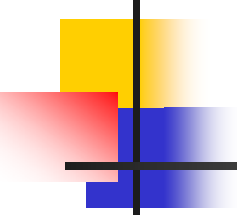


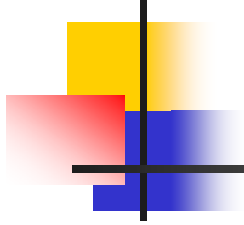
HEPATİT SEROLOJİSİNDE VE BAKTERİ İDENTİFİKASYONUNDA YENİLİKLER VE SORUNLAR

Uzm. Dr. Nur Efe İris
SB Okmeydanı EAH
İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji
Kliniği
30 Mart 2006/İstanbul

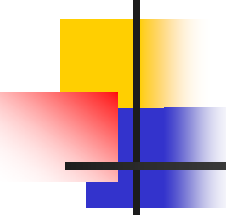


HEPATİT SEROLOJİSİNDE YENİLİKLER VE SORUNLAR

- Viral hepatitler, tüm dünyada ve Türkiye’de en önemli sağlık sorunlarından biridir.
- Yapılan araştırmalarla viral hepatitlerin tanısında son yıllarda önemli gelişmeler kaydedilmiştir.
- Hem serolojik yöntemler, hem de moleküler tanı yöntemlerinde önemli adımlar atılmıştır.

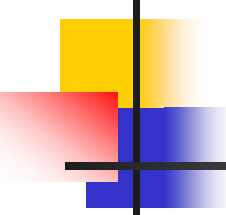


- Teknolojik ilerlemeye bağlı olarak hepatit tanısında kullanılan serolojik testlerin duyarlılık ve özgüllükleri artmıştır, ancak %100 doğruluk oranına ulaşamamıştır.
- Yanlış negatif, yanlış pozitif veya belirlenemeyen sonuçlar sorundur.



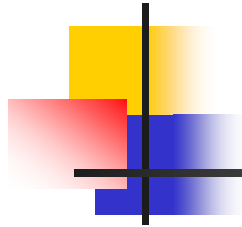
Hepatit A serolojisi

- Hepatit A infeksiyonlarının tanısı, ya virüs antijenlerinin, ya da HAV'a karşı oluşan spesifik antikorların gösterilmesi ile konur.
- HAV infeksiyonlarının tanısında ilk olarak İmmunelektron mikroskobi yöntemi kullanılmış, ancak pahalı, zaman alıcı olduğu ve deneyimli personel gerektirdiği için yerini yeni tekniklere bırakmıştır.



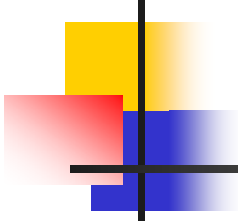
Hepatit A serolojisi

- Hücre kültüründe virüsün üretilmesi denenmiş ancak virüsün yavaş üremesi ve sitopatik etki oluşturmaması nedeniyle bu yöntem de tercih edilmemiştir.



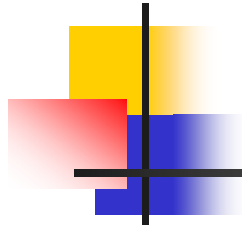
Hepatit A serolojisi

- Antijen saptamak amacıyla ilk olarak RIA yöntemi kullanılmış ve yerini ELISA yöntemine bırakmıştır.
- ELISA testlerinde peroksidaz veya alkali fosfataz kullanılarak antikor işaretlenir, sonuç spektrofotometrede okunur.



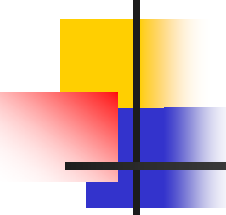
Hepatit A serolojisi

- NC-EIA testi: Nitrosellüloz (NC) membranının kullanıldığı bir ELISA yöntemidir.
 - 1 ng HAV proteinini(antijenini) saptayabilir; bu da $1,5 \times 10^4$ virüs proteinine karşılık gelir.
 - J Virol Methods.1990 May;28(2):155-63.



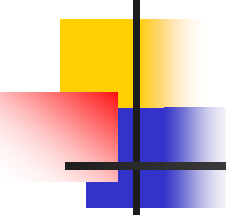
Hepatit A serolojisi

- Antikorların saptanması daha pratiktir.
- A hepatiti tanısında kullanılan ELISA kitleri çoğunlukla yapısal (VP1) proteinlere karşı oluşan antikorları tespit etmektedir.
- En yaygın kullanılanı katı fazı antikorla kaplı testlerdir.



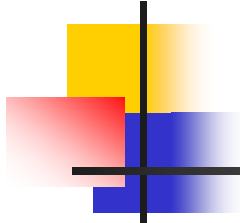
Hepatit A serolojisi

- Katı faz anti-insan Ig M ile kaplıdır.Eğer serumda HAV spesifik IgM varsa, HAV'a bağlanacak, sonuçta işaretli anti HAV konjugatı ile saptanabilecektir.
- Total anti HAV antikorlarını saptamak için genellikle yarışmalı bağlanma testleri kullanılır. Bu testler hasta serumunun katı faza bağlı antijene yapışmak için işaretli anti HAV antikoru ile yarışması temeline dayanır.



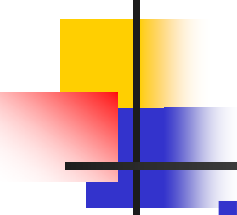
Hepatit A serolojisi

- Titrenin zamanla düşmesine karşılık Ig G antikorunun varlığı HAV infeksiyonuna karşı koruyuculuğu gösterir.
- Son zamanlarda geliştirilen ELISA testleri ile HAV proteinaz (protein 3C'ye) karşı oluşan antikorlar yıllarca serumda saptanabilmektedir.
 - Vaccine 2001 Apr 6;19(20-22):2878-83.
- Protein 3C'ye karşı oluşan antikorları saptayan testler doğal infeksiyon ile immünizasyon sonrası ortaya çıkan bağışıklığı ayırmada da kullanılır. Bu protein sadece doğal infeksiyon sırasında tespit edilir.
 - J Infect Dis 2000;176:593.



Hepatit A serolojisi

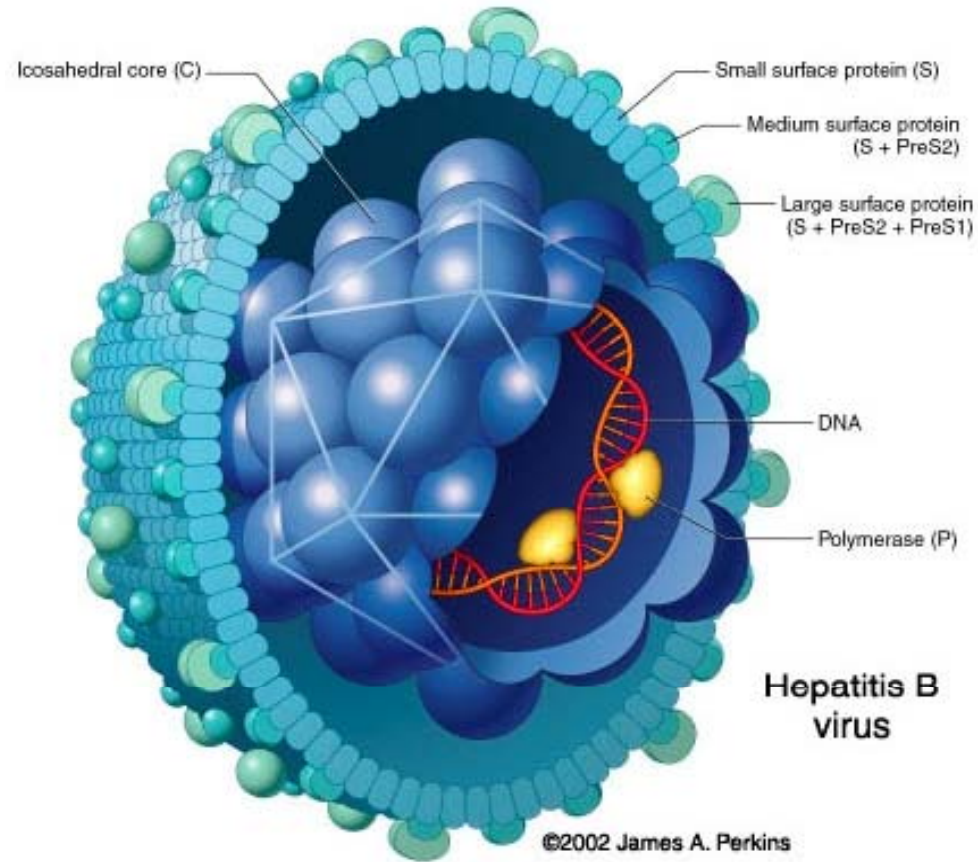
- Çocuklarda ve epidemiyolojik araştırmalarda tükrük örneklerinde HAV antikorlarını saptayan ELISA testleri geliştirilmiştir.
 - Manuel of Clinical Microbiology. ASM Press;1999:1014.
- Anti-HAV IgM antikorları 3-6 ay süreyle saptanabilmektedir.
- Uzamış veya alevlenen HAV infeksiyonlarında Anti HAV IgM antikorlarının kanda 12 ay kadar pozitif kalabildiği gösterilmiştir.

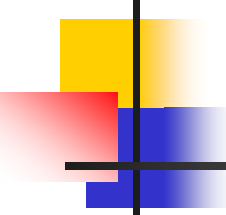


A hepatitinin serolojik tanısında yaşanan sorunlar

- Serolojik tanısında en az sorun yaşanan hepatit etkeni Hepatit A virüsüdür.
- Anti-HAV IgM başvuru anında negatif olabilir, test 1-2 hafta sonra tekrarlanmalıdır.
- Anti-HAV IgM çok nadiren yeni aşılanmış kişilerde de pozitif bulunabilir.
- Yalancı Anti-HAV IgM pozitifliğine rastlanmaktadır.(RF, ANA pozitifliği)
- Yalancı total anti-HAV pozitifliği görülebilir.(yakın zamanda yapılmış kan transfüzyonu, immünglobulin uygulaması, anneden bebeğe geçiş gibi antikorların pasif yolla transferi ile)
- Çok nadir olarak akut HBV enfeksiyonu sırasında anti-HAV IgM pozitifliğine rastlandığı bildirilmektedir.

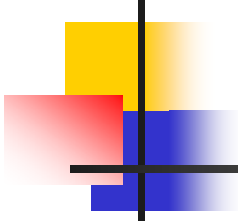
Hepatit B virüsü





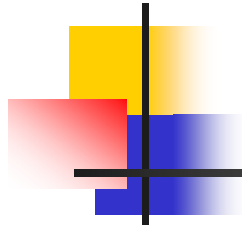
Hepatit B serolojisi

- Hepatit B infeksiyonunun tanısında hücre kültürü, hayvan modelleri, serolojik yöntemler, serolojik yöntemlerin yetersiz kaldığı durumda da moleküler yöntemler kullanılır.



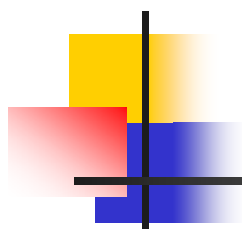
Hepatit B serolojisi

- Akut HBV infeksiyonunda serumda ilk serolojik gösterge olarak HBsAg ortaya çıkar, ve hepatitin klinik ve biyokimyasal olarak ortaya çıkmasından 2-8 hafta önce saptanabilir.
- HBV antijen ve antikor saptanmasında başlangıçta RIA yöntemleri kullanılırken günümüzde yerini ELISA testlerine bırakmıştır.

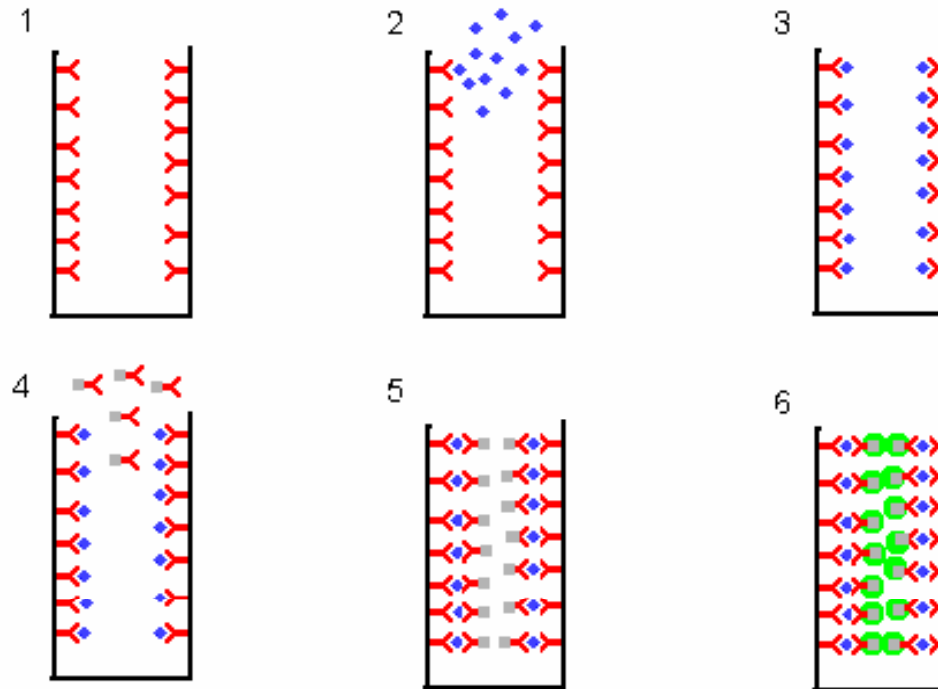


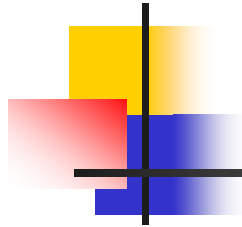
Hepatit B serolojisi

- Katı faz EIA testleri, sandviç ya da kompetitif bağlanma temeline dayanmaktadır.
- Daha sonra bazı testlerde mikropartiküller ve bunların farklı büyüklükte ve bileşimdeki geliştirilmiş şekilleri otomatik cihazlarda kullanılmaya başlanmıştır.



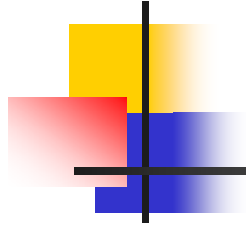
Sandviç ELISA Yöntemi





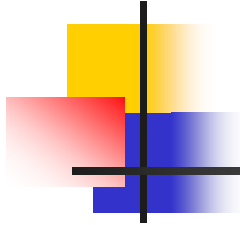
Hepatit B serolojisi

- Testlerdeki hayvan kökenli hiperimmün serum ve insan bağışık serumlarının yerini monoklonal antikorlar almıştır.
- Bazı testlerde doğal saflaştırılmış antijenler olarak rekombinan antijenler kullanılmaya başlanmıştır.



Hepatit B serolojisi

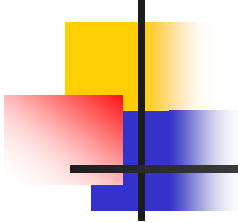
- Peroksidazla işaretli antijen ve antikörlerin saptanması ve kolorimetrik yöntemler günümüzde de kullanılmaktadır.



Hepatit B serolojisi

- Anti-biotin ile işaretli fluoressan saptama ve biotinlenmiş antijen ve antikörlerin kullanıldığı fluoressan polarizasyon yöntemleri de bulunmaktadır.

- J Virol Methods . 2004 Feb;115(2):217-22.

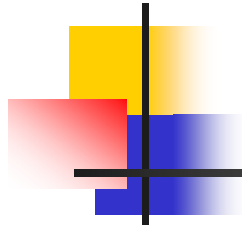


Hepatit B serolojisi

- En son geliştirilmiş kemilüminesans yöntemi de kullanılmaktadır.
- Kemilüminesans mikropartikül testi ile HBsAg'nin saptanması ve kantitasyonu yapılabilmektedir.
 - Bu testin duyarlılığı 0.2 ng/ml dir.
 - Hızlı
 - Çok sayıda örnekle çalışma avantajına sahip.
 - J Clin Microbiol 2004 Feb;42(2):610-7.

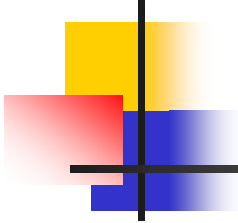
Hepatit B Serolojisinde kullanılan testlerin özellikleri

Serolojik testler	Yöntem	Kullanılan sistem	Absorblanmış reagen	Konjugat
HBsAg	Sandviç	Boncuk, kuyucuk, mikropartikül	Anti-HBs	Anti-HBs
HBeAg	Sandviç	Boncuk, kuyucuk	Anti-HBe	Anti-HBe
Anti-HBs	Sandviç	Boncuk, kuyucuk, mikropartikül	HBsAg	HBsAg
IgM anti-HBc	Sandviç	Boncuk, kuyucuk, mikropartikül,	Anti-IgM	Anti-HBc
Anti-HBc	Kompetitif bağl.	Boncuk, kuyucuk	HBcAg	Anti-HBc
Anti-HBe	Kompetitif bağl.	Boncuk, kuyucuk	Anti-HBe	Anti-HBe



Hepatit B serolojisi

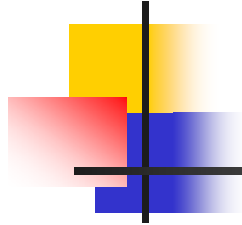
- Boncuk ya da mikrotitrasyonlu kuyucukların olduğu daha eski testler manuel veya yarı otomatik cihazlarda kullanılmaktadır.
- Mikropartiküller veya kuplar içeren daha yeni testler kısmen ya da tamamen otomatik cihazlarda kullanılmaktadır.



Hepatit B serolojisi

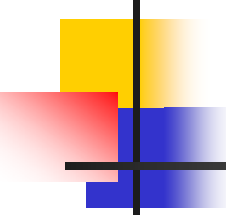
- HBsAg saptanmasında :
 1. Katı fazı fare monoklonal antikorları ile kaplı testler
 2. Katı faza bağlanan HBsAg'yi saptamak için enzim işaretli monoklonal ya da poliklonal anti-HBs antikorları içeren testler kullanılır.

Anti-HBs ,peroksidaz ile konjusedir ve bağlanan HBsAg spektrofotometrede kolorimetrik olarak ölçülür.



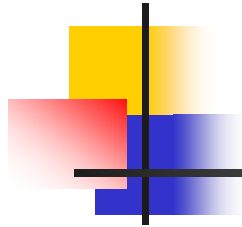
Hepatit B serolojisi

- Eşik değerin üzerindeki optik dansiteye sahip örnekler başlangıç olarak pozitif kabul edilirler.
- Pozitif örnekler, ayrı bir çalışmada çift örnekle tekrarlanmalıdır.
- Çift örnekten en az bir tanesi pozitif bulunursa örnek tekrarlayan pozitif kabul edilir.



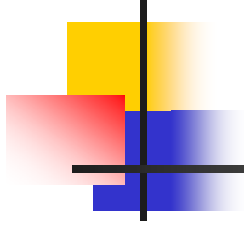
Hepatit B serolojisi

- HBsAg için tekrarlayan pozitif örnekler, reaktif örneği saptayan tarama testinin üreticisinin önerdiği doğrulama testi ile özgüllük yönünden test edilmelidir.
- Doğrulama testleri HBsAg'nin anti-HBs ile nötralizasyonu temeline dayanır.



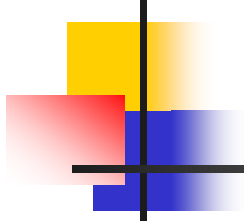
Anti-HBs testi:

- Anti-HBs testleri sandviç prensibinde katı faz testleridir.
 - Tüm anti-HBs testlerinde saflaştırılmış ve katı faza bağlı insan HBsAg'si bulunur.
 - Örnekte anti-HBs varsa katı fazdaki antijene bağlanır.

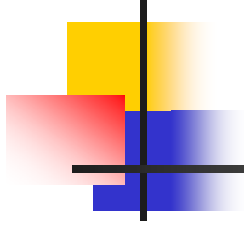


- Hepatit B aşısına yanıtın kantitatif testlerle kontrol edilmesi gerekir.
- WHO 10 mIU/ml Anti-HBs miktarını HBV için koruyucu kabul etmiştir.

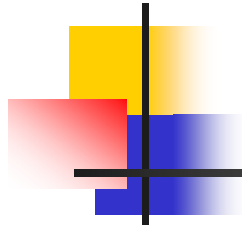
■ Hepatol 2003;38 Suppl 1:90-103.



- Kantitatif anti-HBs miktarı 2 yolla ölçülebilir:
 - 1. FDA onaylı anti-HBs kantitasyon paneli
(anti-HBs referans preparatı olarak 0, 15, 40, 75, 150 mIU/ml'lik 5 adet insan poliklonal anti-HBs antikor kullanılır.
Tüm örnekler aynı yöntemle test edildikten sonra sonuçlar kantitasyon panellerinden elde edilen standard eğri ile karşılaştırılır.
Anti-HBs saptama sınırı 1mIU/ml dir.

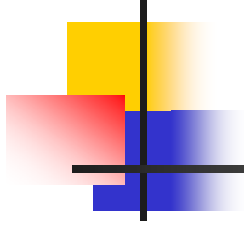


- 2. Kalitatif anti-HBs paneli:
 - HBsAg için antikor miktarı kalibre edilmiş ve 10 mIU/ml Anti-HBs miktarı 1.0 OD'ye ayarlanmıştır.
 - Sonuç $<0,50$ ise: negatif
 - $\geq 1,20$ ise: pozitif
 - $\geq 0,50$ ile $<1,20$ arasında ise indetermine olarak değerlendirilir.
 - FDA onaylı

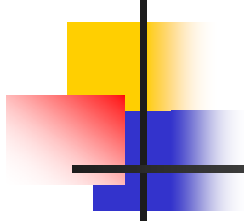


Anti-HBc saptanması

- Kompetitif bağlanma yöntemi daha çok kullanılır.
- Tüm testlerde rekombinan derive HBcAg kullanılır.
- Kompetitif testlerde anti-HBc, katı fazdaki HBcAg'ye tutunmak için peroksidaz ile işaretli anti-HBc ile yarışmaya girer.
- Anti-HBc içeren örnekler sinyal baskılanmasına neden olur, belirli bir seviyenin üzerindeki anti-HBc miktarı oranlanarak hesaplanır.

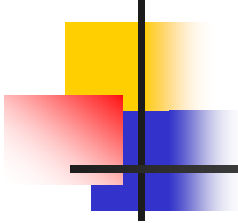


- Anti-HBc için başlangıç olarak pozitif örnekler bağımsız ikinci bir çalışmada çift örnekle tekrarlanır, çift örneklerden biri ya da ikisi de pozitif ise, örnek pozitif olarak değerlendirilir.



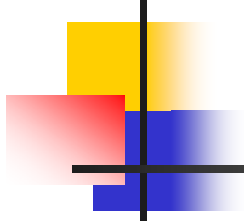
- Anti-HBc kitleri (FDA onaylı) kan donörlerinin araştırılmasında da kullanılır.

- J Clin Virol 2003;27:162-9.

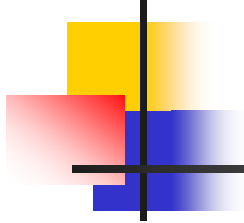


Anti-HBcIg M saptanması

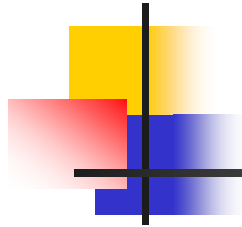
- Anti-insan IgM katı faza bağlanır ve hasta serumundaki Ig M sınıfı antikorları yakalamak için kullanılır.
- Daha sonra rekombinan HBcAg ilave edilir ve anti-HBcIgM'e bağlanır.
- Radyoaktif veya enzimle konjuge edilmiş anti-HBc eklenir ve HBcAg'ye bağlanır; böylece çok katlı sandviç tabaka oluşturulur.



- Anti-HBcIgM testleri için algoritma farklıdır.
- EIA'da eşik değerin üzerindeki değerler, eşik etrafındaki gri zonun altına düşmedikçe, tek bir test bile pozitif olarak kabul edilir.
 - Örnek gri zonda ise çift örnekle tekrar edilir, her 2 örnek gri zonun %10 üzerinde OD değerlerine sahipse pozitif kabul edilir.
 - Örnekler gri zonda kalırsa hastanın takibi önerilir.

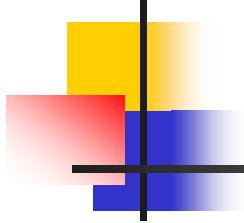


- HBV kor antijenini (HBcAg) saptayan yeni bir EIA testi kullanıma girmiştir.
- HBcAg konsantrasyonu, HBV düzeyi ile yakın uyum göstermekte ve konsantrasyon değişikliklerinde de paralellik devam etmektedir.
- HBV infeksiyonunun izlenmesinde basit bir yöntem olarak kullanılabileceği bildirilmiştir.
 - J Clin Microbiol. 2003 May; 41(5):1901-6.

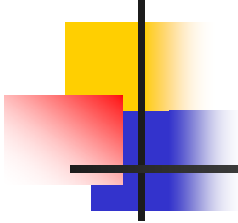


HBe Ag/Anti-HBe saptanması

- Hasta serumundaki HBeAg'nin katı fazda kaplandığı ve buna anti-HBe'nin bağlandığı direkt sandviç EIA yöntemi kullanılmaktadır.

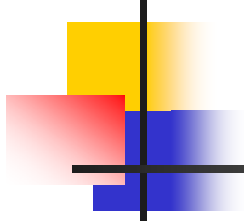


- HBeAg/ Anti-HBe testlerinin değerlendirilmesi: başlangıçta pozitif örnekler tekrar test edilir, tekrarlama da reaktif ise, örnek reaktif olarak değerlendirilir.
 - Eşik değerin %10 civarı gri zondur. Gri zonun üstündekiler pozitif, altındakiler negatif olarak değerlendirilir.
 - Gri zonda ise, çift örnekle test tekrarlanır.



Hepatit B serolojik tanısında sorunlar

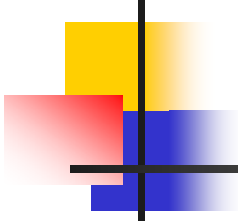
- HBsAg(-) donör kanlarında HBV DNA pozitifliği:
 - Japonya'da yapılan bir çalışmada HBsAg negatif 16 milyon kan donörü arasında 308 örnek HBV DNA pozitif bulunmuştur.
 - Dev Biol (Basel). 2002;108:29-39.



- Seronegatif HBV infeksiyonu olan kişilerde taşıyıcılık ve bulaştırıcılık olabilir.

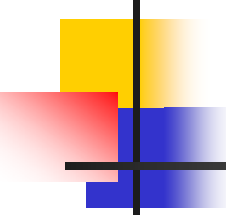
- HBV DNA taramasının önemi
- Kan bankaları için havuzlanmış plazma örneklerinde çalışmaya uygun ticari kitler bulunmaktadır.

- Transfusion Clinique et Biologique 2004;11:18-25.
- Transfusion Today 2006;66:28-30.



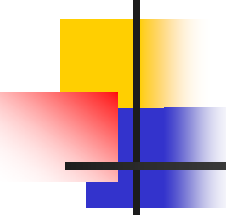
Uygunsuz serolojik profiller

- **Laboratuvar kaynaklı** (teknik hatalar, test duyarlılıkları ve özgüllüklerindeki sorunlar)
- **Etken virüsteki mutasyonlar** (mevcut testler ile mutant infeksiyonların saptanamamasına bağlı)
- **Konak faktörü:** Testleri yorumlarken immün yetmezlikli bireylerde antikor yanıtının zayıf olabileceği veya hiç oluşmayabileceği unutulmamalıdır.



HBsAg(-) HBV infeksiyonu:

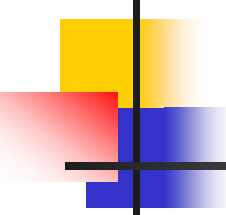
- HBV'nin tüm serolojik göstergelerinin negatif olduğu şahısların karaciğer ve serumlarında HBV DNA saptanmıştır.
- Kan transfüzyonlarında, hemodiyalizde, transplantasyonda alıcılar için bulaşma riski nedenidir.
 - Ulusal Uzlaşma Toplantı Metinleri, Ist. Medikal Yayıncılık, 2003:77-89.



İzole HBsAg pozitifliği

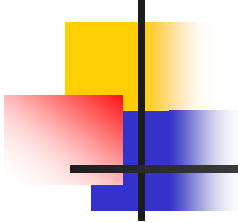
- İnfeksiyonun başlangıç döneminde anti-HBcIgM ve HBeAg'nin geç gelişimi (pencere dönemi)
- Anti-HBc cevabı geliştiremeyen kronik HBV infeksiyonu
- HBV tip 2 infeksiyonu?
- Perinatal olarak infekte olma
- Kontaminasyon
- Nedeni bulunamayan olgular

■ Enferm Infec Microbiol Clin. 2004;22:6-12.



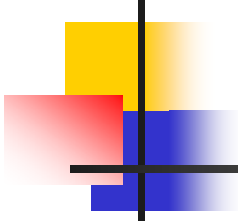
HBsAg ve anti-HBs'nin birlikte pozitifliği

- HBsAg'nin a determinantını kodlayan gen bölgesindeki mutasyonlar ile adwr ve adyr subtiplerinde birliktelikle ilişkili olabilir. (aynı anda farklı alt tiplerle infekte olan kişilerde görülebilir.)
 - Viral Hepatit Derg 1998;4:66.
- Kronik aktif hepatitli, hemodiyaliz uygulanan immün yanıtı bozuk kişilerde görülebilir.
 - Arch Med Res 2002;33:566-71.
- Hepatit göstergeleri bilinmeden hepatit B aşısı yapılan kronik HBV infeksiyonu olan kişilerde görülebilir.
 - J Viral Hepat 2002;9:146-8.



İzole anti-HBs pozitifliği

- Hepatit B aşısı uygulananlarda
- Hasta kanlarıyla sürekli temas eden, infeksiyöz olmayan viryonla tekrarlayan karşılaşmalarla
- Anneden bebeğe pasif transferle
- Test hataları

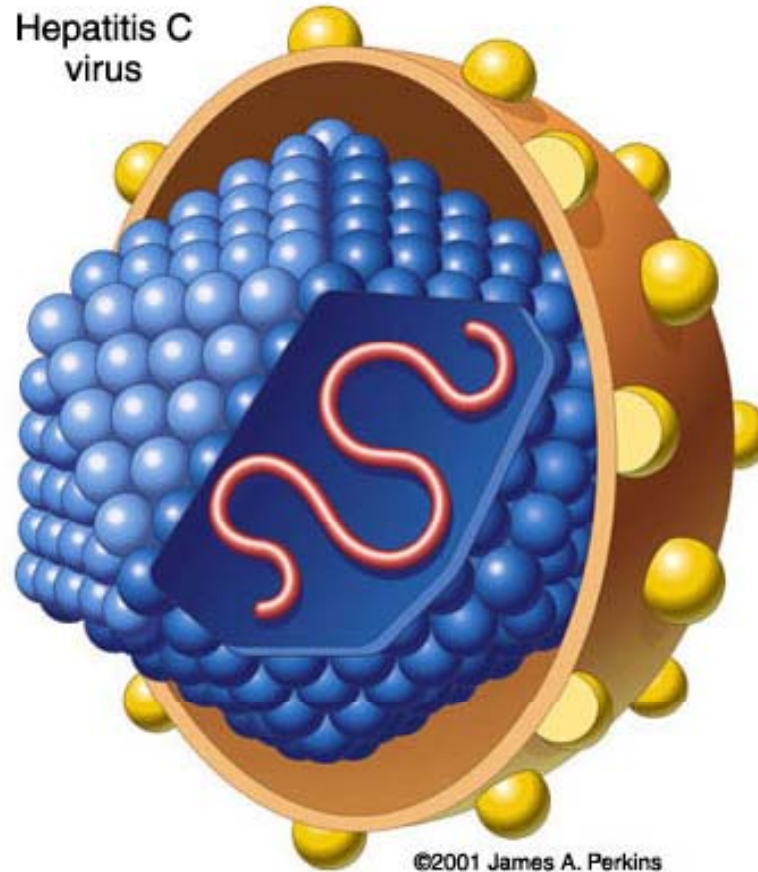


İzole anti-HBc pozitifliği

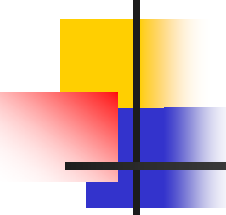
- Yalancı pozitiflikler (kronik HCV'li , HIV'li hastalarda poliklonal aktivasyona bağlı olarak)
- HBsAg mevcut yöntemlerle saptanamayacak kadar düşük düzeydedir.
 - Mutant kökenler de sorumlu olabilir.
 - J Clin Virol 2003;27:162-9.
- Anti-HBs yanıtı gelişmemesi (immün yetmezlik)
- Akut B hepatiti seyrinde görülen pencere döneminde görülebilir.

Hepatit C virüsü

Hepatitis C
virus

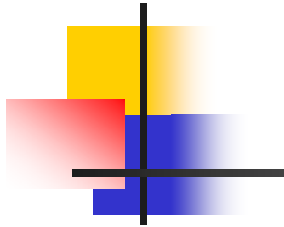


©2001 James A. Perkins

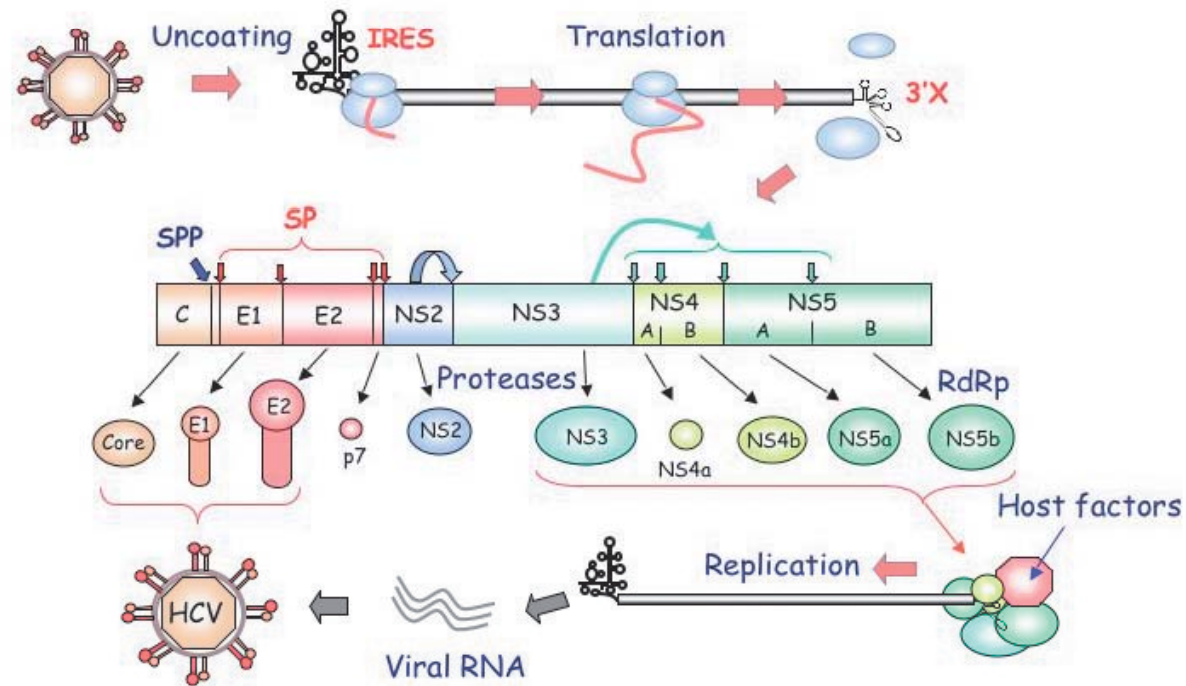


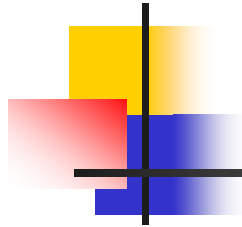
Hepatit C virüsü

- HCV, tüm viral hepatit etkenleri arasında serolojik tanısı en problemli olan virüstür.
- Virüsün komplike genomik yapısı sorumlu tutulmaktadır.
- HCV(core) antijenini saptayan testler, serokonversiyon öncesi dönemde moleküler testlere alternatif olarak geliştirilmiştir, ancak düşük viremi ile seyreden infeksiyonlarda oluşan immüno kompleksler tanısal değerini düşürmektedir.
 - Transfusion,2003;43:958-62.
- HCV infeksiyonlarının tanısı için kullanılan en pratik yöntem antikor aranmasıdır.



Translation and replication of HCV

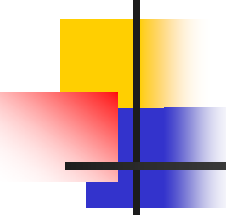




Hepatit C serolojisi

- 1. kuşak ELISA testleri: NS3 bölgesinin bir kısmı ile NS4 bölgesinin tamamını içeren, C-100-3 antijenine dayalı testler
 - Duyarlılık ve özgüllüğü düşük
 - Serokonversiyonu saptamada yetersiz

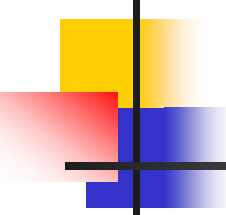
■ J Clin Microb. 1992 Aug;30(8):2145-9.



Hepatit C serolojisi

- 2. kuşak ELISA testleri: Kor (c 22-3) ve NS3 (c33c) bölgelerinden ek rekombinan proteinler içeren testler
 - Özgüllük ve duyarlılığı yüksek
 - Serokonversiyon süresi 16 haftadan 10 haftaya düşmüştür.

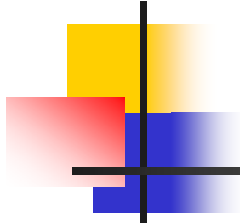
■ N Engl J Med. 1991 Nov 7;325(19):1325-9.



Hepatit C serolojisi

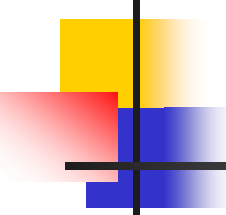
- 3. Kuşak ELISA testleri: Kor ve NS3 antijenleri yeniden düzenlenmiş ve NS5 bölgesine ait bir antijen de eklenmiştir.
 - Duyarlılık daha yüksek
 - Daha kısa sürede serokonversiyonu saptama olanağı (7-8 hafta)

■ Hepatol. 1995 Jul;23(1):103-5.



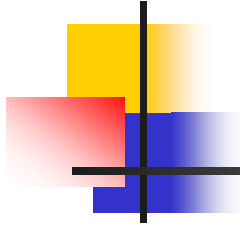
Doğrulama testleri

- RIBA testleri : Nonspesifik reaksiyonlara neden olan antikörleri da saptayabilirler.
 - RIBA 1
 - RIBA 2
 - Belirsiz sonuçlar
 - RIBA 3 : Kan bankalarında EIA 3 testine ilaveten kullanılır, daha az belirsiz sonuç verir.



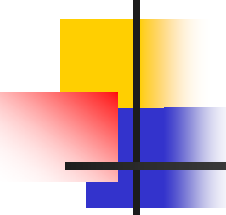
Doğrulama testleri

- Günümüzde RIBA testlerinin, kan donörleri gibi 'düşük riskli popülasyon' olarak tanımlanan gruplarda pozitif ELISA sonucunu desteklemek amacıyla kullanılması önerilmektedir.
- Risk gruplarında saptanan anti HCV pozitifliklerinin desteklenmesinde veya klinik ve biyokimyasal bulguları olan karaciğer hastalıklarının tanısında kullanımı önerilmemektedir.
 - CDC Guidelines for HCV. MMWR 2003 Vol 52/RR 3.



HCV serolojisi

- HCV infeksiyonunun tanısında kemilüminesans yöntemi de kullanılmaktadır.
 - Anti HCV için duyarlılık % 100, özgüllük % 98'dir.
- J Clin Microbiol. 2004 Feb;42(2):610-7.



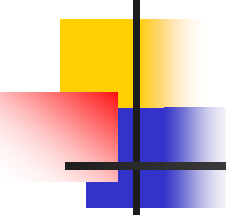
HCV infeksiyonlarının serolojik tanısında karşılaşılan sorunlar

- Yanlış negatif sonuçlar

- 1. Pencere dönemi: Antikor yanıtının henüz saptanamadığı dönemdir.

- 3. kuşak ELISA testleri ile bile 7-8 haftayı bulmaktadır.
 - Enfeksiyonun olup olmadığını söylemek için 3 ay geçmesi beklenmelidir.

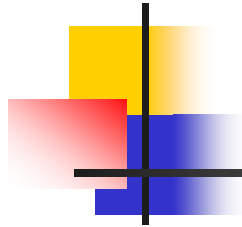
- MMWR 2003 Vol 52/RR 3.



HCV infeksiyonlarının serolojik tanısında karşılaşılan sorunlar

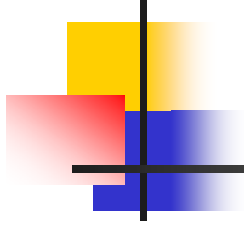
- Özel konak : İmmün yetmezlikli hasta grubunda yeterli antikor yanıtı sağlanamayabilir.
 - Hemodiyaliz hastaları
 - Transplant hastaları

■ Kidney Int 2003; 51:981-9.



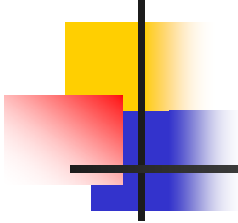
Laboratuvar açısından sorunlar

- Birbiri ile uyumsuz ELISA test sonuçları
- Sınıra yakın pozitif sonuçların değerlendirilmesi
- Pozitif ELISA sonuçlarının doğrulanmasında hangi testlerin kullanılacağına belirlenmesi



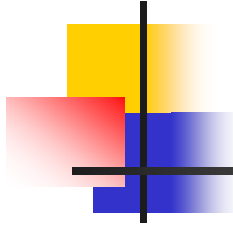
- Son yıllarda , HCV infeksiyonlarının tanısında yüksek risk gruplarının belirlenmesi ve test stratejilerinin buna göre oluşturulması görüşü benimsenmektedir.

- Risk grubunda olmayanlarda anti HCV oranı %2
- Hemodiyaliz hastalarında % 9,5
- CYBH kliniklerinde % 24,9
 - MMWR 2003 Vol 52/RR 3.



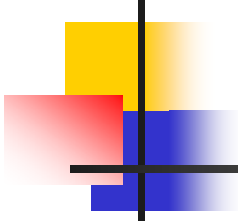
Hepatit D serolojisi

- HDV, HBV varlığında replikasyon gösteren defektif bir virüstür.
- HDV infeksiyonları 2 farklı klinik tabloda ortaya çıkmaktadır.
 - 1. Kronik HBV infeksiyonlarında ortaya çıkan HDV süperinfeksiyonları
 - 2. Akut HBV infeksiyonları sırasında görülen HDV koinfeksiyonları
 - Bu 2 klinik tablonun ayırımında en önemli gösterge anti-HBcIgM'dir.



Hepatit D virüsü

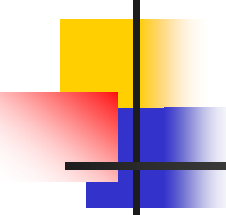
- Rutinde en sık kullanılan test total anti HDV'yi saptayan testlerdir.
- HDV infeksiyonlarının tanısında karşılaşılan bir sorun, antikoru semptomlar başladıktan 2-3 hafta sonra saptanabilmesidir.
 - Tüm göstergeleri negatif olan fulminan hepatitlerde intrahepatik HDV Ag'nin saptanması ile HDV koinfeksiyonu tanısı konabilmektedir.



Hepatit D serolojisi

- Koinfeksiyon sırasında HDV HBV'yi baskılayarak serumda HBsAg kaybına yol açabilmektedir.
 - Bu durumda tanı Anti-HBcIgM pozitifliği ile konmaktadır.

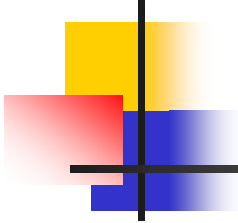
■ Postgraduate Medicine, 2001; 107:1-12.



Hepatit E virüsü

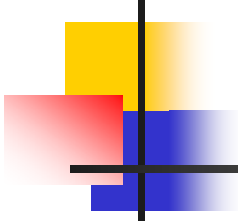
- Akut hepatit tablosu ile başvuran hastada HAV, HBV, HCV'nin ardından endemik bir bölgede ise HEV aranmalıdır.
- Serolojik tanı, anti-HEV Ig M'in saptanması ile konur.
- HEV'in yapısında bulunan ORF2, ORF3 veya her ikisinden de eksprese eden rekombinan antijenlerin kullanıldığı ticari kitler mevcuttur.
- Ig M pozitifliğinden 1-2 hafta sonra Ig G tipi antikorlar saptanmaya başlar, 14 yıldan daha uzun süre pozitif kalabilir.

■ J Clin Microbiol, 1997;35:1244-47.



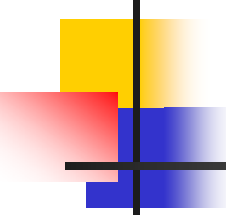
Hepatit E serolojisi

- HEV'in serolojik tanısında yanlış pozitifliklere rastlanabilmektedir.
- Homoseksüellerde ve damar içi ilaç bağımlılarında % 10-15 oranında yalancı pozitiflik oranları bildirilmektedir.
 - J Clin Microbiol, 1997;35:1244-47.



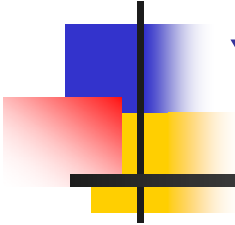
Hepatit G virüsü

- 1995'te tanımlanan bir virüs
- Transfüzyon sonrası kendi kendini sınırlayan akut hepatite neden olmaktadır.
- HGV'nin serolojik tanısında HGV'nin E2 proteinine karşı oluşan antikorlar ELISA yöntemi ile çalışılmaktadır, ancak özgüllüğü düşüktür.
 - Manual of Clin Microbiol. 2003;1495-1511.
- Posttransfüzyon HGV infeksiyonunda oluşan antikorları tespit edebilen ticari kit bulunmamaktadır.

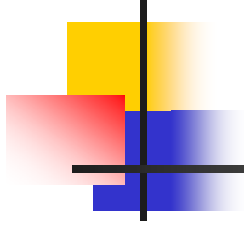


Sonuç:

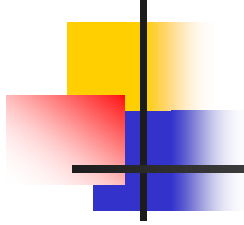
- Klinik örnekler uygun zaman ve koşullarda alınmalı, taşınmalı ve saklanmalı
- Duyarlılık ve özgüllük sorunları en aza indirilmiş kalite belgeli kitlerle çalışılmalı
- Olağan dışı bir sonuçla karşılaşıldığında test tekrarlanmalı ve klinik bilgiler eşliğinde değerlendirilmeli
- Gereğinde ileri moleküler analizlere başvurulmalıdır.



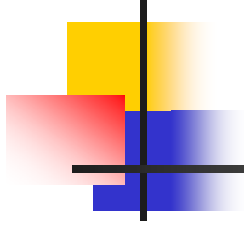
BAKTERİ İDENTİFİKASYONUNDA YENİLİKLER VE SORUNLAR



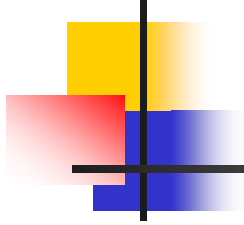
- Mikrobiyoloji laboratuvarı klinisyenin gönderdiği **uygun** (yer, zaman ve teknik açısından) örnekten olası etkeni izole etmeli ve tür düzeyinde tanımlamalıdır.
- Birçok bakterinin tür farklılıkları antibiyotiklere direnç özelliklerini önemli ölçüde değiştirir. Tedavi yaklaşımları ancak tür düzeyinde tanımlama ile yönlendirilebilir.



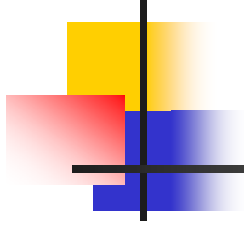
- Hastane infeksiyonu etkenlerinin epidemiyolojik açıdan değerlendirilebilmesi için de mutlaka tür düzeyinde identifikasyon yapılması gerekmektedir.



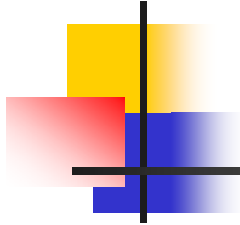
- Etkenler genellikle klasik yöntemlerle cins düzeyinde tanımlanabilirler; tür düzeyinde tanımlanma; özel besiyerleri ve özel yöntemler gerektirir, zaman alıcı, pahalı ve zordur.



- İdentifikasyonu daha pratik hale getirmek için bazı yarı otomatik ve otomatik identifikasyon sistemleri kullanıma girmiştir.
- 1970'li yılların başında yarı otomatik kan kültürü sistemleri
- 1980'li yıllarda bakteriüriyi saptayan sistemler
- 1990'lı yıllarda da hazır birleşik sistemlerle çalışan identifikasyon sistemleri kullanıma girmiştir.



- Klasik ve otomasyon yöntemlerinde ortak hedef; mikroorganizmaların identifikasyon ve duyarlılığının çabuk ve doğru bir şekilde yapılmasıdır.



İdentifikasyonda yenilikler

- Manuel identifikasyon sistemleri: Birçok biyokimyasal testin bir arada çalıştığı sistemlerdir.
 - Enterotube (ROCHE), API (bioMerieux), BBL-Crystal (BD)
 - Yarı ve tam otomatize bakteri tanımlama sistemleri bilgisayar teknolojisini de kullanırlar.
 - Sceptor (BD), Vitek 1 ve Vitek 2 (bioMerieux), Phoenix(BD), MicroScan (Dade Behring)

VITEK2



VITEK



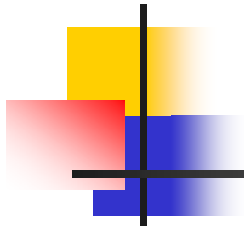
miniAPI

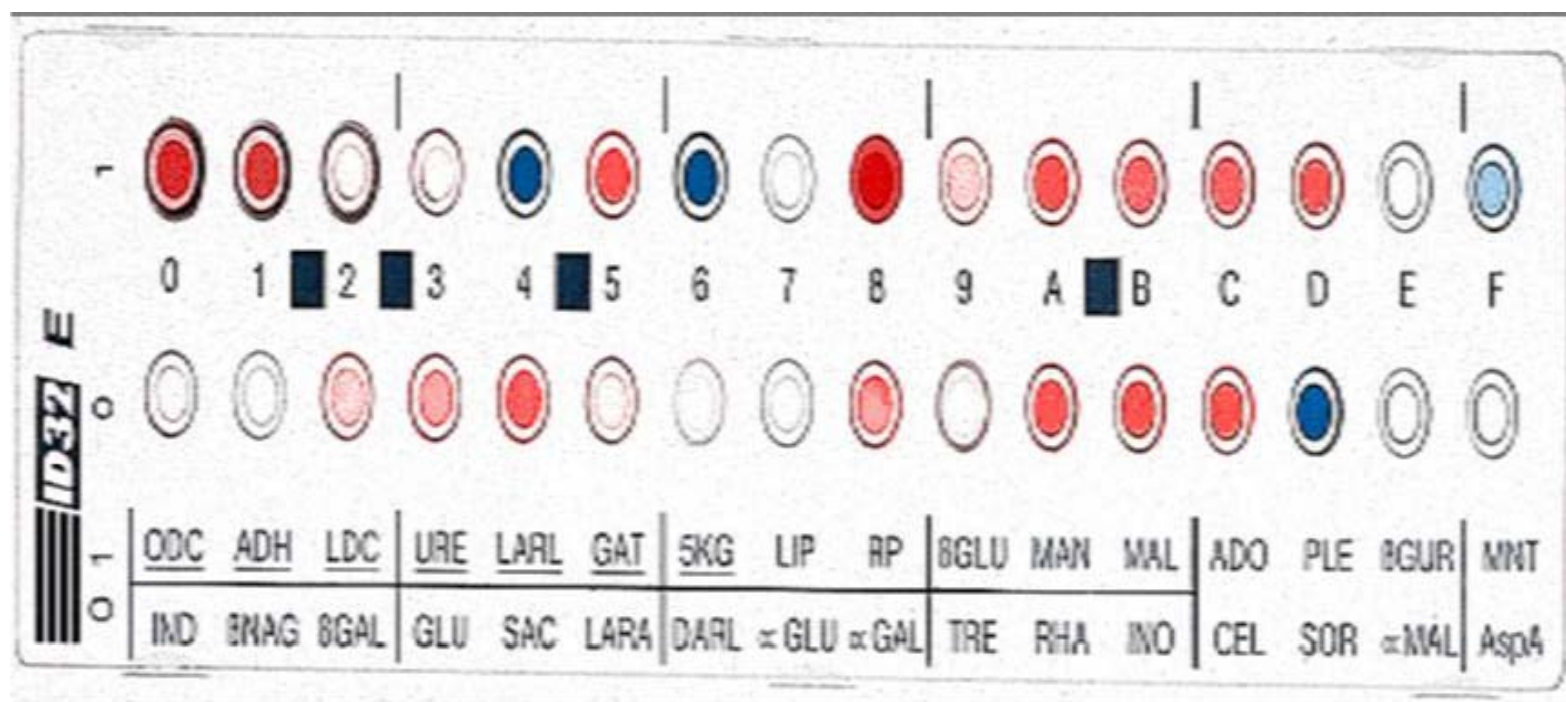


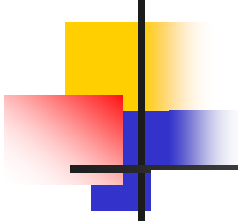
mini API

Otomatize identifikasyon ve antibiyogram cihazı



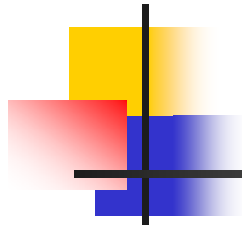






MicroScan





Results of a **Pos Combo panel** after inoculation, overnight incubation, and addition of reagents.



The top portion of the panel contains 27 wells (outlined in red or blue) with biochemicals and nutrients so the bacteria can grow.

The results of the biochemical reaction in each well are used to identify the isolated organism.

If a bacteria produces a particular chemical or enzyme, the color of the well changes.



Results of a **Neg Combo panel** after inoculation, overnight incubation, and addition of reagents.



Antibiotic susceptibility test panel wells are outlined in yellow. MicroScan® uses microtiter susceptibility technology - serial dilutions of the antimicrobial.

Looking downward, panel wells contain increasing concentrations of antimicrobial.

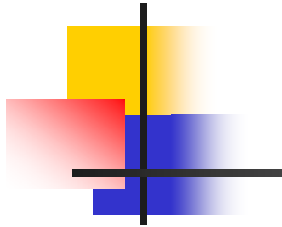
The MIC is read as the first well with no growth.

Q. Note the drug with the dilutions outlined in blue. Would this antibiotic be an appropriate drug to use to treat the patient?

A. No! The organism is resistant to this antibiotic, because it grew in all of the dilutions of the drug.

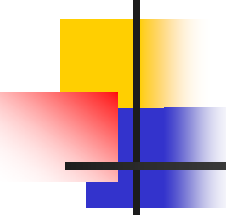
Q. Note the drug with the dilutions outlined in purple. Would this antibiotic be an appropriate drug to use to treat the patient?

A. Yes! The organism is susceptible to this drug, because the drug inhibited its growth in all dilutions.



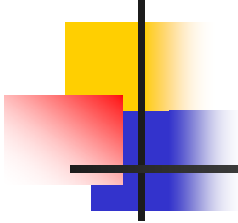
İdentifikasyon sistemlerinin dayandığı prensipler

Sistemlerin prensibi	Üremenin gerekliliği	Araştırılan özellik	Pozitif sonucun göstergesi	Örnek sistemler
pH değişimi ile ilgili reaksiyonlar (15-24 saat)	Evet	Karbonhidratların kullanılması	pH indikatörüne göre renk değişimi	API, Crystal, Vitek, MicroScan ticari panelleri
Enzimatik özellikler (2-4 saat)	Hayır	Oluşturulmuş enzimler	Florojenik veya kromojenik olarak renk değişiminin olması	MicroScan ticari panelleri, Vitek kartları
Karbon kaynağı kullanımı	Evet	Organik ürünler	Karbonla işaretli maddenin metabolik aktivite sonucunda renk değiştirmesi	Biolog
Uçucu ve uçucu olmayan asitlerin saptanması	Evet	Hücre sel yağ asitleri	Daha önceden bilinen standart bilgilerle saptanan son ürünlerin kıyaslanması	MIDI
Üremenin görsel olarak saptanması	Evet	Farklı substratlar	Substrat mevcudiyetinde mikroorganizmanın üremesine bağlı saptanan bulanıklık	API 20 C AUX



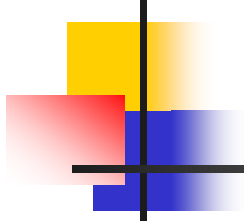
Otomatize - yarı otomatize tanı sistemlerinden beklentiler

- Ön tanıyı desteklemek için gönderilen uygun örnekten etkenin izole edilmesi
- İzole edilen etkenin cins ve tür düzeyinde tanımlanması
- Tanımlanan etken için tedavide kullanılabilecek antimikrobik maddenin etkinliğinin saptanmasına yönelik duyarlılık testlerinin yapılması
- Etkenin direnç mekanizmaları ile ilgili testlerin yapılması
- Tüm bunların en hızlı, en doğru ve klinikte kullanılabilecek özellikte yapılması

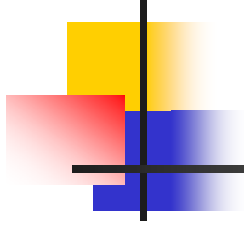


Otomatize identifikasyon sistemlerinin temel özellikleri

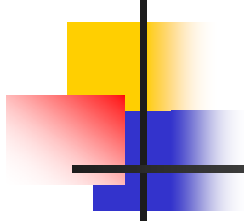
- Hızlı
- Yüksek doğrulukta
- Tekrarlanabilir identifikasyon yaparlar
- Daha az teknik iş gücü gerektirirler



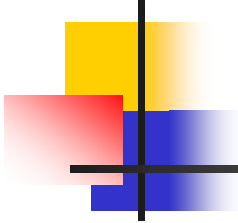
- Hızlı sonuç alma gerekliliği hızlı identifikasyon stratejilerinin doğmasına yol açmıştır.
 - Enzimatik aktiviteyi ölçen substratlar kullanılır. (enzimin saptanması bakterinin çoğalması ile ilgili değildir)



- Üreme temelli testlerde son ürünün ölçülebilmesi için 18-24 saatlik inkübasyon süresi gerekir.
- Son ürünlerin metabolik aktivitesi pH indikatörleri aracılığı ile oluşan renk değişimi ile belirlenir.
- Konvansiyonel biyokimyasal sistemlerin minyatürize modifikasyonları kullanılır; çıplak gözle renk değişimi saptanabilir.

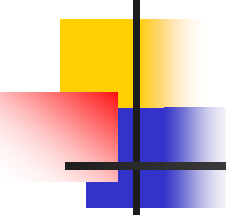


- Alternatif olarak bazı otomatize sistemlerde kullanılan fotoelektrik hücre minyatür üreme kuyularından geçen ışığın dalga boyundaki değişimleri ölçer.
- Floresansı ölçen sistemler
- Bulanıklığı ölçen sistemler
 - İdentifikasyondan çok antimikrobiyal duyarlılığın belirlenmesinde kullanılır.
 - Optik dansite spektrofotometrede ölçülür.



Metabolik profilin analizi

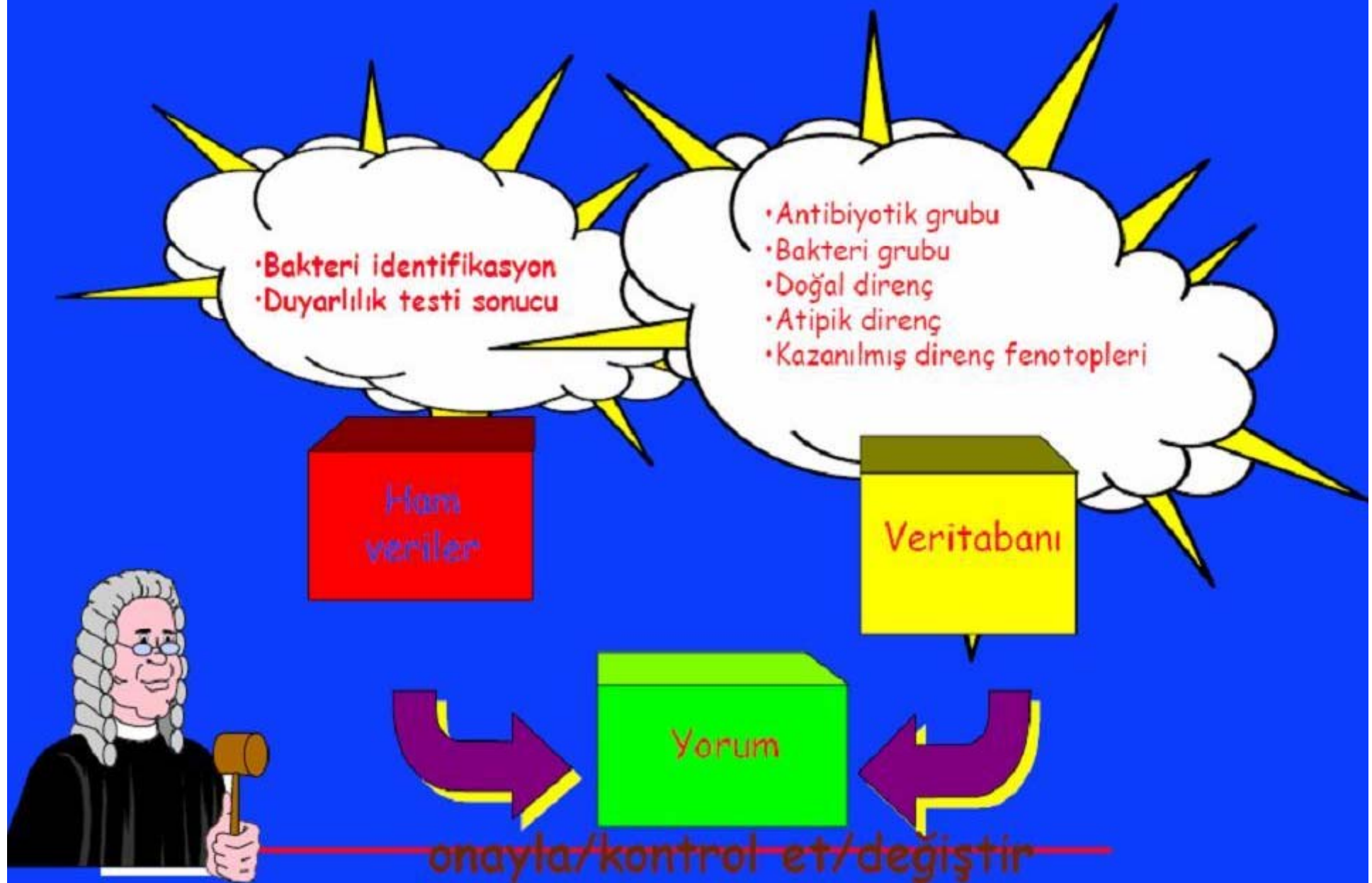
- Bir bakteriyel izolattan elde edilen metabolik profil; temel olarak fenotipik parmak izidir.
- (+) ve (-) reaksiyonların bir serisi olarak kaydedilir.

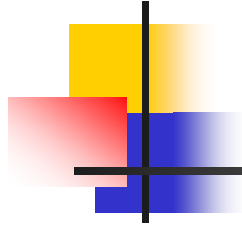


VERİ TABANI

- Üretici tarafından oluşturulur ve klinik olarak önemli bakterilerin taksonomik durumlarının sürekli olarak güncellenmesi temeline dayanır.

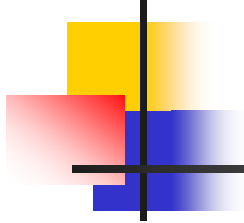
sistem nasıl çalışır?





Veri tabanı oluşturulması

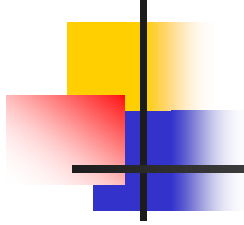
- Aynı türe ait birçok suş toplanır.
- Her suş metabolik testlerin olduğu özdeş identifikasyon paneline inoküle edilir.
- İnkübasyon sonrası (+) ve (-) test profili elde edilir.
- Her test için kümülatif sonuçlar her genusun veya türün %'si olarak ifade edilir.
- Amaç, her tür için her bir testin (+) sonuç olasılığını hesaplamaktır.



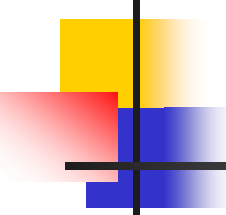
- Çalışılan izolatın metabolik profili belirlendikten sonra, profil numerik bir koda dönüştürülür.

Amaç: bilinmeyen fenotipik parmak izinin uygun veri tabanı ile kıyaslanmasını kolaylaştırmaktır.

Bu kıyaslama numerik kodun bilgisayar yardımlı kıyaslaması şeklinde de olabilir.

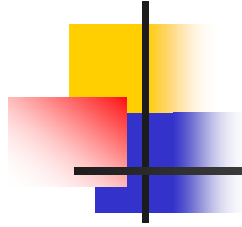


- Veri tabanı araştırılan suşa uygun olmalıdır
 - Örn: bir S.aureus izolatu yanlışlıkla Enterobacteriaceae tanısında kullanılan bir test paneli ile çalışılacak olursa; veri tabanı Gram(+) koku identifiye etmeyecektir. Çünkü veri tabanı sadece Gram(-) enterik çomaklar ile kıyaslamaya uygundur.
 - İdentifikasyon paneli seçilmeden önce koloni yapısı, Gram boyama ile morfoloji belirleme gibi testler ve gözlemlerin yapılması zorunludur.



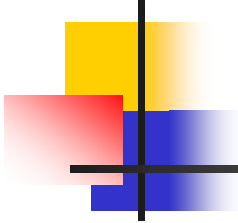
Otomatize identifikasyon sistemlerinin avantajları

- Zaman tasarrufu
- Tür düzeyinde yüksek oranda doğru identifikasyon
- Sonuçların tekrarlanabilir olması
- İç ve dış kalite kontrolünün uygulanabilirliği
- LIS ve HIS bağlantıları ile hızlı raporlama



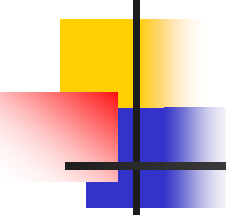
Otomatize sistemlerin avantajları

- Kısıtlı personelin etkin değerlendirilmesi
- Bilgisayar sistemleri ve yazılım programları sayesinde hasta, örnek, klinik izolat ile ilgili verileri sınırsız ölçüde depolayabilmesi
- İstatistiksel, epidemiyolojik analizlerin kısa sürede yapılabilmesi



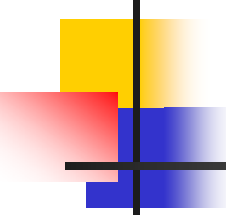
Dezavantajları

- Pahalı olması
- Bakteri morfolojisini önceden bilmenin gerekliliği
- Çok uygun yoğunlukta bakteri süspansiyonu hazırlama zorunluluğu
 - Gram(-) çomaklar için 0,5 Mc Farland
 - Gram(+) koklar için 4 Mc Farland
 - miniAPI için gerekli standartlar



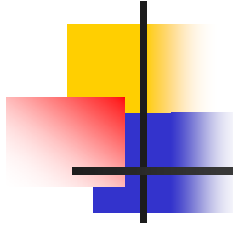
Dezavantajları

- Sadece kendi veri tabanında bulunan bakterilerin identifikasyonunu yapabilir.
- Biyokimyasal özellikleri yakın benzerlik gösteren türlerin identifiye edilerek birbirinden ayrılması çok zordur.
- Kalifiye teknik iş gücünün istihdamını gerekli kılar.
- Mikrobiyoloğun yorumlama yetisini devre dışı bırakırsa dezavantaj oluşturur.
 - Eğitim veren kurumlarda uzmanlık öğrencisinin eğitimi için klasik yöntemlerle de çalışılması gereklidir.



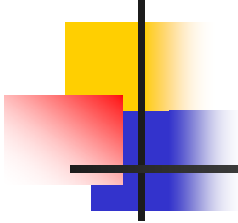
Dezavantajlar

- 4 Mc Farland'lık bakteri yoğunluğunu bulmak için 48 saatlik CO₂'li ortam inkübasyonu gerekir, bazen de bu mümkün olmaz.



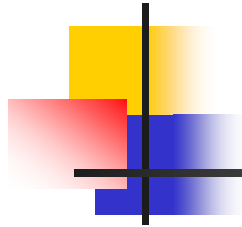
Dezavantajları

- Üreyen bakterinin klinik materyaller ile uyumlu olup olmadığının araştırılması gerekir.
- Klinik Mikrobiyolog, veri tabanı, olasılıklar, yüzdeler sonucu ulaşılan sonuçlara körü körüne bağlanmamalıdır.
- Bazen bir çevre bakterisi üreyebilir.



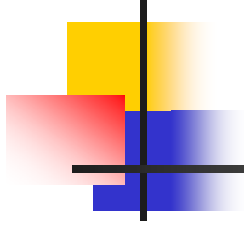
Veri tabanı ile ilgili sorunlar

- Veri tabanında bulunan bakteri sayısı 200-1200 arasında değişir. (özellikle sistem çevresel örnekler ve araştırma amaçlı olarak kullanılacaksa)
- Veri tabanının üretici tarafından sık sık yeni isimli türleri de içerecek şekilde güncellenmesi gerekir.
- Sistem sadece veri tabanında bulunan bakteri identifikasyonlarını yapabilecektir. Mikrobiyolog bu sınırlamaları iyi bilmeli ve klinisyeni de bu konuda uyarmalıdır.

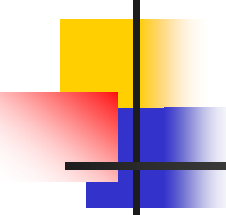


Hatalı sonuçlar

- Kit ile farklı durumlar ortaya çıkabilir.
 - Örn: Laktoz(+) Salmonella spp veya H₂S(+) E.coli üreyebilir.
 - çok güvenilir bir sistemden çok yanıltıcı bir sonuç çıkabilir.
 - Bu gibi durumlarda geriye dönüp klasik identifikasyon sistemlerine başvurmak gerekir.

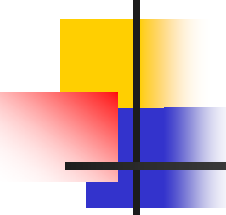


- Sonuçta bir belirsizlik veya uyumsuzluk olduğunda laboratuvar mutlaka ek bir işleme başvurmalı, gerekirse izolat analiz için bir referans laboratuvara gönderilmelidir.



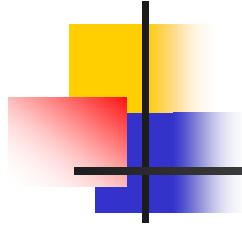
Başlıca hata kaynakları

- Saf suş kullanılmaması
- Taze izolat kullanılmaması (18-24 saatlik kültürle çalışılmalı)
- Standard inokulum kullanılmaması
- Kit dolumu ve yerleştirme arasında geçen sürenin 20 dakikayı aşması
- Önerilen inkübasyon sürelerine uyulmaması



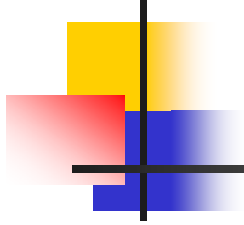
Başlıca hata kaynakları

- Önerilen inkübasyon ortamına uyulmaması
- Önerilen inkübasyon ısisına uyulmaması
- Sonuçların hatalı okunması
- Sonuçların geçirilmesinde hata
- Kitin son kullanma tarihinin geçmiş olması

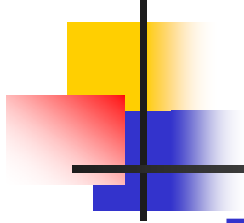


Başlıca hata kaynakları

- Reaktiflerin açılmasından sonra kullanım sürelerinin dolmuş olması
- Kitin ve reaktiflerin saklama koşullarına uyulmaması
- Üreticinin metodolojisine uyulmaması
- Subkültür için önerilen besiyerlerinin kullanılmaması



- Kullanıcının eğitimi
- Cihazın enerji kesintilerine karşı korumalı olup olmadığı
- Sistem tüm çalışanlar tarafından tarafından kullanılabilir mi?
- Sistem basit mi?



- Sonuç olarak; Klinik Mikrobiyologlar üretici firmanın ürünlerle ilgili haberlerini, identifikasyon sistemlerini kullanan diğer kullanıcıların karşılaştıkları sorunları ve potansiyel problemleri açıklayan literatürleri takip etmelidirler.
- Uygun olmayan biyokimyasal profil ya da beklenmedik duyarlılık profili nedeniyle sonuç ile ilgili bir soru işareti oluştuğunda mutlaka ya klasik yöntemlerle ya da bir referans laboratuvara göndererek sonuç doğrulanmalıdır.