 hafta	6 hafta	6 hafta
İzolasyon şansı	Yüksek	Yüksek	Çok yüksek
Maliyet	Düşük	Orta	Orta-Yüksek

Uyarı! – Test yöntemi seçimi

- Ticari yöntemler için;
 - Verifikasyon testleri (yöntem doğrulaması) yapılmış bir sistem seçilmeli,
 - Sistemin verifiye edilmiş bir başka test yöntemi veya verifikasyon çalışmasını yapmış bir başka laboratuvarla eş zamanlı çalışılarak sonuçların güvenilirliği kanıtlanmalıdır (bkz. Ek-3 “Kültür Yöntemlerinin Geçerli Kılınması Yönergesi”).
- Laboratuvar tarafından hazırlanan besiyerleri için;
 - Tüm validasyon (yöntem geçerliliğinin kanıtlanması) basamakları yapılmalıdır (bkz. Ek-3 “Kültür Yöntemlerinin Geçerli Kılınması Yönergesi”).

3 Kültür için asgari laboratuvar koşulları

3.1. Laboratuvar güvenliği önlemleri

Kültür ekimi işlemleri için (Tablo 2):

- Temiz alandan kirli alana doğru tek yönlü hava akımı olan, saatte 6-12 kez temiz hava değişimi sağlayan mekanik havalandırma sistemli ve giriş kontrollü bir çalışma alanı olmalı
- Sınıf-IIA biyogüvenlik kabini ve otoklav bulunmalı
- Eldiven ve önlük kullanılmalıdır.

Tablo 2. Kültür ile ilgili işlemler sırasında alınması gereken önlemler

		Laboratuvar tasarımı		Laboratuvar donanımı		Kişisel koruyucu donanım		
		Havalandırma	Laboratuvar giriş sınırlaması	BGK	Otoklav	Eldiven	Önlük	Maske
Hazırlık	Besiyeri hazırlama	-		-	✓	✓	✓	-
Kültür	İşlenmiş örneğin kültür besiyerine ekimi	Saatte 6-12 hava değişimi	BGD-2 işaretli giriş sınırlaması	✓	Kültür pozitifler	✓	✓	<i>Opsiyonel</i>
	Kültür değerlendirme			-				✓

Ayrıntılı bilgi "UTTR-1 Biyogüvenlik" başlığı altında verilmiştir.

3.2. Gerekli donanım

- Sınıf-IIA Biyogüvenlik Kabini
- İnkübatör
- Otoklav

4 Kültür ekimleri ve inkübasyon

MTBC kültürü için kan ve kemik iliği örnekleri hariç direkt klinik örnekten besiyerlerine ekim yapılmaz.

Örnekler işlendikten (*bkz.* "UTTR-2 Örnek Yönetimi") sonra "Kültür ekimi ve inkübasyon yönergesi"ne (*bkz.* Ek-4) göre ekimleri yapılır.

Uzman Görüşü – Kültür ekimi

Tüberküloz basilinin üreme şansını arttırmak amacı ile en az bir sıvı, bir de katı besiyerinin birlikte kullanılması önerilmektedir. Sıvı besiyeri olarak otomatize sistemlerin tercih edilmesi izolasyon süresini kısaltacaktır.

5 Sonuçların değerlendirilmesi ve raporlama

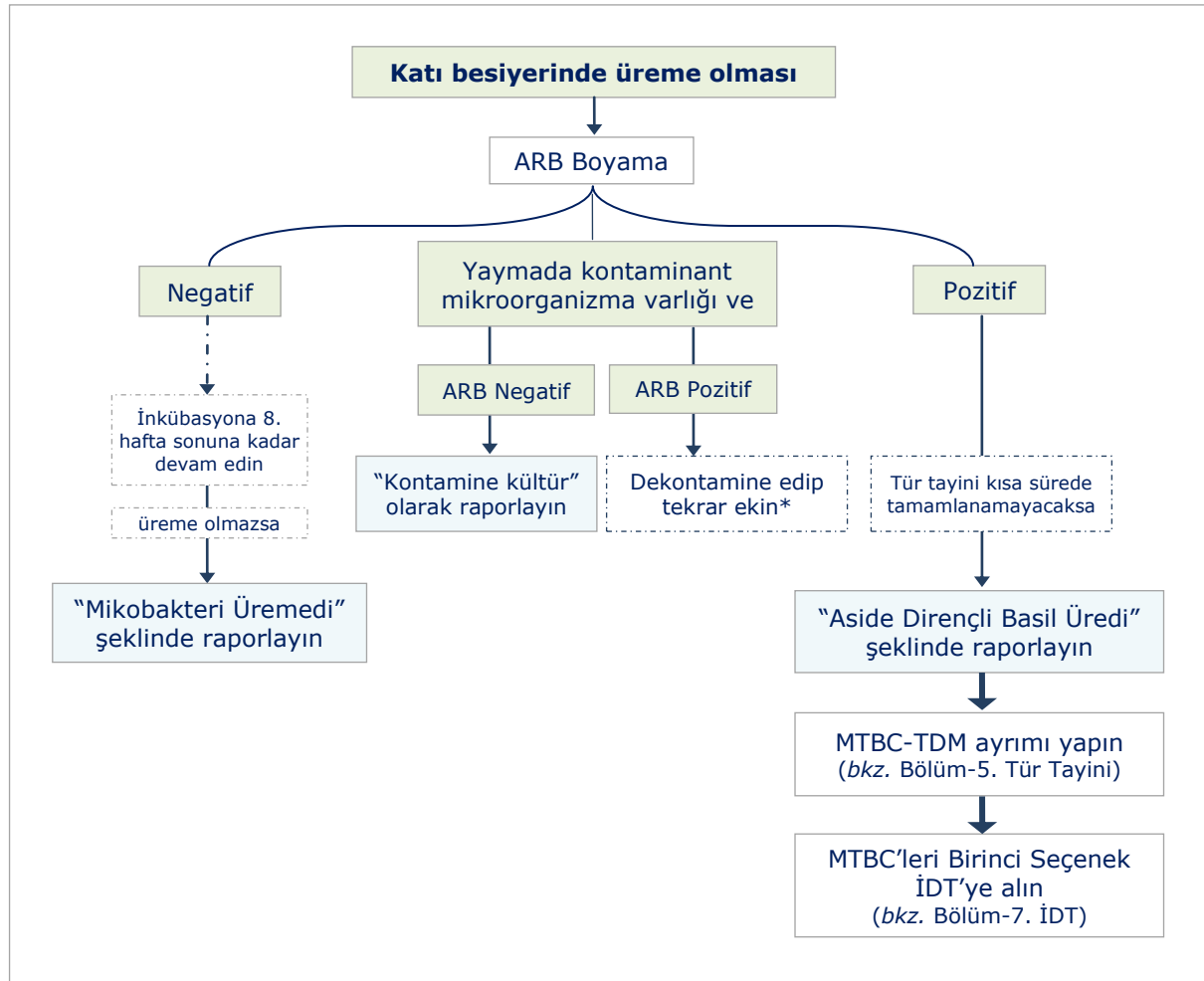
Besiyerlerinde üreme aşağıdakilerden uygun olan yol izlenerek takip edilir:

- **Katı besiyerleri** kontaminasyon ve üreme takibi açısından ilk hafta iki kez, sonra 8. haftaya dek en az haftada bir kez üreme açısından kontrol edilir (Şekil 2).
- **Sıvı besiyerlerinin** haftada 2 kez bulanıklık, yüzeyde zar ve partikül oluşumu açısından görsel kontrolü ile üreme takip edilir.
- **Ticari sistemlerde** üretici firmanın önerileri doğrultusunda üreme takibi yapılır.



Şekil 2. LJ'de üreme

Takipler sırasında besiyerinde üreme saptanması durumunda katı ve sıvı besiyerlerinde değerlendirme Şekil 3 ve Şekil 4'te verilmiştir. Katı kültürdeki üremeler skorlanarak verilmelidir (bkz. Kutu 1).

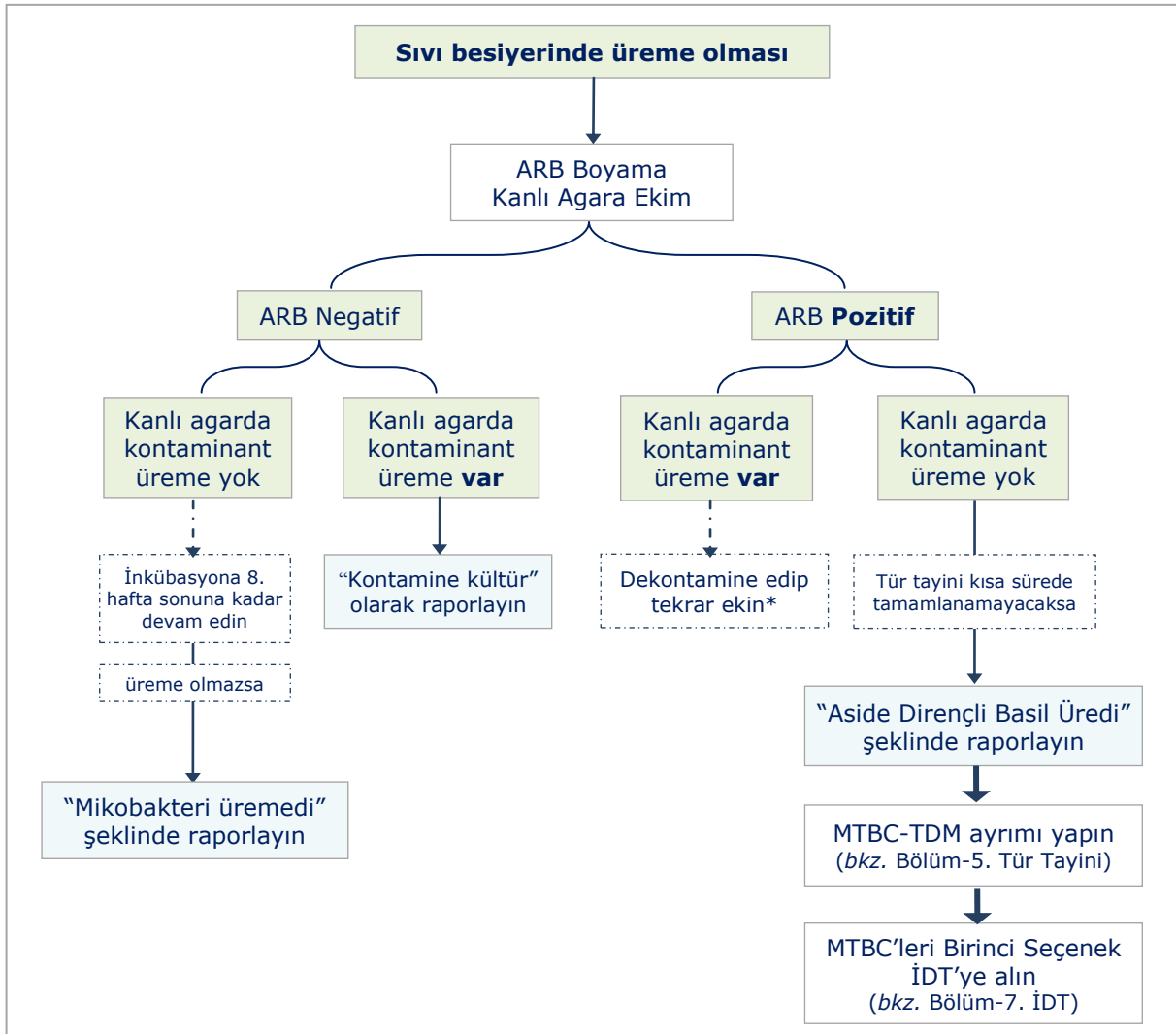


Şekil 3. Katı besiyerinde üreme olması durumunda değerlendirme ve raporlama algoritması

* Güçlü tüberküloz kuşkusunda, tekrar alınması zor ya da mümkün olmayan örnekler için kültürde kontaminasyon olması durumunda, saklanmışsa örnekten veya kültür besiyerinden tekrar dekontaminasyon işlemi yapılarak kültür işlemi tekrarlanabilir.

Kutu 1. Katı kültürdeki üremenin raporlanması

- ARB pozitif koloni yoksa: "Üreme olmadı"
- 1-19 koloni: "1-19 koloni ARB pozitif basil üredi"
- 20-100: "ARB pozitif basil üredi (1+)"
- 100-200: "ARB pozitif basil üredi (2+)"
- 200-500: "ARB pozitif basil üredi (3+)"
- 500 üstü: "ARB pozitif basil üredi (4+)" şeklinde raporlanır.

**Şekil 4.** Sıvı besiyerinde üreme olması durumunda değerlendirme ve raporlama algoritması

* Güçlü tüberküloz kuşkusunda, tekrar alınması zor ya da mümkün olmayan örnekler için kültürde kontaminasyon olması durumunda, saklanmışsa örnekten veya kültür besiyerinden tekrar dekontaminasyon işlemi yapılarak kültür işlemi tekrarlanabilir.

Uyarı! Kültür sonuçlarının raporlanması

- Pozitif kültür sonuçları kültürde üremenin olması durumunda 24 saat içerisinde raporlanmalıdır. Laboratuvar tüm pozitif kültür sonuçlarını örnek kabulünü takip eden ortalama 21 gün içerisinde raporlamış olmalıdır.
- Tüm pozitif sonuçlar ilgili birim/hekime ve İl Halk Sağlığı Müdürlüğüne ivedilikle bildirilmelidir.

6 Saklama

- İşlem gerektiren pozitif kültürler haftalarca oda ısısında saklanabilir.
- Her hastaya ait en az bir pozitif kültür $-70\pm 10^{\circ}\text{C}$ 'de en az bir yıl stoklanmalıdır (bkz. Ek-5 "Suş saklama yönergesi").

7 Kalite kontrol

7.1. İç kalite kontrol

Kültür yöntemleri ile ilişkili olarak bazı verilerin takibi, sürecin kalite kontrol açısından izleminde yardımcı olabilmektedir. Düzenli olarak takibi yapılması gereken parametreler:

- Laboratuvarda hazırlanan besiyerlerinin kontrolü (bkz. Ek-6 "Besiyeri Kalite Kontrol Yönergesi")
 - Görünüm; renk, kuruluk, kontaminasyon, hava kabarcığı vb.
 - pH
 - Sterilite; her partinin % 1-3'ünü, $35-37^{\circ}\text{C}$ 'de ve %5-10 CO_2 'li ortamda 48-72 saat izlem
 - Üretme ve seçicilik; pozitif ve negatif kontrol suşlarının üremeleri test edilir.
- Kalite kontrolü onaylı olarak satın alınan ticari besiyerlerinin kontrollerinin yapılmasına gerek olmayabilir. Bu ürünlerde ticari firmadan;
 - Ürünün üretim tarihi
 - Lot numarası
 - Son kullanım tarihi
 - Test edilen mikroorganizmalar ve test tarihi
 - Sonuçlarını içeren kalite kontrol raporu talep edilir.
- Ekipman kontrolü;
 - Soğutucuların sıcaklık takibi ve bakımı
 - İnkübatörlerin sıcaklık takibi, kalibrasyon ve bakımı
 - Kullanılıyorsa otomatize sistemlerin kalibrasyon ve bakımları
 - Ortam sıcaklığının takibini içerir.

7.2. Dış kalite değerlendirme

Kültür çalışmalarında laboratuvarın yetkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla ulusal veya uluslararası bir Dış Kalite Değerlendirme programına katılması gerekir. Bu amaçla Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı tarafından düzenlenen Dış Kalite Değerlendirme programına katılım sağlanabilir.

Uyarı! – Kültürde kalite göstergeleri

- Kalite güvencesinin amaçlarına uygun olarak **ayda bir** kültür besiyerlerindeki kontaminasyon oranları gözden geçirilmelidir.
 - Katı besiyerlerinde %3-5 kontaminasyon,
 - Sıvı besiyerlerinde %5-10 kontaminasyon, kabul edilir oranlardır.

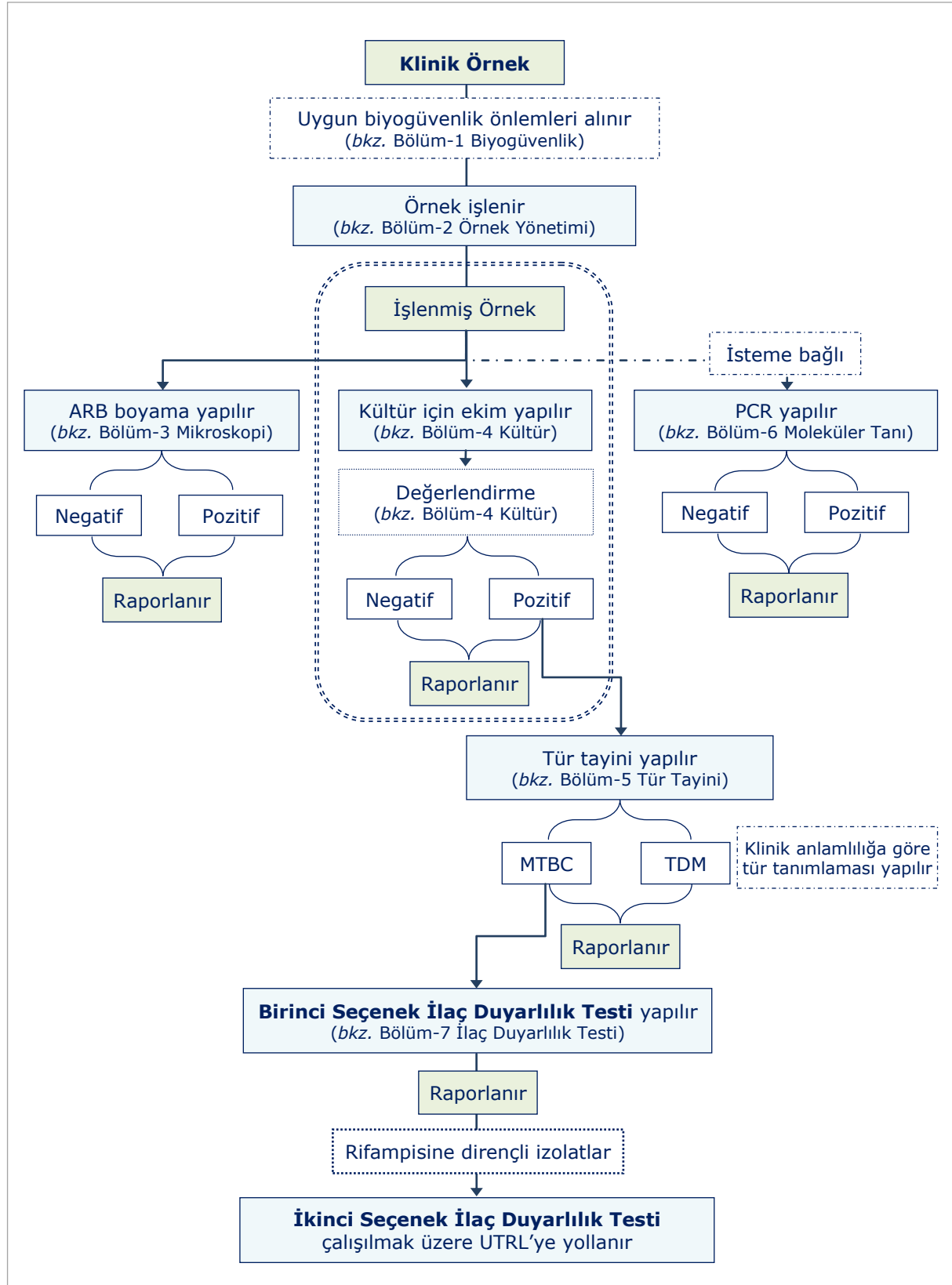
Bu oranların dışına çıkıldığında, dekontaminasyon işleminin tüm basamakları gözden geçirilmelidir (bkz. "UTTR-2 Örnek Yönetimi")
- Laboratuvarlar kültür pozitiflik oranlarını takip etmelidir.
 - Yoğun üremenin olduğu pozitif kültür örneklerinin ardından görülen seri pozitifliklerde,
 - Mikroskopi pozitifliğine göre beklenenden daha az oranda (%90'nın altında) kültürde üreme olması durumunda dikkatli olunmalıdır.
- ARB pozitiflik derecesine göre kültürde ortalama üreme süresi (3-6 aylık periyotta) takip edilmelidir.

Ayrıntılı bilgi için bkz. UTTR-3. Ek-9. Laboratuvar kalite göstergeleri

8 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Kültür yöntemlerinin duyarlılığı mikroskopiden yüksek olmakla beraber daha geç sonuç vermektedir.
- Mikobakterilerin koloni morfolojileri ve pigmentasyonu sadece katı besiyerlerinde görülebilir.
- Yumurta temelli besiyerlerinde besiyerinin kalitesi kullanılan yumurtanın tazeliği ile ilgilidir.
- Sıvı besiyerleri katı besiyerlerine göre kontaminasyona daha açıktır.
- Middlebrook 7H10 ve 7H11 besiyerleri;
 - Isıya ve gün ışığına maruz kaldığında ortamdaki serbest formaldehit konsantrasyonunda artış oluşacağından tüberküloz basilinin üremesi inhibe olabilmektedir.
 - Üretim özelliğini kazanabilmesi için oleik asit-albümin-dekstroz-katalaz (OADC) ile zenginleştirilerek kullanılmalıdır.
- Otomatize sistemlerde;
 - Mutlaka üretici tarafından önerilen homojenizasyon ve dekontaminasyon işlemi yapılmalıdır.
 - Kan ve aşırı kanlı örnekler floresansı maskeleyebilir.
 - Kontaminasyonu önlemek için kullanılan antimikrobiyal karışımlar bazı mikobakterilerin üremesini önleyebilir.
- MTBC ve TDM üremesi birlikte olabilir. İlaç duyarlılığı açısından bu tür kuşkularda moleküler yöntemlerle ileri analiz yapılması önerilir.

Tanı Akış Diyagramı



Ekler

Ek-1 L-J Besiyeri hazırlama yönergesi

Malzeme	Çözeltilerin hazırlanması
Mineral tuz çözeltisi KH ₂ PO ₄ 2,4 g MgSO ₄ .7H ₂ O 0,24 g Magnezyum sitrat 0,6 g Asparajin 36 g Gliserol 12 mL Distile su 600 mL	- Steril bir balon içerisine malzemeler tartılarak konur. - Gliserol ile distile su eklenir. - Karışım 100°C'de 30 dk bekletilerek tuzların tamamen çözünmesi sağlanır. 121°C'de 30 dk otoklavlanır. - Oda sıcaklığında soğutulur.
%2'lik Malaşit yeşili Malaşit yeşili 2 g Distile su 100 mL	- Bir havan veya manyetik karıştırıcı yardımı ile boya distile su içinde çözülür. - Hazırlanan boya, koyu renkli şişelerde ışık görmeyecek bir yerde saklanır.
Yumurta solüsyonu 24-28 adet iri boy taze yumurta (1000 mL olacak şekilde)	- Yumurtaların dışı fırça ve sabunlu su yardımı ile temizlenir. Bir sepet içerisinde kurutulur. %70'lik etanol içerisinde 15 dk bekletilir ve alkolden çıkarılıp kuruması beklenir. - Yumurtalar tek tek aseptik şartlarda bir beherin içine kırılır ve taze olup olmadığı kontrol edilir. Yumurta sarısının bütünlüğü bozulmuş ve/veya kötü koku oluşmuş ise yenisi ile değiştirilir. - Yumurta sıvısı yapışkan özelliği kayboluncaya kadar çalkalanır (steril cam boncuklu erlen veya elektrikli mikser kullanılabilir). - Yumurta sıvısı bir mezür içine, iki katlı steril gazlı bezden geçirilerek süzülür.

Biyogüvenlik Uyarısı!

- Eldiven ve önlüğünüzü giyiniz!**

Besiyerinin hazırlanması

- Erlenmayer veya cam balon içerisinde önceden hazırlanıp steril edilen 600 mL tuz çözeltisine, %2'lik malaşit yeşilinden 20 mL eklenir.
- Hava kabarcığı olmayacak şekilde, 1000 mL yumurta sıvısı kabın yan duvarından yavaşça dökülür. Karışım hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde yavaşça karıştırılır. Oluşan hava kabarcıklarının yüzeyden gitmesi için 5-10 dk beklenir.
- Besiyerinin rengi açık yeşilden koyu yeşile kadar değişebilir.
- Besiyeri hava kabarcığı oluşturmadan steril tüplere 6 mL kadar doldurulur.
- Tüpler 15 dk içerisinde önceden 80-85°C sıcaklığa getirilmiş koagülatöre yerleştirilir. Tüpler 45 dk bu ısıda koagülatörde bekletilir.

Saklama

- Tüplerin üzerine besiyerinin adı, üretim tarihi ve lot numarası yazılı etiket yapıştırılarak 2-8°C'de soğutucuda dik olarak depolanır. Raf ömrü 6 aydır.

Ek-2 MB 7H10/11 Besiyeri hazırlama yönergesi

Malzeme

- MB 7H10 / 11
- OADC

Oleik asit	0,6 mL
Albümin faktör V, sıgır	50 g
Dekstroz	20 g
Katalaz	0,4 g
NaCl	8,5 g
Distile su	1000 mL

Biyogüvenlik Uyarısı!

- **Eldiven ve önlüğünüzü giyiniz!**

Besiyerinin hazırlanması

- MB 7H10 veya MB 7H11 üretici firma önerileri doğrultusunda hazırlanır;
 - Besiyeri tartılır, steril cam balon içerisine konulur ve üzerine 900 mL distile su eklenir.
 - Hazırlanan karışım 100°C'de 30 dk bekletilerek tamamen çözünmesi sağlanır.
 - Çözelti, 121°C'de 20 dk otoklavlanır.
- OADC hazırlanır (hazır olarak da temin edilebilir);
 - Malzemeler tartılarak steril bir cam balon içerisine konulur
 - Üstüne 1000 mL distile su eklenir.
 - Karışım 100°C'de 30 dk bekletilerek tamamen çözünmesi sağlanır.
 - Oda sıcaklığında soğutulur.
 - Sterilizasyon 0,22 µm membran filtreden geçirilerek yapılır.
- Otoklavlanan MB 7H10 veya MB 7H11 besiyerleri, su banyosunda 50-56°C'ye soğutulur.
- Hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde 100 mL OADC yavaşça besiyerinin içine eklenir.
- Karışım hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde hafifçe çalkalanır.
- Besiyeri hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde steril Petri kaplarına veya tüplere dağıtılır.

Saklama

- Tüplerin veya petrilerin üzerine besiyerinin adı, üretim tarihi ve lot numarası yazılı etiket yapıştırılarak buzdolabında depolanır. Raf ömrü ortalama 4 haftadır.

Ek-3 Kültür yöntemlerinin geçerli kılınması

Genel hususlar

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan yöntemlerin uygunluğunun ve geçerliliğinin uluslararası bilimsel kriterlere göre valide veya verifiye edilerek kanıtlanması ve onaylanması gereklidir.

Validasyon, bir yöntemin performans karakteristiğini ve kısıtlılığını ortaya koyarak, bu karakteristiğin hangi şartlarda, ne kadar değiştiğinin belirlenmesi işlemidir. Diğer bir anlamı da bir testin, prosedür veya yöntemin performansının sürekli olarak izlenmesidir.

Verifikasyon ise valide bir yöntemin laboratuvardaki beklenen performansının test rutin kullanıma girmezden önce bir kereliğine ölçülmesi işlemi veya FDA (veya CE) onaylı bir yöntem için üretici tarafından belirtilen performans değerlerinin laboratuvarda elde edildiğinin gösterilmesidir. Cihaz veya kit içermeyen, mikroorganizma tanımlama basamaklarının bir parçası olarak uygulanan işlemlerin yöntem geçerliliğinin kanıtlanması gerekli değildir. Bu testler kalite kontrol protokolleri ile izlenmelidir.

Mikrobiyolojik testlerin yöntem geçerliliğinin kanıtlanması temel olarak testin CE/FDA onaylı olması ve olmaması (laboratuvar yapımı test) durumuna göre iki grupta incelenir (bkz. Tablo 3).

Tablo 3. Verifikasyon ve validasyon için yapılması gereken asgari çalışmalar

CE/FDA onaylı ticari testte VERİFİKASYON için test edilmesi gereken parametreler	Laboratuvar yapımı test veya CE/FDA onaylı olmayan ticari testte VALİDASYON için test edilmesi gereken parametreler
1. Doğruluk 2. Tekrarlanabilirlik 3. Doğrusallık (Kantitatif testler için)	1. Doğruluk 2. Tekrarlanabilirlik 3. Doğrusallık* (Kantitatif testler için) 4. Duyarlılık 5. Özgüllük

Kontrol materyali

- Yöntem geçerliliğinin kanıtlanmasında kullanılacak kontrol materyali **yanda** verilen sıraya göre seçilir ve kullanılır:
- Sertifikalı referans materyali
 - Referans materyali
 - Dış kalite değerlendirme materyali (farklı bir yöntem ile daha önce çalışılmış)
 - Akredite bir laboratuvarda çalışılmış hasta materyali
 - Sonucu referans yöntem ile ölçülmüş hasta materyali

Kültür yöntem geçerliliğinin kanıtlanması

Referans yöntemle karşılaştırma yapılır. Tek analit (organizma) saptayan testler için 10 pozitif ve 10 negatif izolatin çalışılması önerilmektedir. Referans yöntemle uyum $\geq 90\%$ olmalıdır. Ayrıca sistem organizmaların gereken sürede saptanmasını sağlıyor mu? Üretici önerileri ile karşılaştırılmalıdır.

- Doğruluk:
 - Uyumlu sonuç sayısı / toplam sonuç sayısı $\times 100$ olarak hesaplanır.
 - Ticari testlerde üretici firmanın belirttiği değerler ile karşılaştırılabilir.
 - Referans yönteme göre doğruluk oranının $\geq 90\%$ olması önerilmektedir.
- Kesinlik:
 - Elde edilen sonuçlardan ortalama, standart sapma ve %CV (varyasyon katsayısı) hesaplanır.
 - Varyasyon katsayısının küçük olması, tekrarlanabilirliğin yüksek olduğunu gösterir. Genel olarak $\%CV \leq 15\%$ olması kabul görmektedir.

Ek-4 Kültür ekimi ve inkübasyon yönergesi

Malzeme

- Besiyeri
- Steril pipet veya plastik tek kullanımlık öze
- Bunsen beki / mikroinsineratör
- İnkübatör

Biyogüvenlik Uyarısı!

- **Eldiven ve önlüğünüzü giyiniz!**
- **Biyogüvenlik kabinini kullanınız!**

Yönerge

- Tek kullanımlık steril pastör pipeti ile aerosol oluşturmada dikkatlice, işlem görmüş çökeltiden 200 µL (2-4 damla) katı besiyerine aktarılır. Sıvı ticari sistemler için üreticinin önerdiği miktarda ekim yapılır.
- İnkübasyon;
 - Yumurta bazlı besiyerine (LJ, Ogawa, vb.) ekilen örnekler, emilinceye kadar kapakları gevşek, besiyeri yüzeyi yukarı bakacak şekilde yatık pozisyonda 35-37°C'de bir hafta süresince inkübe edilir. Birinci hafta sonunda kapakları sıkıştırılarak dik konumda inkübasyona devam edilir.
 - MB 7H10 veya MB 7H11 plak besiyerleri, ekilen örnek emilinceye kadar besiyeri aşağıda kalacak şekilde 35-37°C'de ve % 5-10 CO₂'li ortamda inkübe edilir. Daha sonra, kurumalarını önlemek için, besiyerleri CO₂ geçirgen polietilen torbalarda ters çevrilerek veya CO₂ geçirgen bantlarla kenarları kapatılarak inkübe edilmelidirler.
- Tüm katı besiyerleri, hızlı üreyen mikobakterilerin erken saptanabilmesi ve kontamine kültürlerin hemen uzaklaştırılması amacıyla inokülasyondan 3-5 gün sonra incelenir.
- Üreme olan besiyerlerinde kontaminasyon kontrolü için ARB boyama yapılır.
- Örnekte kontaminasyon saptanırsa işlem görmüş örnekten yeniden dekontaminasyon yapıldıktan sonra tekrar ekim yapılır.

Ek-5 Suş saklama yönergesi

Malzeme

- Cam boncuklar, 1-2 mm çaplı, steril
- Derin dondurucu (-80°C)
- Katı besiyerinde üremiş kültür
- Otomatik pipet, pipet uçları veya Pastör pipeti
- Bisturi, steril
- Distile su, steril
- Öze, steril
- Vorteks
- Yağsız süt
- Tüpler, 2 mL'lik, polipropilen, vida kapaklı, steril tüp – suşu saklamak için stok tüpü
- Tüpler, 50 mL'lik, polipropilen, vida kapaklı, steril santrifüj tüpü – süspansiyon hazırlamak için

Biyogüvenlik Uyarısı!

- **Eldiven ve önlüğünüzü giyiniz!**
- **Solunum maskenizi takınız!**
- **Biyogüvenlik kabinini kullanınız!**
- **İş bitiminde tüm malzemelerinizi otoklavlayınız!**

Yönerge

- Moleküler ve klasik tiplendirme sonucu MTBC olarak tanımlanmış, majör/ minor ilaç duyarlılık testleri yapılmış suşlar bir liste altında toplanır. Her suşa ayrı bir suş **stok numarası** verilerek saklamaya alınır.
- Her suş için iki adet **stok tüpü** hazırlanır.
- Her suş için bir bakteri **süspansiyon tüpü** (50 mL'lik santrifüj tüpü) hazırlanır.
- Tüplerin üzerine ve kapaklarına saklanacak suşun numarası yazılır.
- Süspansiyon tüpüne 5-7 mL steril distile su konur.
- İyi ve bol üremiş 3-5 haftalık taze kültürden (5 koloniden az bakteri suş stoklama işlemine alınmaz) 1-2 öze dolusu koloni alınır, süspansiyon tüpüne aktarıldıktan sonra tüpün kapağı sıkıca kapatılır.
- Bakteri süspansiyonu gözle görülebilecek kadar büyük partiküller kalmayana kadar 2-5 dk vortekslenir.
- Büyük partiküllerin dibe çökmesini sağlamak için 20-30 dk oda sıcaklığında bekletilir.
- Yağsız sütün bulunduğu kutunun ağız kısmı veya steril bisturi ile kesilerek açılan kısmı, alkol veya çamaşır suyu ile ıslatılmış gazlı bezle dezenfekte edilir.
- İlk önce yağsız süttten her bir "stok tüpü"ne steril pipet ile 750-900 µL aktarılır.
- Daha sonra bakteri süspansiyonundan 750-900 µL alınıp, "stok tüpleri"ndeki yağsız sütün üstüne aktarılır; böylece iki adet 1,8 mL yeni süspansiyon elde edilir.
- Kullanılan pipet ucu veya Pastör pipeti 1/10 sulandırılmış çamaşır suyu bulunan atık kabına atılır.
- Stok tüplerin kapağı sıkıca kapatıldıktan sonra, tüpler alt üst edilerek bakteri süspansiyonu ile yağsız sütün iyice karışması sağlanır
- Stok tüpleri önceden hazırlanmış stok kutularına konarak -30°C ile -80°C arasındaki derin donduruculara yerleştirilir.

Ek-6 Besiyeri kalite kontrol yönergesi

Malzeme

- Pozitif kontrol
 - *M. tuberculosis* ATCC 25177 (H37Ra)
 - *M. kansasii* ATCC 12478
 - *M. fortuitum* ATCC 2841 (hızlı üreme için)
- Negatif kontrol
 - *Escherichia coli* ATCC 25922

Biyogüvenlik Uyarısı!

- **Eldiven ve önlüğünüzü giyiniz!**
- **Solunum maskenizi takınız!**
- **Biyogüvenlik kabinini kullanınız!**
- **İş bitiminde tüm malzemelerinizi otoklavlayınız!**

Yönerge

- Yeni hazırlanan veya ticari olarak satın alınan hazır besiyerlerine iç kalite kontrol programı uygulanır.
- Rastgele 10 adet besiyeri seçilir ve renk, hava kabarcığı, yüzeyinde pürüz olup olmadığına bakılır.
- Sterilite kontrolü için $36\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de boş besiyeri iki gün inkübe edilir.
- Besiyerlerinin üretme yeteneği ve hızının test edilebilmesi için pozitif kontrol suşları ile ekim yapılır.
 - Besiyerleri 3. günde kontaminasyon takibi için, sonrasında haftada bir üremeler açısından kontrol edilerek 6 hafta süreyle inkübe edilir.
 - Standart suşlar MB 7H9 sıvı besiyerinde 0,5 McFarland bulanıklığında hazırlanır.
 - Kalibre bir öze veya pipet kullanarak kontrol süspansiyonundan 10 µL besiyerine inoküle edilir.
 - Besiyerinin seçicilik özelliği için steril %0,85 NaCl içerisinde 1:10 dilüsyonu hazırlanan süspansiyondan 10 µL besiyerine inoküle edilir.
 - Tüm besiyerleri $35-37^{\circ}\text{C}$ 'de ve %5-10 CO_2 'li ortamda 21 güne kadar inkübe edilir.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesinde (UTTR-4 [Bölüm 4] Kültür) geçen bazı hususlar için daha ayrıntılı veya ilave bilgi için aşağıda listelenen UMS belgelerine başvurunuz:

- UMS, UTTR-1 [Bölüm 1] Biyogüvenlik
- UMS, UTTR-2 [Bölüm 2] Örnek Yönetimi
- UMS, UTTR-3 [Bölüm 3] Mikroskopi

Kaynaklar

- 1 World Health Organization. Services in tuberculosis control culture. Part III. Geneva: WHO, 1998. <http://wwwn.cdc.gov/dls/ila/documents/lstc3.pdf>
- 2 Soilingen DV, Jarlier V, Drobniewski F. Information for physicians: The laboratory diagnosis of tuberculosis-first steps. *In: Mastering the Basics of TB Control: Development of a Handbook on TB Diagnostic Methods*. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control Technical Report, 2011, p. 96-99. http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1105_TER_Basics_TB_control.pdf
- 3 CLSI. Laboratory detection and identification of *Mycobacteria*. Approved Guideline. CLSI document M48-A, Vol. 28, No. 17. Pennsylvania. 2008.
- 4 Pfyffer GE. *Mycobacterium*: General characteristics, laboratory detection, and staining procedures. *In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds). Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed, ASM Pres, Washington, D.C. 2007, p. 543-72.
- 5 Della-Latta P, Weitzman I. Mycobacteriology, *In: Isenberg HD (ed). Essential Procedures for Clinical Microbiology*. ASM, Washington, D.C. 1998, p. 171-202.
- 6 Tuberculosis – Information for Health Care Providers. 4th ed., Ontario Lung Association. 2009 <http://www.on.lung.ca/document.doc?id=475>
- 7 Ceyhan İ. Tüberkülozda Bakteriyolojik Tanı. Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, Ankara, 2007.
- 8 Tüberküloz Tanı ve Tedavi Rehberi. Başak Ltd. Şti., Ankara, 2011. <http://www.verem.org.tr/pdf/tum-kitap.pdf>
- 9 Tüberküloz. Toraks Kitapları, Türk Toraks Derneği, Sayı: 11, Aves Yayıncılık, İstanbul, 2010. <http://www.toraks.org.tr/uploadFiles/book/file/79201116497-TUBERKULOZ.pdf>
- 10 Clark RB, Lewinski MA, Loeffelholz MJ, Tippetts RJ. Cumitech 31A: Verification and validation of procedures in the clinical microbiology laboratory. Sharp SE (coordinating ed). ASM Pres, Washington, D.C. 2009.
- 11 CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendments) Standards. 1988.



ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

ULUSAL TÜBERKÜLOZ TANI REHBERİ (UTTR)

Tür Tayini

Hazırlayan Birim	Tüberküloz Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Tüberküloz
Bölüm	Tür Tayini
Standart No	UTTR-5
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2014
Geçerlilik tarihi	01.01.2016

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	2
TÜR TAYİNİ - TEKNİK BİLGİLER.....	3
1 Temel prensip	3
2 Yöntem çeşitleri ve avantaj-dezavantajları.....	3
3 Tür tayini için asgari laboratuvar koşulları	6
4 İşlem.....	7
5 Sonuçların değerlendirilmesi ve raporlama	8
6 Saklama	8
7 Kalite kontrol	8
8 Olası sorunlar/kısıtlılıklar	9
TANI AKIŞ DİYAGRAMI	10
EKLER.....	11
Ek-1 Katalaz testi uygulama yönergesi	11
Ek-2 Niasin birikim testi uygulama yönergesi.....	12
Ek-3 Nitrat indirgenme testi uygulama yönergesi	13
Ek-4 PNB testi uygulama yönergesi.....	14
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ	15
KAYNAKLAR.....	16

"Basit yaşa ki başkaları da var olabilsin."

M. Gandhi

Kapsam ve Amaç

Bu Rehberin amacı; tüberkülozun mikrobiyolojik tanısının doğru yapılabilmesi için kültürdeki üremelerin *M. tuberculosis kompleks* (MTBC) ve Tüberküloz Dışı Mikobakteri (TDM) ayrımını standartlara uygun yapılmasının sağlanmasıdır.

Bu bölüm, tüberküloz laboratuvarlarında izolatin tür tayini işlemine alınma ve değerlendirme sürecini kapsamaktadır.

Tür Tayini - Teknik Bilgiler

Tüm kültürde üreyen mikobakterilerin MTBC ve TDM ayrımı yapılmalıdır. İnsan mikobakteri enfeksiyonlarının çok büyük bir kısmında etken MTBC olduğundan tür tayininde temel hedef MTBC'nin TDM'den ayrılması olmalıdır.

1 Temel prensip

MTBC'nin tanımlanması uygun tedavi kararını belirlediği için hasta yönetiminde önemli bir basamak oluşturmaktadır.

Kültürde üremiş izolatların MTBC-TDM olarak ayrımında üreme özellikleri ve biyokimyasal testler kullanılmakla birlikte, son yıllarda hızlı genotipik ve immünokromotografik yöntemler de kullanılmaya başlanmıştır.

2 Yöntem çeşitleri ve avantaj-dezavantajları

MTBC-TDM ayrımında biyokimyasal testler zaman alıcı ve zahmetli olup sonuçların değerlendirilmesi güç olabilmektedir.

Günümüzde kullanılan farklı genotipik ve immünokromotografik yaklaşımların çoğu laboratuvarlarda yaygın kullanım alanı bulmuştur.

Bu yöntemler hızlı ve güvenilir şekilde MTBC-TDM ayrımı yapabilmektedir. MTBC-TDM ayrımı;

- Fenotipik yöntemler
 - Üreme özellikleri
 - Biyokimyasal testler
 - HPLC (High Performance Liquid Chromatography)
- Genotipik yöntemler
 - PCR restriksiyon enzim analizi
 - Ters hibridizasyon testleri
- İmmünokromotografik yöntemler

2.1. Fenotipik yöntemler

2.1.1. Üreme özellikleri

MTBC'nin üreme özellikleri aşağıdaki gibidir:

- Üreme hızı; katı besiyerine kültür pasajında 7. günden sonra ürer.
- Koloni morfolojisi; R tipi (düzensiz), kuru, devetüyü renginde koloniler oluşturur.
- Pigment üretimi; pigment yapmaz.
- Mikroskopik morfoloji; sıvı kültürden yapılan ARB boyamanın incelenmesinde yılanvari / halat benzeri yapılar (kord faktör) görülür.

Üreme özellikleri bakterinin ön tanımlanmasında MTBC-TDM ayırımına yardımcı olmakla birlikte, MTBC'nin kesin tanısı için yeterli değildir.

2.1.2. Biyokimyasal testler

MTBC'nin TDM'den ayırımında kullanılan biyokimyasal testler ve bu testlere ait MTBC sonuçları aşağıdaki gibidir:

- Katalaz testi; negatif
- Niasin birikim testi; pozitif
- Nitrat indirgenme testi; pozitif
- Paranitrobenzoik asit (PNB)'li besiyerinde üreme; üremez

PNB'de üreme olmaması MTBC olarak değerlendirilir.

Katalaz, niasin ve nitrat indirgenme testleri bir arada kullanılmalıdır, tek başlarına MTBC-TDM ayırımı yapamazlar.

Katalaz testi

Bazı izoniazid dirençli *M. tuberculosis* ve *M. bovis* suşlarının dışındaki bütün mikobakteriler katalaz aktivitesi gösterirler. Bununla birlikte mikobakterilerin katalaz üretimi ve enzimin ısıya stabilitesi değişkenlik gösterir.

Katalaz aktivitesi iki şekilde araştırılır;

- (a) Katalaz üretim miktarı (semikantitatif test) (Ek-1a Uygulama Yönergesi)
- (b) 68°C'de ısıya stabil katalaz (Ek-1b Uygulama Yönergesi)

Niasin birikim testi

Bütün mikobakteriler üremeleri süresince nikotinik asit üretirler. *M. tuberculosis* ve *M. simiae* ile *M. chelonae*'nin bazı izolatları daha fazla nikotinik asidi metabolize edemezler ve ortamda daha fazla birikir. Niasin agarda birikir ve buradan ayrıştırılarak tespit edilir (Ek-2 Niasin Birikim Testi Uygulama Yönergesi).

Nitrat indirgenme testi

Mikobakteriler nitratı indirgeme kabiliyetlerine göre birbirinden ayrılır. Bu test, nitritin uygun reaktifler ile reaksiyona girdiğinde renk oluşumunun gösterilmesi prensibine dayanır. Günümüzde nitrat indirgenmesini tespit eden strip testler

bulunmaktadır (Ek-3 Nitrat İndirgenme Testi Uygulama Yönergesi).

PNB (p-nitrobenzoik asit) testi

MTBC'nin tanımlanmasında 37°C'de PNB'li besiyerinde üreme özelliği kullanılabilir. PNB, MTBC'nin üremesini selektif olarak inhibe eder (Ek-4 PNB Testi Uygulama Yönergesi).

2.1.3. HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Mikobakteri kültür izolatlarının tanımlanmasında, mikolik asitlerin ekstraksiyonu ve ayrıştırılmasına dayanan kimyasal bir yöntemdir. Uygulama zorluğu ve ekipman gereksinimi nedeniyle tüberküloz laboratuvarlarında yaygın kullanım alanı bulamamıştır.

2.2. Genotipik yöntemler

2.2.1. PCR restriksiyon enzim analizi (PRA)

Katı veya sıvı kültürden elde edilen izolatların hsp65 geninin 441 bp'lik bir parçasının PCR ile amplifikasyonunu takiben amplifiye ürünlerin BstEII ve HaeIII restriksiyon enzimleri ile kesimi esasına dayanmaktadır.

Kesim reaksiyon ürünleri daha sonra agaroz jel elektroforez yöntemi ile incelenir. Elde edilen restriksiyon paternleri, fragman büyüklüğü algoritması ile karşılaştırılarak mikobakteri tipi belirlenir.

Test bir gün içinde tamamlanabilir. Test maliyeti uygun olmakla birlikte ekipman, donanım ve deneyimli personel gerektirir.

2.2.2. Ters hibridizasyon testleri

Kültür izolatından amplifiye edilmiş biyotinle işaretli PCR ürünlerinin, nitrosellüloz şeritler üzerine bağlanmış özgün DNA problemleri ile hibridize edilmesi temeline dayanır.

Ters hibridizasyon testleri "Line Probe Assay (LPA)" hızlı, uygulaması ve değerlendirmesi kolay, ancak ekipman gerektiren ve maliyeti yüksek testlerdir.

Bu amaçla hazırlanmış çeşitli ticari kitler mevcuttur. Çalışmalar üretici firma önerileri doğrultusunda gerçekleştirilir.

2.3. İmmünokromatografik yöntemler

Son yıllarda kullanımı giderken artan MTBC'ye özgü hücre duvar antijenlerini (MPT-64) saptamaya yönelik geliştirilmiş testlerdir.

Hem katı hem de sıvı kültürden çalışılabilmekte ve dakikalar içerisinde sonuç alınabilmektedir.

Basit, uygulaması kolay, hızlı, ekipman gerektirmeyen ve maliyeti düşük testlerdir.

3 Tür tayini için asgari laboratuvar koşulları

3.1. Laboratuvar güvenliğı önlemleri

- Laboratuvarın fiziki tasarımı;
 - Temiz alandan kirli alana doğru tek yönlü hava akımı olan
 - Saatte 6-12 kez temiz hava değışimi sağlayan mekanik havalandırma sistemli
 - Kendiliğinden kapanan şifreli / kilitli kapıya sahip bir giriş odasına sahip
 - İzlenebilir negatif basınçlı bir çalışma alanı
- Biyogüvenlik donanımı;
 - Sınıf-IIA biyogüvenlik kabini
- Kişisel koruyucu donanım (KKD);
 - Eldiven
 - Önlük
 - Solunum maskesi kullanılmalıdır (Tablo 1).

Tablo 1. Tür tayini işlemleri sırasında alınması gereken önlemler

		Laboratuvar tasarımı		Laboratuvar donanımı		Kişisel koruyucu donanım		
		Havalandırma	Laboratuvar giriş sınırlaması	BGK	Otoklav	Eldiven	Önlük	Maske
Tür tayini	Üremiş kültürden yapılan her işlem	Negatif basınçlı mekanik havalandırma	BGD-3 işaretli kilitli çift kapılı giriş	✓	✓	✓	✓	✓
Moleküler test	İşlenmiş örnekten ekstraksiyon	Saatte 6-12 hava değışimi	BGD-2 işaretli giriş sınırlaması	✓	<i>Opsiyonel</i>	✓	✓	<i>Opsiyonel</i>
	Üremiş kültürden ekstraksiyon	Negatif basınçlı mekanik havalandırma	BGD-3 işaretli kilitli çift kapılı giriş	✓	✓	✓	✓	✓
	DNA'dan yapılan işlemler	Doğal havalandırma	BGD-2 işaretli giriş sınırlaması	-	-	✓	✓	-

Ayrıntılı bilgi "UTTR-1 Biyogüvenlik" başlığı altında verilmiştir.

3.2. Gerekli donanım

Tür tanımlaması yapılırken gereken donanım seçilen yöntemle göre değışmektedir.

- Biyokimyasal testlerde;
 - İnkübatör
 - Su banyosu
- HPLC yönteminde;
 - HPLC cihazı
- PCR restriksiyon enzim analizinde;

- Termal cycler
- Elektroforez cihazı
- Ters hibridizasyon testlerinde;
 - Termal cycler
 - Hibridizasyon cihazı gereklidir.

4 İşlem

- Kültürde üreme olması durumunda, üreme öncelikle ARB ile doğrulanmalıdır (*bkz.* UTTR-4 Kültür).
- ARB pozitif tüm üremelerde MTBC ve TDM ayrımı yapılmalıdır.
- Tür tayini sonucunda TDM olarak tespit edilen suşlar her zaman klinik olarak anlamlı olmayabilir, raporlanırken klinik anlamlılık göz önünde bulundurulmalıdır (*bkz.* Kutu 1).

Kutu 1. Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin (TDM) Klinik Anlamlılığı

▪ Hastanın klinik durumu

TDM için altta yatan hastalık, immün sistemi baskılayan bir hastalığın varlığı ve hastalarda deri bütünlüğünü bozan aletlerin bulunması risk faktörüdür.

▪ Tespit edilen mikroorganizmanın hastalandırıcılık potansiyeli

Bazı türler (*M. gordonae*, *M. xenopi*, *M. fortuitum*, *M. mucogenicum*, *M. terrae* kompleks, vb.) sıklıkla çevresel patojendir. Ancak bunların varlığı diğer maddeler ile birlikte değerlendirilmelidir.

▪ Klinik örneğin türü ve kontamine olma ihtimali

Sıklıkla çevresel patojen olan bir etkenin (örnek; *M. mucogenicum*) balgamda tespiti anlamlı değilken venöz kateterli bir hastanın kanında tespit edilmesi sepsisle ilişkili olabilir.

▪ ARB pozitiflik derecesi

Balgamda ARB pozitifliğinin yüksek olması anlamlı olarak kabul edilirken diğer örnek türleri için böyle bir özellik aranmamalıdır.

▪ Kültürdeki üreme sayısı

Balgam için birden fazla örnekte kültürde üreme olması ve steril alanlardan alınan örneklerde tek bir kültürde üreme olması anlamlıdır.

5 Sonuçların değerlendirilmesi ve raporlama

Test sonuçları kullanılan yöntemle göre değerlendirilerek raporlandırılır. Ayrıca tüm raporlarda testin hangi yöntemle yapıldığı belirtilmelidir. Yukarıdaki yöntemlerden herhangi biri ile yapılan tanımlama sonucunda;

- (a) MTBC olarak tespit edilen izolatlar "*Mycobacterium tuberculosis* kompleks" olarak rapor edilir.

Uyarı!

- *Mycobacterium tuberculosis* kompleks içerisindeki türlerin ayrımı yapılmadığı sürece "*Mycobacterium tuberculosis*" olarak rapor edilmez.
- "*Mycobacterium tuberculosis* kompleks" olarak rapor edilir.

- (b) TDM olarak tespit edilen izolatlar "Tüberküloz Dışı Mikobakteri" olarak rapor edilir.

Uyarı! - Tür tayini sonuçlarının raporlanması

- *M. tuberculosis* kompleks tanımlanması örnek kabulünü takip eden ortalama 21 gün içerisinde raporlanmalıdır.
- Tüm *M. tuberculosis* kompleks sonuçları ilgili birim/hekime ve İl Halk Sağlığı Müdürlüğüne ivedilikle bildirilmelidir.

6 Saklama

Kültür izolatları en az 1 yıl süre ile saklanır (*bkz.* Suş Saklama Yönergesi).

7 Kalite kontrol

7.1. İç kalite kontrol

Tür tayini testlerinde kullanılan teste göre kullanılması önerilen kalite kontrol işlemleri farklılık gösterir. Testlerde kullanılan malzeme ve donanımların düzenli bakım ve kalibrasyonları yapılmalıdır. Yapısal kontrolünü kendi içerisinde bulunduran ticari sistemlerde sonuçlar, kontrol sonuçlarının uygunluğuna göre verilmelidir. Biyokimyasal testlerde kullanılması gereken kalite kontrol suşları Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Biyokimyasal testlerde kullanılması gereken kalite kontrol suşları

Test Adı	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol
Katalaz Testi	<i>M. gordonae</i> ATCC 14470	<i>M. tuberculosis</i> ATCC 25177
Niasin Birikim Testi	<i>M. tuberculosis</i> ATCC 25177	<i>M. intracellulare</i> ATCC 13950
Nitrat İndirgenme Testi	<i>M. tuberculosis</i> ATCC 25177	<i>M. intracellulare</i> ATCC 13950
PNB Testi	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. tuberculosis</i> ATCC 25177

7.2. Dış kalite değerlendirme

Tür tayininde laboratuvarın yetkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla ulusal veya uluslararası bir Dış Kalite Değerlendirme programına katılması gerekir. Bu amaçla Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı tarafından düzenlenen Dış Kalite Değerlendirme programına katılım sağlanabilir.

Uyarı! – Tür tayininde kalite göstergeleri

- Kültür pozitif örneklerde MTBC / TDM oranı takip edilmelidir.

Ayrıntılı bilgi için bkz. UTTR-3. Ek-9. Laboratuvar kalite göstergeleri

8 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

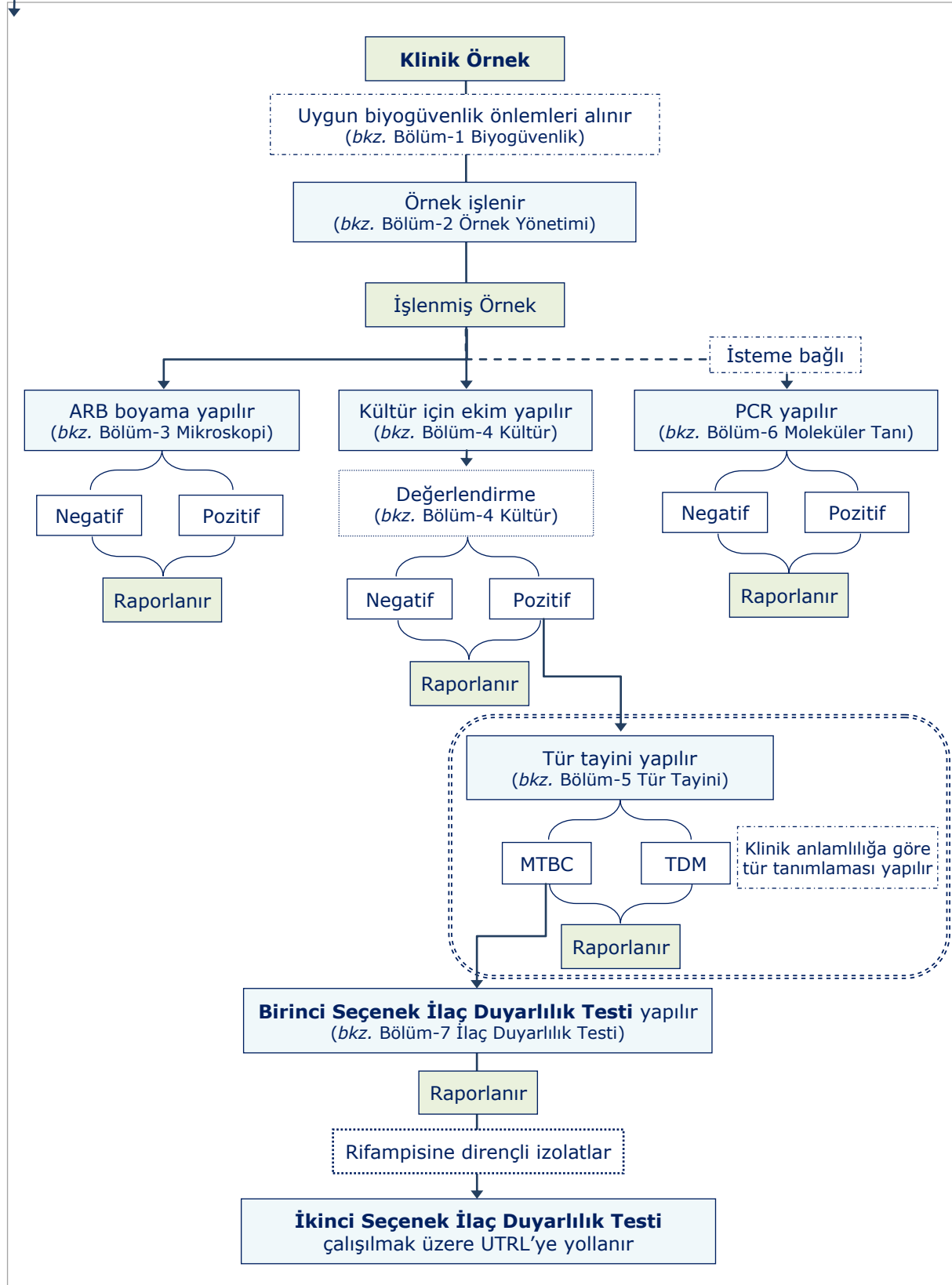
Fenotipik yöntemler;

- Zahmetli ve zaman alıcı yöntemlerdir
- Taze kültür ve kültür pasajı gerektirir
- Kesin sonuç vermeyebilir
- Biyolojik risk düzeyi yüksektir.

Genotipik yöntemler;

- Maliyetlidir
- Ekipman ve deneyimli personel gerektirir.

Tanı Akış Diyagramı



Ekler

Ek-1 Katalaz testi uygulama yönergesi

Ek-1a Katalaz üretim miktarı (semikantitatif test)

Malzeme	Uygulama
Besiyeri, ayıraç - Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri - LJ besiyeri (25x150 mm tüpte) - Katalaz ayırıcı (%30'luk H₂O₂) Diğer gereç, donanım - İnkübatör - Steril Pastör pipetleri	- LJ besiyerinin dip kısmına 7 günlük sıvı kültürden 0,1 mL ya da aktif olarak üreyen koloniden bir öze dolusu ekilir. 37°C'de 2 hafta boyunca kapakları gevşek olarak inkübe edilir. - Besiyerine 1 mL %30'luk H₂O₂ ilave edilir - Oda ısısında 5 dk bekletilir. - Oluşan hava kabarcığının besiyerinde oluşturduğu yükseklik (milimetre) ölçülür. - Hava kabarcıklarının yüksekliğinin 45 mm altında olması <i>M. tuberculosis</i> kompleks lehinedir.

Ek-1b 68°C'de ısıya stabil katalaz

Malzeme	Uygulama
Besiyeri, ayıraç - Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri - LJ besiyeri (25x150 mm tüpte) - Katalaz ayırıcı (%30'luk H₂O₂) %10'luk Tween 80 - M/15 fosfat tamponu (0,067 M) Diğer gereç, donanım - İnkübatör - Steril Pastör pipetleri	- Vida kapaklı bir tüpte 0,5 mL 0,067 M fosfat tamponundan (pH 7) yoğun bir organizma süspansiyonu hazırlanır. - Su banyosunda ya da ısı bloğunda 68°C'de 20 dk inkübe edilir. - Oda ısısına kadar soğutulur. 0,5 mL katalaz ayırıcı ilave edilir. - Tüpün kapağı gevşekçe kapatılır, tüpler çalkalanmamalıdır. - Oda ısısında 5 dk bekledikten sonra test yorumlanır. - Çok az kabarcık oluşması bile pozitif olarak değerlendirilir. - Kabarcık oluşmaması ise negatif olarak değerlendirilir.

Biyogüvenlik Uyarısı!

- **Eldiven ve önlüğünüzü giyiniz!**
- **Solunum maskenizi takınız!**
- **Biyogüvenlik kabinini kullanınız!**
- **İş bitiminde tüm malzemelerinizi otoklavlayınız!**

Ek-2 Niasin birikim testi uygulama yönergesi

Malzeme

Besiyeri, ayıraç

- Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri
- LJ besiyeri (25x150 mm tüpte)
- Ticari niasin test stripleri
- Distile su ya da serum fizyolojik (SF)
- %10'luk sodyum hidroksit (NaOH)

Diğer gereç, donanım

- İnkübatör
- Steril vida kapaklı test tüpleri (20x125 mm)
- Steril Pastör pipetleri

Biyogüvenlik Uyarısı!

- **Eldiven ve önlüğünüzü giyiniz!**
- **Solunum maskenizi takınız!**
- **Biyogüvenlik kabinini kullanınız!**
- **İş bitiminde tüm malzemelerinizi otoklavlayınız!**

Uygulama

- LJ besiyerinde yoğun olarak üreyen 4 haftalık kültüre 1 mL steril distile su ya da SF ilave edilir.
- Steril bir öze ile besiyeri yüzeyindeki kolonilerin, besiyerine fazla zarar vermeden, kazınarak sıvı içerisine geçmeleri sağlanır.
- Tüpler eğik bir şekilde 15 dk bekletilerek sıvının besiyeri yüzeyini örtmesi sağlanır.
- Süre sonunda tüpteki sıvıdan 0,6 mL steril bir tüpe aktarılır.
- Niasinin bu sıvıya geçmesi için 15-20 dk kadar beklenir.
- Sıvının rengine göre değerlendirilir;
 - Rengin sarıya dönmesi pozitif,
 - Rengin değişmemesi ise negatif olarak değerlendirilir.
- Tüpler atılmadan önce üzerine %10 NaOH ilave edilir.

Ek-3 Nitrat indirgenme testi uygulama yönergesi

Malzeme	Uygulama
Besiyeri - Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri - LJ besiyeri (25x150 mm tüpte) Ayıraçlar - Sodyum nitrat çözeltisi 0,085 g NaNO₃ 0,117 g KH₂PO₄ 0,485 g Na₂HPO₄.12H₂O 100 mL distile su karıştırılarak otoklavlanır. - Ayıraç 1 50 mL konsantre HCl 50 mL steril su Asit suyun üzerine dikkatle ilave edilir. - Ayıraç 2 (%0,2'lik sulfanilamid) 0,2 g sülfanilamid 100 mL distile su Su banyosunda çözdürülür. - Ayıraç 3 (%0,1'lik β-N-(1-naftil) etilendiamin dihidroklorid; n-NEDD) 0,1 g n-NEDD 100 mL distile su Diğer gereç, donanım - İnkübatör - Su banyosu - Steril Pastör pipetleri - Steril 5 mL pipetler	- Tüplere 0,2 mL steril distile su konur. - Üzerine en fazla 4 haftalık kültürden bir öze dolusu (~0,1 g) koloni konur. 2 mL sodyum nitrat çözeltisi eklenir. - Çalkalanarak karıştırılır ve 37°C'de 2 saat inkübe edilir. - Süre sonunda; 1 damla ayıraç 1 2 damla ayıraç 2 2 damla ayıraç 3 ilave edilir. - Beklemeden değerlendirme yapılır; - Pembeden koyu kırmızıya olan renkler pozitiftir. - Renk değişimi olmazsa üzerine çinko tozu eklenir. - Bu durumda pembe renk oluşursa bu durum gerçek negatiftir. Değişmezse pozitiftir.

Biyogüvenlik Uyarısı!

- Eldiven ve önlüğünüzü giyiniz!**
- Solunum maskenizi takınız!**
- Biyogüvenlik kabinini kullanınız!**
- İş bitiminde tüm malzemelerinizi otoklavlayınız!**

Saklama

Tüm ayıraçlar koyu renkli şişelerde 4°C'de 1-2 aya kadar saklanabilir. Renk değişikliği ve tortu oluşursa yenisi hazırlanır.

Güvenlik uyarısı!

*Su veya alkol **asla** asit üzerine **eklenmez!**
Asitler sulandırılmak istendiğinde önce su (ya da alkol) ölçülmeli, asit **yavaş bir şekilde** üzerine eklenmelidir!*

Ek-4 PNB testi uygulama yönergesi

Malzeme

Besiyeri, ayıraç

- LJ besiyeri (25x150 mm)
- PNB
- Propilen glikol
- Steril distile su

Donanım Diğer gereç, donanım

- Koagülatör
- İnkübatör
- Steril Pastör pipetleri
- Steril 5 mL pipetler
- Öze
- Steril vida kapaklı test tüpleri (20x125 mm)

Biyogüvenlik Uyarısı!

- **Eldiven ve önlüğünüzü giyiniz!**
- **Solunum maskenizi takınız!**
- **Biyogüvenlik kabinini kullanınız!**
- **İş bitiminde tüm malzemelerinizi otoklavlayınız!**

Uygulama

- 0,5 mg/mL PNB'li besiyeri hazırlanır.
 - 250 mg PNB 10 mL propilen glikol içinde çözündürülür.
 - 98 mL ham LJ besiyerine 2 mL PNB solüsyonu ilave edilir. Ayrıca PNB'siz besiyeri hazırlanır.
 - PNB'li ve PNB'siz ham besiyerleri ayrı ayrı 6'şar mL tüplere dağıtılır.
 - 60 dakika 90°C'de yarı yatık pozisyonda koagüle edilir.
- 0,1 mL veya 1 öze dolusu bakteri süspansiyonu (5 mL steril distile su içinde süspanse edilen) hem PNB'li hem PNB'siz besiyerine (kontrol tüpü) ekilir.
- 37°C'de 4 gün-4 haftaya kadar inkübe edilir.
- PNB'li besiyerinde 4 hafta içinde üreme olmaması durumunda test negatif olarak kabul edilir.
- *M. tuberculosis* komplekste PNB testi negatiftir.
- PNB'siz besiyerinde üreme olmaması ya da çok az sayıda koloni oluşması, testi değerlendirmek için yeterli üremenin olmadığını gösterir.

Saklama

Tüm ayıraçlar koyu renkli şişelerde 4°C'de 1-2 aya kadar saklanabilir. Renk değişikliği ve tortu oluşursa yenisi hazırlanır.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesinde (UTTR-5 [Bölüm 5] Tür Tayini) geçen bazı hususlar için daha ayrıntılı veya ilave bilgi için aşağıda listelenen UMS belgelerine başvurunuz:

- UMS, UTTR-1 [Bölüm 1] Biyogüvenlik
- UMS, UTTR-2 [Bölüm 2] Örnek Yönetimi
- UMS, UTTR-3 [Bölüm 3] Mikroskopi
- UMS, UTTR-4 [Bölüm 4] Kültür

Kaynaklar

- 1 World Health Organization. Services in tuberculosis control culture. Part III. Geneva: WHO, 1998. <http://wwwn.cdc.gov/dls/ila/documents/lstc3.pdf>
- 2 Soilingen DV, Jarlier V, Drobniewski F. Information for physicians: The laboratory diagnosis of tuberculosis-first steps. In: *Mastering the Basics of TB Control: Development of a Handbook on TB Diagnostic Methods*. European Centre for Disease Prevention and Control Technical Report, Stockholm. 2011, p. 96-99. http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1105_TER_Basics_TB_control.pdf
- 3 CLSI. Laboratory Detection and Identification of *Mycobacteria*. Approved Guideline. CLSI document M48-A, Vol. 28, No. 17, Pennsylvania. 2008
- 4 Kent PT, Kubica GP. Public Health Mycobacteriology. A Guide for the level III laboratory-Division of laboratory training and consultation laboratory program office. Public Health Service-Centers for Disease control, Atlanta 1985, p. 159-182.
- 5 Leao SC, Martin A, Mejia GI. Practical handbook for the phenotypic identification of *mycobacteria*. Belgium. 2004
- 6 Pfyffer GE. *Mycobacterium*: General characteristics, laboratory detection, and staining procedures. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed, ASM Pres, Washington, D.C. 2007, p. 543-72.
- 7 Lee LV. Procedures for identification from culture: Mycobacteriology and Antimycobacterial Susceptibility Testing. In: Isenberg HD (ed). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. ASM Press, Washington, D.C. 2004, p. 7.6.1.1-7.6.1.12
- 8 Tuberculosis – Information for Health Care Providers. 4th ed., Ontario Lung Association. 2009 <http://www.on.lung.ca/document.doc?id=475>
- 9 Ceyhan İ. Tüberkülozda Bakteriyolojik Tanı. Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Ankara, 2007
- 10 Tüberküloz Tanı ve Tedavi Rehberi. Başak Ltd. Şti., Ankara, 2011. <http://www.verem.org.tr/pdf/tum-kitap.pdf>
- 11 Tüberküloz. Toraks Kitapları, Türk Toraks Derneği, Sayı: 11, Aves Yayıncılık, İstanbul, 2010. <http://www.toraks.org.tr/uploadFiles/book/file/79201116497-TUBERKULOZ.pdf>



ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

ULUSAL TÜBERKÜLOZ TANI REHBERİ (UTTR)

Moleküler Tanı

Hazırlayan Birim	Tüberküloz Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Tüberküloz
Bölüm	Moleküler Tanı
Standart No	UTTR-6
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2014
Geçerlilik tarihi	01.01.2016

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	2
MOLEKÜLER TANI - TEKNİK BİLGİLER.....	3
1 Temel prensip	3
2 Yöntem çeşitleri ve avantaj-dezavantajları.....	3
3 Moleküler tanı için asgari laboratuvar koşulları	4
4 Uygulama.....	5
5 Kalite kontrol	7
6 Sonuçların değerlendirilmesi ve raporlama	5
7 Saklama	6
8 Olası sorunlar/kısıtlılıklar	7
TANI AKIŞ DİYAGRAMI	8
EKLER.....	9
Ek-1 Moleküler testlerde yöntem geçerliliği	9
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ	11
KAYNAKLAR.....	12

"Fayda vermeyen ilimden sakınanlara..."

Kapsam ve Amaç

Tüberkülozun tanısında günümüze kadar farklı Nükleik Asit Amplifikasyon Temelli (NAAT) testler uygulanmıştır. Bu rehberin amacı; tüberkülozun moleküler tanısında testlerin gereksinimlere uygunluğunu, avantaj, dezavantajlarını, rapor edilme sürecini ve kalite kontrolün önemini vurgulamaktır. Bu bölüm, tüberkülozun moleküler tanısında kullanılan testlerin genel özelliklerini, raporda yer alması gereken bilgileri ve gerekli kalite kontrol uygulamalarını kapsamaktadır.

Moleküler Tanı - Teknik Bilgiler

Tüberküloz hastalığının kesin tanısı mikrobiyolojik inceleme ile konur. "Altın standart" yöntem **kültürdür**. Mikroskopik incelemenin duyarlılığının düşük olması ve kültürde üremenin zaman alması nedeniyle standardize edilmiş, özgüllük ve duyarlılığı yüksek, güvenilir ve hızlı yöntemlerin kullanımına ihtiyaç doğmuştur. Bu amaçla günümüzde, NAAT klinik örnekten hızlı tanıyı desteklemek üzere kullanılmaya başlanmıştır. Hızlı tanı, tedavinin daha erken başlamasını sağlayarak hasta bakım ve sonuçlarının daha iyi olmasına ve bulaşın engellenmesine katkıda bulunacaktır. Ancak NAAT mutlaka altın standart olan kültür yöntemleri ile birlikte kullanılmalı ve sonuçları doğrulanmalıdır.

1 Temel prensip

Klinik ve radyolojik tanıyı desteklemek amacıyla tüberküloz şüpheli hasta örneklerinde *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTBC) varlığının hızlı saptanmasında NAAT kullanımı önerilmektedir.

2 Yöntem çeşitleri ve avantaj-dezavantajları

Tüberküloz şüpheli hasta örneğinde MTBC varlığının saptanmasında birçok NAAT kullanılmaktadır. Bu testler, kısa sürede sonuç alınabilme avantajı nedeniyle tercih edilmektedir.

NAAT içerisinde ilk geliştirilen yöntem, laboratuvar koşullarında hazırlanan (*in-house*) PCR rutin laboratuvarlarda ve araştırma amacıyla kullanılmaktadır. Bu testlerin duyarlılık ve özgüllükleri yıllar içinde artmakla birlikte ticari testlerle karşılaştırıldığında hala düşüktür. Tüberkülozun moleküler tanısında;

- Geleneksel PCR
- Gerçek zamanlı PCR
- Zincir ayrıştırma amplifikasyon (SDA)
- Transkripsiyon aracılı amplifikasyon (TMA)
- Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)
- Ligaz zincir reaksiyonu (LCR) yöntemlerine dayanan *in-house* ve ticari testler kullanılmaktadır.

Klinik örnekte MTBC'nin moleküler yöntemlerle saptanmasında en yaygın olarak kullanılan hedef bölgeleri *M. tuberculosis*'in IS6110, 16s rRNA, 16S 23S ITS, rpoB ve hsp65 gen bölgeleridir.

Moleküler testler;

- Hızlıdır,
- Duyarlılıkları kullanılan yöntemle göre %10-100 arasında değişmektedir,
- Pahalıdır,
- Canlı ve ölü basil ayrımı yapılamamaktadır.
- Yanlış pozitif ve negatif sonuçlar olabilmektedir.

3 Moleküler tanı için asgari laboratuvar koşulları

3.1 Laboratuvar güvenliği önlemleri

Klinik örnekte moleküler yöntemle MTBC aranması için:

- Laboratuvarın fiziki tasarımı;
 - Temiz alandan kirli alana doğru tek yönlü hava akımı olan
 - Saatte 6-12 kez temiz hava değişimi sağlayan mekanik havalandırma sistemli
 - Giriş kontrollü bir çalışma alanı
- Biyogüvenlik donanımı;
 - Sınıf-IIA biyogüvenlik kabini
- Kişisel koruyucu donanım (KKD);
 - Eldiven
 - Önlük kullanılmalıdır (Tablo 1).

Tablo 1. Moleküler tanı işlemleri sırasında alınması gereken önlemler

		Laboratuvar tasarımı		Laboratuvar donanımı		Kişisel koruyucu donanım		
		Havalandırma	Laboratuvar giriş sınırlaması	BGK	Otoklav	Eldiven	Önlük	Maske
Moleküler test	Direkt örnekten ekstraksiyon	Doğal havalandırma	BGD-2 işaretli giriş sınırlaması	-	-	✓	✓	Opsiyonel
	İşlenmiş örnekten ekstraksiyon	Saatte 6-12 hava değişimi	BGD-2 işaretli giriş sınırlaması	✓	Opsiyonel	✓	✓	Opsiyonel
	Üremiş kültürden ekstraksiyon	Negatif basınçlı mekanik havalandırma	BGD-3 işaretli kilitli çift kapılı giriş	✓	✓	✓	✓	✓
	DNA'dan yapılan işlemler	Doğal havalandırma	BGD-2 işaretli giriş sınırlaması	-	-	✓	✓	-

Ayrıntılı bilgi "UTTR-1 Biyogüvenlik" başlığı altında verilmiştir.

3.2 Gerekli donanım

Moleküler tanı testleri için gereken donanım seçilen yöntemle göre belirlenir.

4 Uygulama

- Rutin olarak alınan örnekler işlendikten sonra ARB mikroskopisi ve kültür ekimleri yapılır.
- Örnek alımı ve mikrobiyolojik işlemler NAAT sonuçları için bekletilmemelidir.
- Hasta örneklerinden en az birinden NAAT üretici firma önerileri veya geçerli standart çalışma prosedürlerine uygun olarak çalışılır.

Uzman Görüşü - Moleküler tanı testlerinin yapılması önerilen durumlar

- *Tüberküloz olduğundan kuvvetle şüphelenilen yayma negatif olgular*
- *Yayma duyarlılığının düşük olduğu akciğer dışı tüberkülozu şüpheli olgular*

5 Sonuçların değerlendirilmesi ve raporlama

Klinik örnekten çalışılan NAAT canlı ve cansız bakterileri ayıramamaktadır. Tedavi almakta olan hasta örneklerinden çalışılan testler ölü basiller nedeniyle pozitif sonuçlanabilir.

Klinik örnekteki basilin homojen dağılmaması, yeterli nükleik asit elde edilememesi veya ortamda çoğalmayı engelleyen faktörlerin bulunması da sonucun negatif olmasına neden olabilir. Bu olasılıklar nedeniyle rapor sonucu yorumlanarak verilmelidir (Tablo 2).

NAAT sonuçlarının ARB sonuçları ile korelasyonu değerlendirilir.

- ARB mikroskopisi ve NAAT **pozitif** ise; hasta >%95 olasılıkla tüberkülozudur.
- ARB mikroskopisi **negatif**, NAAT **pozitif** ise; klinik olarak karar verilerek tedaviye başlanabilir veya kültür sonucu beklenebilir veya ek bir örnekte daha NAAT çalışılabilir. Kültür sonucunu beklerken iki veya fazla örnekte NAAT pozitif bulunan hasta tüberküloz olarak varsayılabilir.
- ARB mikroskopisi **pozitif**, NAAT **negatif** ise; inhibitörlerin varlığı araştırılmalı, ek bir örnekte daha NAAT çalışılmalıdır. Balgam örnekleri %3-7 oranında inhibitör içermektedir.
 - İnhibitör saptanan örnekte NAAT'nin tanısal değeri yoktur. Bu durumda kültür ve ek test sonuçları beklenirken tedavi kararı klinik olarak verilmelidir.
 - İnhibitör saptanmazsa, kültür sonucu beklenirken ve ek test gerekliliği belirlenirken tedavi kararı klinik olarak verilmelidir. İkinci örnekte de ARB mikroskopisi pozitif, NAAT negatif bulunur ve inhibitör saptanmazsa hastada TDM olduğu düşünülebilir.
- ARB mikroskopisi ve NAAT **negatif** ise; kültür ve ek test sonuçları beklenirken tedavi kararı klinik olarak verilmelidir.

Uyarı! - Moleküler test sonuçlarının yorumlanması

- Moleküler testlerin negatif olmasının aktif tüberküloz olasılığını ortadan kaldırmadığı unutulmamalıdır.

Tablo 2. Moleküler sonuçların raporlanması

Test	Sonuç	Raporlama	Yorum
PCR testleri	Pozitif	<i>M. tuberculosis</i> kompleks DNA'sı tespit edildi	Pozitif sonuç canlı basili göstermez. Kültür ile doğrulanmalıdır.
	Negatif	<i>M. tuberculosis</i> kompleks DNA'sı tespit edilmedi	Negatif sonuç tüberküloz ve tüberküloz dışı mikobakteri enfeksiyonunu ekarte ettirmez. Kültür ile doğrulanmalıdır.

Hasta örneği laboratuvara ulaştıktan sonra testlerin en kısa sürede çalışılması ve sonuçların en kısa sürede raporlanması gerekmektedir.

Uyarı! - Moleküler test sonuçlarının raporlanması

- *M. tuberculosis* kompleks tanımlanması örnek kabulünü takip eden ortalama 7 gün içerisinde raporlanmalıdır.
- Tüm *M. tuberculosis* kompleks sonuçları tetkiki isteyen birime/hekime ve İl Halk Sağlığı Müdürlüğü'ne ivedilikle bildirilmelidir.

6 Saklama

Günümüzde kullanılmakta olan NAAT direkt klinik örnekten yapılabildiği gibi işlenmiş örnekten de yapılabilmektedir.

NAAT çalışmaya başlanana kadar örnek 2-8°C'de muhafaza edilmelidir.

7 Kalite kontrol

Kalite kontrol programları tüm laboratuvar testlerinde olduğu gibi moleküler testlerde de doğru, tekrarlanabilir ve güvenilir test sonuçları için gereklidir. Testin laboratuvarında çalışmaya başlanmasını takiben öncelikle yöntem geçerlilik testleri "Moleküler Testlerde Yöntem Geçerliliği Yönergesi"ne (Ek-1) göre yapılmalıdır.

Klinik örneklerde bulunabilen nükleaz ve proteazlar amplifikasyonu engelleyerek yalancı negatifliğe yol açabilirler. Ticari testlerde genellikle kit içeriğinde bulunan internal amplifikasyon kontrolü ile inhibitör varlığı gösterilebilmektedir. Pozitif ve negatif iç kalite kontrol örnekleri her çalışmada mutlaka test edilmelidir.

En az yılda bir kez olmak üzere dış kalite değerlendirme programlarına katılıp geçerli sonuçlar alındığının belgelenmesi gerekmektedir.

NAAT performansının takip edilmesini sağlayan dış kalite değerlendirme programlarının seçiminde program sağlayıcının ISO 17043 akreditasyon belgesine sahip olması önem taşımaktadır. Hatalı sonuçlar için mutlaka düzeltici ve önleyici faaliyetler belirlenmeli ve uygulanmalıdır.

Uyarı! – Moleküler tanı testlerinde kalite göstergeleri

- Kültür ile uyum takip edilmelidir.

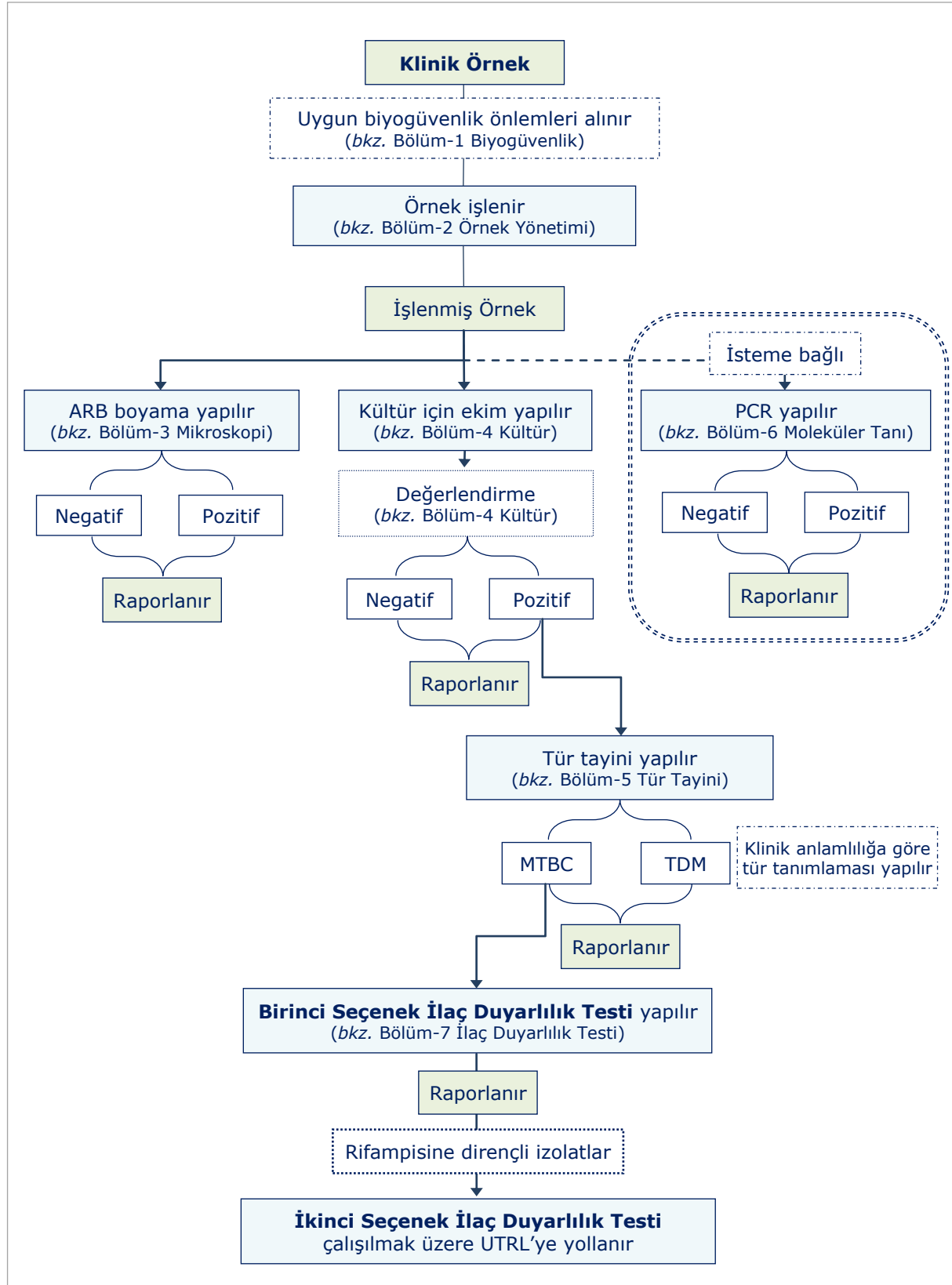
Ayrıntılı bilgi için bkz. UTTR-3. Ek-9. Laboratuvar kalite göstergeleri

8 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

NAAT çalışmasında; örnekteki basilin homojen dağılmaması, yeterli nükleik asit elde edilememesi veya ortamda çoğalmayı engelleyen faktörlerin bulunması yalancı negatifliğe neden olarak testin duyarlılığını azaltmaktadır.

Yalancı pozitifliğe yol açarak testin özgüllüğünü düşüren en önemli faktör ise klinik örneğin kontaminasyonudur.

Tanı Akış Diyagramı



Ekler

Ek-1 Moleküler testlerde yöntem geçerliliği

Genel hususlar

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan yöntemlerin uygunluğunun ve geçerliliğinin uluslararası bilimsel kriterlere göre valide veya verifiye edilerek kanıtlanması ve onaylanması gereklidir.

Validasyon, bir yöntemin performans karakteristiğini ve kısıtlılığını ortaya koyarak, bu karakteristiğin hangi şartlarda, ne kadar değiştiğinin belirlenmesi işlemidir. Diğer bir anlamı da bir testin, prosedür veya yöntemin performansının sürekli olarak izlenmesidir.

Verifikasyon ise valide bir yöntemin laboratuvardaki beklenen performansının test rutin kullanıma girmezden önce bir kereliğine ölçülmesi işlemi veya FDA (veya CE) onaylı bir yöntem için üretici tarafından belirtilen performans değerlerinin laboratuvarında elde edildiğinin gösterilmesidir. Cihaz veya kit içermeyen, mikroorganizma tanımlama basamaklarının bir parçası olarak uygulanan işlemlerin yöntem geçerliliğinin kanıtlanması gerekli değildir. Bu testler kalite kontrol protokolleri ile izlenmelidir.

Tablo 3. Verifikasyon ve validasyon için yapılması gereken asgari çalışmalar

CE/FDA onaylı ticari testte VERİFİKASYON için test edilmesi gereken parametreler	Laboratuvar yapımı test veya CE/FDA onaylı olmayan ticari testte VALİDASYON için test edilmesi gereken parametreler
1. Doğruluk 2. Tekrarlanabilirlik 3. Doğrusallık (Kantitatif testler için)	1. Doğruluk 2. Tekrarlanabilirlik 3. Doğrusallık* (Kantitatif testler için) 4. Duyarlılık 5. Özgüllük

Mikrobiyolojik testlerin yöntem geçerliliğinin kanıtlanması temel olarak testin CE/FDA onaylı olması ve olmaması (laboratuvar yapımı test) durumuna göre iki grupta incelenir (bkz. Tablo 3).

Kontrol materyali

Yöntem geçerliliğinin kanıtlanmasında kullanılacak kontrol materyali **aşağıda** verilen sıraya göre seçilir ve kullanılır:

- Sertifikalı referans materyali
- Referans materyali
- Dış kalite değerlendirme materyali (farklı bir yöntem ile daha önce çalışılmış)
- Akredite bir laboratuvarında çalışılmış hasta materyali
- Sonucu referans yöntem ile ölçülmüş hasta materyali

Moleküler Testlerde Yöntem Geçerliliğinin Kanıtlanması

Referans yöntemle karşılaştırma yapılır.

Moleküler testlerde (NAAT) kullanılması gereken kontrollerin özelliği ve sayısı Tablo 4 ve Tablo 5'te sunulmaktadır.

Tablo 4. Pozitif ve düşük pozitif kontrollerin özellikleri

Kontrolün Adı	Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri
Pozitif Kontrol	Saptama limiti değerinden 1 log10 daha yüksek
Düşük Pozitif Kontrol	Saptama limiti değeri ile 1 log10 yükseklik değeri arası

Tablo 5. Yöntemlerin Geçerli Kılınması için kullanılması gereken kontrol sayıları

Kontroller	Nükleik asit saptama testleri	
	Kalitatif	Kantitatif
Doğruluk		
Pozitif	3	3
Düşük pozitif	3	3
Negatif	3	3
Kesinlik (çalışma içi) (3'er kez)		
Pozitif	1	3
Düşük pozitif	1	3
Kesinlik (çalışmalar arası) (3 ayrı günde 1'er kez)		
Pozitif	1	1
Düşük pozitif	1	1
Doğrusallık (10 katlık dilüsyonlardan 3 tanesi 2'şer kez)		
Pozitif	0	1

- "Doğruluk = Uyumlu sonuç / total sonuç x 100" ile hesaplanır
 - Ticari testlerde üretici firmanın belirttiği değerler ile karşılaştırılabilir.
 - Referans yöntemle göre doğruluk oranının $\geq 90\%$ olması önerilmektedir.
 - Moleküler testlerde referans yöntemle fark 0,5 log10 içerisinde olmalıdır. Klinik olarak 1 log10 fark kabul edilebilir.
- "Kesinlik = Elde edilen sonuçlardan ortalama, standart sapma ve %CV (Varyasyon katsayısı)" hesaplanır.
 - Varyasyon katsayısının küçük olması, tekrarlanabilirliğin yüksek olduğunu gösterir.
 - $\%CV \leq 15\%$ olması kabul görmektedir.

Kalitatif testlerde kesinlik ve doğruluk aynı çalışma içinde değerlendirilmektedir.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesinde (UTTR-6 [Bölüm 6] Moleküler Tanı) geçen bazı hususlar için daha ayrıntılı veya ilave bilgi için aşağıda listelenen UMS belgelerine başvurunuz:

- UMS, UTTR-1 [Bölüm 1] Biyogüvenlik
- UMS, UTTR-2 [Bölüm 2] Örnek Yönetimi
- UMS, UTTR-3 [Bölüm 3] Mikroskopi
- UMS, UTTR-4 [Bölüm 4] Kültür

Kaynaklar

- 1 Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med* 2010;363(11):1005-15.
- 2 Centers for Disease Control and Prevention. Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of TB. *MMWR* 2009;58:7-10.
- 3 Fluit C, Visser MR, Schmitz FJ. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:836-871.
- 4 Greco S, Rulli M, Girardi E, Piersimoni C, Saltini C. Diagnostic accuracy of in-house PCR for pulmonary tuberculosis in smear-positive patients: meta-analysis and meta-regression. *J Clin Microbiol* 2009;47(3):569-76.
- 5 Moore DF, Guzman JA, Mikhail LT. Reduction in turnaround time for laboratory diagnosis of pulmonary TB by routine use of a nucleic acid amplification test. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;52:247-254.
- 6 Noordhoek GT, Kolk AH, Bjune G, et al. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. *J Clin Microbiol* 1994;32:277-84.
- 7 Noordhoek, GT, Mulder S, Wallace P, van Loon AM. Multicentre quality control study for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by nucleic amplification methods. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:295-301.
- 8 Taegtmeier M, Beeching NJ, Scott J, et al. The clinical impact of nucleic acid amplification tests on the diagnosis and management of TB in a British hospital. *Thorax* 2008;63:317-321
- 9 U.S. Department of Health and Human Services. Healthy People 2010: Understanding and Improving Health. 2nd ed. Washington, D.C. U.S. Government Printing Office, Nov 2000. <http://www.healthypeople.gov/2010/Document/pdf/uih/2010uih.pdf>
- 10 U.S. Department of Health and Human Services. Healthy People 2020 topics and objectives. Aug 2013. <file:///Volumes/TOSHIBA/Rehber/Healthy%20People%202020.webarchive>
- 11 Soilingen DV, Jarlier V, Drobniewski F. Information for physicians: The laboratory diagnosis of tuberculosis-first steps. In: *Mastering the Basics of TB Control: Development of a Handbook on TB Diagnostic Methods*. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control Technical Report. 2011, p. 96-99. http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1105_TER_Basics_TB_control.pdf
- 12 Clark RB, Lewinski MA, Loeffelholz MJ, Tibbetts RJ. Cumitech 31A: Verification and validation of procedures in the clinical microbiology laboratory. Sharp SE (coordinating ed). ASM Pres, Washington, D.C. 2009.
- 13 CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendments) Standards. 1988.



ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

ULUSAL TÜBERKÜLOZ TANI REHBERİ (UTTR)

İlaç Duyarlılık Testi

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Tüberküloz
Bölüm	İlaç Duyarlılık Testi
Standart No	UTTR-7
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2014
Geçerlilik tarihi	01.01.2016

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	2
İLAÇ DUYARLILIK TESTİ - TEKNİK BİLGİLER	3
1 Temel prensip.....	4
2 Yöntem çeşitleri ve avantaj-dezavantajları	4
3 İDT için asgari laboratuvar koşulları	7
4 İDT tekniklerinin uygulanması	8
5 Sonuçların değerlendirilmesi ve raporlama	9
6 Saklama	9
7 Kalite Kontrol	9
8 Olası sorunlar/kısıtlılıklar	10
TANI AKIŞ DİYAGRAMI	11
EKLER.....	12
Ek-1 İlaçlı agar besiyeri hazırlama yönergesi	12
Ek-2 İlaçlı LJ besiyeri hazırlama yönergesi.....	14
Ek-3 İDT yöntemlerinin geçerli kılınması	15
Ek-4 Agar/LJ Proporsiyon İDT yönergesi	17
Ek-5 Agar / LJ Proporsiyon İDT değerlendirme ve raporlama yönergesi.....	19
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ	20
KAYNAKLAR.....	20

"Gelecek bilgiyi üretenlerindir."

M.K. Atatürk

Kapsam ve Amaç

Tüberkülozda ilaç direncinin doğru ve hızlı tanısı, etkin tedavinin erken başlanmasını sağlayarak ilaç direncinin yayılımını azaltabilir, hastalığın süresini kısaltabilir, kür oranını artırabilir.

Dolayısı ile ilaç direncinin **doğru** ve **hızlı** tanısı, uygun klinik takip ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin oluşturulmasında son derece önemlidir. İlaç direncinin doğru tanısı; iyi standardize edilmiş ve güvenilir test yöntemlerini kullanan, deneyimli, iyi donanımlı ve kalite değerlendirme programlarına katılan laboratuvarlarda uygulanması ile sağlanabilir.

Bu Rehberde *Mycobacterium tuberculosis* kompleks'in antitüberküloz ilaçlara duyarlılığını belirlemek için ülkemizde uygun ve güvenilir ilaç duyarlılık testlerinin (İDT), uygun koşullarda uygulanmasının sağlanması ve standardize edilmesi; dirençli olguların kayıt ve bildirimine iyileştirilmesi; dirençli olguların yayılımının engellenmesi amaçlanmıştır.

Bu Bölümde *Mycobacterium tuberculosis* kompleks'in birinci seçenek ilaçlara karşı duyarlılığını belirlemede en yaygın kullanılan testler ele alınmıştır.

İlaç Duyarlılık Testi - Teknik Bilgiler

Tüberküloz ile savaşın en etkili yolu, tüberküloz hastalarının erken saptanması ve etkin tedavisi ile bulaş zincirinin kırılmasıdır. Tedavinin etkinliği ilaç duyarlılık testlerine göre düzenlenmesi ile arttırılabilir. Belli bir bölgenin direnç sürveyans çalışmaları için veri sağlamak da ilaç duyarlılık testlerinin diğer bir amacıdır.

Tüberkülozda direnç, tedavi gören hastalarda dirençli mutant basillerin seçilmesi yoluyla ortaya çıkabildiği gibi (sekonder direnç), direkt dirençli suşlar ile bulaş olan, daha önceden tedavi görmemiş hastalarda da (primer direnç) görülebilir. Ülkelere ve epidemiyolojik duruma bağlı olarak değişmekle beraber sekonder direnç oranı, primer dirence göre daha yüksektir. Primer direnç oranının yüksek olması tüberküloz kontrol programının başarısızlığının göstergesidir.

Yeni, nüks ve terkten dönen tüberküloz olgularının standart tedavilerinde kullanılan ilaçlar **birinci seçenek ilaçlar** olarak adlandırılmaktadır. Her tüberküloz olgusunda en kısa zamanda, öncelikle birinci seçenek ilaçlara karşı duyarlılık test edilmelidir. İzoniazid, rifampisin, etambutol, streptomisin birinci seçenek ilaçlardır. Standart tedavilerin önemli bir parçası olan pirazinamid de birinci seçenek ilaçlardandır; ancak güvenilir sonuçlar elde etmedeki zorluk nedeniyle ilk test edilecek ilaçlar arasına alınmayabilir. Laboratuvar da test edilmesi olası olduğu durumlarda klinisyene kombine tedavi rejimi ile ilişkili kapsamlı bilgi sağlayabilmek amacıyla pirazinamid ilk panelde test edilmelidir.

En etkin antitüberküloz ilaçlardan rifampisin ve izoniazid'e dirençli basillerin neden olduğu tüberküloz olguları "çok ilaca dirençli tüberküloz" (ÇİD-TB) olarak tanımlanmaktadır. "Yaygın ilaç dirençli tüberküloz" (YİD-TB) ise izoniazid ve rifampisin direncine ek olarak bir kinolona ve bir de ikinci grup enjeksiyonla verilen ilaca (kanamisin, kapreomisin, amikasin) direnç olmasıdır.

1 Temel prensip

Mycobacterium tuberculosis kompleks (MTBC) ilaç direnci rastgele ve düşük sıklıkta meydana gelen spontan mutasyonların bir sonucudur. Bu nedenle hastalığı oluşturan mikobakteri topluluğu içinde çok düşük bir oranda dirençli mutantlar bulunabilir.

Kültüre dayalı ilaç duyarlılık testleri, hastalığı oluşturan mikobakteri topluluğu içerisinde dirençli olanların belli bir oranının üzerinde olduğunda ilacın tedavide etkili olamayacağı temeline dayanır. Bu nedenle günümüzde yaygın olarak kullanılan ve kültüre dayalı yöntem olan **proporsiyon yönteminin amacı** bir ilacın kritik konsantrasyonuna dirençli olan bakterilerin kritik proporsiyon olan %1'in üzerinde olup olmadığını saptamaktır. Sıvı besiyerinde kültüre dayalı ticari otomatize yöntemlerde de benzer şekilde proporsiyon yönteminin prensibi temel alınmaktadır. Moleküler yöntemler ise direnç ile ilişkili gen mutasyonlarını saptamaya yönelik genotipik yöntemlerdir.

Kültüre dayalı yöntemlerde antibiyotikli besiyerlerinde test için bulundurulması gereken ilaç konsantrasyonları (kritik konsantrasyon) kullanılan yöntemde, kullanılan besiyerine ve test edilen antibiyotiğe göre farklılık göstermektedir (Ek-1 ve Ek-2). Önerilen kritik konsantrasyonların kullanılmaması yanlış sonuçlara neden olabilir.

İlaç duyarlılık testleri (İDT'ler) **direkt** ya da **indirekt** yapılabilir. **Direkt İDT** yayma pozitif örnekten doğrudan yapılan testtir; bu testte kontaminasyon olasılığı yüksektir ve başarı oranı düşüktür. **İndirekt İDT** ise üremiş kültürden yapılır; başarı oranı yüksektir ancak zaman alır.

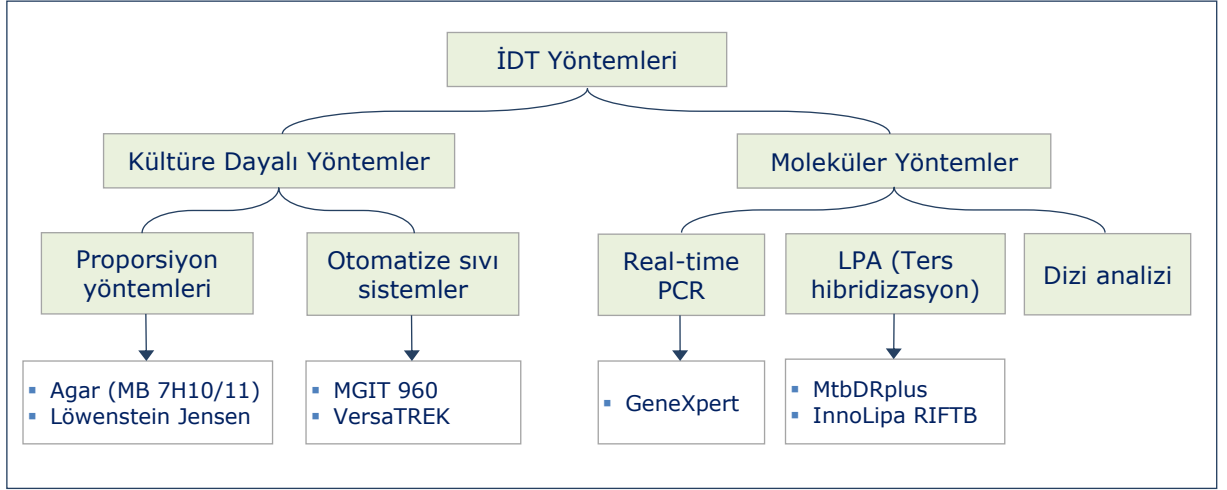
Moleküler yöntemlerle ise yayma pozitif örneklerden ve kültürde üremiş örneklerden ilaç direnci saptanabilmektedir.

Uzman Görüşü - İlaç duyarlılık testlerinin yapılması gereken durumlar

- Her hasta için izole edilen ilk *M. tuberculosis* kompleks suşuna ilaç duyarlılık testi yapılır.
- Tedavinin 3. ayı ve sonrasında kültürde üreme saptanması durumunda yeni izolattan test tekrarlanır.
- Tedavinin 3. ayından önce, klinik olarak tedaviye yanıt olmadığı düşünülüyorsa yeni örnekten test tekrar edilir.
- Nüks, terkten dönen, tedavi başarısızlığı ve kronik olgularda mutlaka İDT yapılır.

2 Yöntem çeşitleri ve avantaj-dezavantajları

M. tuberculosis kompleksin antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılığını belirlemede, kültüre dayalı yöntemler ve dirence neden olan mutasyonu belirlemeye yönelik moleküler yöntemler kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan ilaç duyarlılık testleri aşağıda verilmiştir.



Şekil 1. *M. tuberculosis* kompleks ilaç duyarlılık test yöntemleri

Agar proporsiyon yöntemi iyi standardize edilmiş güvenilir bir yöntemdir.

LJ Proporsiyon Yöntemi ekonomik olması nedeni ile yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Ancak katı besiyerinde kültüre dayalı bu yöntemler hızlı yöntemler değildir. Sıvı besiyerinde kültüre dayalı otomatize yöntemler sonuç alma süresini önemli derecede kısaltmaktadır.

Moleküler bir yöntemle ise direkt klinik örnekten direnci göstermek 1-2 günde mümkün olabilmektedir.

Kültüre dayalı yöntemlerin karşılaştırması Tablo 1’de, kültüre dayalı yöntemlerin moleküler yöntemler ile karşılaştırılması Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 1. Kültüre dayalı yöntemlerin karşılaştırması

	LJ Proporsiyon Yöntemi	Agar Proporsiyon Yöntemi	Otomatize Kültür Sistemleri
Besiyeri	Katı	Katı	Sıvı
Test süresi	4-6 hafta	3 hafta	1-2 hafta
Örnek kabulünden sonra sonuçlanma süresi (indirekt test)	9-12 hafta	7-10 hafta	3-5 hafta
Güvenilirlik	İyi	İyi	İyi
Kolaylık	Orta	Orta	Kolay
Maliyet	Düşük	Orta	Yüksek
Özel cihaz ve ekipman gereksinimi	Yok	Yok	Var
Deneyimli personel gereksinimi	Yüksek	Yüksek	Orta

Tablo 2. Kültüre dayalı yöntemlerin moleküler yöntemlerle karşılaştırması

	Kültüre Dayalı Yöntemler (Fenotipik)	Moleküler Yöntemler (Genotipik)
Prensip	İlaç varlığında üremenin inhibisyonu	Dirence yol açan gen mutasyonlarının saptanması
Test süresi	1-6 hafta	2-8 saat
Örnek kabulünden sonra sonuçlanma süresi	9-12 hafta	Direkt test 1-2 gün İndirekt test 2-6 hafta*
Direkt örnekten test	Olası, ancak önerilmez	Olası
Kontamine örnekten test	Olası değil	Olası
Mikst kültürden test	Olası değil	Olası
Güvenilirlik	Yüksek	Bilinen mutasyonun saptanmasında iyi**
Kolaylık	Kolay-Orta	Kolay-Orta
Maliyet	Düşük-yüksek	Yüksek
Özel cihaz ve ekipman gereksinimi	Yok-var	Var
Deneyimli personel gereksinimi	Orta-Yüksek	Orta-Yüksek
Biyolojik riski	Yüksek	Düşük

* Direkt test, örnekten çalışılan duyarlılık testini; indirekt test kültürde üreme olduktan sonra çalışılan testtir.

**Antibiyotiğe göre değişen oranlarda, seyrek olarak mutasyon aranan gen bölgesi dışındaki mutasyonlar da dirence neden olabilir. Bu durum yalancı duyarlılığa neden olabilir.

Uyarı! Test yöntemi seçimi

- Ticari yöntemler için;
 - Verifikasyon testleri (yöntem doğrulaması) yapılmış bir sistem seçilmeli,
 - Sistemin verifiye edilmiş bir başka test yöntemi veya verifikasyon çalışmasını yapmış bir başka laboratuvarla eş zamanlı çalışılarak sonuçların güvenilirliği kanıtlanmalıdır (Ek-3 İDT Yöntemlerinin Geçerli Kılınması Yönergesi).
- Laboratuvar tarafından hazırlanan besiyerleri için;
 - Tüm validasyon (yöntem geçerliliğinin kanıtlanması) basamakları yapılmalıdır (Ek-3 İDT Yöntemlerinin Geçerli Kılınması Yönergesi).

3 İDT için asgari laboratuvar koşulları

3.1. Laboratuvar güvenliği önlemleri

Kültüre dayalı İDT için:

- Laboratuvarın fiziki tasarımı;
 - Temiz alandan kirli alana doğru tek yönlü hava akımı olan
 - Saatte 6-12 kez temiz hava değişimi sağlayan mekanik havalandırma sistemli
 - Kendiliğinden kapanan şifreli / kilitli kapıya sahip bir giriş odasına sahip
 - İzlenebilir negatif basınçlı bir çalışma alanı olmalı
- Biyogüvenlik donanımı;
 - Sınıf-IIA biyogüvenlik kabini ve otoklav olmalı
- Kişisel koruyucu donanım (KKD);
 - Eldiven, önlük ve solunum maskesi kullanılmalıdır (Tablo 3).

Moleküler yöntemlere dayalı İDT eğer klinik veya işlenmiş örnekten çalışılıyorsa "UTTR-6 Moleküler Tanı" belgesinde verilen güvenlik önlemleri alınmalı, kültürden çalışılıyorsa örneğin inaktivasyon aşamasına kadar olan kısım yukarıdaki şartlarda çalışılmalıdır (Tablo 3).

Tablo 3. İlaç duyarlılık testi uygulamaları sırasında alınması gereken önlemler

		Laboratuvar tasarımı		Laboratuvar donanımı		Kişisel koruyucu donanım		
		Havalandırma	Laboratuvar giriş sınırlaması	BGK	Otoklav	Eldiven	Önlük	Maske
Fenotipik İDT	Üremiş kültürden yapılan her işlem	Negatif basınçlı mekanik havalandırma	BGD-3 işaretli kilitli çift kapılı giriş	✓	✓	✓	✓	✓
Moleküler test	Direkt örnekten ekstraksiyon	Doğal havalandırma	BGD-2 işaretli giriş sınırlaması	-	-	✓	✓	<i>Opsiyonel</i>
	İşlenmiş örnekten ekstraksiyon	Saatte 6-12 hava değişimi	BGD-2 işaretli giriş sınırlaması	✓	<i>Opsiyonel</i>	✓	✓	<i>Opsiyonel</i>
	Üremiş kültürden ekstraksiyon	Negatif basınçlı mekanik havalandırma	BGD-3 işaretli kilitli çift kapılı giriş	✓	✓	✓	✓	✓
	DNA'dan yapılan işlemler	Doğal havalandırma	BGD-2 işaretli giriş sınırlaması	-	-	✓	✓	-

Ayrıntılı bilgi "UTTR-1 Biyogüvenlik" başlığı altında verilmiştir.

3.2. Gerekli donanım

- Sınıf II Biyogüvenlik Kabini
- İnkübatör
- Otoklav

4 İDT tekniklerinin uygulanması

4.1. Kültüre dayalı yöntemler

Proporsiyon yöntemi ilacın kritik konsantrasyonunda, bakterilerin %1'den (kritik proporsiyon) daha fazlasının üremesi durumunda dirençli olarak tanımlanması esasına dayanır. Proporsiyon yöntemi Middlebrook 7H10 veya 7H11 agarda ve LJ besiyerinde benzer uygulama prosedürüne sahiptir. Ancak kullanılan besiyerine göre bazı farklılıklar olduğu ve bu farklılıkların sonucu etkileyebileceği unutulmamalıdır. Agar ve LJ proporsiyon yöntemindeki uygulama prosedürü Ekler bölümünde anlatılmıştır (Ek-4 Agar/LJ Proporsiyon İDT Uygulama Yönergesi).

Günümüzde otomatize ticari mikobakteri kültür sistemleri de ilaç duyarlılık testleri için kullanılmaktadır ve bu yöntemlerde benzer şekilde proporsiyon yönteminin prensibini temel alınmaktadır. Sıvı besiyerinde (modifiye Middlebrook 7H9) kültüre dayalı bu sistemler, üretici firmanın uygulama yönergesi doğrultusunda çalışılmalıdır.

4.2. Moleküler yöntemler

Direnç geni saptamak amacıyla kullanılan moleküler yöntemlerden günümüzde rutin uygulamada en çok kullanılanlar ters hibridizasyon yöntemleri ve gerçek-zamanlı ('real-time') PCR yöntemleridir. Bu yöntemlerle yayması pozitif olan örneklerden ve kültürde üremiş örneklerden ilaç direnci saptanabilmektedir. Ancak, moleküler yöntemlerin kültüre dayalı testlerin yerine kullanılmaması, saf kültür mevcut ise kültüre dayalı testlerin uygulanması; moleküler yöntemlerin ise belli durumlarda kullanılması önerilmektedir (bkz. Uzman görüşü). Ayrıca moleküler test sonuçlarının kültüre dayalı testler ile doğrulanması; moleküler yöntem ile ÇİD-TB ilişkili mutasyon saptandığında, hemen kültür temelli yöntem ile birinci ve ikinci seçenek ilaçlara duyarlılığın test edilmesi önerilmektedir. Ticari moleküler duyarlılık testlerinde üretici firmanın uygulama yönergesi takip edilmelidir.

Uzman Görüşü - Moleküler İDT yapılması önerilen durumlar

- *İlaç direnci olduğundan kuşku edilen hastalarda;*
 - *Daha önceye ait tedavi öyküsü olan*
 - *Yüksek direnç oranı olan ülke veya yerden gelmiş olan*
 - *Tedaviye iyi yanıt vermeyen*
 - *ÇİD-TB teması olan*
- *Geniş bir temaslı grubu olan hastalarda*
- *Etkili antitüberküloz tedavisinin yaşamsal aciliyet gerektirdiği hastalarda;*
 - *Menenjit, HIV pozitifliği ve bağışıklığın baskılandığı durumlar gibi*
- *Fenotipik test ile İDT yapılamayan TDM ile karışık veya diğer bakterilerle kontamine kültürü olan hastalarda yapılması önerilir.*

5 Sonuçların değerlendirilmesi ve raporlama

Proporsiyon yönteminin değerlendirme ve raporlama prosedürü agarda veya LJ besiyerinde uygulandığında benzerdir. Ancak kullanılan besiyerine göre bazı farklılıklar olduğu unutulmamalıdır. Bu yöntemlerin değerlendirme ve raporlama prosedürü Ekler bölümünde anlatılmıştır (Ek-5).

Ticari otomatize kültür yöntemlerinde ve moleküler yöntemlerde değerlendirme ve raporlama üretici firma önerilerine göre yapılmalıdır.

RIF veya EMB'ye karşı tek ilaca direnç gibi beklenmeyen bir sonuç varlığında raporlamadan önce direnci doğrulamak için test tekrar edilir.

Uyarı! Raporlama

- İlaç duyarlılık test sonuçları örnek kabulünden sonra ideal olarak ortalama 30 günde raporlanması önerilir.
- Tüm dirençli sonuçlar tetkiki isteyen birim/hekime ivedilikle bildirilmelidir.
- Tüm Rifampisin dirençli bulunan sonuçlar ilgili İl Halk Sağlığı Müdürlüğüne ivedilikle bildirilmelidir.

6 Saklama

- Her hastaya ait en az bir pozitif kültür $-70\pm 10^{\circ}\text{C}$ 'de en az bir yıl stoklanmalıdır (*bkz.* Kültür).
- Her hastanın değişen duyarlılık paternlerine ait her bir izolat $-70^{\circ}\text{C}\pm 10^{\circ}$ 'de en az bir yıl stoklanmalıdır (*bkz.* Kültür-Suş Stoklama Yönergesi).
- Rifampisin dirençli tüm izolatlar ikinci seçenek ilaç duyarlılık testi çalışılmak üzere Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı'na gönderilmelidir.

7 Kalite Kontrol

7.1. İç kalite kontrol

Kalite kontrol uygulamaları klinik izolatlar için uygulanan rutin duyarlılık test prosedürüne uyularak yapılmalıdır. Kalite kontrol testinde uygun sonuçlar alınmaz ise testler tekrar edilmeli, hasta sonuçları raporlanmamalıdır. Kalite kontrol çalışmaları tüm ilaçlara duyarlı olduğu bilinen *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) kalite kontrol suşu ile yapılır ve stok suşları -70°C 'de saklanır.

- Besiyeri kontrolü; her yeni besiyeri hazırlanmasında ve yeni lot numarasında
- Antibiyotik kontrolü; her yeni besiyeri hazırlanmasında ve yeni lot numarasında
- Ekipman kontrolü
 - Soğutucuların sıcaklık takibi ve bakımı
 - İnkübatörlerin sıcaklık takibi, kalibrasyon ve bakımı
 - Kullanılıyorsa otomatize sistemlerin kalibrasyon ve bakımları
 - Ortam sıcaklığının takibi'ni içerir.

Uyarı! İlaç duyarlılık testlerinde kalite göstergeleri

- Laboratuvarlar ilaç direnç oranlarını ülke / laboratuvar verilerine göre takip etmelidir.
- RIF veya EMB'ye karşı tek ilaca direnç gibi ülke / laboratuvar verilerine göre beklenmeyen sonuçların varlığı takip edilmelidir.

Ayrıntılı bilgi için bkz. UTTR-3. Ek-6. Laboratuvar kalite göstergeleri

7.2. Dış kalite değerlendirme

İDT çalışmalarında laboratuvarın yetkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla ulusal veya uluslararası bir Dış Kalite Değerlendirme programına katılması gerekir. Bu amaçla Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı tarafından düzenlenen Dış Kalite Değerlendirme programına katılım sağlanabilir.

8 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Güvenilir olmalarına karşın katı besiyerinde kültüre dayalı yöntemler önerilenden daha geç sonuç vermektedir.

Bu kısıtlılık nedeni ile daha hızlı yöntemlerin kullanımı önerilmektedir.

- Kültüre dayalı ilaç duyarlılık testlerinde *M. tuberculosis*'in sadece saf kültürü kullanılmalıdır. Ancak saf kültürden çalışılmasına rağmen test besiyerlerinde kontaminasyon olabilir.

Kontaminasyonun gözle görülemediği otomatize yöntemlerde bir direnç saptandığında kontaminasyon olmadığı doğrulanmalıdır.

- Kültürde MTBC izolatının TDM ile karışık olması yanlış dirençli sonuçlara neden olabilir.

Test çalışılmadan MTBC'in tanımlanması ve saflığının kanıtlanması gereklidir. Karışık kültürlerde zaman kazanmak için moleküler bir yöntem kullanılabilir.

- Daha hızlı sonuç vermesine rağmen, kontaminasyon riskinin yüksekliği nedeniyle kültüre dayalı testlerin direkt klinik örnekten çalışılması (direkt test) önerilmez.

İlaç direnci olduğu düşünülen hastalarda moleküler yöntemle hızlı direnç tespiti yapılamıyorsa mikroskopik incelemede ARB pozitif olan klinik örnekten kültüre dayalı direkt İDT çalışılabilir.

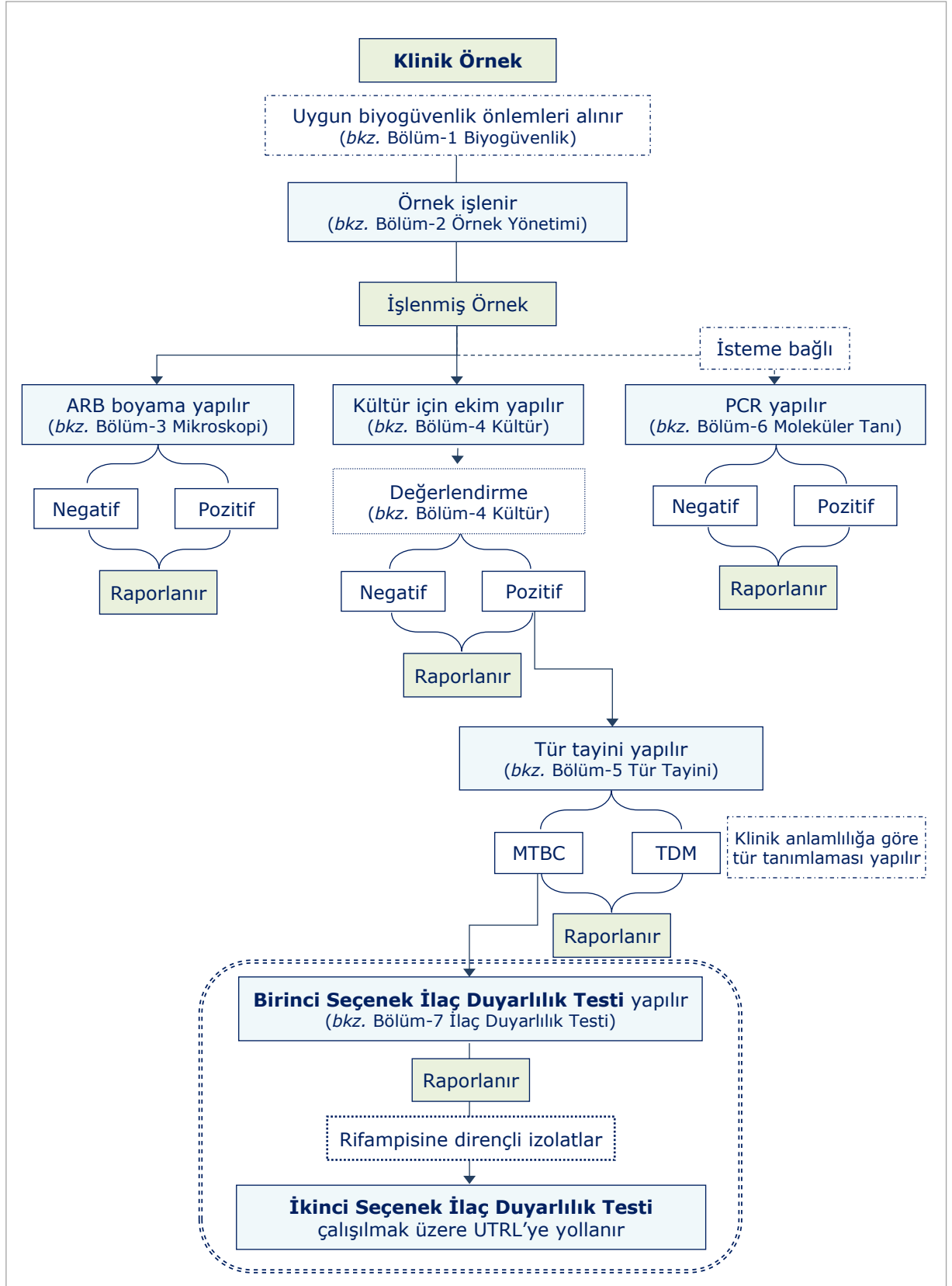
- Otomatize kültür sistemlerinde kullanılan kritik konsantrasyonlar, katı besiyerinde proporsiyon yönteminde kullanılan konsantrasyonlardan biraz daha düşüktür.

Direnç durumunda İDT'nin INH, SM ve EMB için yüksek konsantrasyonlarda çalışılması önerilir.

- Katı besiyerinde kültüre dayalı testler ile pirazinamid duyarlılığının test edilmesi standart değildir.

Pirazinamid için otomatize yöntemlerin kullanılması önerilmektedir.

Tanı Akış Diyagramı



Ekler

Ek-1 İlaçlı agar besiyeri hazırlama yönergesi

Antibiyotik solüsyonlarının hazırlanması

- Antibiyotikler ticari toz şeklinde üretici firmadan alınmalı, klinik preparatları kullanılmamalıdır.
 - Antibiyotikler üretici önerilerine göre veya olası ise vakumlu bir desikatör içinde -20°C'de saklanmalıdır.
 - Antibiyotiklerin steril distile su ile veya uygun çözücüler (Tablo 4) ile 10.000 µg/mL'lik (en az 1000 µg/mL) stok solüsyonları hazırlanır.
- Örnek;** 100 mg ilaç + 10 mL steril distile su
- Stok solüsyonlar hazırlanırken gerekli miktar antibiyotik üzerinde belirtilen potense (% veya µg/mg) göre şu formüle göre hesaplanmalıdır;
- Ağırlık (mg) =** Hacim (mL) x İstenilen konsantrasyon (µg/mL) / Potens (µg/mg)
- veya gerekli olan miktar potense bölünerek kullanılması gereken miktar bulunur.
- Örnek;** 100 mg SM ile bir ilaç çözeltisi hazırlamak istediğimizde, ilacın potensi %80 ise 100/0,80=125 mg SM tartmak gerekir.
- Stok solüsyonlar yaklaşık 100 mg'lık antibiyotik miktarı ile hazırlanmalıdır. Daha küçük miktarlarda doğru tartım güç olabilir, büyük miktarlar ise ekonomik olmaz.
 - Stok solüsyonu 0,22 µm por çaplı membran filtreden süzüp steril ettikten sonra, polipropilen tüplerde daha sonraki kullanımlara uygun küçük miktarlara bölünerek -20°C'de (tercihen -60°C'nin altında) 1 yıl kadar saklanabilir (aseptik koşullarda hazırlandığında filtrasyon gerekmez).
 - Stok solüsyon kullanılacağı zaman oda ısısına getirilip, bekletilmeden kullanılır ve kalanı atılır.
 - Antibiyotikler besiyerlerine eklenmeden önce stok konsantrasyonlardan çalışma konsantrasyonları hazırlanır ve besiyerlerine uygun miktarlarda eklenir (Tablo 4).

Biyogüvenlik Uyarısı!

- Eldiven ve önlüğünüzü giyiniz!**

Tablo 4. MB 7H10 agar besiyerine eklenecek ilaçların stok ve çalışma konsantrasyonları, besiyerine eklenen miktarları ve önerilen konsantrasyonlar

İlaç	Çözücü	Stok konsantrasyon (µg/mL)	7H10 agar için çalışma konsantrasyonu (µg/mL)	200 mL 7H10 agara çalışma konsantrasyonundan eklenen miktar (mL)	7H10 agarda ilacın son konsantrasyonu (µg/mL)
INH	SDW	10.000	200	0,2	0,2 ^{KK}
				1,0	1,0
EMB	SDW	10.000	1.000	1,0	*5,0 ^{KK}
RIF	DMSO (veya metanol)	10.000	1.000	0,2	1,0 ^{KK}
SM	SDW	10.000	1.000	0,4	2,0 ^{KK}
				2,0	10,0

SDW, steril distile su; DMSO, dimetil sülfoksit; KK, kritik konsantrasyon

* Middlebrook 7H11'de EMB'nin kritik konsantrasyonu 7.5 µg/mL'dir

İlaçlı agar besiyerlerinin hazırlanması

- Genellikle test edilecek her bir ilaç için, ayrı balonlar içinde, her biri 200 mL'lik besiyerleri hazırlanır.
- Her bir 200 mL'lik 7H10 agar besiyerinin hazırlanması için (üretici firmanın önerileri doğrultusunda);
- Bir cam balon içinde,
 - 180 mL distile su
 - 3,8 g dehidrate 7H10 agar besiyeri
 - 1 mL gliserol eklenerek eritilir.
- Otoklavda 121°C'de 15 dk süreyle sterilize edilir.
- Daha sonra 50-56°C'lik su banyosunda soğumaya bırakılır.
- Besiyeri sıcaklığı 50-56°C'ye indiğinde içine zenginleştirici olarak 20 mL OADC (oleik asit, albümin, dekstroz ve katalaz karışımı) eklenir.
- *Alternatif olarak, tüm besiyerleri için bu aşamaya kadar olan basamaklarda, tek bir 2 L'lik cam balonda gerçekleştirilip, daha sonra steril şartlarda daha küçük cam balonlara her biri 200 mL olacak şekilde bölünebilir.*
- Su banyosundaki balonların üzerine eklenecek antibiyotikler yazılır, ilaç eklenmeyecek olana ise "kontrol" yazılır.
- Besiyerlerinin her birine farklı bir ilaç olacak şekilde, antibiyotiklerin önceden hazırlanan çalışma konsantrasyonlarından (Tablo 4) eklenir.
- Karıştırıldıktan sonra tekrar su banyosuna yerleştirilir. İlaç eklenmeyen besiyeri kontrol için ilaçsız besiyeri olarak kullanılır.
- Önceden yeterli sayıda (yaklaşık 40 adet), tercihen dört bölmeli steril, plastik petri plağının her bir bölmesi üzerine, dökülecek besiyeri yazılır (Kontrol, RIF, INH 0,2, EMB 5 gibi).
- Hazırlanan ilaçlı ve ilaçsız besiyerleri, Petri plağının her bölümüne 3-4 mm kalınlığında olacak şekilde (dört bölmeli Petri kullanılıyorsa her bir kadrana 5 mL) dökülür.
- Besiyerleri dökülürken, balonlar tek tek su banyosundan alınıp iyice karıştırılmalı, agar katılaşmadan hemen plaklara paylaştırılmalı ve baloncuklar oluşmamasına dikkat edilmelidir.
- Direkt ışıktan korunarak oda ısısında katılaştıran besiyerleri, kullanımdan veya saklamadan önce yüzeyleri iyice kuruyuncaya kadar birkaç saat steril kabin içinde kapakları hafif aralık bırakılmalıdır.

Biyogüvenlik Uyarısı!

- Eldiven ve önlüğünüzü giyiniz!

Kalite kontrol

Dökülen her parti besiyerinden birkaç tanesi (ideali %10) kontaminasyon kontrolü için 35°C'de 48 saat inkübe edilmelidir. Birden fazla plak kontamine ise plakların tümünün atılması önerilir.

Saklama

Hazırlanan besiyerleri kurumaya engel olmak için deliksiz plastik torbalara konularak ve ışıktan korunarak 4-8°C'de 1 ay saklanabilir.

Ek-2 İlaçlı LJ besiyeri hazırlama yönergesi

Antibiyotik solüsyonlarının hazırlanması

- Antibiyotiklerin stok solüsyonlarının hazırlanması ve saklanması agar proporsiyon yönteminde anlatıldığı gibidir. Ancak antibiyotiklerin besiyerlerine eklenmeden önce stok solüsyonlarından hazırlanan çalışma konsantrasyonları ve besiyerlerine eklenen miktarları farklıdır (Tablo 5).

Tablo 5. Proporsiyon yönteminde LJ besiyerine eklenmek üzere hazırlanan ilk seçenek ilaçların stok ve çalışma konsantrasyonları, besiyerine eklenen miktarları ve besiyeri içindeki final konsantrasyonları

İlaç	Çözücü	Stok konsantrasyon (µg/mL)	LJ için çalışma konsantrasyonu (µg/mL)	500 mL LJ'ye çalışma konsantrasyonundan eklenen miktar (mL)	LJ'de ilacın son konsantrasyonu (µg/mL)
INH	SDW	10.000	100	1,0 5,0	0,2 ^{KK} 1,0
EMB	SDW	10.000	1.000	1,0	2,0 ^{KK}
RIF	DMSO (veya metanol)	10.000	10.000	2,0	40,0 ^{KK}
SM	SDW	10.000	1.000	2,0 2,0	4,0 ^{KK} 10,0

SDW, steril distile su; DMSO, dimetil sülfoksit; KK, kritik konsantrasyon

İlaçlı LJ besiyerlerinin hazırlanması

LJ besiyeri (1600 mL için)

- Tuz solüsyonu
 - Monopotasyum fosfat 2.400 mg
 - Magnezyum sülfat 240 mg
 - Magnezyum sitrat 600 mg
 - L-Asparajin 3.600 mg
 - Gliserin 12 mL
 - Saf su 600 mL
- Yumurta
 - 25 adet temiz, taze (en fazla yedi günlük), iri boy yumurta
- Malaşit yeşili (%2'lik) 20-25 mL

- Tuz solüsyonu bir balona konulup su banyosunda eritilir.
- 115°C'de 20 dk. otoklavlanır.
- Yumurtalar sabunlu su ile iyice fırçalanarak temizlenir.
- Yumurtalar geniş bir kap içinde varsa U.V. lamba altında 45 dk steril edilir (veya 15 dk %70'lik etanolde bırakılır).
- Büyükçe, ağız kapatılabilen, steril bir balona steril huni yardımı ile kırılarak konur. Homojen oluncaya kadar kuvvetlice çalkalanır.
- Daha önce hazırlanmış ve steril edilmiş tuz solüsyonuna önce %2'lik malaşit yeşili 20-25 mL ilave edilir.
- Homojen edilmiş 1000 mL yumurta temiz steril bir tülbent veya gazlı bez ile tuz solüsyonu içine süzülür. Böylece ana LJ besiyeri elde edilmiş olur.

Biyogüvenlik Uyarısı!

- Eldiven ve önlüğünüzü giyiniz!**

- Eklenecek antibiyotiklere göre üzerleri etiketlenmiş balon jöjelere 500'er mL LJ besiyeri paylaşılır.
- Her birine Tablo 5'de belirtilen miktarlarda ilacın çalışma konsantrasyonundan eklenir. Ayrıca 1000 mL'lik bir besiyeri ilaçsız kontrol besiyeri olarak bırakılır.
- Balonlar iyice çalkalanıp homojen olması sağlandıktan sonra üzeri etiketlenmiş, steril, vida kapaklı tüplere (16 × 160 mm), her birine 5-7 mL olacak şekilde, aseptik şartlarda dağıtılır.
- Tüpler koagülatörde 85°C'de 45 dk veya 78-80°C'de 1 saat koagüle edilir.

Kalite Kontrol

Dökülen her parti besiyerinden birkaç tanesi (ideali %10) sterilite kontrolü için 37°C'de 18-24 saat inkübe edilmelidir. Birden fazla tüp kontamine ise tümünün atılması önerilir.

Saklama

Hazırlanan besiyerleri kurumaya engel olmak için deliksiz plastik torbalara konularak ve ışıktan korunarak 4-8°C'de 1 ay saklanabilir.

Ek-3 İDT yöntemlerinin geçerli kılınması

Genel hususlar

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan yöntemlerin uygunluğunun ve geçerliliğinin uluslararası bilimsel kriterlere göre valide veya verifiye edilerek kanıtlanması ve onaylanması gereklidir.

Validasyon, bir yöntemin performans karakteristiğini ve kısıtlılığını ortaya koyarak, bu karakteristiğin hangi şartlarda, ne kadar değiştiğinin belirlenmesi işlemidir. Diğer bir anlamı da bir testin, prosedür veya yöntemin performansının sürekli olarak izlenmesidir.

Verifikasyon ise valide bir yöntemin laboratuvardaki beklenen performansının test rutin kullanıma girmezden önce bir kereliğine ölçülmesi işlemi veya FDA (veya CE) onaylı bir yöntem için üretici tarafından belirtilen performans değerlerinin laboratuvarında elde edildiğinin gösterilmesidir. Cihaz veya kit içermeyen, mikroorganizma tanımlama basamaklarının bir parçası olarak uygulanan işlemlerin yöntem geçerliliğinin kanıtlanması gerekli değildir. Bu testler kalite kontrol protokolleri ile izlenmelidir.

Mikrobiyolojik testlerin yöntem geçerliliğinin kanıtlanması temel olarak testin CE/FDA onaylı olması ve olmaması (laboratuvar yapımı test) durumuna göre iki grupta incelenir (bkz. Tablo 6).

Tablo 6. Verifikasyon ve validasyon için yapılması gereken asgari çalışmalar

CE/FDA onaylı ticari testte VERİFİKASYON için test edilmesi gereken parametreler	Laboratuvar yapımı test veya CE/FDA onaylı olmayan ticari testte VALİDASYON için test edilmesi gereken parametreler
1. Doğruluk 2. Tekrarlanabilirlik 3. Doğrusallık (Kantitatif testler için)	1. Doğruluk 2. Tekrarlanabilirlik 3. Doğrusallık* (Kantitatif testler için) 4. Duyarlılık 5. Özgüllük

Kontrol materyali

Yöntem geçerliliğinin kanıtlanmasında kullanılacak kontrol materyali **aşağıda** verilen sıraya göre seçilir ve kullanılır:

- Sertifikalı referans materyali
- Referans materyali
- Dış kalite değerlendirme materyali (farklı bir yöntem ile daha önce çalışılmış)
- Akredite bir laboratuvar da çalışılmış hasta materyali
- Sonucu referans yöntem ile ölçülmüş hasta materyali

İlaç Duyarlılık Testlerinin “Yöntem Geçerliliği”nin kanıtlanması

- Referans yöntemle karşılaştırma yapılır.
 - Yöntemin doğrulanması için kesinlik ve doğruluk çalışmaları yapılır.
 - Kesinlik çalışmalarında “Kategorik Uyum”
 - Doğruluk çalışmalarında;
 - “Büyük Hata (BH)”
 - “Çok Büyük Hata (ÇBH)”
 - “Kategorik Uyum”
- dikkate alınır.

Kategorik uyum; test suşunun yorumlanan duyarlılık sonuçları ile (S/I/R) uyumudur.

Kategorik hata türleri ve hata oranları aşağıdaki Tablo 7 ve 8’deki gibi belirlenir.

Tablo 7. Kategorik hata türleri

Hata Türleri	Denenen Yöntem	Referans Yöntem
Çok büyük hata (ÇBH)	S	R
Büyük hata (BH)	R	S

S, duyarlı; R, dirençli

Tablo 8. Hata oranlarının hesaplanması

$$\text{Çok büyük hata (ÇBH)} = \frac{\text{ÇBH sonucu veren izolat sayısı} \times 100}{\text{Referans yöntem ile R olan izolat sayısı}}$$

$$\text{Büyük hata (BH)} = \frac{\text{BH sonucu veren izolat sayısı} \times 100}{\text{Referans yöntem ile S olan izolat sayısı}}$$

$$\text{Küçük Hata (KH)} = \frac{\text{KH sonucu veren izolat sayısı} \times 100}{\text{Test edilen izolat sayısı}}$$

Yapılan değerlendirme sonucunda

- Çok büyük hata $\leq 1,5\%$
- Büyük hata $\leq 3\%$
- Büyük + küçük hata $\leq 7\%$
- Kategorik uyumları $\geq 90\%$ olmalıdır.

Ek-4 Agar/LJ Proporsiyon İDT yönergesi

Malzeme

- Antibiyotikli ve antibiyotiksiz besiyerleri
- Pipetler, vidalı kapaklı steril tüpler, McFarland standardı, steril distile su

Biyogüvenlik Uyarısı!

- Eldiven ve önlüğünüzü giyiniz!**
- Solunum maskenizi takınız!**
- Biyogüvenlik kabinini kullanınız!**
- İş bitiminde tüm malzemelerinizi otoklavlayınız!**

İnokulumun hazırlanması

- Katı besiyerinde üremiş olabildiğince taze koloniler (4-5 haftalıktan eski olmamalı) kullanılır. Primer izolat pasajlara tercih edilir. Katı besiyeri yerine sıvı besiyerindeki üreme de inokulum kaynağı olarak kullanılabilir.
- Katı besiyerinde üremiş koloniler, tüm üremeyi temsil edecek şekilde bol miktarda, besiyerini almamaya dikkat edilerek, bir öze veya spatula yardımı ile kazınarak alınır.
- Alınan koloniler, içinde 6-10 adet cam veya plastik boncuk bulunan, yaklaşık 10-15mL'lik vida kapaklı steril bir tüpte, 3-5 mL steril distile su, serum fizyolojik, fosfat tamponu veya tween-albuminli sıvı besiyeri içerisine aktarılır.
- Tüpün kapağı sıkıca kapatıldıktan sonra, tüp içeriği 1-2 dk kuvvetlice vortekslenerek homojenize edilir.
- Büyük partiküllerin çökmesi ve oluşan aerosollerin azalması için tüp 20-30 dk süre bekletilir.
- Süpernatant steril pastör pipeti yardımıyla boş bir steril tüpe alınır.
- Sıvı besiyeri veya steril distile su eklenerek süspansiyonun bulanıklığı 0,5-1 McFarland'a ayarlanır.
- Daha sonra steril distile su veya serum fizyolojik ile süspansiyonun 10^{-2} (1/100) ve 10^{-4} (1/10.000) dilüsyonları hazırlanır.

Örnek;

0,1 mL ana süspansiyon (McFarland 0,5-1) + 9,9 mL steril distile su = 10^{-2}

0,1 mL 10^{-2} süspansiyon + 9,9 mL steril distile su = 10^{-4}

- Hazırlanan inokulum LJ veya agar besiyerlerine ekilir.

A – “Agar Proporsiyon Yöntemi” inokülasyon ve inkübasyon yönergesi

- Antibiyotik duyarlılığı test edilecek her bir mikroorganizma için; iki set antibiyotikli besiyeri oda ısısına getirilir. Plak yüzeylerinin nemli olmamasına dikkat edilir.
- Petri plakları hasta kültür numarası ve dilüsyon oranlarını gösterecek şekilde, setlerden biri “10⁻²” (I nolu set) diğeri “10⁻⁴” (II nolu set) olarak etiketlenir.
- Önce I nolu setin her bir bölmesine (antibiyotiksiz ve antibiyotikli tüm bölmelere) önceden hazırlanmış olan 10⁻² basil dilüsyonundan steril bir pipet kullanarak 0,1'er mL inoküle edilir (veya pastör pipeti kullanılarak her bölmeye 3'er damla farklı noktalara damlatılır).
- Sonra II nolu set için aynı işlem 10⁻⁴ dilüsyon ile tekrarlanır.
- İnokülumun saf olup olmadığını kontrol etmek amacıyla dilüe edilmemiş süspansiyondan kanlı agar besiyerine 1-2 damla ekim yapılır.
- İnokülumun besiyerlerine absorbe olması için inoküle edilen plakları, kapakları kapalı ve agar yüzeyi yukarı bakacak şekilde, oda ısısında yaklaşık 1 saat süreyle, damlalar kuruyuncaya kadar bekletilir.
- Plak kapakları hafif aralı şekilde biyogüvenlik kabini içinde bekletilerek, damlaların kuruması kolaylaştırılabilir. Bu işlem esnasında plaklar güneş ışığından korunmalıdır.
- Her bir petri plağı ayrı bir CO₂ geçirgen polietilen torbaya yerleştirilir. Plaklar, agar yüzeyi aşağı bakacak şekilde, 35-37°C'de, %5-10 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakılır.

B – “LJ Proporsiyon Yöntemi” inokülasyon ve inkübasyon yönergesi

- Antibiyotik duyarlılığı test edilecek her bir mikroorganizma için; bir set antibiyotikli besiyeri oda ısısına getirilir. Tüplerin yüzeylerinin nemli olmamasına dikkat edilir.
- Tüpler hasta kültür numarası ve dilüsyon oranlarını gösterecek şekilde, setlerden biri “10⁻²” (I no.lu set) diğeri “10⁻⁴” (II no.lu set) olarak etiketlenir.
- Önce I nolu setteki antibiyotiksiz ve antibiyotikli tüm LJ'lere önceden hazırlanmış olan 10⁻² basil dilüsyonundan steril bir pipet kullanarak 0,1'er mL inoküle edilir veya pastör pipeti kullanılarak her tüpe 3'er damla damlatılır.
- Sonra II no.lu set için aynı işlem 10⁻⁴ dilüsyon ile tekrarlanır.
- İnokülumun saf olup olmadığını kontrol etmek amacıyla dilüe edilmemiş süspansiyondan 1-2 damla kanlı agar besiyerine de ekim yapılır.
- Ekilen tüpler, basillerin yüzeye yayılabilmesi için etüve yatık olarak konulur. İnokülumun buharlaşabilmesi için kapaklar hafifçe gevşek bırakılır. 24-48 saat sonra kapaklar sıkıca kapatılıp, 37°C'de inkübasyona bırakılır.

Ek-5 Agar / LJ Proporsiyon İDT değerlendirme ve raporlama yönergesi

Değerlendirme

- **Agar proporsiyonda** inkübasyonun ilk 7 günü kontaminant bakteri varlığı yönünden kanlı agar incelenir. Kontaminasyon saptanırsa, test tekrar edilir.
- Test besiyerlerinde antibiyotiksiz kontrol bölmeleri üç hafta boyunca, torbalardan çıkarılmadan her hafta incelenir. Üçüncü hafta sonunda, iki dilüsyon setinin en az birinin kontrol bölmesinde 50 koloni üzerinde üreme görülürse test değerlendirilebilir, üreme yetersizse test tekrar edilmelidir.
- Üç haftadan önce dirençli sonuçlar rapor edilebilir. Fakat duyarlı sonuçları rapor etmek için üç hafta beklemek gerekir. Üçüncü haftadan sonra plaklar değerlendirilmemelidir. Dördüncü haftadan sonra beliren koloniler direnci göstermeyebilir.
- Değerlendirme için inkübasyon sonunda tüm kadrantlardaki koloniler sayılır, Tablo 9'a göre kantite edilir ve bir kayıt formuna kaydedilir.
- İlaçlı bölmedeki koloni sayısı, kontrol bölmesindeki koloni sayısı ile karşılaştırılarak direnç oranı hesaplanır.
- **LJ proporsiyonda** sonuçların 28. ve 42. günlerde okunması önerilmektedir. 28. günde dirençli koloni oranı kritik proporsiyondan yüksek ise dirençli olarak rapor edilebilir; yine 28. günde kontrol besiyerinde yeterli üreme olmasına rağmen, en yoğun dilüsyon (10^{-2}) inoküle edilmiş olan, ilaçlı besiyerinde üreme yok ise duyarlı olarak rapor edilebilir; bu iki durum dışındaki tüm sonuçlar 42. günde değerlendirilmelidir.

Tablo 9. Agar plaklarındaki kolonilerinin üreme yönünden kantitasyonu

Koloni sayısı	Kantitasyon
0 - 50	Gerçek koloni sayısı
50 - 100	1+
100 - 200	2+
200 - 500	3+
>500 (silme üreme)	4+

Direnç oranı (DO)(%) = İlaçlı bölmedeki koloni sayısı / kontrol bölmesindeki koloni sayısı X 100

- $\geq 1\%$ ise sonuç dirençli
- $< 1\%$ ise duyarlı olarak yorumlanır.

Dikkat edilmesi gereken hususlar

- Kontrol kadrantında 50'den fazla ama sayılabilir düzeyde kolonisi olan dilüsyonun sonucu yorumlanır ve karşılaştırma aynı dilüsyonlar arasında yapılır.

10⁻² dilüsyon ekim yapılmış kontrol bölmesinde sayılamayacak kadar koloni varsa (3+, 4+) ve 10⁻⁴ dilüsyon ekim yapılmış kontrol bölmesinde 50'den az koloni varsa, 10⁻⁴ dilüsyon ekim yapılmış kontrol bölmesindeki koloni sayısı 100'le çarpılıp 10⁻² dilüsyon ekim yapılmış kontrol bölmesindeki koloni sayısı hesaplanabilir. Bu mantıktan yola çıkarak, daha az besiyeri gerektiren ekonomik bir alternatif olarak, kontrol bölmelerine inokulumun 10⁻² ve 10⁻⁴ dilüsyonlarından, ilaçlı bölmelere sadece 10⁻² dilüsyonundan ekimler yapılabilir.

- Tüm kontrol bölmelerinde koloni sayımının 4+ olduğu dilüsyonlar dikkatle değerlendirilmelidir.

Bu durumda mikroorganizma tüm antibiyotiklere duyarlı ise, sonucu bildirilir, herhangi bir antibiyotiğe direnç söz konusu ise, yoğun bir inokulum kullanılmış olabilir, test tekrar edilir.

- INH, kritik konsantrasyonuna karşı direnç saptandığında yüksek konsantrasyonunun da test edilmesi önerilir. Bu süreçte ilgili doktora ön rapor verilmelidir. Organizma düşük konsantrasyona dirençli, yüksek konsantrasyona duyarlı ise rapora "Bu test sonucu izoniazid'e düşük düzey direnci gösterir" şeklinde yorum eklenmelidir.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesinde (UTTR-7 [Bölüm 7] İlaç Duyarlılık Testi) geçen bazı hususlar için daha ayrıntılı veya ilave bilgi için aşağıda listelenen UMS belgelerine başvurunuz:

- UMS, UTTR-1 [Bölüm 1] Biyogüvenlik
- UMS, UTTR-3 [Bölüm 3] Mikroskopi
- UMS, UTTR-4 [Bölüm 4] Kültür
- UMS, UTTR-5 [Bölüm 5] Tür Tayini

Kaynaklar

- 1 Della-Latta P. Mycobacteriology and Antimycobacterial Susceptibility Testing. *In: Garcia LS (ed in chief). Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM, Washington, D.C. 2007, p. 7.7.1 - 7.8.6.
- 2 European Centre for Disease Prevention and Control Technical Report. Mastering the basics of TB control: Development of a handbook on TB diagnostic methods. ECDC, Stockholm. 2011.
http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1105_TER_Basics_TB_control.pdf
- 3 Kent PT, Kubica GP. Public Health Mycobacteriology; a Guide for the Level III Laboratory. Centers for Disease Control (CDC), Atlanta. 1985.
- 4 Susceptibility Testing of *Mycobacteria*, *Nocardiae*, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard—Second Edition. CLSI document M24-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Pennsylvania. 2011.
- 5 Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. WHO/CDS/TB/2003.320; World Health Organization, 2003.
- 6 Canetti G et al. Advances in Techniques of Testing Mycobacterial Drug Sensitivity, and the use of Sensitivity Tests in Tuberculosis Control Programmes. *Bulletin of the World Health Organization*, 1969;41:21-43.
- 7 Woods GL, Lin SYG, Desmond EP. Susceptibility test methods: *Mycobacteria*, *Nocardia*, and other Actinomycetes. *In: Versalovic J (ed in chief). Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed. ASM Press, Washington, D.C. 2011, p. 1215-38.
- 8 Clark RB, Lewinski MA, Loeffelholz MJ, Tibbetts RJ. Cumitech 31A: Verification and validation of procedures in the clinical microbiology laboratory. Sharp SE (coordinating ed). ASM Pres, Washington, D.C. 2009.
- 9 CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendments) Standards. 1988.



ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

ULUSAL TÜBERKÜLOZ TANI REHBERİ (UTTR)

İnterferon Gama Salınım Testi

Hazırlayan Birim	Tüberküloz Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Tüberküloz
Bölüm	İnterferon Gama Salınım Testi
Standart No	UTTR-8
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2014
Geçerlilik tarihi	01.01.2016

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	2
GENEL BİLGİ	3
TEKNİK BİLGİLER.....	4
KAYNAKLAR.....	6

"Marifet, nefsi silmek değil, bilmektir..."

Kapsam ve Amaç

İnterferon Gama Salınım Testleri (İGST), *M. tuberculosis* enfeksiyonu tanısı için bir indirekt testtir. Bu testler esas olarak latent tüberküloz enfeksiyonu (LTBE) tanısı koymayı hedefleyen testlerdir. Bu Rehberde ülkemiz koşullarına göre İGST'lerin kullanılması ile ilgili gereksinimlerin belirlenmesi ve standardize edilmesi amaçlanmıştır.

Genel Bilgi

Dünya nüfusunun yaklaşık üçte biri *Mycobacterium tuberculosis* ile enfektidir. Latent tüberküloz olgularının yaklaşık %10'unda tüm hayatları boyunca aktif tüberküloz geliştiği bildirilmektedir. Özellikle gelişmiş ülkelerde LTBE tanısı ve koruyucu tedavisi tüberkülozun kontrolü açısından önemli bir basamaktır. Tüberkülin deri testi (TDT) 1890'dan beri kullanılan, latent tüberkülozu saptamaya yönelik bir testtir. Tüberkülin deri testinde pürifiye protein derivesi (PPD) kullanılarak gecikmiş tip aşırı duyarlılık yanıtı ölçülmektedir. Bu testte, PPD deri içine verilmekte, antijene özgül lenfosit infiltrasyonu ve inflamatuvar sitokinlerin etkisi sonucu enjeksiyon yerinde oluşan karakteristik endürasyon ölçülmektedir. PPD *M. tuberculosis* komplekse ek olarak *M. bovis* BCG (Bacille Calmette-Guérin) ve pek çok tüberküloz dışı mikobakteri (TDM) için de ortak antijenler içerir. Bu nedenle BCG ile aşılananlarda veya TDM ile enfekte olanlarda, çapraz reaksiyonlara bağlı yanlış pozitif TDT sonuçları alınabilmektedir.

İnterferon gama salınım testleri, TDT'ye alternatif olarak geliştirilmiş, *M. tuberculosis* kompleks antijenlerine karşı hücrel immün yanıtı ölçen *in vitro* testlerdir. TDT ve İGST, LTBE tanısında kullanılan ancak aktif tüberkülozu dışılayamayan, LTBE ve aktif TB ayırımı yapamayan, aktif hastalığa progresyon açısından yeterli fikir vermeyen testlerdir.

İnterferon gama salınım testleri öncelikle aktif hastalığa dönüşme açısından daha yüksek riske sahip ve koruyucu tedaviden yararlanacak LTBE gruplarında önerilmektedir.

Ülkemizde İGST'nin aşağıdaki durumlarda TDT ile birlikte yapılması önerilir:

- Bağışıklığı baskılananlarda koruyucu tedavi kararı için
 - TNF α blokeri kullanmadan önce
 - Organ transplantasyonundan önce
 - Kronik böbrek yetmezliği olanlar
 - Yüksek doz (15 mg/kg, uzun süreli) steroid kullanımı öncesi
 - Hematolojik malignite nedeniyle kemoterapi başlanacaklar
- Bağışıklık yetmezlikli kişiler (HIV pozitifler)
- Çocukta klinik ve radyolojik tanı şüphesini desteklemek için
- Akciğer dışı tüberküloz tanı şüphesini desteklemek için

Ülkemizde İGST'nin aşağıdaki durumlarda yapılması önerilmez:

- Temaslı LTBE taramasında

- Aktif TB tanısında
- Tüberküloz tedavisinin takibinde

Teknik Bilgiler

İnterferon gama salınım testlerinde TDT'ye benzer şekilde T hücre yanıtı değerlendirilmektedir.

Ancak bu testler, *M. tuberculosis* kompleksin özgül antijenlerine karşı *in vitro* IFN- γ salınımının saptanmasına dayanır. *M. tuberculosis* RD1 ('region of difference') bölgesindeki genler tarafından kodlanan ESAT-6 ('early secretory antigenic target 6'), CFP10 ('culture filtrate protein 10') ve bazılarında TB7.7 proteinleri antijen olarak kullanılmaktadır. Bu antijenler tüberküloz dışı mikobakteri türleri (*M. kansasii*, *M. szulgai* ve *M. marinum* dışında) ve *M. bovis* BCG'de bulunmadığı için İGST'lerinin özgüllüğü yüksektir.

Günümüzde başlıca iki ticari İGST bulunmaktadır;

- (a) QuantiFERON-TB Gold In-Tube test (QFT-GIT); tam kan örneğinde, *in vitro* koşullarda özgül antijenler ile uyarılan T-hücrelerden salınan IFN- γ düzeyini ölçen ELISA temelli bir testtir. Bu testte antijen olarak ESAT-6, CFP10 ve TB7.7 antijeni bulunmaktadır.
- (b) T-SPOT.TB; periferik kan mononükleer hücreleri kullanılarak antijene spesifik IFN- γ üreten T-hücreleri sayan ELISPOT (enzime-bağlı immunospot) temelli bir testtir. Bu testte ESAT-6 ve CFP-10 antijenleri kullanılmaktadır.

İGST'nin TDT'den farkları

- TDM ile (*M. kansasii*, *M. szulgai* ve *M. marinum* dışında) çapraz reaksiyon vermemektedir.
- Aşı suşu *M. bovis* BCG ile çapraz reaksiyon vermemektedir.
- Olguların tekrar gelmesine gerek kalmadan sonuç alınabilmektedir.
- Değerlendirme objektiftir.
- 24-48 saatte sonuç alınabilmektedir.
- Booster etkisi yoktur.
- Laboratuvar donanımı gereklidir.
- Maliyeti yüksektir.
- Taze venöz kan gerekir. Çocuklarda kan almak zor olabilir.

İGST'ler için test işlemleri, kalite kontrol uygulamaları, testin değerlendirilmesi ve raporlama ticari üreticinin önerilerine uygun olarak yapılmalıdır.

Raporlama Tablo 1'deki gibi yapılmalıdır.

Tablo 1. İGST sonuçlarının raporlanması

İGST SONUCU	RAPORLAMA	YORUM
Pozitif	İnterferon gama salınım testi pozitif	Kişinin <i>M.tuberculosis</i> ile karşılaştığını gösterir. Latent tüberküloz enfeksiyonu ile aktif hastalık ayırımı yapmaz.
Ara Değer	İnterferon gama salınım testi ara değer	Testin sonucunun şüpheli (sıklıkla bireyin bağışıklık sisteminin baskı altında olmasına bağlı olarak) olduğunu gösterir. Yeni kan ile tekrar edilebilir.
Negatif	İnterferon gama salınım testi negatif	Negatif sonuç tüberküloz enfeksiyonunu ekarte ettirmez. Akciğer tüberkülozunda esas tanı bakteriyolojiktir.

Bu tanı yöntemleri potansiyel olarak enfekte kan örnekleri ile çalışılır. Kan örnekleri ile çalışırken KKD (eldiven ve önlük) kullanılmalıdır (Tablo 2).

Tablo 2. İGST işlemleri sırasında alınması gereken önlemler

	Laboratuvar tasarımı		Laboratuvar donanımı		Kişisel koruyucu donanım		
	Havalandırma	Laboratuvar giriş sınırlaması	BGK	Otoklav	Eldiven	Önlük	Maske
İnterferon gama salınım testi	Doğal havalandırma	BGD-2 işaretli giriş sınırlaması	-	-	✓	✓	-

Ayrıntılı bilgi için "UTTR-1 Biyogüvenlik" belgesine bakınız.

Dikkat edilmesi gereken noktalar

- Pozitif İGST sonuçlarının aktif TB ile LTBE ayırımını yapamayacağı unutulmamalıdır. Pozitif sonuç durumunda aktif TB ileri testler ve değerlendirmeler ile dışlanmalıdır.
- Negatif İGST sonuçlarının aktif TB'yi dışlamayacağı unutulmamalıdır. Negatif bir sonuç özellikle bağışıklık fonksiyonları bozuk kişilerde tıbbi ve anamnez verileri ile birlikte değerlendirilmelidir.
- Bağışık yetmezlikli / bağışıklığı baskılanmış kişilerde ve beş yaş altı çocuklarda yalancı negatif veya belirsiz sonuçlarda artış olabilir. Bu gruplarda negatif İGST sonuçları tek başına LTBE'ni dışlamaz. İGST'nin TDT ile birlikte kullanılması duyarlılığı artırabilir.
- TDT, daha sonra yapılan İGST sonuçlarını etkileyebilir. Bu nedenle iki aşamalı uygulamada (önce TDT, sonra İGST) TDT uygulandıktan sonra 3 gün içinde (TDT'nin değerlendirildiği gün) İGST için kan alınmalıdır.
- İGST, TB hastası ile temastan 4-7 hafta sonra pozitifleşir. Temas sonrası uygulanan testler temastan 6-8 hafta sonra tekrarlanmalıdır.

Kaynaklar

- 1 Tüberküloz Tanı ve Tedavi Rehberi. Sağlık Bakanlığı. Başak Ltd. Şti., Ankara, 2011. <http://www.verem.org.tr/pdf/tum-kitap.pdf>
- 2 Denkinger CM, Dheda K, Pai M. Guidelines on interferon-c release assays for tuberculosis infection: concordance, discordance or confusion? *Clin Microbiol Infect* 2011;17:806-14.
- 3 Use of interferon-gamma release assays in support of TB diagnosis. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Stockholm. 2011. www.ecdc.europa.eu
- 4 Mazurek GH, Jereb J, Vernon A, LoBue P, Goldberg S, Castro K. Updated guidelines for using interferon gamma release assays to detect *Mycobacterium tuberculosis* Infection - United States. *MMWR Recomm Rep* 2010; 59 (No. RR-5) 1-25.
- 5 Brouqui P, Delaigue S, Parola P, Drancourt M. Interferon-gamma release assay: use and misuse. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:1053-4.
- 6 Amicosante M, Ciccozzi M, Markova R. Rational use of immunodiagnostic tools for tuberculosis infection: guidelines and cost effectiveness studies. *New Microbiologic* 2010;33:93-107.
- 7 Pai M, Menzies D. Interferon-gamma release assays for diagnosis of latent tuberculosis infection. UpToDate, 2013 (www.uptodate.com).
- 8 Sester M, Sotgiu G, Lange C et al. Interferon-γ release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systemic review and meta-analysis. *Eur Respir J*. 2011; 37: 100-111.
- 9 Metcalfe JZ, Everett CK, Steingart KR et al. Interferon-γ release assays for active pulmonary tuberculosis in adults in low- and middle income contries: systemic review and meta-analysis. *J Infect Dis* 2011;204 (Suppl 4):1120-1129.
- 10 Diel R, Goletti D, Ferrera G et al. Interferon-γ release assays for the diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: a systemic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2011;37:88-99.
- 11 Munoz L, Santin M. Interferon-γ release assays versus tuberculin skin test for targeting people for tuberculosis preventive treatment: an evidence based review. *J Infect*. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2012.12.005>.
- 12 Use of tuberculosis interferon-gamma release assays (IGRAs) in low- and middle-income countries WHO Policy Statement, 2011.
- 13 TB Elimination Interferon-Gamma Release Assays (IGRAs) – Blood tests for TB Infection CDC, 2011.
- 14 European Centre for Disease Prevention and Control Technical Report. Mastering the basics of TB control: Development of a handbook on TB diagnostic methods. ECDC Stockholm. 2011 http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1105_TER_Basics_TB_control.pdf



ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

ULUSAL TÜBERKÜLOZ TANI REHBERİ (UTTR)

“Antitüberküloz İlaç Direnci Laboratuvar Sürveyans Ağı” Rehberi

Hazırlayan Birim	Tüberküloz Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Tüberküloz
Bölüm	Sürveyans Rehberi
Standart No	UTTR-9
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2014
Geçerlilik tarihi	01.01.2016

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	2
“SÜRVEYANS AĞI”NA KATILIM	7
“SÜRVEYANS AĞI”ÇALIŞMA PLANI.....	8
“SÜRVEYANS AĞI”NA KATILIM BELGELERİ	14
EKLER.....	16
Ek-1 Antitüberküloz İlaç Direnci Laboratuvar Sürveyans Ağı – Katılım Protokolü	16
Ek-2 Antitüberküloz İlaç Direnci Laboratuvar Sürveyans Ağı – Katılım belgesi	17
Ek-3 Antitüberküloz İlaç Direnci Laboratuvar Sürveyans Ağı – Katılım ve yetki belgesi	17
Ek-4 Antitüberküloz İlaç Direnci Laboratuvar Sürveyans Ağı – Yetki belgesi.....	18
KAYNAKLAR.....	18

"İlmini paylaşmaktan sakınmayanlara..."

Kapsam ve Amaç

Ülke genelinde kalite güvence sistemine dayalı antitüberküloz ilaç direnci dağılımını, ilaca dirençli tüberküloz olgularının seyri ve direnç yükünü belirlemek ve laboratuvarların kapasitelerini izlemek ve geliştirilmesine katkıda bulunmak amacıyla 'Antitüberküloz İlaç Direnci Laboratuvar Sürveyans Ağı'nın kurulması gerekmektedir.

Amaç;

- 'Antitüberküloz İlaç Direnci Laboratuvar Sürveyans Ağı'nın kurulması ve tüm ülke genelinde yaygınlaştırılmasıdır.

İlaç direncini izlemek için 1994 yılında DSÖ, Antitüberküloz İlaç Direnci Laboratuvar Sürveyansı çalışmalarını üç temel prensibe dayandırarak başlattı:

- **Temsiliyet;** sürveyans bir coğrafi bölgedeki tüm olguları temsil etmeli,
- **Epidemiyolojik veri;** olguların antitüberküloz tedavi öyküsü bilinmeli
- **Kalite güvence sistemi;** laboratuvar çalışmalarının doğruluğundan kalite güvence sistemi ile emin olunmalıdır.

Kalite güvence sistemi iki ayrı yöntemle değerlendirilmektedir.

- Panel testler ile laboratuvarın dış kalite değerlendirmesi,
- İlaç duyarlılık testlerinin referans laboratuvarında kontrol edilmesidir.

Bu üç bileşen bileşen, laboratuvar sürveyansının temelini teşkil ettiğinden ve bu bileşenler sağlanamadığında laboratuvar verileri kabul görmediğinden 'Antitüberküloz İlaç Direnci Laboratuvar Sürveyans Ağı' kurulum çalışmaları üç temel hedefe dayandırılmıştır.

Hedef;

- Bölge temsiliyetinin sağlanması
- Epidemiyolojik veri ile laboratuvar verisinin eşleştirilmesi
- Laboratuvar kalite güvence sisteminin sağlanmasıdır.

Çoklu İlaca Dirençli Tüberküloz eğiliminin izlenmesinde ve muhtemel bir salgının belirlenmesinde en güvenilir yöntem, laboratuvara dayalı sınıf A devamlı sürveyans verisinin takibidir.

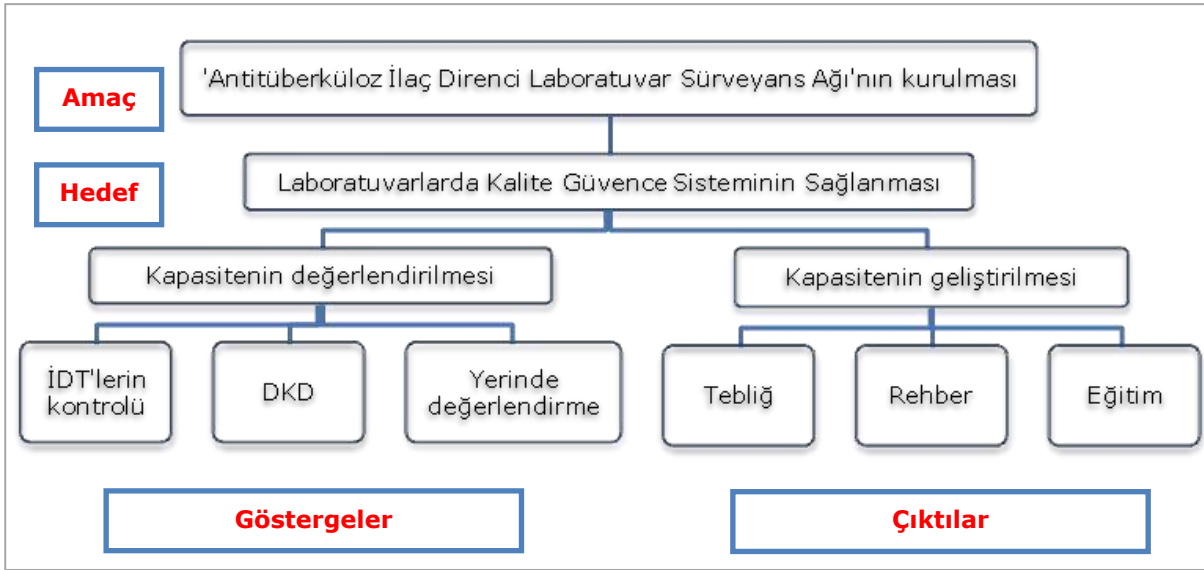
Sınıf A sürveyans verisi (bölge temsiliyeti);

- Bölgenin tüm akciğer tüberkülozu vakalarının %50'sinde kültür pozitifliği
- Kültür pozitiflerin %75'inin ilaç duyarlılık testi sonuçlarının varlığı olarak tanımlanmaktadır.

Bölge temsiliyetinin sağlanması ve epidemiyolojik veriler ile laboratuvar verilerinin eşleştirilmesi hedeflerine ulaşma esas olarak, il TB birimleri ile işbirliği ile sağlanmaktadır.

Tüberküloz laboratuvarlarının bu hedefleri sağlamadaki rolleri ise;

- Bölge temsiliyetinin sağlanması için tüberküloz şüpheli örneklerin hepsine mikroskopi ve kültür yapmaları, kültür pozitiflere de İDT yapmaları ve
- Laboratuvar kalite güvence sistemini sağlamalarıdır (Şekil 1).



Şekil 1. Laboratuvar bazlı hedef ağacı

Kapsam; Tüberküloz tanısı yapan tüm tıbbi laboratuvarlar istenen kriterleri sağlamaları koşulu ile sürveyans kapsamında yer almaktadır.

- Sadece mikroskopi yapan Düzey I tüberküloz tanı laboratuvarları
- Mikroskopi ve kültür yapan Düzey II tüberküloz tanı laboratuvarları
- Ek olarak İDT yapan Düzey III tüberküloz tanı laboratuvarları

2012'de Tüberküloz Daire Başkanlığı tarafından gerçekleştirilen laboratuvar anketi sonuçlarına göre Türkiye'deki tüberküloz laboratuvarlarının dağılımı aşağıda verilmiştir. Tüberküloz tanısı yapan toplam 386 laboratuvar;

- Sadece mikroskopi yapan;
 - 154 Düzey I laboratuvar
- Mikroskopi ve kültür yapan;
 - 156 konvansiyonel kültür
 - 81 sıvı kültür
 - Toplam 157 Düzey II laboratuvar

- 13'ü bölge TB laboratuvarı*
- 4'ü göğüs hastalıkları hastanesi
- Mikroskopi, kültür, tür tayini ve İDT yapan;
 - 75 Düzey III laboratuvarı
 - 9'u bölge TB laboratuvarı*
 - 7'si göğüs hastalıkları hastanesi

*4 göğüs hastalıkları hastanesi (Tablo 1), aynı zamanda bölge TB laboratuvarı (Tablo 2) olarak da hizmet vermektedir.

Tablo 1. Göğüs hastalıkları hastanesi tüberküloz laboratuvarlarının dağılımı

	İl	Kurum Adı	İDT	Bölge olarak çalışıyor mu?
1	Ankara	Atatürk GHH	✓	
2	Balıkesir	Balıkesir GHH	✓	✓
3	Bursa	Prof. Dr. Türkan Akyol GHH	✓	✓
4	Çorum	Çorum GHH	-	
5	Giresun	Dr. Ali Menekşe GHH	-	
6	İstanbul	Süreyyapaşa GHH	✓	✓
7	İstanbul	Yedikule GHH	✓	
8	İzmir	Dr. Suat Seren GHH	✓	
9	Kayseri	Naci Yazgan GHH	✓	✓
10	Samsun	Samsun GHH	✓	
11	Zonguldak	Uzun Mehmet GHH	-	

Tablo 2. Bölge tüberküloz laboratuvarlarının dağılımı (n=22)

Bölge Tüberküloz Laboratuvarları	Materyal Gönderen İller	Hizmeti veren kurum	İDT
1 Adana BTL	Adana, Adıyaman, Osmaniye, Hatay, Gaziantep, Kilis, Kahramanmaraş, Mersin	Çukurova Üniv. Tropikal HUM	✓
2 Ankara BTL	Ankara, Çankırı, Kırşehir, Nevşehir, Niğde, Kırıkkale, Aksaray, Yozgat	Ankara Halk Sağlığı Laboratuvarı	
3 Antalya BTL	Antalya, Burdur, Isparta	Merkez VSD / HSL	✓
4 Bursa BTL*	Bursa Balıkesir Bilecik Yalova Çanakkale	Bursa GHH / Bursa HSL Balıkesir GHH Eskişehir Osmangazi ÜTF Süreyyapaşa GHH Çanakkale Onsekiz Mart ÜTF	✓
5 Çorum BTL	Çorum	Merkez VSD	
6 Denizli BTL	Denizli	Denizli VSD	✓
7 Diyarbakır BTL	Diyarbakır, Mardin, Batman, Şırnak, Şanlıurfa, Siirt	Merkez 1 Nolu VSD / HSL	
8 Elazığ BTL	Elazığ, Bingöl, Muş, Malatya, Tunceli	Elazığ VSD / HSL	
9 Erzurum BTL	Erzurum, Erzincan, Ağrı, Iğdır, Kars, Ardahan	Erzurum VSD / HSL	
10 Eskişehir BTL	Eskişehir, Afyon, Kütahya	Eskişehir VSD	
11 İstanbul-Bakırköy BTL	İstanbul	İstanbul Halk Sağlığı Laboratuvarı	✓
12 İstanbul-Taksim BTL	İstanbul, Edirne, Kırklareli, Tekirdağ	İstanbul VSD Derneği	✓
13 İzmir BTL	İzmir, Aydın, Manisa, Muğla, Uşak	Kahramanlar VSD / İzmir HSL	
14 Kastamonu BTL	Kastamonu	Kastamonu VSD	
15 Kayseri BTL	Kayseri	N. Naci Yazgan GHH	✓
16 Kocaeli BTL	Kocaeli, Sakarya, Düzce, Bolu	Kocaeli VSD / HSL	✓
17 Konya BTL	Konya, Karaman	Selçuk Üniv. Meram TF	✓
18 Samsun BTL	Samsun, Amasya, Ordu, Sinop	Samsun Merkez VSD / HSL	
19 Sivas BTL	Sivas, Tokat	Sivas VSD	
20 Trabzon BTL	Trabzon, Giresun, Gümüşhane, Rize, Bayburt, Artvin	Trabzon VSD	
21 Van BTL	Van, Bitlis, Hakkâri	Van VSD / HSL	
22 Zonguldak BTL	Zonguldak, Bartın, Karabük	Zonguldak VSD	

*22 BTL tanımlanmış olmasına rağmen bu hizmet 26 laboratuvar tarafından yürütülmektedir.

BTL'lerin kurum tipine göre dağılımı;

- 16 halk sağlığı laboratuvarı / dispanser
- 4 göğüs hastalıkları hastanesi
- 4 üniversite hastanesi
- 1 dernek dispanseri

“Sürveyans Ağı”na katılım

Tüberküloz laboratuvarları “Antitüberküloz İlaç Direnci Laboratuvar Sürveyans Ağı”na dahil olabilmek için aşağıda yer alan tüm kriterleri sağlamalıdır. Kriterleri sağlayan laboratuvarlar “Antitüberküloz İlaç Direnci Laboratuvar Sürveyansı – Katılım Protokolü (Ek-1)”nü imzalayarak ağı dahil edilirler.

Ağa Dahil Edilme Kriterleri;

- Laboratuvar kalite güvence sistemi kriterleri;
 - Laboratuvar kapasitesinin geliştirilmesi için
 - Tüm işlemlerini tebliğe uygun olarak gerçekleştirmeli
 - Ulusal (UTTR) veya uluslararası standartları kullanmalı
 - UTRL’nin eğitim programlarına katılmalı
 - Laboratuvar kapasitesinin değerlendirilebilmesi için
 - İDT sonuçları UTRL tarafından kontrol edilmeli
 - UTRL tarafından uygulanan DKD programına katılmalı
 - UTRL tarafından düzenlenen yerinde değerlendirme ziyareti programına dahil olmalıdır.
- Temsiliyet kriterleri;
 - İl sürveyans sınıf A kriterlerini sağlamalı
 - İlin tüm akciğer tüberkülozu olgularının en az %50’si yayma ve kültür pozitif olmalı
 - İlin kültür pozitif olgularının en az %75’ine İlaç Duyarlılık Testi yapılmış olmalıdır.

Ağa dahil laboratuvarların yıllık olarak değerlendirmesi yapılır ve kalite güvencesini sağlayan laboratuvarların elde ettiği İDT verileri “Antitüberküloz İlaç Direnci Laboratuvar Sürveyans Sistemine” izolat İDT sonuç kontrolü yapılmadan direkt olarak kabul edilir.

Kalite güvencesinin sağlandığının göstergeleri

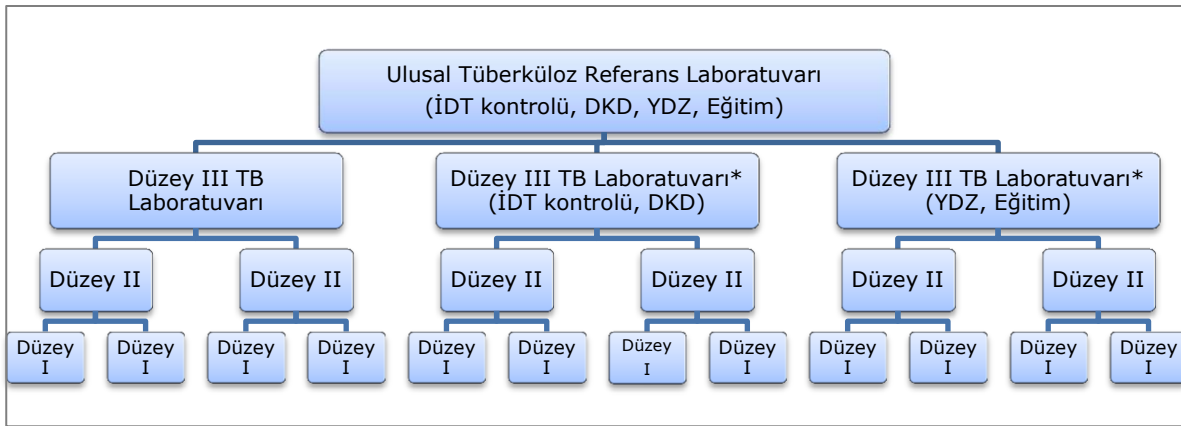
- **İDT sonuçlarının kontrolü;** UTRL’ye yollanan izolatların kontrol çalışmalarında RİF ve INH için İDT uyumu en az %95 olmalı, bunun sağlanamadığı durumda yapılan düzeltici faaliyetler belirtilmelidir.
- **DKD;** laboratuvarın DKD uygulamaları sonucundaki mikroskopi, kültür, tür tayini ve İDT başarısı en az %80 olmalı; bunun sağlanamadığı durumda yapılan düzeltici faaliyetler belirtilmelidir.
- **Yerinde Değerlendirme Ziyareti;** laboratuvar ziyaretlerinde Laboratuvar Değerlendirme Aracında yer alan asgari koşullar sağlanmalıdır. Sağlanamadığı durumlarda planlanan düzeltici faaliyetler işleme konulmalıdır.

“Sürveyans Ağı” Çalışma Planı

“Antitüberküloz İlaç Direnci Laboratuvar Sürveyans Ağı” Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı koordinasyonunda birbirine karşı sorumlu farklı düzey ve işlevlerdeki tüberküloz laboratuvarlarından oluşmaktadır (Şekil 2). TB birimleri de bu ağ yapısında temsiliyetin ve epidemiyolojik verinin sağlanması açısından paydaştır.

Paydaşlar;

- Tüberküloz laboratuvarları
- Tüberküloz Daire Başkanlığı
- İl TB Koordinatörleri
- İl Tüberküloz Birimleri



Şekil 2. Antitüberküloz İlaç Direnci Laboratuvar Sürveyans Ağı yapısı

*Düzen III TB laboratuvarlarının bir kısmı ihtiyaca göre UTRL tarafından Düzen I ve II laboratuvarların DKD, yerinde değerlendirme ziyareti (YDZ) ve eğitim çalışmaları ve Düzen III laboratuvarların İDT kontrolü için yetkilendirilebilir.

Çalışma basamakları;

1. Epidemiyolojik verinin sağlanması

- TB hasta kaydı
- Kayıt bildirimi

2. Bölge temsiliyetinin sağlanması

- TB kuşkulu hasta örnek alımı
- Tüm örneklerle kültür yapılması
- Tüm izolatlar İDT yapılması
- RIF dirençli izolatların UTRL'ye yollanması

3. Laboratuvar kalite güvence sisteminin sağlanması

- İDT'lerin kontrolü
- Dış Kalite Değerlendirme
- Yerinde Değerlendirme Ziyareti
- Eğitim

4. Sürveyans faaliyetlerinin takibi

- Koordinasyon
- Faaliyetlerin değerlendirilmesi basamaklarından oluşmaktadır.

1. Epidemiyolojik verinin sağlanması

a. TB hasta kaydı

- Ölüm vakaları dahil TB hasta kayıtlarının düzenli olarak tutulması ve UTRL'ye bildirilmesi (Şekil 3)

Sorumlu;

- İl TB Koordinatörleri
- İl TB Birimleri

b. Kayıt bildirimi

- Ölüm vakaları dahil TB hasta kayıtlarının düzenli olarak tutulması ve UTRL'ye bildirilmesi

Sorumlu;

- İl TB Koordinatörleri
- İl TB Birimleri

2. Temsiliyetin sağlanması

a. TB kuşkulu hastadan örnek alınması (Şekil 3)

- Her akciğer tüberkülozu şüpheli hastaya ait en az iki balgam örneğinin uygun şartlarda alınması, yayma ve/veya kültür çalışılmak üzere örneğin alınmasını takip eden en geç 72 saat içerisinde ilgili Bölge TB Laboratuvarına yollaması ve sonuçlarını takip etmesi
- Örnek yollarken paketleme ve gönderim yönergesine uyulması (bkz. UTTR-2. Örnek Paketleme ve Gönderim Yönergesi)

Sorumlu;

- İl TB Birimleri
- Düzen I TB laboratuvarları

b. Tüm örneklerle kültür yapılması (Şekil 3)

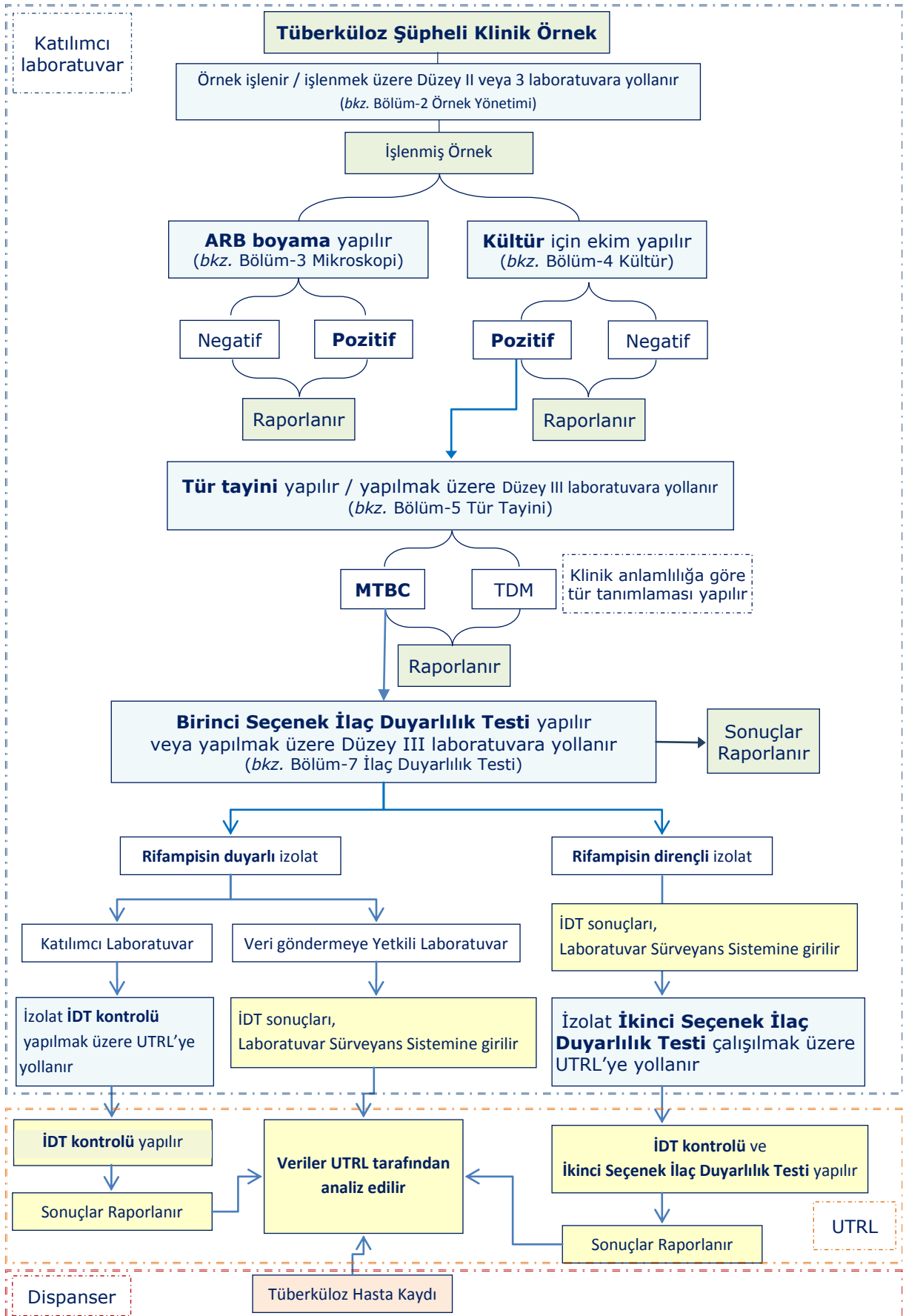
- Tüberküloz şüpheli hastalara ait tüm örneklerle yayma yapılması, tercihan tüm örneklerle, mümkün değilse yayma pozitif tüm örneklerle kültür çalışılması

Sorumlu;

- Düzen II ve III TB laboratuvarları
- Kültür pozitif izolatların İDT çalışılmak üzere yetkili Düzen III laboratuvarına yollanması
- İzolat ile birlikte izolat bilgilerinin yollanması
- İzolat yollarken paketleme ve gönderim yönergesine uyulması (bkz. UTTR-2. İzolat Paketleme ve Gönderim Yönergesi)

Sorumlu;

- Düzen II ve III TB laboratuvarları



Şekil 3. Antitüberküloz İlaç Direnci Laboratuvar Sürveyans Ağı örnek / izolat işlem algoritması

c. Tüm kültür pozitif *M. tuberculosis* kompleks izolatlara İDT yapılması (Şekil 3)

- Her hastaya ait en az bir üremiş kültüre tür tayini yapılması
- *M. tuberculosis* kompleks olarak tanımlanan her hastaya ait en az bir izolata İDT yapılması
- Tedaviye yanıtsızlık veya direnç gelişimi düşünülen vakalara tekrar İDT yapılması
- İDT yapılan izolatların İDT kontrolünün yapılması için UTRL veya yetkili İDT kontrol laboratuvarına yollanması
- İzolat ile birlikte izolat bilgilerinin yollanması
- İzolat yollarken paketleme ve gönderim yönergesine uyulması (bkz. UTTR-2. İzolat Paketleme ve Gönderim Yönergesi)
- Her hastaya ait en az bir izolatın saklanması

Sorumlu;

- Düzey III TB laboratuvarları

d. Rifampisin dirençli izolatlara ikinci seçenek İDT yapılması

- Rifampisin dirençli tüm izolatların ikinci seçenek ilaç duyarlılık testi çalışılmak üzere UTRL'ye yollanması

Sorumlu;

- Düzey III TB laboratuvarları

- Rifampisin dirençli tüm izolatlara ikinci seçenek ilaç duyarlılık testi yapılması

Sorumlu;

- UTRL

3. Laboratuvar kalite güvence sisteminin sağlanması

a. İDT'lerin kontrolü

- İzolatların hem genetik hem de fenotipik test ile İDT'sinin yapılması
- Sonuçların karşılaştırılması
- Sonuçların izolat gönderen laboratuvarave İl TB koordinatörlüğüne gecikmeden bildirilmesi
- Uyumsuz sonuçların UTRL'de yeniden değerlendirilmesi, gerekli ileri analizlerin yapılması ve ihtiyaç halinde Supranasyonel Referans Laboratuvarına yollanması
- Rifampisin dirençli izolatların saklanması

Sorumlu;

- UTRL
- İDT kontrolü yetkili Düzey III laboratuvarı

b. Dış Kalite Değerlendirme

- DKD katılımın organizasyonu
- Düzey II laboratuvarlara yılda bir kez mikroskopi ve kültür panellerinin uygulanması
- Düzey III laboratuvarlara yılda bir kez mikroskopi, kültür, tür tayini ve ilaç duyarlılık test panellerinin uygulanması
- Panel sonuçların analiz edilerek laboratuvar performanslarının değerlendirilmesi
- Panel sonuçlarının gizlilik ilkesi ile sadece katılımcı laboratuvar ile paylaşılması

Sorumlu;

- UTRL
- Düzey I laboratuvarlara yılda bir kez mikroskopi panellerinin uygulanması
- Panel sonuçların analiz edilerek laboratuvar performanslarının değerlendirilmesi
- Panel sonuçlarının gizlilik ilkesi ile sadece katılımcı laboratuvar ve UTRL ile paylaşılması

Sorumlu;

- DKD yetkili Düzey III laboratuvar

c. Yerinde Değerlendirme Ziyareti

- Yerinde değerlendirme ziyaret ekiplerinin oluşturulması
- Ziyaretlerin koordinasyonunun yapılması
- Laboratuvarlar değerlendirme aracı ile laboratuvarın değerlendirilmesi, geliştirilmesi gereken yönlerin ve gelişimlerin analiz edilmesi ve düzeltici önerilerde bulunulması

Sorumlu;

- UTRL
- Laboratuvarlar değerlendirme aracı ile laboratuvarın değerlendirilmesi, geliştirilmesi gereken yönlerin ve gelişimlerin analiz edilmesi ve düzeltici önerilerde bulunulması

Sorumlu;

- Yerinde Değerlendirme Ziyareti yetkili Düzey III laboratuvar uzmanı

d. Eğitim

- 5 günlük uygulamalı TB eğitim materyalinin hazırlanması
- Standart materyal ile TB eğitici eğitimlerinin yapılması
- Bölgesel eğitim gruplarının oluşturulması
- Eğitimlerin koordinasyonunun yapılması
- Yılda en az bir kez Düzey I, iki kez Düzey II ve 3 laboratuvarı teknik personeline yönelik, bir kez de uzman eğitimi verilmesi

Sorumlu;

– UTRL

- Yılda en az bir kez Düzey I, bir kez Düzey II ve 3 laboratuvarı teknik personeline yönelik, bir kez de uzman eğitimi verilmesi

Sorumlu;

– Bölge eğitim grubu

4. Sürveyans faaliyetlerinin takibi

a. Koordinasyon

- 'Antitüberküloz İlaç Direnci Laboratuvar Sürveyans Ağı'na dahil laboratuvarların ve İl TB koordinatörlerinin koordinasyonunun sağlanması
- Örnek ve veri akışının koordinasyonunun sağlanması, eksikliklerin kontrolü ve geri bildirim verilmesi
- Paydaşlar ile koordinasyonun sağlanması
- Proje koordinasyon ekibi toplantılarının organize edilmesi

Sorumlu;

– UTRL

b. Faaliyetlerin değerlendirilmesi

- Laboratuvar ve epidemiyolojik verilerin eşleştirilmesi
- Faaliyet raporunun hazırlanması
- Geliştirilmesi gereken yönlerin belirlenmesi
- Geliştirmeye yönelik önerilerde bulunulması

Sorumlu;

– UTRL

- Proje Ekibi çalışmalarının takibi ve yönlendirilmesi
- 6-12 aylık aralıklarla değerlendirme toplantıları yapılması
- Geliştirmesi gereken noktaların tespiti ve giderilmesine yönelik önlemlerin alınması
- Paydaşlara çalışmalara ilişkin bilgi notu hazırlanması

Sorumlu;

– Proje Koordinasyon Ekibi

Proje Koordinasyon Ekibi:

- Bulaşıcı Hastalıklar Kontrol Programı Başkan Yardımcısı
- Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanı
- Tüberküloz Daire Başkanı
- Halk Sağlığı Laboratuvarları Daire Başkanı
- Klinik Danışman
- Teknik Danışman
- UTRL Sürveyans Sorumlusu
- UTRL DKD Sorumlusu
- UTRL Eğitim Sorumlusu
- UTRL Yerinde Değerlendirme Ziyareti Sorumlusu
- Epidemiyolojik Veri Sorumlusu
- İl TB Koordinatörü Temsilcisi
- İl TB Birimi Temsilcisi
- Göğüs Hastalıkları Hastanesi Laboratuvar Temsilcisi
- Bölge TB Laboratuvarı Temsilcisi

“Sürveyans Ağı”na katılım belgeleri

Sürveyans ağına katılım UTRL ile paydaş laboratuvarlar arasında her yılın başında imzalanan protokol ile belgelenir (Ek-1).

Yılın sonunda laboratuvarın tüm faaliyetlerinin analizi yapılarak

- Sürveyans Ağı'na dahil tüm laboratuvarlara; “Antitüberküloz İlaç Direnci Laboratuvar Sürveyans Ağı - Katılım belgesi (Ek-2)” verilir.
- Tüm kalite güvence sistemi göstergeleri uygun bulunan laboratuvarlara; “Antitüberküloz İlaç Direnci Laboratuvar Sürveyans Ağı – Katılım ve yetki belgesi (Ek-2)” verilir. Bu laboratuvarlar izleyen yılda TB İDT sonuçlarını kontrol edilmeden sürveyans sistemine girebilme yetkisi elde etmiş olurlar.

Ayrıca, Düzey III yetkili laboratuvarlar ihtiyaca ve gönüllülük esasına göre aşağıdaki hususlarda da özel alanlarda yetkilendirilebilir (Ek-4). Tüm belgeler, gerekli analizler yapıldıktan sonra her yıl yenilenir.

Laboratuvarların özel alan yetkilendirilmesi için asgari koşullar

- Sürveyans ağına dâhil olmalı
- Kalite güvence sistemini sağlamış olmalıdır.

▪ İDT kontrolü yetkili laboratuvar;

Düzey III laboratuvarların *M. tuberculosis* kompleks izolatlarının İDT sonuçlarını kontrol etme yetkisi bulunan Düzey III laboratuvar

▪ DKD yetkili laboratuvar;

Düzey I laboratuvarlarına mikroskopi için DKD yapma yetkisi bulunan Düzey III laboratuvar

▪ Yerinde Değerlendirme Ziyareti yetkisi;

Laboratuvar Değerlendirme Aracı ile laboratuvar yerinde değerlendirme yetkisi bulunan Düzey III laboratuvar uzmanı

▪ Eğitim yetkisi;

UTRL koordinasyonunda gerçekleştirilen TB eğitici eğitimi almış Düzey III laboratuvar uzmanı

Verilerin Paylaşımı ve Yayın Politikası

'Antitüberküloz İlaç Direnci Laboratuvar Sürveyans Ağı' çalışması çerçevesinde katılımcıların göndermiş oldukları veri ve analiz sonuçları, üç aylık dönemler halinde toplanabilir, gerektiğinde sağlık politikalarının geliştirilebilmesi amacı ile karar vericiler ve ilgili kurumlarla paylaşılabilir. Ayrıca verilerin doğrulanması ve verilerin analizinden sorumlu kişiler tarafından hazırlanan raporlar, bu şekilde hazırlanan yayınlar ve bilimsel kongrelerde yapılan sunumlar aracılığıyla bilimsel çevrelerle de paylaşılabilir. Bu yayınlar ve raporlarda UTRL Sürveyans sorumlularının isimleri, katılımcı laboratuvarların sorumlularının isimleri, temsilcisi oldukları kurum / bölümlerden oluşan "Antitüberküloz İlaç Direnci Laboratuvar Sürveyans Ağı" çalışma grubu" şeklinde belirtilir. Katılımcı kurum isimlerinin yer aldığı liste yayın veya raporların uygun yerlerinde açıkça belirtilir.

Sadece belirli bir laboratuvarı ilgilendiren özel bir koşul oluşması durumunda hazırlanacak yayında, o laboratuvardan yazıyı kaleme alan konu ile ilgili kişilerin isimleri ayrıca belirtilir ve verinin oluşmasına ve yayına sağladıkları katma değer oranında UTRL sürveyans sorumlularının isimleri de yer alır. Sürveyans kapsamında kendi verilerini sunan katılımcı laboratuvarlar, yayın veya raporların uygun yerlerinde (örneğin, Acknowledgement, Teşekkür bölümlerinde veya metin içinde) bu verinin UTRL sürveyansı kapsamında toplandığını belirtmelidir.

Ağdan toplanan her suş ve veri ile ilgili ulusal gereklilikler doğrultusunda daha sonra yapılacak olan her çalışmada proje koordinasyon ekibinin onayları alınır ve çalışmada suş ve veri sağlayıcıların isimleri "Antitüberküloz İlaç Direnci Laboratuvar Sürveyans Ağı" çalışma grubu" şeklinde belirtilir. Katılımcı kurum isimlerinin yer aldığı liste yayın veya raporların uygun yerlerinde açıkça belirtilir.

Ekler

Ek-1 Antitüberküloz İlaç Direnci Laboratuvar Sürveyans Ağı – Katılım Protokolü

Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı

- Epidemiyolojik verinin sağlanması
- Bölge temsiliyetinin sağlanması
- Laboratuvar kalite güvence sisteminin sağlanması
 - İDT kontrolü
 - Dış Kalite Değerlendirme
 - Yerinde Değerlendirme Ziyareti
 - Eğitim

çalışmalarının takip ve koordinasyonundan, bu çalışmaların proje koordinasyon ekibine sunumundan ve proje koordinasyon ekibince alınan kararların paydaşlara sunulmasından sorumlu olduğumuzu beyan ederiz.

- Ayrıca, sürveyans faaliyetleri dahilinde yapılan bilimsel yayınlara "Antitüberküloz İlaç Direnci Laboratuvar Sürveyans Ağı" çalışma grubu"nın yazılmasından sorumlu olduğumuzu beyan ederiz.

Tarih

İmza

UTRL Sürveyans Sorumlusu

Katılımcı Laboratuvar

Kurum Adı:

Laboratuvar Adı:

Laboratuvar düzeyi:

Laboratuvar Sürveyans Sorumlusu Adı:

Sorumlu iletişim bilgisi (telefon, email):

- Laboratuvar kalite güvence sisteminin sağlanması için
 - Gerekli suşları ve tüm İDT verilerini UTRL'ye yollayacağımı
 - UTRL tarafından koordine edilen DKD, Yerinde Değerlendirme Ziyareti ve Eğitim faaliyetlerine katılacağımı beyan ederim.
- Ayrıca, sürveyans faaliyetleri dahilinde yapılan çalışmalardan bilimsel yayın hazırlamam durumunda UTRL sürveyans sorumlusu aracılığı ile Proje koordinasyon ekibinden onay alacağımı
- Sürveyans sorumlusu değiştiğinde, değişikliği UTRL sürveyans sorumlusuna bildireceğimi beyan ederim.

Tarih

İmza

Laboratuvar Sürveyans Sorumlusu

Ek-2 Katılım belgesi

 T.C. Sağlık Bakanlığı	No...../.....
	T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı
KATILIM BELGESİ	
Sayın: Laboratuvar Sürveyans Sorumlusu Adı-Soyadı	
Kurum adı, Laboratuvar adı olarak kurumumuz, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı tarafından yürütülen “Antitüberküloz İlaç Direnci Laboratuvar Sürveyans Ağı”na Sürveyansa katılan yıl yılında vermiş olduğunuz katkı ve katılımınızdan dolayı teşekkür ederiz.	
Tarih İmza Daire Başkanı Adı-Soyadı Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanı	

Ek-3 Katılım ve yetki belgesi

 T.C. Sağlık Bakanlığı	No...../.....
	T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı
KATILIM ve YETKİ BELGESİ	
Sayın: Laboratuvar Sürveyans Sorumlusu Adı-Soyadı	
Kurum adı, Laboratuvar adı olarak kurumumuz, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı tarafından yürütülen “Antitüberküloz İlaç Direnci Laboratuvar Sürveyans Ağı”na Sürveyansa katılan yıl yılında vermiş olduğunuz katkı ve katılımınızdan dolayı teşekkür ederiz. Laboratuvarınıza TB İDT sonuçlarını direkt olarak sürveyans sistemine girme yetkisi verilmiştir.	
Tarih İmza Daire Başkanı Adı-Soyadı Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanı	

Ek-4 Özel alan yetki belgesi

	T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı YETKİ BELGESİ Sayın: Laboratuvar Sürveyans Sorumlusu Adı-Soyadı Kurum adı, Laboratuvar adı olarak kurumumuz, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı tarafından yürütülen “Antitüberküloz İlaç Direnci Laboratuvar Sürveyans Ağı”na Sürveyansa katılan yıl yılında vermiş olduğunuz katkı ve katılımınızdan dolayı teşekkür ederiz. Laboratuvarınıza sürveyans kapsamında İDT kontrolü / DKD / yerinde değerlendirme / bölgesel eğitim yapma yetkisi verilmiştir. Tarih İmza Daire Başkanı Adı-Soyadı Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanı
---	---

Kaynaklar

- 1 Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis-4th edition. WHO, 2009.
- 2 Tüberküloz Tanı ve Tedavi Rehberi. Sağlık Bakanlığı. Başak Ltd. Şti., Ankara, 2011.
<http://www.verem.org.tr/pdf/tum-kitap.pdf>

*"Duyduğumu unuturum,
Gördüğümü hatırlarım,
Yaptığımı anlarım."*

Çin atasözü

İletişim:

www.thsk.gov.tr
utrl@thsk.gov.tr
0 312 565 5620

