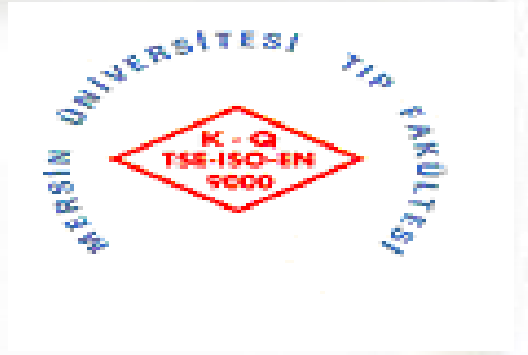




Klinik Mikrobiyolojide Bu Yıl Makalalar II

Prof. Dr. Gönül ASLAN

Mersin Üniversitesi

Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

- 
- 
- Hızlı, ucuz tanıya yönelik yeni sistemler geliştirilmesi
 - Klasik tanı yöntemlerinin öneminin vurgulanması
 - Nadir görülen bir olgu

Development of Low-Cost Inverted Microscope to Detect Early Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in MODS Culture

Mirko Zimic^{1*}, Abner Velazco², Germán Comina², Jorge Coronel¹, Patricia Fuentes¹, Carmen G. Luna¹, Patricia Sheen¹, Robert H. Gilman^{1,3,4}, David A. J. Moore^{1,3,4,5}

MODS kültürde *Mycobacterium tuberculosis*' in erken üremesini tespit etmede düşük maliyetli invert mikroskobun gelişimi



- Son yıllarda sıvı besiyerinde *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) kolonilerinin erken dönemde mikroskopik tespitine dayalı "**Microscopik Observation Drug Susceptibility**" (**MODS**) yöntemine, büyük ilgi vardır.

MODS hızlı, duyarlı ve ucuz

- MODS yöntemi ile örnekler antibiyotik içeren ve içermeyen doku kültür pleytlerindeki (24 kuyucuklu) sıvı kültür besiyerlerine eş zamanlı olarak inokule edilerek, kültür ve ilaç duyarlılık testi tek yöntemde aynı anda gerçekleştirilmektedir.
- MTB'nin karakteristik kord üremesinin gösterilmesinde invert ışık mikroskopundan yararlanmaktadır.



MODS (avantajları)

- İnoküle edilen balgam örneğinden kültür ve ilaç duyarlılık testi eş zamanlı yapabilmekte,
- Geleneksel ilaç duyarlılık testine göre hızlı ve biyolojik tehlike daha az ,
- TB ve çoklu ilaç dirençli TB'un doğru ve hızlı tanısında ucuz **[bir örnek için üç dolardan daha az maliyete sahip]**

MODS (dezavantajları)

- MODS yöntemini uygulamak (sıvı besiyerine süspanse edilen mikrokolonileri değişik zamanlarda mikroskopik incelemek) halen yoğun emek gerektirmesi
- Yüzen kolonilerin karakteristik kord üremesinin morfolojik olarak tanımlanması eğitilmiş kişiler gerektirmesi



İnvert Mikroskopların rutin laboratuvarlarda kullanımı kısıtlı

Üst sınıf bir model için ortalama maliyet 5.000 \$

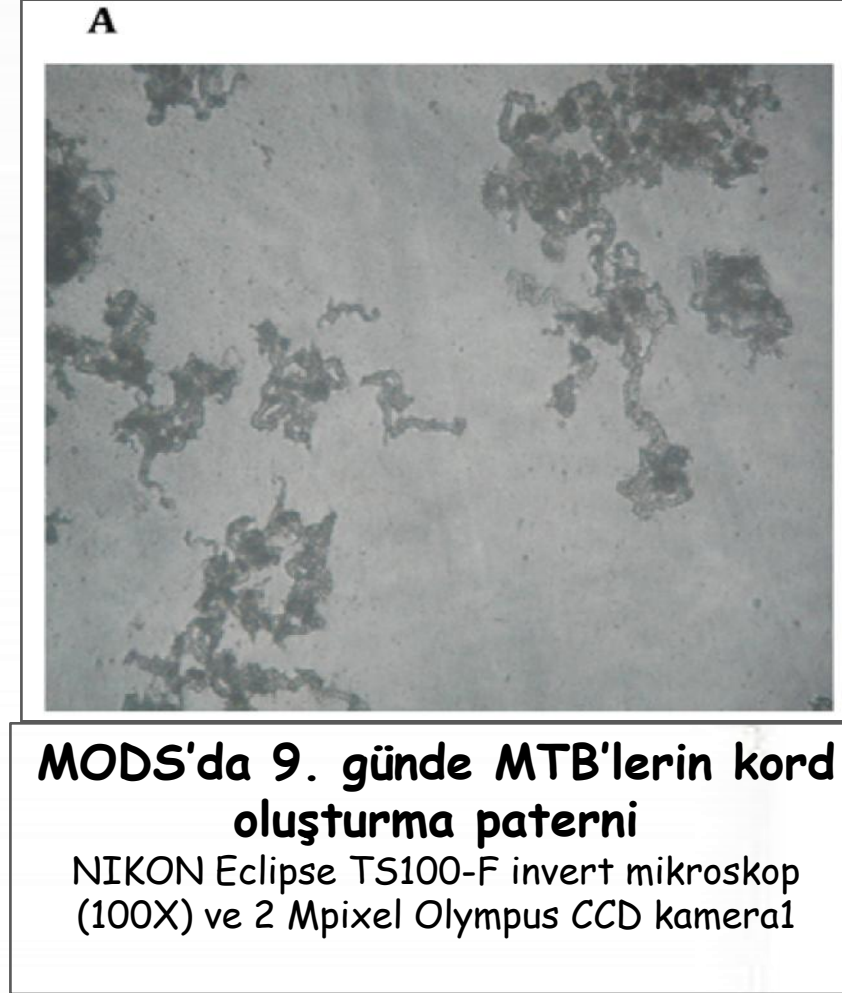


AMAÇ

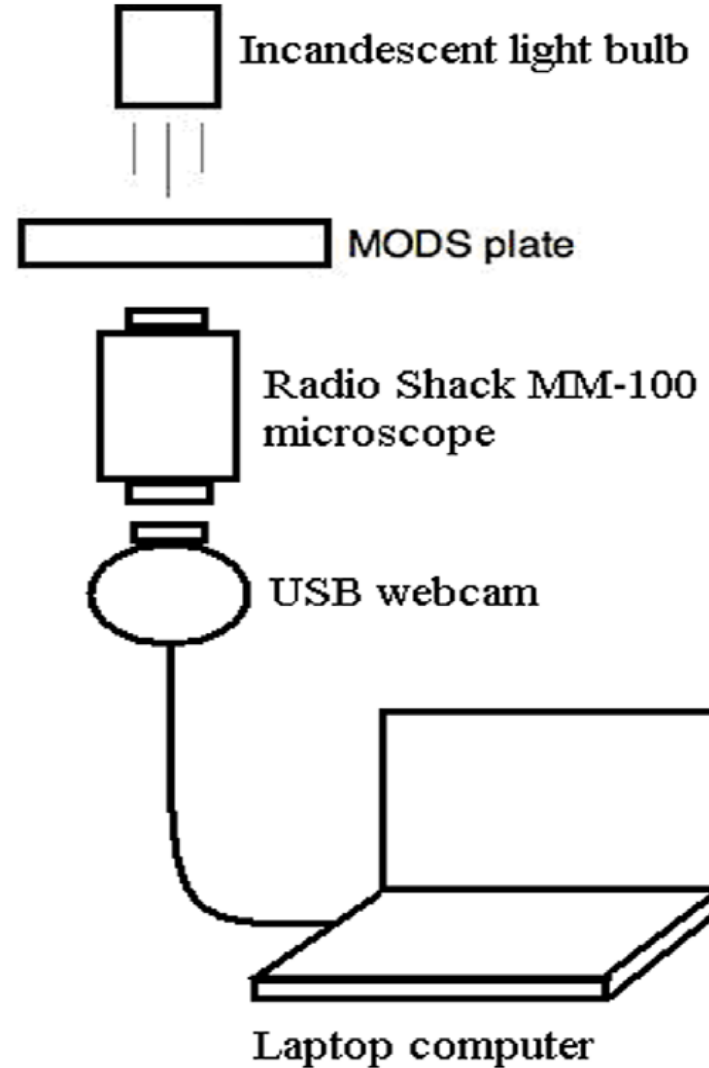
- Bu çalışmada MODS testinde invert ışık mikroskobuna alternatif hem **lokal** hem de **uzak merkezlerden** MTB tanımlamasını sağlayan entegre, **efektif, düşük maliyetli** bir sistemin dizaynı ve geliştirilmesi amaçlanmıştır.

YÖNTEM

- MODS pleytleri invert ışık mikroskopunda değerlendirilip (NIKON Eclipse TS100-F sınırsız ayarlama optik sistemi ile)
- Görüntülerin dijitalizasyonunun yapılabildiği yerlerde mikroskoba takılı 4 megapiksel çözünürlüğe sahip bir CCD kamera (Olympus C-3030) kullanarak elde edilen fotomikrograf, elektronik iletimle uzaktan tanımlanabilmektedir



Prototip1 şematik diyagram



Büyütücü ve dijital kamera prototipi'nin laptop ile bağlantısı

Prototip2

MODS pleyti objektifin üstüne yerleştirilmekte ve fokuslama mekanik olarak yapılmakta.

İkinci jenerasyon invert mikroskop

100X büyütücü

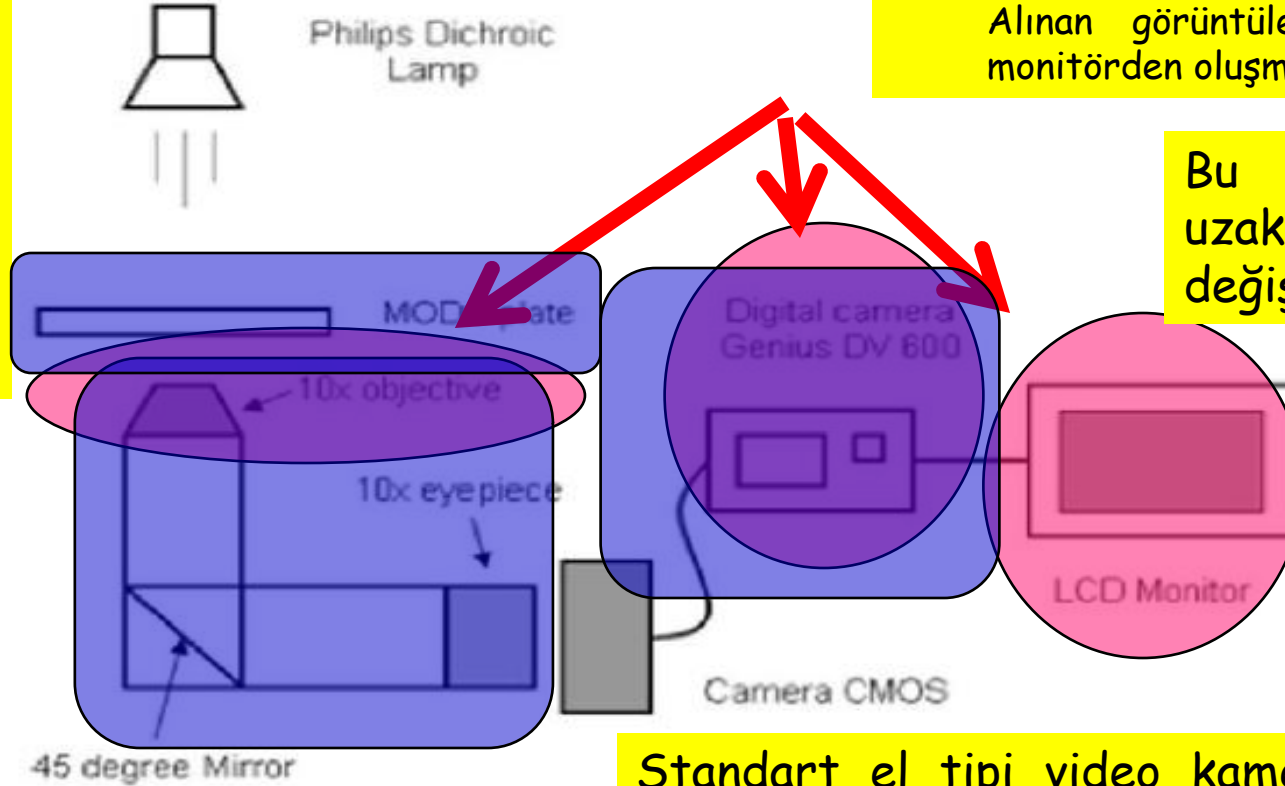
Hafıza kartı ve TV çıkışı bulunan dijital kamera

Alınan görüntüleri gösterebilen 5 inç'lik LCD monitörden oluşmaktadır.

Büyütücü

L şeklinde alüminyum optik tabanla desteklenmiş 10X objektif ve 10X ocular lensden oluşmaktadır (standart DIN seti)

Tabana 45°'lik ayna ile eklenmiş



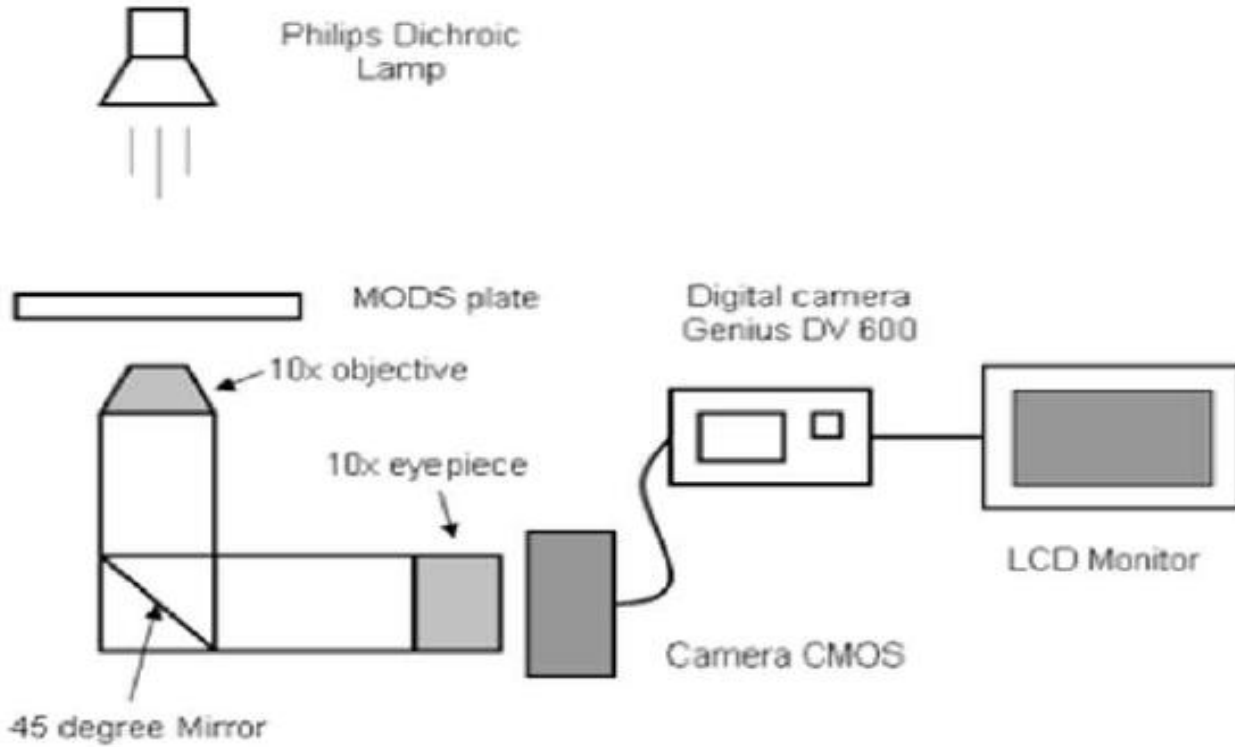
Bu aşamada objektifin lense uzaklığı pleyt destek kısmının değiştirilmesiyle ayarlanmaktadır.

Standart el tipi video kamera (Genius DV600, 2048x1536 piksel) bu prototip için modifiye edilmiştir.



A

Prototip2'nin şematik diyagramı



B

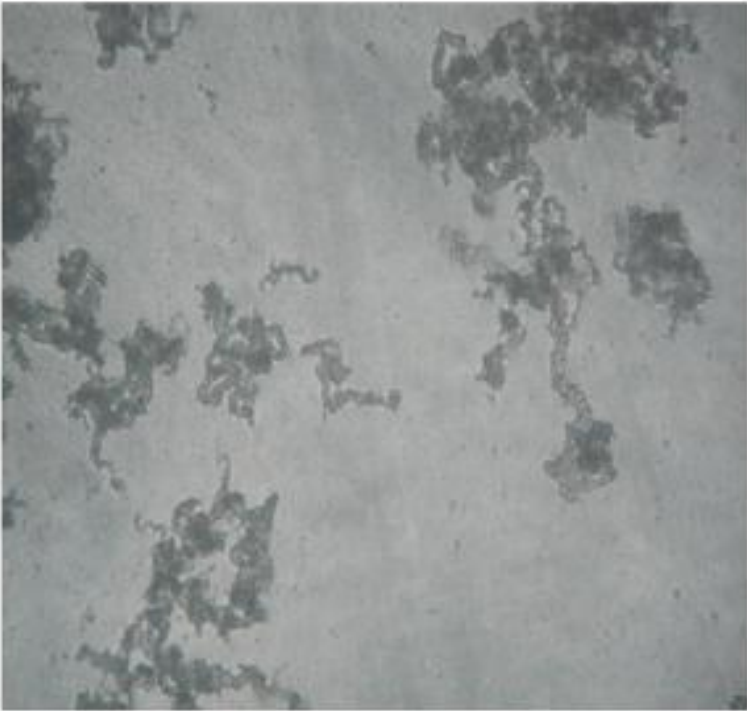
- Aydınlatma pleytten 170 mm uzağa yerleştirilen 12V, 50 W Philips halogen dikromik lamba (2\$) ile sağlanmış.



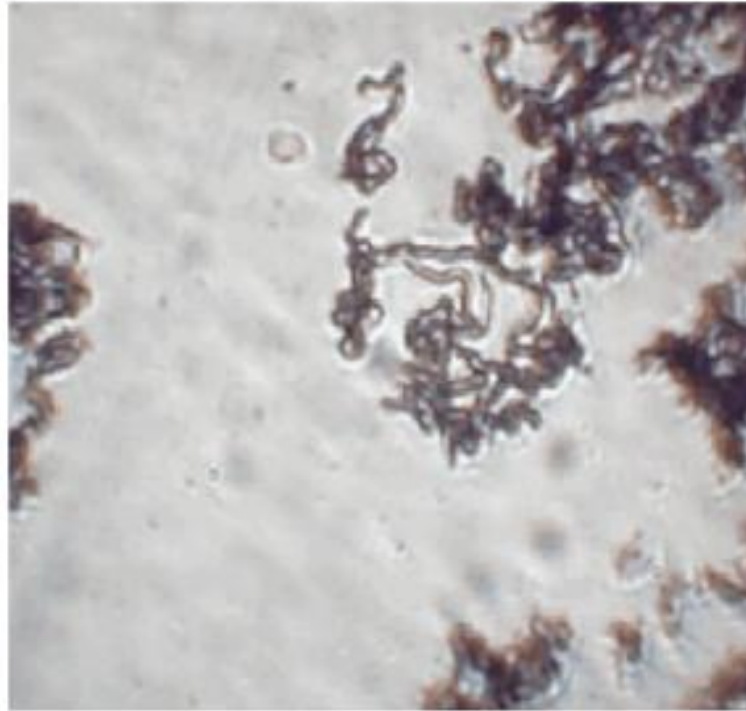
- Bu prototip hem standart hem de dijital değerlendirme
- Standart okumada, teknisyen göz merceği yoluyla doğrudan gözlemlenmekte
- Dijital okuma uzak bir bölgeye, elde edilen dijital görüntünün aktarılmasıyla uzaktan veya LCD ekranın izlenmesiyle yapılmaktadır
- Bu sistemin maliyeti ticari son sistem bir invert mikroskopun maliyetinin onda birinden daha az olarak belirtilmiştir.



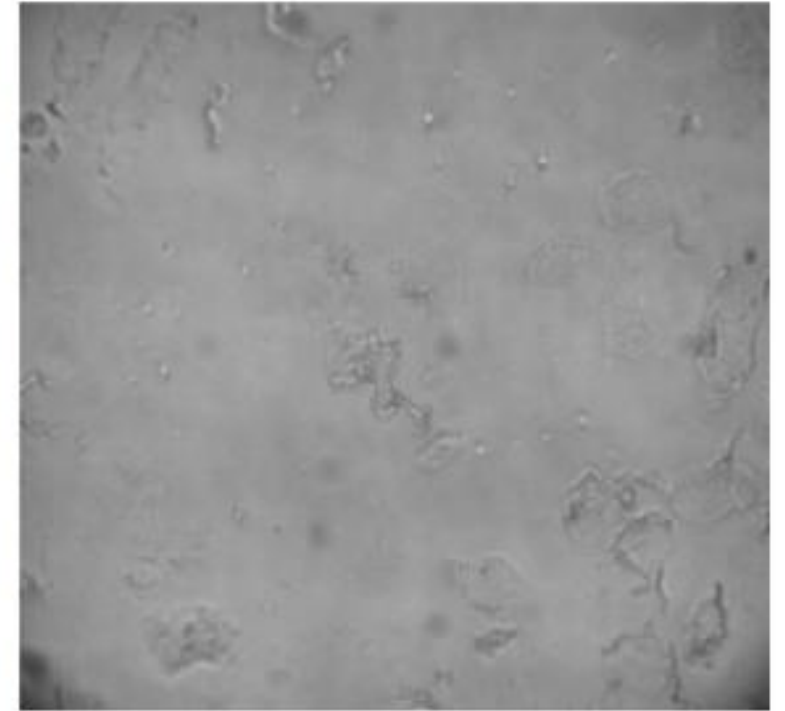
A



B



C



NIKON Eclipse TS100-F inverted
microscope (100X) and a 2 Mpixels
Olympus CCD camera1(9.gün)

Prototip1 (14. gün)

Prototip2 (9. gün)

TB tanısında Manuel/Dijital prototip2 sisteminin performansı

- Manuel 118 adet 9 günlük MODS kültürü okunarak (MTB var veya yok)
- Dijital 153 adet 9 günlük MODS kültürlerinin okunması
- Bütün örnekler 4 saat içerisinde aynı teknisyen tarafından prototip2 ve Nikon mikroskobu kullanılarak körlemesine 2 kez okunmuş.
- İkinci bir teknisyen aynı gün sadece Nikon mikroskobu kullanarak bütün örnekleri okumuş.

Uzaktan TB tanısı için prototip2 sisteminin performansı

- 30 adet 9 günlük MODS kültürü okunmuş ve dijital maksimum çözünürlükte (3MP) elde edilen görüntüler kart okuyucusuna bir bilgisayar kullanılarak aktarılıp karşılaştırılmış.
- Aynı teknisyenin zum ve kontrast ayarları ile gerçek bir görüntü görüntülemesi için bir yazılım kullanılarak görüntüler analiz edilmiş.

TB tanısı için prototip2 sisteminin performansı

SONUÇLAR

		Aynı teknisyenin iki okuma arası uyumu	İki farklı teknisyenin okumaları arası uyum
Manuel 9 günlük 118 MODS kültür	Nikon		%98.3
	Prototip2/Nikon	%96.6	
Dijital 9 günlük 153 MODS kültür	Nikon		%93.5
	Prototip2/Nikon	%94.1	
Uzaktan Prototip2 9 günlük 30 MODS kültür		%100	



TARTIŞMA

- Bu çalışma dijitalize MODS kültür görüntüleriyle uzaktan TB tele-tanısında prototip2'nin pahalı ekipmanlar yerine kullanılabileceğini göstermektedir
 - Bu deneylerde prototip2 invert mikroskop görüntüleri karşılaştırılarak yüksek düzeyde uyumlu oldukları gözlemlenmiştir (%94-96).
- Böyle bir aletin fabrika üretimi, maliyetin daha da ucuza gelmesini sağlayacaktır.

Cord factor detection and macroscopic evaluation of mycobacterial colonies: an efficient combined screening test for the presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex on solid media*, **

Detecção do fator corda e avaliação do aspecto macroscópico das colônias de micobactérias: um eficiente teste de triagem combinado para a identificação presuntiva do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em meios sólidos

Fernanda Cristina dos Santos Simeão, Erica Chimara, Rosângela Siqueira Oliveira, Jonas Umeoka Yamauchi, Fábio Oliveira Latrilha, Maria Alice da Silva Telles

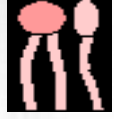
J Bras Pneumol 2010 ; 35(12) 1212-1216

Kord faktörün saptanması ve mikobakteri kolonilerinin makroskopik olarak belirlenmesi: katı besiyerinde *Mycobacterium tuberculosis* kompleksinin tiplendirilmesi için etkili kombine tarama testi

- 
- *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi (MTC) ve tüberküloz dışı mikobakterileri (NTM) birbirinden hızlı bir şekilde ayırımı:
 - klinikte doğru tedavinin uygulanması açısından önemlidir.
 - MTC'in tiplendirilmesinde kullanılan konvansiyonel yöntemler zaman alıcı, moleküler yöntemlerin ise maliyeti yüksek



Mikolik asit



Açıl lipid



Arabinogalaktan



Lipid tabaka



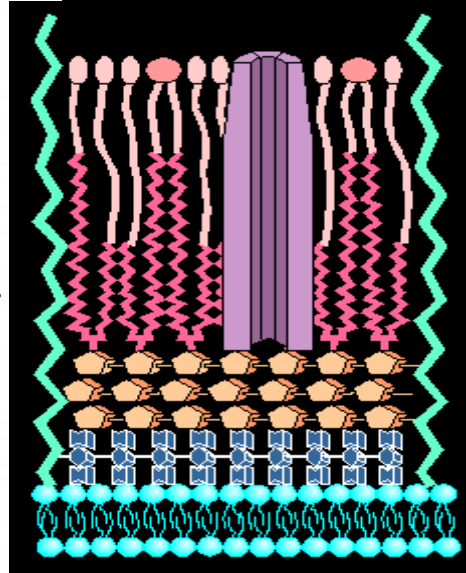
Pepdoglikan tabaka



Lipid + LPS



Porlar



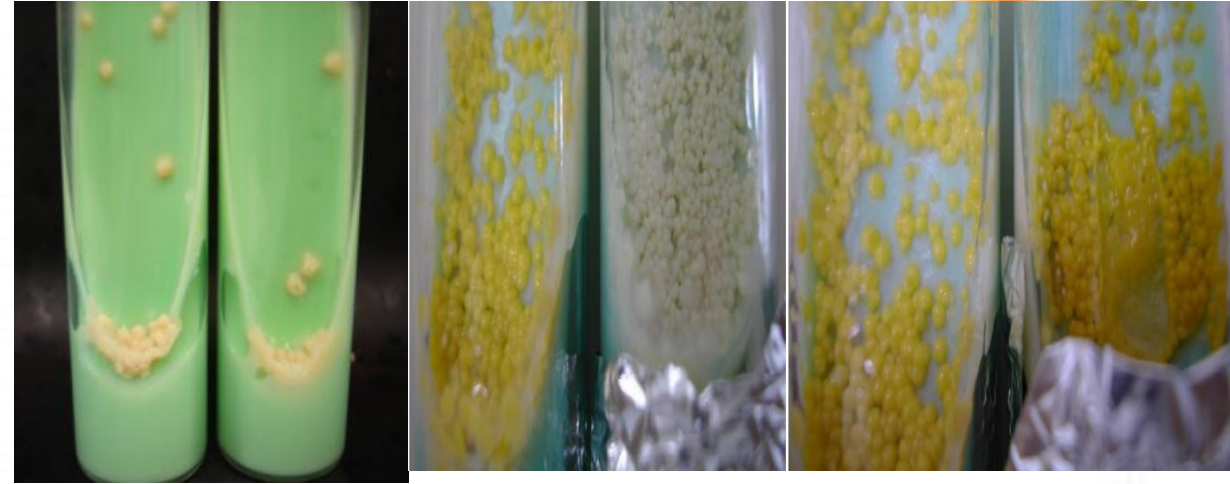
Kord faktörü [6-6'-dimikolat-a-D-trehaloz] bir glikolipiddir ve mikolik asidler trehaloz gibi şekerlere bağlanarak kord faktör oluştururlar.

MTC'inde yer alan virulan suşlar sıvı besiyerinde karakteristik olarak ip veya demet şeklinde yılankavi kord (serpentine cord) oluşturarak ürerler.

MTC türlerinde kord faktör oluşumu görülürken ve NTM türlerin çoğu kord oluşturmadığı için tanıda bu özellikten yararlanılmaktadır

Katı besiyerinde Mikobakteri kolonilerinin koloni morfolojileri türlerin karakterize edilmesinde yardımcıdır.

- Katı besiyerinde MTC kolonileri
 - karnabahar
 - ekmek kırıntısı,
 - kuru,
 - nonkromojenik ve sarımtırak bej renkteyken
- NTM kolonileri
 - düzgün ve nemli görünümde dirler





AMAÇ

- Polimeraz zincir reaksiyonu- restriksiyon enzim analiz yöntemi (PZR+RFLF) altın standart yöntem olarak kabul edilerek
- Koloni morfolojisi ve kord faktör oluşumunun birlikte değerlendirildiği tarama testinin MTC tanımlanmasında tanısal performansının araştırılması amaçlanmıştır.

YÖNTEM

- Bu çalışma Brezilya, Adolfo Lutz Enstitüsü, Mikobakteriyoloji Referans Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.
- 2-17 Nisan 2007 tarihleri arasında, laboratuvara gelen örnekler değerlendirilmiş, duyarlılık testi ve tiplendirmeleri yapılmıştır.
- Kord faktör varlığı Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyama yöntemi ile araştırılmıştır.





- Kültürü yapılan su ların makroskopik incelemesi farklı bir kişi tarafından yapılmıştır.
- Her iki çalışan da altın standart çalışması sonucunu bilmemekte olup körlemesine değerlendirme yapılmıştır.
- PZR-RFLF yöntemi, tiplendirmede altın standart olarak kullanılmıştır.
- Bu moleküler yöntemde 441 baz çiftlik hsp65 ısı  ok geni  o altılıp, BstEII ve HaeIII restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir.

SONUÇLAR

	PZR-RFLP		Duyarlılık	Özgüllük	Doğruluk
	MTC	NTM	%	%	%
Kord					
MTC	106	3 (YP)	96.4	92.9	95.4
NTM	4 (YN)	39			
Kord+Koloni					
MTC	110	1	100	97.6	99.3
NTM	-	41			
TOPLAM	110	42			152



TARTIŞMA

- Kombine tarama testinin (kord faktör ve koloni morfolojisinin birkilte değerlendirilmesi) **MTC'i** NTM'den ayırt etmede %100 duyarlı
- Kord faktör tek başına %95.4 doğruluğa sahip,
- Kombine tarama testi kullanıldığında ise doğruluk oranı %99.3 ulaşmakta
- Bazı NTM kord oluşturmaları nedeniyle oluşan YP ler kombine tarama testi ile giderilebilmekte



- Çalışma dahil edilen 152 suştan 7'sinde kord fakt. identifikasyonu ile uyumsuz sonuçlar ortaya çıkmıştır
[4YN ve 3YP]
- Bu suşlardan 6'sının değerlendirmesi koloni morfolojisine dayanılarak yapılmıştır.
- Kombine tarama testi ile YP olarak değerlendirilen bir suş ise PZR-RFLP ile *M.peregrinum* olarak tiplendirilmiştir



- Katı besiyerindeki kültür koşulları, morfolojik görünüme göre mikobakterilerin doğru sınıflandırılmasını etkileyebilmektedir

- Suyla doymuş besiyerinde, pürüklü koloniler; düzgün
- Kuru besiyerinde düzgün koloniler; pürüklü görünüme sahip olabilmektedir

(By hazırlama, kültür ve inkübasyon şartlarındaki standartların önemi, kalite kontrolü yapılması zorunluluğu)

- Biyokimyasal tiplendirme; karmaşık ve uygulaması zor olduğundan referans lab.da uygulanmakta
- Bir çok gelişmiş ülkede moleküler yöntemler mikobakteri identifikasyonunda, altın standart olarak kullanılmaktadır.

	Kord	PZR-RFLP
Maliyet	0.25 \$	7 \$
Süre	2 gün	4 gün
Teknisyen Eğitimi	Kolay ucuz	Zor ve pahalı
Lab. ekipmanı	Mikroskop	Gelişmiş pahalı lab.



Sınırlı kaynaklara sahip, moleküler ve biyokimyasal yöntemler için laboratuvar ekipmanları yetersiz olan ülkelerde MTC suşlarını NTM'lerden ayırmak için;

- Kombine tarama testinin kullanılabileceği
 - Testin %100 duyarlılığa, %99.3 doğruluğa sahip olduğu belirtilmektedir.
- 

A rare tuberculosis form: congenital tuberculosis

Erdal PEKER¹, Erol BOZDOĞAN², Murat DOĞAN³

¹ Department of Children Health and Diseases, Faculty of Medicine, Mustafa Kemal University, Antakya, Turkey,

² Department of Radiology, Antakya State Hospital, Antakya, Turkey,

³ Department of Microbiology, Antakya State Hospital, Antakya, Turkey.

Congenital tuberculosis is defined as infection developing as a result of the encounter between the infant and Mycobacterium tuberculosis bacilli during the intrauterine period or during normal birth. Although tuberculosis infection is very common all over the world congenital tuberculosis cases are rare and mortalities of 50% have been reported. Non-specific symptoms in congenital tuberculosis and difficulties encountered in the diagnosis of tuberculosis in general, make it difficult to reach a final diagnosis. Cases of congenital tuberculosis are generally known clinically during the first post-natal month. This case is important as the three-month infant was presented with pneumonia symptoms and diagnosed as congenital tuberculosis after an attentive anamnesis which is unusual during three postnatal months. To our knowledge, this case is one of a few cases in the literature diagnosed as congenital tuberculosis in three months. Our case emphasizes that it is necessary to consider congenital tuberculosis in the differential diagnosis of pulmonary infections in infants, particularly in countries where the incidence of tuberculosis is high. For this reason, we believe that a successfully obtained anamnesis is the parameter which provides a valid diagnosis. Furthermore, early and speedy initiation of treatment in cases with a potential diagnosis of tuberculosis is a very important factor that affects prognosis.

Key Words: Congenital tuberculosis, infant, infection, mortality.



- 3 aylık kız bebek
- Birinci ayından itibaren sebat eden öksürük ve 10 gündür karında şişlik şikayeti
- Beş gündür antibiyotik kullanıyor
- 24 yaşında anneden 38. hafta normal vajinal doğumla 3100gr ağırlığında



FM

- Genel durumu orta,
- Kilosu 5350gr (25-50 percentile), boyu 62cm (50-75 percentile),
- Baş çevresi 40cm (50 percentile),
- Solunum sayısı 52/dk subkostal ve interkostal çekilmeler var
- Hepatosplenomegali (KC 4cm, Dalak 2-3cm)
- BCG scarı yok



LABORATUVAR

Hb 9.2g/dl normositik ve normokromik anemi

BK 16.500/mm³ sola kayma

Trombosit 158-000/mm³

CRP 15.4mg/dl

Akc grafisinde pulmoner parankimde infiltrasyon

CT hepatosplenomegali, paraaortik lenf nodları, porta hepatis ve KC'de multiple hipodens alanlar

PPD (-)

Bronkopnömoni
Seftriakson+Eritromisin+Amikasin



Kan
İdrar
BOS

CMV
EBV
HIV
HSV
Toxoplasma
Syphilis

Açlık mide sıvısı
ARB
aranması



- Anb. tedavisinin 7. gün hastanın genel durumu kötüleşiyor, destek tedavisine rağmen 11. gün eks
- Postmortem KC biyopsisinde *M. tuberculosis* saptandı
- Aile taraması

Baba PPD (-), Akc grafisi normal

Anne PPD 27mm, Akc grafisinde kaviter lezyonları mevcut (tedavi başlandı)



- Konjenital Tüberküloz (KTB) infantlarda *M. tuberculosis* ile İU dönemde veya normal doğum sırasında karşılaşma sonucu oluşan infeksiyon tablosudur.
- KTB çok nadir görülür, %50 mortaliteye sahip
- KTB'un semptomları genelde nonspesifik olduğundan tanısı zordur
- Genellikle ilk ay içinde semp. başlar

KTB *M. tuberculosis* plasenta yoluyla veya infekte amnion sıvısının aspire edilmesi yoluyla bulaşır. Basil öncelikle bağırsağa sonra umblikal ven yoluyla KC yayılır

- (i) Annede TB varsa bebekte nonspesifik semp varsa
- (ii) Ateş ve hepatosplenomegali varsa
- (iii) TB'un endemik olduğu bölgede tedaviye cevapsız kötüleşen pnömoni varsa
- (iiii) BOS kültüründe bakteriyel patojen üretilemeyen, yüksek lenfositoz olan olgularda



Ülkemiz gibi TB'un endemik görüldüğü ülkelerde pnömoni yakınmaları ile gelen infantlarda KTB'un hatırdaki tutulması ve bu amaca uygun alınacak dikkatli ve ayrıntılı bir anamnezin tanı için hala en geçerli parametre olduğunun utulmamalıdır

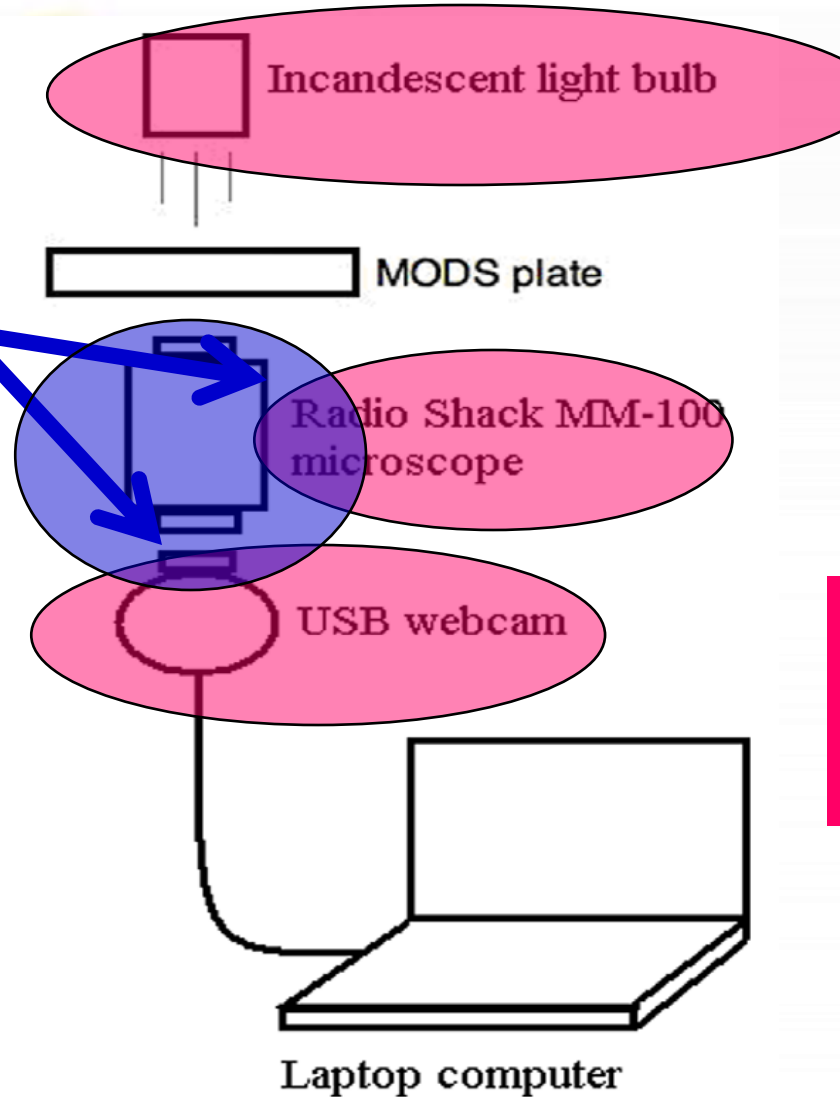


Prototip 1 şematik diyagram

İlk prototipte 60-100X büyütmeli mikroskop ve standart bir USB web kameradan oluşmuş olan basit bir sistem kullanılmıştır (Radioshack MM-100, 10\$)

Büyütme mikroskobu MODS pleytinin 5 mm altına dik bir pozisyonda sabitlenmiş.

Web kamera lensleri çıkartılmış ve web kameranın sensörü CMOS ve oküler arasında 15 mm aralık ile okülerine bağlanmış.



Örnek 0,5 W standart ışık ve basit kondansatör lensi ile yukarıdan aydınlatılmış

Web kamera USB portu yoluyla bir laptop'a bağlanmış.



İnvert mikroskopun geleneksel mikroskopik görüntülemeden iki önemli avantajı

- 1- Işık mikroskobu objektifinin (lamel/lama) çalışma mesafesi (WD) kısa invert mikroskopta WD odak mesafesi (kuyucukların dip kısmına kadar uzanabilmesi için) uzundur
- 2-Pleytlerin kapağındaki sıkışma kondansasyon sıvısı oluşumu ve besiyeri süpernatantlar ışık mikroskobu ile görmeyi engellerken alttan objektifli invert mikroskopta görülebilmektedir