

KLASİK TANI YÖNTEMLERİNDE YAŞANAN SORUNLAR

Prof.Dr. Suna GEDİKOĞLU

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Görükle, Bursa

Tüberküloz hastalığının tanı, tedavi ve kontrolü pek çok disiplini ilgilendirmekte, tıptaki gelişmelere paralel olarak, farklı görüş ve uygulamalar olabilmektedir. Son yıllardaki en büyük değişikliğin, bakteriyolojik tanı açısından olduğunu söylemek yanlış olmaz. Önceleri, direkt mikroskopi ile basilin gösterilmesi, klinik bulgular ile uyum halinde tanıda yeterli görülmekte iken, 1950'li yıllardan itibaren kültür yöntemleri de önem kazanmaya başlamış, zamanla mikobakteriyoloji laboratuvarlarının, hastalığın tanı ve tedavisinin yönlendirilmesinde önemli sorumlulukları olduğu yadsınamaz hale gelmiştir.

Mikobakteriyoloji laboratuvarı; mikobakterinin mikroskopik olarak gösterilmesi, izole edilmesi, tür düzeyinde tanımlanması, ilaç duyarlılığı ve moleküler yöntemler ile tanı ve tedaviye yol göstermelidir. Bu yöntemlerin hepsi rutin bakteriyolojik işlemlerin dışındadır. Doğru olarak çalışma ve yorumlanması; deneyim, zaman, farklı mekan gibi pek çok değişik parametreye bağlıdır.

Lepa basili Mycobacterium genusunda yer alan ilk organizma olarak Hansen (1868) tarafından tarif edilmiş, R. Koch (1882) memeli tüberküloz basiliini tanımlamıştır. R Koch, bakteriyi mikroskopik olarak göstermiş, saf kültür olarak izole etmiş, laboratuvar hayvanlarında hastalığı oluşturmuş ve etken - hastalık ilişkisini ortaya koyarak Koch Postulasını tarif etmiştir. Strauss ve Gamelia (1891) M avium, Frothingam (1895) M paratuberculosis'i, Theobald Smith (1896) M tuberculosis ve M bovis'i, memeli tüberküloz basiliinin 2 farklı türü olarak tanımlamıştır. Tüberküloz basili dışındaki türlerin insanda hastalık yapabileceği görüşü, 1950'li yılların başlarında ortaya çıkmıştır. Runyon (1959), M tuberculosis ve M bovis dışında kalan mikobakterileri klasifiye etmiş, ışıpta ve karanlıkta pigment oluşturma, üreme süresi ve koloni morfolojisi gibi çeşitli özelliklerini göz önüne alarak bir sistem içinde incelenmesini sağlamıştır. Moleküler testlerin yaygınlaşması ile daha doğru tanıya ulaşmak olası olmakla beraber, Runyon sınıflaması pratikliği nedeniyle günümüzde de kullanılmaktadır.

Tüberküloz hastalığı, kalkınmış ülkelerde önemi yitirmiş iken, 1990'lı yıllarda HIV/AIDS epidemisine bağlı olarak tekrar önem kazanmış ve buna bağlı olarak hastalık çeşitli boyutları ile irdelenerek, sorunlar ana başlıklar altında toplanmıştır. Sürveyans, salgın kontrolü, hastaların tedaviye uyumunun takibi ve eğitim gibi konular yanında, laboratuvar çalışmaları ve yapılması gerekenler çok önemli bir bölümü oluşturmakta, direkt tanı yanında, mutlaka kültür ve ilaç duyarlılıklarının çalışılması, ayrıca M tuberculosis kompleks tanımının en erken şekilde yapılmasının gerekli olduğu vurgulanmaktadır.

Klasik tanı yöntemlerinde yaşanan sorunları irdelemeden, laboratuvar çalışma koşullarına değinmek yararlı olacaktır. Geçmişte, üstünde pek durulmayan çalışma koşulları ve çalışanların güvenliği konularına, günümüzde çok önem verilmektedir. Amacı başta çalışanları korumak olmakla beraber, bunun yanında, laboratuvar içi çapraz kontaminasyonu kontrol etmek, uygun santrifüj kullanımı ile basili yitirme şansını azaltmayı da hedeflemektedir. Ülkemiz koşulları açısından bakıldığında mikobakteriyoloji laboratuvarlarının, önerildiği gibi ayrı bir mekanda yapılandırılması; ayrı ekipman, teknik eleman gibi gereksinimleri nedeniyle pek çok kurum için sorun oluşturabilmekte, dolayısıyla sorunlarımızın başında yer almaktadır.

Bir laboratuvar hizmetinin yeterliliği, çalışılan örneğin kalitesi ile doğrudan ilgilidir. Uygun olmayan örnekle yapılan çalışma, elde edilen sonucun doğruluğunu, dolayısıyla, klinisyenin laboratuvar hizmetlerine güvenle bakışını etkilemektedir. Hasta örneğinin doğru seçilmiş, uygun taşıyıcıya kurallarına uyularak alınmış ve laboratuvara gönderilmiş olması gerekir. Günümüzde bu olumsuzluklar fark edilmiş olup, çeşitli şekillerde çözümüne çalışılmaktadır. Ayrıca klinisyen-laboratuvar iletişimindeki gelişmeler, laboratuvar çalışmasının başarısını arttırmaktadır. Tüberküloz örnekleri toplamakta kullanılan çoklu kullanımlık cam kapların özel şekilde yıkandıktan sonra steril edilmesi gerekir. Mikroskopik incelemede ise yeni, temiz, tek kullanımlık lam kullanılmalıdır. Aksi takdirde yanlış pozitif sonuç elde edilebilir. Uygulamada her laboratuvarın bu hususlarda gerekli hassasiyeti gösterebildiğini söylemek zordur. Oysaki, mikroskopik tanı, bakteriyi izole etmeye oranla sensitivitesi düşük bir yöntem olsa da; erken tanı sağlaması, üremeyi doğrulaması, tedavinin izlenmesi bakımından çok önemlidir.

Modern tüberküloz kontrol programlarında, mikroskopik tanı halen önemini korumakla beraber, etken mikroorganizmanın spesifik tanısının yerini almamaktadır. Bu nedenle bakteri kültür yöntemleri ile saptanmalıdır. Kültür yöntemlerinde son yıllarda olan hızlı gelişmeler bakterinin izolasyon ve M tuberculosis kompleks ayrımını kolaylaştırmaktadır. M tuberculosis'in izolasyonu için çeşitli besiyerleri geliştirilmiştir. Geleneksel olarak kullanılan bazı besiyerleri, yumurta – patates veya serum – agar içeriklidir ve hazırlayan kişinin deneyimini gerektirir. Yumurtalı besiyerlerinin en yaygın kullanılanları, Lowenstein-Jensen ve American Trudeau Society (ATS) besiyerleridir. Agar içerenler, Dubos oleic acid-albumin agar, Middlebrook 7H-10 ve 7H-11 agar'dır. Farklı türlerin üremesine kolaylık sağlaması bakımından, primer kültürde iki farklı besiyerinin birlikte kullanılması önerilmekte, geçmişte pek yapılmayan bu uygulama günümüzde kabul görmüş bulunmaktadır.

Bir besiyerinin kalitesi; içerdiği maddelerin saflığı, inhibitör maddelerin konsantrasyonu, hazırlık ve sterilizasyon aşamasındaki dikkat, pH, ışığa maruz kalma, saklama koşulları ve süresi gibi değişik faktörler ile ilişkilidir. Örneğin, Middlebrook besiyerlerinin hazırlığı sırasında aşırı ışık ve ısı toksik formaldehitlerin oluşmasına neden olabilir. Bir mikrobiyoloji laboratuvarının temel standartları içinde, bulunması gereken özellikler, mikobakteri laboratuvarları içinde geçerlidir. Besiyerlerinin hazırlığında kullanılan tüm cam malzemenin çok temiz ve steril olması, kullanılan malzemenin saf ve taze olması yanında, hazırlık odasının da, trafikten uzak, tozsuz, hava akımı olmayan, uygun çevre temizlik ve dezenfeksiyonu yapılan bir mekan olması gerekir. Isıya duyarlı maddelerin ilavesi sırasında kesin aseptik tekniklere uymak gereklidir. Lowenstein-Jensen besiyeri hazırlığı için özel kagülatörlere gereksinim vardır.

Ekilmiş besiyerlerinin inkübasyonu sırasında %10 oranında artırılmış CO₂ üremeyi hızlandırmaktadır. Bu koşullar özel plastik torbalar ile sağlanabilmekle birlikte, çok materyel ile çalışıldığında özel inkübatörler gerekli olmaktadır. Ticari sıvı besiyerlerinde bu koşullar sağlanabilmektedir.

Mikobakterilerin laboratuvar çalışmalarının en güç yönlerinden birisi, geç üremeleridir. Konvansiyonel laboratuvar yöntemlerinde, izolasyondan sonra,

identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık testleri için geçen süre de eklendiğinde, zaman çok uzamaktadır. Dolayısıyla, klinisyene özellikle antibakteriyel duyarlılık için yardım edilebilme şansı azalmaktadır.

Tüberküloz basili izole edilebilmiş ise, çok sayıdaki mikobakteri türünün tanımlanması için bir seri test uygulanması gerekir. Mikobakterilerin taksonomisi ile ilgilenen uluslar arası bir çalışma grubu olan International Working Group on Mycobacterial Taxonomy (IWGMT) 1980'li yıllarda, mikobakterilerin birkaç anahtar test kullanarak, spesifik laboratuarlarda sınıflandırılmasını önermiş, elde edilen sonuçlar, o günün koşulları ile saprofitler ile patojen türlerin ayrımının sağlamak yönünden yeterli görülmüştür. Bu amaçla üreme hızları, karanlık veya ışıқта pigment oluşturmaları yanında niasin testinin yapılması önerilmiştir. Ancak pigment oluşumunun izlenmesi de bazı kurallara bağlıdır. Pigment oluşumunu izlemek için, taze kültür bir saat kadar parlak ışıқта tutulmalı, bu sırada kapak gevşetilmeli, bir gece daha inkübe edildikten sonra, renklenirse fotokromojen olarak değerlendirilmelidir. Sub kültürler 25, 37, 45°C'da inkübe edilerek, 5 gün her gün, daha sonra haftada bir izlenerek değerlendirilmelidir. Bu yöntem de zaman aldığı gibi, tek test ile sonuca gitme şansıda bulunmamaktadır. Barksdale ve ark (1977) klinik olarak önemli olan mikobakterileri 12 adımda yapılan bir grup test ile sınıflandırmışlardır. Bu amaçla kullanılan testler; üreme hızları, karanlık ve ışıқта pigment oluşumu, niasin oluşumu, nitrat redüksiyonu, katalazın semikantitatif tayini, katalazın 68°C'da 20 dakika stabilizasyonu, tween 80 hidrolizi, 3 günde tellüritin redüksiyonu, arilsülfataz, %5 NaCl içeren besiyerinde ve MacConkey besiyerinde üremenin araştırılması gibi değişik testlerin yapılmasını gerektirmektedir. Test sonuçları bir formüle uyarlanarak tiplendirme sağlanmaktadır. Çok büyük bir emek harcanmakla beraber, sonuç itibariyle tüm türlerin tanımlanması mümkün olamamaktadır.

Günümüzde çeşitli nedenlerle uygulanması çok azalmış olmakla beraber, geçmişte, çeşitli amaçlarla deney hayvanı kullanılmıştır. Ancak, kobyada *Coccidioides immitis*, *Brucella* türleri, salmonellalar ve bazı streptokoklar, gross incelemede tüberkülozun oluşturduğu lezyonlardan ayrılamayan bir görüntü oluşturabilir veya insan patojeni olduğu halde bazı nontüberküloz mikobakteriler ve dirençli basiller hiç patoloji oluşturmayabilir. O nedenle bütün şüpheli patolojik

değişikliklerin mikroskopi ve kültür ile konfirme edilmesi gerekir. Bu durum, ayrı bir işgücü ve ekonomik kayıp yanında, bulaş riski açısından da göz ardı edilmemelidir.

Mikobakteri izole edilip, idantifikasyonu yapılabilmiş ise, bir sonraki aşama antibakteriyel duyarlılığının çalışılmasıdır. Bu işlemin klasik yöntemler ile yapılması, bir seri problemi de birlikte getirmektedir. Çok sayıda tüp ile çalışılması, besiyerinin taze hazırlanması, ancak hazırlık veya inkübasyon aşamasında antibiyotik potensinin düşmesi gibi nedenlerle yanlış sonuçlara neden olabildiğini unutmamak gerekir.

Bugünkü bilgilerimizin ışığında, yukarıda özetlenenleri değerlendirecek olursak; konvansiyonel yöntemler ve çalışma koşulları bulaş riski olan, zaman gerektiren, sonuç yorumlarında doğruya ulaşma olasılığı her zaman kesin olamayabilen testlerdir. Oysaki, standardizasyonda temel amaç doğru sonuç alınmasıdır. Mikrobiyoloji laboratuvarlarının kalite tanımında; örnek kalitesi, yapılan tetkikin klinik uyumu, uygulanan yöntem, personelin bilgi ve deneyimi, kullanılan cihazlar, besiyeri, boya ve çeşitli reaktiflerin standardizasyonu ana başlıkları oluşturmaktadır. Mikobakteriyoloji laboratuvarlarında bunlara ek olarak, öncelikle çalışan kişiler ve çevrenin korunmasına özen gösterilmesi gerektiği vurgulanmaktadır. Mikobakteriyoloji laboratuvarı, yapabileceği işlem aşamalarına göre gruplandırılmalı, laboratuvarın işlevleri ile ilgili eğitimler süregen olarak sağlanmalıdır. Personelin korunmasına yönelik önlemler alınmalı ve periyodik kontrolleri sağlanmalıdır. Elbette, geçmiş deneyimler ve bu günün bilgileri birlikte değerlendirildiğinde, mikobakteriyoloji laboratuvarlarında daha verimli ve yararlı çalışmalar yapılması daha kolay olacaktır.

KAYNAKLAR:

1. Salfinger M, Morris AJ. The role of microbiology laboratory in diagnosing mycobacterial diseases. Am J Clin Pathol 1994; 101(suppl 1):6-13
2. Shinnick TM, Good RC. Diagnostic mycobacteriology laboratory practices. Clin Infect Dis 1995; 21:291-299
3. MMWR Recomm Rep 1992;19:5-48

4. Watterson SA, Drobniewski FA. Modern laboratory diagnosis of mycobacterial infections. *J Clin Pathol* 2000; 53:727-732
5. Murray SJ, Barrett A, Magee JG, Freeman R. Optimisation of acid fast smears for the direct detection of mycobacteria in clinical samples. *J Clin Pathol* 2003; 56:613-615
6. Rattan A, Kishore K, Singh S, et al. Evaluation of a safe sputum processing method for detecting tuberculosis. *J Clin Pathol* 1994;47:411-413
7. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, et al. The resurgence of tuberculosis: Is your Laboratory ready? *J Clin Microbiol* 1993;31:767-770
8. Smith DW. Mycobacteria. In: Braude AI, Davis CE, Fierer J, eds. *Microbiology*. Philadelphia: Saunders, 1982:416-424
9. Kubica GP, David HL. The Mycobacteria. In: Sonnenwirth AC, Jarett L, eds. *Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis*. Eighth ed. St Louis: The Mosby Company, 1980:1693-1730
10. Gradmann C. Robert Koch and the white death: from tuberculosis to tuberculin. 2005 www.sciencedirect.com