



TiBO

İNÖVATİF BİYOTEKNOLOJİ ORGANİZASYONU

TK ANTI TB & PNB KIT

ANTİMİKOBAKTERİYEL İLAÇLARA DUYARLILIK VE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS KOMPLEKS VE TÜBERKÜLOZ DIŞI
MİKOBAKTERİLERİN (MYCOBACTERIA OTHER THAN TUBERCULOSIS –MOTT–) AYRIMI İÇİN HIZLI SIVI KÜLTÜR KİTİ

Katalog No:TK250-251

Kullanım Yönergesi

Canlı Dışında Kullanım İçindir

Ürünün İsmi:

TK ANTI TB & PNB KIT

Kullanım Amacı:

TK ANTI TB & PNB KIT mikobakterilerin antimikobakteriyel ilaçlara duyarlılıklarının hızlı bir şekilde belirlenmesinde ve *M. tuberculosis* complex (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*) türlerinin, tüberküloz dışı (mycobacteria other than tuberculosis – MOTT–) mikobakteri türlerinden hızlı ayırımında kullanılan bir kittir.

Genel Bilgi:

TK MEDIUM içerdiği çoklu renk belirteçleri ile mikobakterilerin üremesinin erken saptanmasını sağlayan bir sıvı kültür besiyeridir. Ayrıca, **TK MEDIUM** mikobakteri üremesini kontaminasyondan ayırt etme özelliğine de sahiptir. Besiyerinin ekim yapılmadan önceki kırmızı rengi mikobakteri üremesi ile sarıya, kontaminant birçok bakteri veya mantar türleri üreyecek olursa yeşile döner. **TK MEDIUM** radyoaktif madde veya floresan boya içermez; değerlendirme için radyoaktivite sayıcı, ultraviyole ışını ve özel bir okuyucu gerektirmez. Renk değişikliği çıplak gözle kolayca değerlendirilebildiği gibi tüpler çok gelişmiş bir otomatik inkübatör ve okuyucu olan **MYCOLOR TK** ile de izlenebilir.

Hastadan alınmış örneklerden bir mikobakteri türü üretildiği zaman bunun *M. tuberculosis* veya başka bir mikobakteri türü (MOTT) olup olmadığının ayırt edilmesi önemlidir. Birçok olguda MOTT insanlar için patojen olmayabilir ve tedavi gerektirmeyebilir. Üretilen mikobakterinin hastalığa neden olabilen bir MOTT türü olması durumunda ise *M. tuberculosis* enfeksiyonunu tedavi etmekte kullanılanlardan farklı ilaçlarla tedavi etmek gerekebilir. **TK PNB** para-nitro-benzoik asit (PNB) içeren bir **TK MEDIUM** türüdür. PNB *M. tuberculosis* complex grubuna ait bakterilerin üremesine engel olurken, tüberküloz dışı mikobakterilerin üremesine engel olmaz ve böylece iki grubun birbirinden ayırt edilmesini sağlar. Dünyada hızla artmakta olan ilaç direnci mikobakterilere duyarlılık testi yapılmasının önemini artırmıştır. **TK ANTI TB & PNB KIT** içinde yer alan antitüberküloz ilaçları içeren besiyerleri sayesinde hızlı duyarlılık testi yapılabilir. Hastaların tedavilerinin yönlendirilmesinde tür saptama ve duyarlılık testlerinin hızla gerçekleştirilerek erken sonuç verilmesi her yönden önemli kazançlar sağlamaktadır.

Yöntemin kısıtlı yanları:

Nadir de olsa tüberküloz dışı bazı mikobakteri türlerinin de PNB tarafından üremeleri engellenebilir. **TK PNB** sadece *M. tuberculosis* complex veya MOTT ayırımı yapar, mikobakterinin tam tür ismini belirlemez. Tam tür isminin belirlenmesi için ek incelemelerin yapılması gereklidir.

Yöntemin Bilimsel Temeli:

Mikobakterinin **TK MEDIUM** ve antitüberküloz ilaçlar izoniazid (**TK INH**), rifampisin (**TK RIF**), streptomisin (**TK STR**), ve ethambutol (**TK EMB**) içeren besiyerleri ayrıca **TK PNB** de üremesi karşılaştırılır. **TK MEDIUM** da üreme oluyor **TK PNB** de üreme olmuyorsa bu mikobakterinin *M. tuberculosis* complex grubuna ait olduğunu gösterir. Eğer mikobakteri her iki besiyerinde de üriyorsa bu mikobakterinin tüberküloz dışı bir tür (MOTT) olduğunu gösterir. **TK MEDIUM** da üreme oluyor, antitüberküloz ilaçları içeren besiyerlerinde üreme olmuyorsa mikobakteri bu ilaçlara duyarlı, ilaçlı besiyerlerinde üreme oluyorsa, üreme olan besiyerindeki ilaca dirençlidir.

İçerik:

TK MEDIUM da polipeptitler, karbohidratlar, tuzlar, renk belirteçleri ve vitaminler bulunur (beyaz kapak).

SUSPENSION TUBE T80 Tween80 çözeltisi içerisinde 1mm çapında polikarbonat boncuklar içermektedir (mor kapak).

DILUTION TUBE T80 Tween80 çözeltisi içermektedir (mor kapak).

Antimikobakteriyel madde içeren tüplerdeki derişim şu şekildedir:

- TK INH** : Isoniazid 0,05µg/mL
- TK RIF** : Rifampin 1,0µg/mL
- TK STR** : Streptomycin 0,5µg/mL
- TK EMB** : Ethambutol 2,5µg/mL
- TK PNB** : Para-nitro benzoic acid (PNB) 250µg/mL

Dikkat Edilmesi Gerekenler ve Uyarılar:

- Canlı dışında (in vitro) kullanım içindir.
- Tüpler kullanımdan hemen önce açılmalıdır.
- Ekimden sonra tüplerin kapakları tüpteki gazların değişimini izleyebilmek için sıkıca kapatılmalıdır.
- Mikobakterilerin tanısında kullanılan laboratuvar yöntemleri, laboratuvar kaynaklı enfeksiyonların önlenmesi açısından özel önlemler gerektirir. Örnek işleme, düzey II biyogüvenlik odacığında gerçekleştirilmelidir. Bu işlemleri gerçekleştirecek kişiler özel eğitim almış olmalıdır.
- Laboratuvar enfeksiyonu olasılığını en aza indirecek şekilde ek önlemler alınmalıdır. En azından, örnek işleme, giriş çıkışı laboratuvar çalışanları ile sınırlandırılmış alanlarda yapılmalıdır. Bu alanda yüzeyler, bir yüzey dezenfektanı ile silindiğinde kolayca temizlenebilecek şekilde olmalıdır.

Genel Güvenlik Kuralları:

- Enfeksiyon etkeni içermesi olasılığı olan örneklerle çalışırken daima eldiven ve maske takılmalıdır.
- Pipetleme, çözelti ekleme, boşaltma gibi işlemler daima düzey II biyogüvenlik odacığında gerçekleştirilmelidir.
- Hiçbir zaman ağızla çekerek pipetleme yapılmamalıdır.
- Bakterilerin çöktürülmesi sırasında aerosollerin önlenmesi için hava geçirmez kapaklı sepetleri olan soğutmalı santrifüjlerin kullanılması önerilmektedir.
- Kontamine bir sıvı dökülecek olursa %2,5'lik hipo-klorit çözeltisi ile temizlenmelidir.
- Tüpler çevre güvenliğine uygun şekilde atılmalıdır.

Saklama Koşulları:

2 ila 8°C'de saklayınız.

Bozulma Belirtileri:

Ekim öncesi besiyerinin rengi sarıya ya da yeşile dönmüşse kullanmayınız.

Örnek Hazırlama:

Löwenstein-Jensen, Middlebrook Besiyeri, **TK MEDIA** veya **TK ANTI TB & PNB KIT** ile incelemeye alınabilir. Mikroskopi ile aside dirençli boyanan basil (ARB) pozitif olduğu saptanmış örneklerde zaman kazanmak için doğrudan duyarlılık testi ve tiplendirme yapılabilir.

Önerilen Uygulama:

Ekimler düzey II biyogüvenlik odacığında yapılmalıdır.

Verilen Malzemeler:

Ürün 15'lik setler halinde karton kutularda sunulmaktadır. Her set 1 **TK MEDIUM**, 1 **TK PNB**, 1 **TK INH**, 1 **TK RIF**, 1 **TK STR**, 1 **TK EMB**, 1 **SUSPENSION TUBE T80** ve 1 **DILUTION TUBE T80** den oluşmaktadır.

Gerekli Ek Malzemeler:

- Düzen II biyogüvenlik odacığı.
- Mikrobiyolojik ekim yapmak için gerekli malzeme ve düzenekler.

Sıcaklık:

Örnek işleme ve ekim oda sıcaklığında yapılmalıdır. İnkübasyonlar 37°C'da gerçekleştirilmelidir.

Zaman Kısıtlamaları:

Örnek işlenmesinden ekime dek geçen sürenin üreme üzerine etkisi belirlenmemiş olmakla birlikte örnek işlendikten hemen sonra ekim yapılması mikobakterilerin üretilme şansını artırabilir.

Uygulama:

Mikobakteri Kültürü Katı Besiyerinde İse:

- Katı, Löwenstein Jensen gibi besiyerlerinde üretilmiş mikobakteri kolonilerinden alarak **SUSPENSION TUBE T80** içerisinde 1,0 Mc Farland bulanıklığında mikobakteri süspansiyonu hazırlayınız. **TK SLC** gibi sıvı besiyerlerinde üretilmiş mikobakteri kültürlerini vorteks ile iyice çalkaladıktan sonra 200µl **SUSPENSION TUBE T80** içerisine aktarınız ve vorteks yardımı ile karıştırınız.



TiBO

İNOVATİF BİYOTEKNOLOJİ ORGANİZASYONU

2. Polikarbonat boncuklu tüpteki süspansiyondan **DILUTION TUBE T80** seyreltim tüpüne 500µL aktararak karıştırarak seyreltiniz.
3. Bir **TK MEDIUM**, birer tane antimikobakteriyel ilaç içeren tüp ve bir **TK PNB** üzerine hasta ve örneğe ait gerekli bilgileri yazınız.
4. Tüplerin kapağını sıra ile açınız.
5. Her tüpe 200µL mikobakteri süspansiyonu ekiniz. Sıvı besiyerini pipet ile birkaç kere çekip vererek mikobakterilerin eşit dağılımını sağlayınız.
6. Kapağı sıkıca kapatınız (**ÇOK ÖNEMLİ**: Besiyerindeki renk değişikliği tüpteki oksijenin tüketilip, CO2 birikmesine bağlı olduğundan kapaklar mutlaka gaz geçirilmeyecek şekilde sıkıca kapatılmalıdır.)

Mikroskopi ile ARB+ olduğu saptanan klinik örneklerden, kültürde mikobakteri üretilmesiz duyarlılık testi ve tiplendirme yapılması olanaklıdır.

NALC-NaOH dekontaminasyon ve yoğunlaştırma yöntemi ile hazırlanmış örnekler **TK MEDIUM** ve çeşitlerine ekmeye uygundur. Ekilecek işlenmiş örneğin son pH'ı 7,0 ve 7,8 arasında olmalıdır. Dekontaminasyon ve yoğunlaştırma işlemi için **MYCOPROSAFE**, **DECOMICS** veya **DECOCENT** kullanılması önerilir. Bu kitler ile hazırlanan örneklerde uygun pH kolayca ayarlanır. Ekimler düzey II biyogüvenlik odacığında yapılmalıdır. Doğrudan tiplendirme yapıldığında kültür amacı ile **TK MEDIUM** besiyerine ekim yapılmış olur ancak **TK MEDIUM** da kontaminasyon oranı seçici besiyeri **TK SLC** den yüksek olabileceğinden **TK SLC** ye de ekim yapılması önerilir. **TK MEDIUM**, antitüberküloz ilaç içeren tüpler ve **TK PNB** de kontaminasyon olursa **TK SLC** de üretilen mikobakteriden işlemler tekrarlanabilir.

ARB+ klinik örneklerden doğrudan duyarlılık testi ve tiplendirme uygulaması:

1. Klinik örneğin dekontaminasyon ve konsantrasyon işlemini tercihen **DECOMICS**, **DECOCENT** veya **MYCOPROSAFE** kullanılarak ekime hazırlayınız. (**DECOMICS**, **DECOCENT** veya **MYCOPROSAFE** kullanıyorsanız kullanım yönergelerinde önerilen uygulamayı yapınız).
2. Yukarıda yazılı işlemleri üçüncü basamaktan başlayarak uygulayınız.

İnkübasyon:

Tüpleri standart bir 37°C inkübatöre veya **MYCOLOR TK** ya yerleştiriniz. **MYCOLOR TK** kullanıyorsanız hasta ve örneğe ait bilgileri kaydediniz. Programda duyarlılık ve tür saptama seçeneğini seçiniz.

Sonuçların Değerlendirilmesi:

Gözle Değerlendirme:

Laboratuvarınızda **MYCOLOR TK** bulunmuyor ve tüpler standart 37°C inkübatörde bekletiliyorsa tüplerdeki üreme gözle kolayca değerlendirilebilir. Tüplerdeki renk değişikliği günlük olarak kontrol edilmelidir.

Besiyerlerinin orijinal kırmızı renginin sarıya dönmesi mikobakteri üremesini gösterir. Test, **TK MEDIUM** tüpü sarıya döndüğü zaman değerlendirmeye alınmalıdır. Bu sırada **TK PNB** kırmızı kalmışsa bu mikobakteri türünün *M. tuberculosis* complex grubuna ait olduğunu gösterir. Eğer **TK MEDIUM** sarıya döndüğünde **TK PNB** de sarıya dönmüşse bu mikobakterinin tüberküloz dışı bir tür (MOTT) olduğunu gösterir ("Yöntemin kısıtlı yanları"na bakınız). PNB bazı mikobakteri türlerinin üremesini yavaşlatabilir. Eğer **TK MEDIUM** rengi sarıya döndüğünde **TK PNB** kırmızı ise kesin sonucu vermeden önce 48 saat daha **TK PNB** de üreme olup olmadığının gözlenmesi önerilir. Eğer **TK MEDIUM** sarıya döndüğünde antimikobakteriyel ilaç içeren bir tüp sarıya dönmüşse bu mikobakterinin o ilaca dirençli, kırmızı kalmış ise duyarlı olduğunu gösterir. Mikobakteri suşunda bazen kısmi direnç olabilir. Bu nedenle **TK MEDIUM** rengi sarıya döndüğünde ise kesin sonucu vermeden önce 48 saat daha ilaç içeren tüplerde üreme olup olmadığının gözlenmesi önerilir. Tüplerden herhangi birinde rengin yeşile dönmesi kontaminasyonu gösterir.

MYCOLOR TK ile değerlendirme:

Tüplerdeki renk değişikliği **MYCOLOR TK** tarafından otomatik olarak izlenmekte ve sonuç size sistem tarafından bildirilmektedir.

Çok Önemli:

Besiyerlerindeki renk değişikliği sadece üremenin erken saptanmasını ve üreyen mikroorganizmanın türü hakkında bir öngörü elde edilmesini sağlar. Renk değişikliği görülen tüplerden örnek alınarak yayma hazırlanmalı ve aside dirençli boyama yapıldıktan sonra mikroskop ile incelenmelidir. Bu şekilde kültürde üreyen mikroorganizmanın mikobakteri veya başka mikroorganizma olup olmadığını belirlenmelidir. Kesin sonuç bu konuda deneyimli bir kişi tarafından mikroskopla inceleme sonrasında verilmelidir.

Kalite Kontrol:

Kalite kontrol için aşağıdaki mikroorganizmalar kullanılır ve ekim ve 37°C'da inkübasyon sonrası karşılarında belirtilen renkler elde edilir:

<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra:	TK MEDIUM	Sarı
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra:	TK INH	Kırmızı
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra:	TK RIF	Kırmızı
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra:	TK STR	Kırmızı
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra:	TK EMB	Kırmızı
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra:	TK PNB	Kırmızı
<i>Mycobacterium smegmatis</i> :	TK MEDIUM	Sarı
<i>Mycobacterium smegmatis</i> :	TK INH	Sarı
<i>Mycobacterium smegmatis</i> :	TK RIF	Sarı
<i>Mycobacterium smegmatis</i> :	TK STR	Kırmızı
<i>Mycobacterium smegmatis</i> :	TK EMB	Kırmızı
<i>Mycobacterium smegmatis</i> :	TK PNB	Sarı

Dirençli *M. tuberculosis* WHO koleksiyon suşları

TK INH, TK RIF, TK STR, TK EMB

sonuçları ile uyumlu olarak sarı ya da kırmızı

Ekim yapılmamış besiyeri:

WHO

Kırmızı

Yöntemin Kısıtlı Yanları:

Dekontaminasyon ve yoğunlaştırma işlemi sonunda örneğin pH'sı 7.5 ± 0.2 olmalıdır. NaOH tarafından oluşturulan yüksek pH nötralize edilemezse, bu tür örneğin ekimi sonrasında **TK MEDIUM**, ilacı besiyerleri ve **TK PNB** nin rengi kırmızıdan mora dönebilir. Bu durum mikobakterinin üremesini yavaşlatabilir veya tamamen engelleyebilir. pH'ın iyi ayarlanması için fosfat tamponu ile nötralizasyon ve santrifüj işlemi ile çöktürme sonrasında üst sıvı tamamen dökülmelidir. Örnek işleme için **DECOMICS**, **DECOCENT** veya **MYCOPROSAFE** kullanılması ve böylece uygun pH'nın sağlanması önerilir.

Performans Özellikleri:

TK ANTI TB & PNB KIT kullanarak mikobakterilerin antimikobakteriyel ilaçlara duyarlılıklarının tespiti ve *M. tuberculosis* complex ve MOTT ayrımı klasik besiyerleri ile yapılabildiği kadar kısa zamanda yapılabilmektedir. Bu süre mikobakteri türünün üreme hızına bağlı olmak üzere 2 ila 14 gün arasında değişmektedir.^{1,2}

Raf ömrü:

Altı ay.

Kaynaklar:

1. Kocagöz T., A. Alp, A. Albay. A new rapid non-radioactive medium for culturing mycobacteria that also enables visually differentiation of mycobacterial growth from contamination. American Society for Microbiology, 100th General Meeting, Los Angeles. May 21-25, 2000.
2. Kocagöz T., Altın S., Türkyılmaz Ö., Taş İ., Yuca P., Bolaban D., Yeşilyurt E., Öktem S., Aytekin N., Şınık G., Mozioglu E., Silier T. The efficiency of TK Culture System in the diagnosis of tuberculosis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012 72(4):350-357.

Üretici Firma:

İnovatif Biyoteknoloji Organizasyonu Tic. Ltd. Şti.

Ahmet Yesevi Mah. Kerem Sok.

No:9/1-7

Pendik 34903

İSTANBUL, TÜRKİYE

Katalog Numarası:

TK250-251

