

Mikrobiyolojik İncelemede Yenilikler: Her Bulduğumuz Etken mi?

Doç. Dr. Filiz PEHLİVANOĞLU
Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi
29.01.2019

İnfeksiyöz İshaller

- Dünyada morbidite ve mortalite nedeni olarak 2. sırada
- Her yıl 2 milyar kişi AGE (WHO)
- Uygunsuz antibiyotik kullanımına yol açıyor
- Salgınlara neden oluyor
- Çeşitli komplikasyonları var



Klinik Uzlaşı Raporu: Gastrointestinal İnfeksiyonlar

Uzm.Dr.Şafak Göktaş
İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji

XVIII. TÜRK KLİNİK MİKROBİYOLOJİ VE İNFEKSİYON HASTALIKLARI KONGRESİ (KLİMİK 2017)I ANTALYA

İnfeksiyöz İshallerde Yeni Ne Var?
29.01.2019, İstanbul



Klinik Uzlaşı Raporu: Gastrointestinal İnfeksiyonlar

Bu rehber ile amaçlanan;

- Akut Gastroenteritli hastaya yaklaşım yönünden önerilerde bulunmak,
- Ülkemizde, ölüm ve komplikasyonların azaltılmasıdır

2017 Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Infectious Diarrhea

- Komplike olmayan turist ishalinde tanısal testler rutin olarak önerilmemektedir.
- Kanlı ishal, ateş, karın krampları veya sepsis bulguları varsa dışkı *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Clostridium difficile* ve STEC için test edilmelidir.
- Klinisyen, ishalleri hastayı enterik enfeksiyonlarla ilişkili postenfeksiyöz ve ekstraintestinal belirtiler açısından değerlendirmelidir.

Clinical Infectious Diseases

IDSA GUIDELINE



A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology^a

TANI

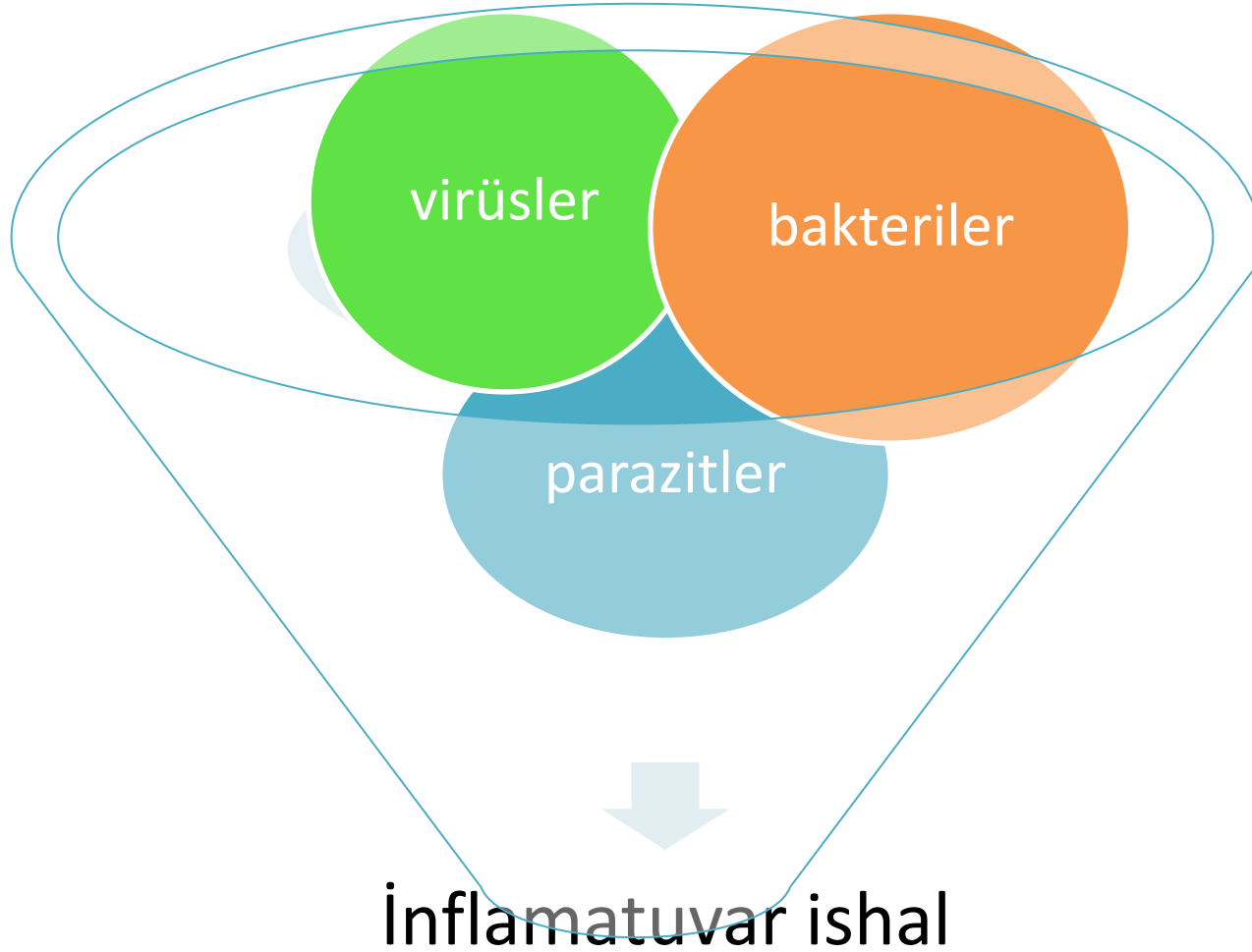
- Anamnez
- Fizik Muayene
- Dışkı incelemesi
- Uygun mikrobiyolojik incelemeler



Süreye göre sınıflama

- Akut İshal; <14 gün,
- Persistan İshal; 14-30 gün,
- Kronik İshal; >30 gün





İnflamatuvar ishal etkeni mikroorganizmalar

BAKTERİLER

- *Salmonella*
- *Shigella*
- *Campylobacter jejuni*
- *Yersinia enterocolitica*
- Enteroinvazif *E.coli*
- *Clostridium difficile*
- Enterohemorajik *E.coli*
- Enteroagregative *E.coli*
- *Vibrio parahemolyticus*

VİRÜSLER

- Rotaviruslar
- Kalisiviruslar
- Adenoviruslar
- Koronavirüsler
- Astrovirüsler vs

PARAZİTLER

- Giardia
- Entamoeba
- Strongyloides
- Isospora
- Cryptosporidium
- Cyclospora

Anamnez, Klinik Bulgular, Fizik Muayene



- Hastanın yaşı
- Hastalığın şiddeti, süresi, tipi
- Dehidratasyonun değerlendirilmesi, tedavisi
- Dikkatli öykü, fizik muayene

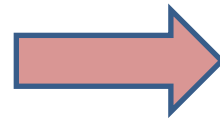


Laboratuvar testi yapılacak mı?
Hangi testler yapılacak?

Gİ infeksiyonda ne zaman laboratuvar testi yapılır?

Tanı için sulu dışkı örneği kullanılır

- Noninflamatuvar diyare
- Kısa süreli gastroenterit



Tetkik gerekmez

Laboratuvar tanıda önemli noktalar

- Materyal olarak sulu dışkı kullanılmalı
- Forme dışkı ya da **sürüntü kullanılmamalı**
- Çocuk hastada bu kurala uyulmaz ve eküvyon üzerinde dışkı varsa kabul edilir
- *C.difficile* için toksin testi ya da NAAT sulu dışkı varsa yapılır, forme dışkıda yapılmaz
- Ancak hekim hastada ileus olduğunu bildirirse forme dışkıda da *C.difficile* için test yapılır

Uygun tanı yaklaşımında önemli noktalar

- Hastanın yaşı
- Altta yatan hastalıkları
- Hastalığın ciddiyeti
- Süresi ve tipi; akut, persistan, kronik
- Mevsimsel bağlantı
- Coğrafik konum

Dışkı kültürü ya da kültür dışı testler

- Şiddetli hastalık
- Kanlı ishal
- Ateş varlığı
- Dizanterik ishal
- Nosokomiyal ishal
- Pesistan ishal için endikedir.

Kültür Yapılması Gereken Özel Durumlar

- Yaşlılarda ishal (>65 yaş)
- Turist ishali (uzamışsa)
- Antibiyotiğe bağlı ishal
- Hemorojik kolit
- Salgın şeklindeki ishal
- İmmün yetmezlikli hastada ishal
- Bakımevinde görülen ishal
- Nosokomial ishal
- Septisemi eğilimli akut ishal

Dışkı kültürü

- İnvaziv bakteriyel enterik patojenleri saptar
- Rutin olarak bakılanlar
 - Salmonella
 - Shigella
 - Campylobacter
 - Shiga toxin–producing *E. coli*
- Bütün pediatrik hastalarda toksin üreten *E.coli* taranmalı
- Vibrio ve Yersinia için laboratuvar ile iletişim kurulmalı
- Raporlarda hangi patojenlerin tarandığı belirtilmeli

Kültür dışı test

- Rutin olarak *C.difficile* için mevcut
- Rutinde kullanılmayan diğer bakteriler ve virüsler için de testler mevcut
- Laboratuvar ile iletişime geçilmeli...



Dışkı kültürü başarısı

- Yetişkin hastada ilk örnekte % 87-94,
- İkinci örnekte % 98
- Çocuk hastada ilk örnekte %98 etken saptanabilir
- Rektal sürüntü, dışkı örneğine göre daha az duyarlı
- Çocuk hastada her iki örnek de eşit yararlılıkta



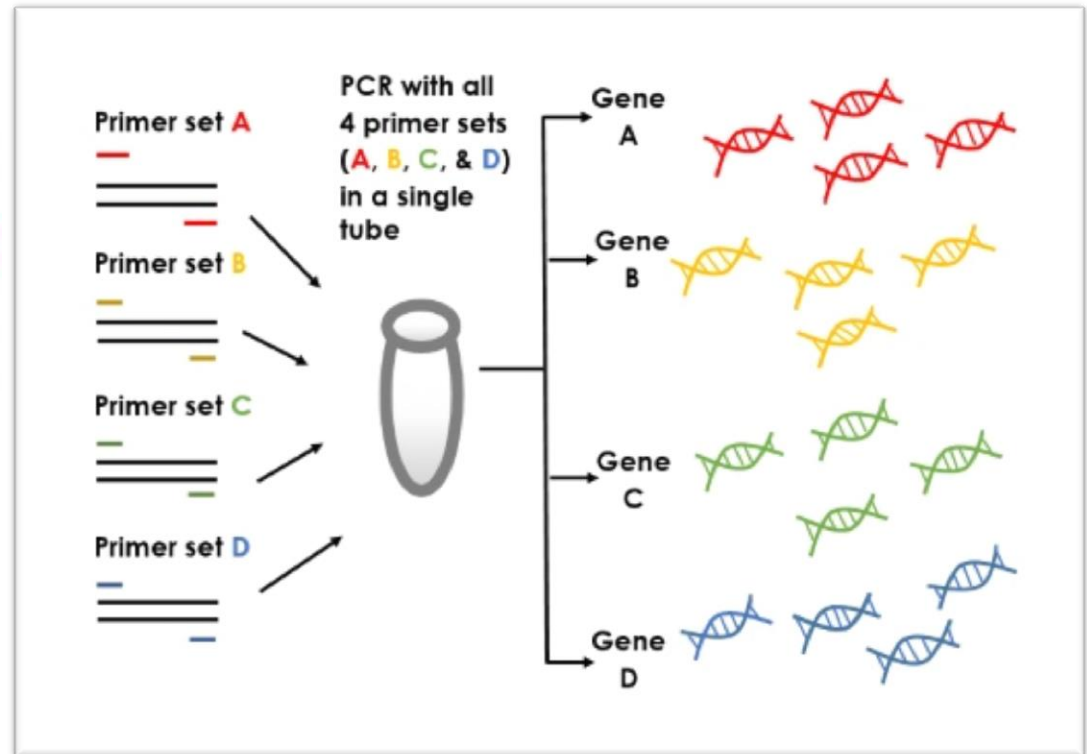
A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases CID 2018

Kültür dışı testler

- Günden güne artmakta
- Nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT) singleplex testlerden multiplex testlere kadar değişebilir çeşitlilikte
- Kültür için 24-96 saat gerekirken bunlarda 1-5 saatte sonuç alınır
- Kültüre göre daha duyarlı ve yüksek saptama oranları var
- Birçok patojeni aynı anda saptayabilir
- Hangisinin etken olduğuna karar vermek gerekir
- Kür kontrolü için kullanılmazlar; canlı ve cansız tüm etkenleri saptar

Multiplex PCR

fast-track
DIAGNOSTICS



GI Pathogen PCR Profile (CMI36)

View analytes within this test

Andenovirus ▼

Andenovirus

Astrovirus

Campylobacter

Clostridium difficile (toxin A/B)

Cryptosporidium

Cyclospora cayetanensis

E Coli

Entamoeba histolytica

Giardia duodenalis

Intestinalis & Lamblia)

Norovirus

Plesiomonas shigelloides

Rotavirus A

Salmonella

Sapovirus (I,II,IV,V)

Shigella

Vibrio Cholerae

Vibrio

Yersinia enterocolitica

İnfeksiyöz İshallerde Yeni Ne Var?

29.01.2019, İstanbul



C. difficile

- Hastane kaynaklı ishallerin en önemli sebeplerinden
- Hafif ishalden, pseudomembranöz kolite kadar
- Tanıda toksijenik kültür en duyarlı ve özgül yöntem
- Ancak rutin laboratuvarlar için fazla emek yoğun ve uzun süren bir çalışma
- Toksin oluşturan *C.difficile* sıklığı %3-20
- Dışkıda toksin tespiti enzyme immunoassay (EIA) veya immunochromatographic metod ile yapılabilir ve duyarlılığı %70-85, sonuç <2 saat
- Glutamate dehydrogenase (GDH) antijen testi ise duyarlı olmasına rağmen özgüllüğü düşüktür. Tarama testi olarak kullanan laboratuvarlar var
- NAAT testi duyarlılığı %93-100 olup seçilmiş olgularda yapılmalı

A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases CID 2018

C. difficile

- İnfeksiyonun tespiti için tek başına NAAT yapılmamalı
- NAAT negatif kişiler tekrar test yapılacaksa en az 6 gün geçmeli
- Rutin test 2 yaş altı çocuklarda taşıyıcılık nedeni ile yapılmamalı
- Toksik *C. difficile*, yaşamın ilk yıllarında bebeklerin yaklaşık % 50'sinde kolonizedir
- 2 yaşlarında asemptomatik taşıyıcılık oranları sağlıklı yetişkinlere yaklaşır.
- 2 yaş altında *C.difficile* infeksiyonu ve taşıyıcılığını ayırt etmek zor olup öncelikle diğer infeksiyon nedenleri dışlanmalıdır

Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile*
Infection in Adults and Children: 2017 Update by the
Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society
for Healthcare Epidemiology of America (SHEA)

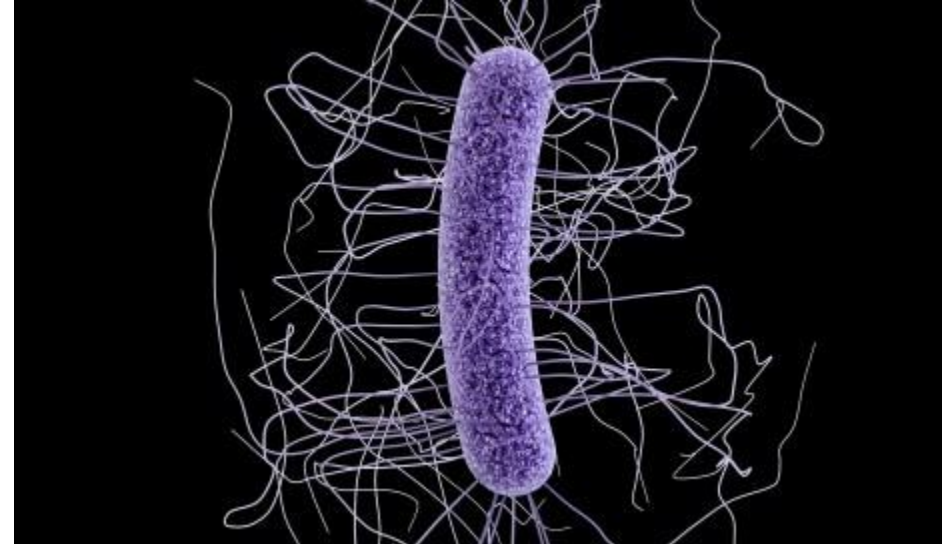
- Doğru tanı koyma ve
- Test yapılacakların seçiminin
 - yeni başlayan, açıklanamayan ve klinik olarak anlamlı (24 saatte en az 3 sulu dışkı) olan hastalara *C difficile* testini sınırlamanın önemine dikkat çekmektedir.



C. difficile--Innocent until Proven Guilty?

June 26, 2017

- Toksikjenik *C. difficile* suçlu olduğu ispatlanıncaya kadar masum mu yoksa suçsuz olduğu ispatlanıncaya kadar suçlu mu kabul edilmeli?



Parazitolojik inceleme

- Örnek sayısı tartışmalı
- Konvensiyonel mikroskopik incelemede en az 3 örnek isteniyordu
- Güncel olarak ise 1. örnek negatif ve hastanın şikayetleri devam ediyorsa 2. ve 3. örnek istenmeli

Parazitolojik inceleme

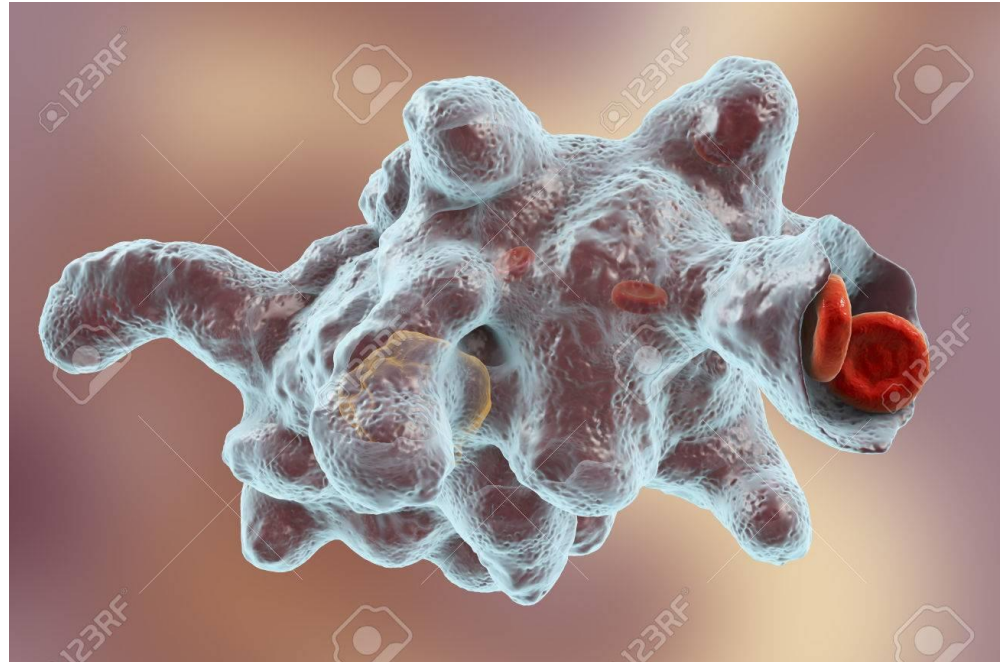
- İmmunassey ve NAAT kullanımı
 - Direk incelemesi negatif ve sürekli semptomları olan
 - Hasta ile ilgili spesifik risk faktörleri
 - Coğrafik özellikler
 - Hekimin tam bir inceleme istemesi

Parazitolojik inceleme

- *Giardia* için Immunoassays tek örnekte dahi oldukça duyarlı
- NAAT yapıldığında enfeksiyonun ekarte edilmesi için gerekli olan örnek sayısı hakkında veri yoktur.
- Uygun taşıma koşulları ve fiksatifi laboratuvar belirler

Entamoeba histolytica tanısı

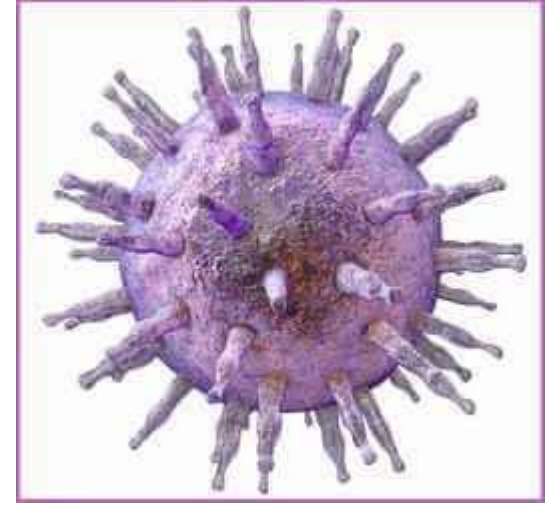
- Rutin işlemlerde, patojenik *Entamoeba histolytica*, morfolojik kriterler kullanarak patojenik olmayan *Entamoeba dispar*'dan ayırt edilemez
- Sadece bir immunoassay veya NAAT bu organizmaları ayırt edebilir.



Virüsler

- İnfeksiyonlar genellikle kısa süreli ve kendini sınırlayıcıdır
- Semptomlar geçtikten sonra da viral bulaş olabilir
- Multiplex NAAT kullanımı
 - immün sistemi baskılanmış hastalar
 - enfeksiyon kontrol amaçlı çalışmalar
 - salgın incelemeleri dışında rutin olarak yapılmaz.

CMV tanısı



- İmmün sistemi baskılanmış hastada düşünülebilir
- Plazmada kantitatif NAAT yapılır
- Negatif sonuç hastalığı ekarte ettirmez
- Test tekrarı gerekebilir

Laboratuvar tanı

Etken	Prosedür	Transport koşulları
<i>Clostridium difficile</i>	GDH antijen ve toksin testi NAAT	Kapalı kap, oda ısısı, 2 sa
<i>Salmonella</i> spp <i>Shigella</i> spp <i>Campylobacter</i> spp	NAAT Rutin dışkı kültürü	Kapalı kap, oda ısısı, 2 sa ^a
EHEC (<i>E. coli</i> O157:H7 ve Shiga toksin üreten <i>E. coli</i>)	Shiga toksin geni için NAAT Shiga toksin immunoassay <i>E. coli</i> O157 kültürü	Kapalı kap, oda ısısı, 2 sa ^a

^aLaboratuvara 2 sa içinde gidemeyecekse Cary-Blair transport besiyerinde 24 sa oda ısısında saklanabilir.

Laboratuvar tanı

Etken	Prosedür	Transport koşulları
<i>Yersinia</i> spp, <i>Vibrio</i> spp <i>Plesiomonas</i> spp <i>E. coli</i> (enterotoxigenic, enteroinvasive, enteropathogenic, enteroaggregative)	NAAT ^b	Kapalı kap, oda ısısı, 2 sa ^a
<i>Yersinia</i> spp, <i>Vibrio</i> spp <i>Aeromonas</i> spp, <i>Plesiomonas</i> spp <i>Edwardsiella tarda</i> , <i>S.aureus</i> <i>E. coli</i> (enterotoxigenic, enteroinvasive, enteropathogenic, enteroaggregative)	Etkene özgü dışkı kültürü	Kapalı kap, oda ısısı, 2 sa ^a

^bMultiplex paneller mevcut.

Laboratuvar tanı

Etken	Prosedür	Transport koşulları
<i>Bacillus cereus</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Staphylococcus aureus</i> ^c	Toksin tespiti	Kapalı kap, oda ısısı, 2 sa

^cHalk Sağlığı lab veya konuda uzmanlaşmış lab

Laboratuvar tanı

Etken	Prosedür	Transport koşulları
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i> <i>Blastocystis hominisi</i> <i>Dientamoeba fragilis</i> <i>Balantidium coli</i> , <i>Giardia lamblia</i> , Nematod (<i>Ascaris lumbricoides</i> , <i>Strongyloides stercoralis</i> , <i>Trichuris trichiura</i>) Sestod, Trematod	Direk ve kalıcı boyalı mikroskopi ile parazit ve yumurta incelemesi	Direk dışkı <1 sa oda ısısı, tespitleyici içinde 2-24 sa ^d
<i>E. histolytica</i>	İmmunoassay, NAAT ^b	Tespitleyici kullanılmaz, Cary-Blair transport, oda ısısı, 24 sa

^bMultiplex paneller mevcut.

^dTespitleyici: Polyvinyl alcohol, sodium acetate formalin transport, vs.

Laboratuvar tanı

Etken	Prosedür	Transport koşulları
<i>Giardia lamblia</i>	EIA,	Tespitleyicide ^d 2-24 sa
<i>Cryptosporidium spp</i>	DFM	Tespitleyicide ^d 2-24 sa
	NAAT ^b	Cary-Blair transport, oda ısısı, 24 sa
<i>Cyclospora</i>	NAAT ^b	Cary-Blair transport, oda ısısı, 24 sa
<i>Cryptosporidium</i> <i>Cyclospora</i> <i>Isospora</i>	Modifiye aside dirençli boyama	Direk dışkı <1 sa oda ısısı, tespitleyici ^d içinde 2-24 sa
<i>Microsporidia</i>	Modifiye trikrom boyama	Direk dışkı <1 sa oda ısısı, tespitleyici ^d içinde 2-24 sa

^bMultiplex paneller mevcut

^dTespitleci: Polyvinyl alcohol, sodium acetate formalin transport, vs.

Laboratuvar tanı

Etken	Prosedür	Transport koşulları
<i>Enterobius vermicularis</i>	Perianal bölge, Selebant yöntemi ile direk mikroskopi	Oda ısısı, 2 sa
<i>Dışkı örneği kullanılmayan tek araştırma</i>		

Laboratuvar tanı

Etken	Prosedür	Transport koşulları
<i>Astrovirus</i> <i>Calicivirus (norovirus, sapovirus)</i> <i>Enteric adenovirus</i> <i>Enterovirus/parechovirus^e</i> <i>Rotavirus</i>	NAAT	Kapalı kap, oda ısısı, 2 sa
<i>Rotavirus</i> <i>Enteric adenovirus</i>	EIA	Kapalı kap, oda ısısı, 2 sa
<i>Calicivirus (norovirus, sapovirus)</i>	Salgın araştırmasında Halk Sağlığı yetkilileri	Kapalı kap, oda ısısı, 2 sa

^eAsemptomatiklerde de tespit edilebilir

Laboratuvar tanı

Etken	Prosedür	Transport koşulları
<i>Cytomegalovirus</i>	Histopatolojik inceleme (biyopsi) Kültür (biyopsi)	Formalinli kap, oda ısısı, 2-14 gün Steril kap, oda ısısı, acil
	Viral yük için NAAT(plazma)	EDTA'lı tüpte kan, oda ısısında 2 sa, 2°C– 8°C for 24 sa, –20°C dondurucuda uzun süre

Türkiye Halk Sağlığı Kurumunun enterik patojenler için yaptığı testler

130.136 908.726 905.672 905.880 905.680	ENTERİK PATOJENLER EHEC HUS PAKETİ <i>E.coli</i> EHEC ELISA Verotoksin PCR, multipleks Dışkı Kültürü <i>E.coli</i> 0157 H7 Kültürü Bakteri tanımlanması (Manuel)	ELISA, PCR, Kültür, Kültür, Yarı otomatik	5 g taze dışkı + Cary Blair taşıma besiyerinde Dışkı (bির adet)
905.770 905.680 905.780 905.880 905.672 912.260	ENTERİK PATOJENLER DIŞKI KÜLTÜR PAKETİ Boyasız Direkt Mikroskopik İnceleme Bakteri tanımlanması Campylobakter kültürü <i>E.coli</i> 0157 H7 Kültürü Dışkı Kültürü Vibrio cholerae Kültürü □	Mikroskopi, Kültür, Kültür, Kültür, Kültür, Kültür	Salgın durumunda <u>Salgın (Dışkı) Paketi</u> girilmelidir. 5 g taze dışkı + Cary Blair taşıma besiyerinde Dışkı (bির adet)
130.149	PCR (In House)	PCR	5 g Dışkı, Bir tüp saf bakteri izolatı (Yatık nutrient agar besiyeri içinde), Klinik materyal /izolat, Uygun taşıma besiyerinde klinik dışı izolat (Gıda, Su, Hayvan, Çevresel izolat vb)

Türkiye Halk Sağlığı Kurumunun enterik patojenler için yaptığı testler

<u>SALGIN (DİŞKİ) PAKETİ</u> <u>a. Enterik Patojenler L.</u> Boyasız Direkt Mikroskopik İnceleme Bakteri tanımlanması <i>Campylobakter</i> kültürü <i>E.coli</i> 0157 H7 Kültürü Dışkı Kültürü <i>Vibrio cholerae</i> Kültürü <u>b. Parazitoloji L.</u> Cryptosporidium antijeni (DFA/ELİSA) Parazit aranması (Konsantrasyon yöntemi ile yüzdürme ve/veya çöktürme) Giardia intestinalis antijeni (DFA/ELISA) Serolojik Yöntemle Entamoeba histolytica Antijeni Aranması Entamoeba histolytica PCR, Giardia intestinalis PCR, Cryptosporidium spp. PCR, Dientamoeba fragilis PCR <u>c. Viroloji L.</u> Gastroinstenstinal Viral Multipleks PCR Norovirus I, Norovirus II, Rotavirus, Adenovirus, Astrovirus (Test çalışılmıyor) <u>d. Salgın Araştırmaları L.</u> Gastrointestinal Patojen (Bakteri, Virüs, Parazit) Paneli (Not: 22 etken çalışılmaktadır.)	Mikroskopi, Kültür, Kültür, Kültür, Kültür, Kültür ----- DFA/ELISA, Mikroskopi, DFA/ELISA, ELISA, Real Time PCR ----- Real Time PCR 1-10 çift ----- Reverse Transkrpsiyon PCR, Multipleks PCR, Mikroarray, Real Time PCR	<u>Enterik Patojenler L. : 5 g taze dışkı (bir adet) + Cary Blair taşıma besiyerinde dışkı (bir adet)</u> <u>Parazitoloji L. : 5 g taze dışkı</u> <u>Viroloji L. : 5 g taze dışkı</u> <u>Salgın Araştırmaları L. : 5 g Dışkı veya Cary Blair taşıma besiyerinde dışkı (Bir adet)</u> <u>(Aktif 2 ayrı laboratuvar için ayrı numune alınmalı, barkod çıkarılmalı ve numuneler ayrı etiketlenmelidir)</u>
---	---	--

2017 Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Infectious Diarrhea

Gelecek için talimatlar

- Bulaşıcı diyare sahip kişilerin tanı ve tedavisindeki asıl zorluk, moleküler tabanlı teşhislerin kullanımı ve yorumlanmasıdır.
- Teşhisin gelişmesine rağmen, infeksiyöz ishalleri kişilerin optimal yönetimi, kapsamlı bir anamnez ve fizik muayeneye dayanır.
- Bu bilgi, klinisyenin teşhis yöntemlerini **seçici** olarak kullanmasını ve uygun bir tedavi uygulayabilmesini sağlar.

Tedavi edilen laboratuvar sonucu deęil
hasta olmalı





Teşekkür ederim.