

NON-MOLEKÜLER TEKNİKLERİN TANI AMAÇLI KULLANIMLARI

Yrd.Doç.Dr.Alpaslan ALP

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AB Dalı,
ANKARA

Tüberküloz kontrolünde anahtar faktörler hızlı tanı, etkili tedavi ve bulaşı önlemektir. Hasta kişilerin tüberküloz basilini bulaştırmalarını önleyebilmek için, tüberküloz tanısının kısa sürede konması ve zaman kaybetmeden tedaviye başlanması gerekmektedir. Bu nedenle tüberküloz tanısının hızlı bir şekilde konması, tüberkülozla savaş programının önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Tüberküloz tanısında kullanılan yöntemler temel olarak, aside dirençli boyama yöntemleri sonrasında mikroskopik inceleme ile basilin görülmesi ve bakterinin çeşitli sıvı veya katı besiyerlerinde üretilerek tanımlanması esasına dayanmaktadır. Mikroskopik incelemede aside dirençli basilin görülebilmesi için örneğin mililitresinde en az 5000 kadar bakteri bulunması gerekmektedir. Kültür ile örnekteki birkaç canlı bakterinin bile gösterilebilmesi mümkündür, ancak kolonilerin katı besiyerinde gözle görülebilir hale gelmesi 4-6 hafta kadar sürebilmektedir. Bu nedenle tüberküloza yakalandığı düşünülen hastaların tanımlarını sağlayacak, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, hızlı sonuç veren, uygulaması kolay ve pahalı olmayan laboratuvar yöntemlerinin günlük kullanıma girmesi önemli bir gereksinim haline gelmiştir.

Tüberküloz tanısında kullanılan yöntemler direk ve indirek yöntemler olarak ikiye ayrılabilir. Direk yöntemler mikobakterilerin veya ürünlerinin saptanması esasına dayanırken, indirek yöntemler tüberküloza karşı konakta oluşan immün yanıtın ölçülmesi esasına dayanır.

Mikroskopik İnceleme: Klinik örneklerde aside dirençli basil saptanması amacıyla kullanılan en basit, ucuz ve hızlı yöntemdir. Boyalı yayma preparatların mikroskopik incelemesinde aside dirençli basillerin görülebilmesi için örneğin mililitresinde en az 5000 basilin olması gereklidir. Özellikle tüberkülozun endemik

olduğu bölgelerde, hızlı sonuç alınabilmesi nedeniyle tanıda vazgeçilmez bir yöntemdir. Mikroskopik inceleme sonuçlarını etkileyebilecek faktörler örneğin türü, yaymanın kalınlığı, boyama sırasında dekolorizasyon süresi ve incelemeyi yapan kişinin tecrübesidir.

Kültür Yöntemleri: Günümüzde tüberküloz tanısında altın standart olarak kabul edilen yöntemler, kültür yöntemleridir. Bu amaçla yumurta bazlı veya agar içerikli katı besiyerleri kullanılabildiği gibi, sıvı besiyerleri de kullanılabilmektedir. Hızlı tanı sağlayabilmek amacıyla sıvı besiyerlerinin yarı otomatize cihazlarda kullanıldığı çeşitli sistemler mevcuttur. Hangi yöntem kullanılırsa kullanılsın, kültür yöntemlerinin verimliliğini etkileyen en önemli faktör, kültür öncesinde gerçekleştirilen dekontaminasyon-homojenizasyon işleminin başarılı bir şekilde yapılmasıdır. Kültür yöntemlerinin en önemli avantajları, mikobakteri canlılığını doğrudan gösterebilmeleri ve bakteri izolatu ile duyarlılık tesbiti, identifikasyon, genotiplendirme gibi ek testler yapılabilmesine imkan sağlamalarıdır. Kültür amacıyla günümüzde en yaygın olarak kullanılan katı besiyeri Lowenstein-Jensen besiyeri, sıvı besiyeri sistemi ise Bactec 460 radyometrik sistemidir. Lowenstein-Jensen besiyeri, laboratuvar şartlarında kolayca hazırlanabilmesi ve ucuz olması nedeniyle birçok merkez tarafından tercih edilmektedir. Bactec 460 radyometrik sistemi hızlı ve güvenilir tanı sağlaması nedeniyle altın standart olarak kabul görmüş bir sıvı besiyeri sistemidir. Ancak inokülasyon öncesi şişenin ön okutma işlemi ve haftada üç kez rutin okutma işlemleri nedeniyle iş yükünün fazla olması, kültür şişeleri arasında çapraz kontaminasyon riski, radyoaktif materyallerin kullanımına ve yok edilmesine ilişkin problemler, cihaz içinde okutmalar sırasında aerosol oluşma riski, koloni morfolojisinin belirlenememesi, karışık kültürlerin tanımlanmasında zorluk çekilmesi ve enjektörlerin yoğun kullanımına bağlı olarak laboratuvar çalışanlarının iğne kazaları bakımından sürekli risk altında bulunmaları, en önemli dezavantajlarıdır.

Middlebrook katı ve sıvı besiyerleri, hazırlanmaları daha zor olduğundan ve hazır satın alınmaları durumunda da daha pahalı olduklarından, daha az sıklıkla kullanılmaktadırlar. Bununla birlikte, özellikle duyarlılık testlerinde Lowenstein-Jensen besiyerine göre daha güvenilir ilaç konsantrasyonları sağladıklarından, tercih edilmektedirler. Middlebrook katı besiyerleri, mikrokolonilerin erken

dönemde saptanabilmesi amacıyla kullanılabilirler. Bu amaçla özellikle antibiyotik içeren selektif 7H11 besiyeri tercih edilmektedir. Bu yöntemle besiyerinde koloni oluşumu bir hafta içinde mikroskopik olarak saptanabilmektedir. Ancak rutin tanı laboratuvarlarında çok tercih edilen bir yöntem değildir. Hızlı bir tüberküloz tanı sistemi olan TK kültür sistemi, yeni geliştirilmiş olan bir tanı yöntemidir. Bu sistemde izolasyon için kullanılan TK besiyeri, çoklu renk indikatörleri kimyasından yararlanılarak hazırlanmış, mikobakterilerin üremesini erken saptayan bir besiyeridir. Ekilen örnekte mikobakteri bulunması durumunda, inkübasyon süresince mikobakterilerin ürettiği metabolitlere ve enzimlere bağlı olarak TK besiyerinin orijinal kırmızı rengi sarıya, diğer bakteri veya fungal türlerin varlığında ise yeşile dönmektedir. Bu renk değişimi, kolonilerin görünür hale gelmesinden çok daha önce gerçekleşmektedir. Renk değişimi hem gözle, hem de otomatik kültür sistemi MYCOLOR TK ile izlenebilmektedir. TK kültür sistemi tüberküloz tanısında rutin olarak kullanılabilecek pratik, hızlı ve güvenilir bir yöntemdir.

Otomatize bir mikobakteri tanı sistemi olan MGIT 960 sistemi, floresans veren bir indikatörün bulunduğu tüplerde bakterilerin üretilmesi esasına dayanmaktadır. Mikobakteriler üredikçe tüpteki oksijenin tüketilmesine bağlı olarak indikatör serbest kalmakta ve floresans açığa çıkmaktadır. Açığa çıkan floresans cihaz tarafından otomatik olarak ölçülmekte ve sonuçlar verilmektedir. MGIT 960 sisteminin kısa sürede sonuç vermesinin yanında en önemli avantajları, iğne veya benzeri riskli gereçlere ihtiyaç duyulmaması ve radyoaktif madde kullanılmamasıdır. Bu nedenle bu sistem bazı merkezlerde Bactec 460 radyometrik sistemine bir alternatif olarak kullanılmaktadır.

MB/BacT Alert sistemi, besiyerindeki karbondioksit miktarının kolorimetrik olarak saptanması esasına dayanan bilgisayarlı bir sistemdir. Her şişenin tabanında bulunan silikona gömülü kolorimetrik sensör, besiyerinde bulunan mikobakterilerin oluşturduğu çözünmüş karbondioksit değişimine ve bunun sonucunda değişen pH'ya duyarlıdır. Böylece üremenin gerçekleşmesi durumunda pH değişikliği sonucunda kolorimetrik sensör renk değiştirir. Sensörün koyu yeşilden sarıya dönmesi, sonucun pozitif olduğunu gösterir ve bakteriler canlılığını yitirse bile bu renk değişimi geriye dönmez. Bu sistemde radyoaktif madde kullanılmaması

bir avantaj olmakla birlikte, kontaminasyon riskinin biraz daha fazla olması ve Bactec sistemine göre saptama zamanının biraz daha uzun olması dezavantajları mevcuttur.

Tam otomatize bir tüberküloz tanı sistemi olan Myco-ESP II (Extra Sensing Power) kültür sistemi, mikobakterilerin üremeleri sonucu oksijen tüketimine bağlı olarak kapalı şişedeki basınç değişikliklerinin devamlı takip edilmesi ve bilgisayarda grafiksel olarak görüntülenmesi esasına dayanmaktadır. Radyoaktif madde kullanılmaması ve az işgücü gerksinimi nedeniyle tercih edilebilecek bir yöntem olmasına rağmen, Myco-ESP II kültür sistemi henüz rutin uygulamaya girmemiştir.

Fast Plague TB Test: Klinik örneklerden *M. tuberculosis* saptanmasında kullanılabilen fenotipik bir testtir. Örneğin ekildiği katı besiyerine mikobakteriyofajların eklenmesi ve örnekte bulunabilecek mikobakterilerin bu mikobakteriyofajlarla enfekte edilmesi esasına dayanır. Kısa bir inkübasyon süresi sonrasında hızla çoğalan mikobakteriyofajlar, ikinci bir besiyerinde hızlı üreyen nonpatojenik mikobakteri türü ile inkübasyona bırakılır. Bir gecelik inkübasyon sonrasında örnekteki mikobakteri varlığı besiyerinde litik zonların görülmesiyle anlaşılır.

Adenozin Deaminaz Ölçümü: Adenozin deaminaz (ADA) pürin metabolizmasında işlevi olan bir enzimdir ve monosit, makrofaj ve özellikle T-lenfosit gibi birçok hücrenin olgunlaşmasında önemli rol oynar. Plevra, periton, perikard ve beyin omurilik sıvılarında, bu boşluklarda tüberküloz bulunduğu zaman ADA düzeyinin yükselmiş olduğu belirlenmiştir. Bu durum kötü huylu tümörlerin varlığı gibi durumlarda da görülmekle beraber ADA düzeyindeki yükseklik genellikle tüberkülozda olduğu kadar belirgin değildir. Ancak rutin tanıda ADA seviyesinin ölçümü, yeterince özgül bir test olmaması nedeniyle tamamlayıcı bir test niteliğindedir.

Serolojik Testler: *M. tuberculosis* antijenik yapılarının saptanması esasına dayanan serolojik testler, rutin tanı laboratuvarlarında yaygın kullanım alanı bulamamışlardır. Bunun en önemli nedeni, serolojik testlerin duyarlılıklarının düşük olması ve *M. tuberculosis* ile nontüberküloz mikobakteri ayrımının bu

testlerle yapılamamasıdır. Bu testlerde sıklıkla balgam veya idrardaki mikobakteriyel lipoarabinomannan komponentinin saptanmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır.

Tüberküloz Tanısında İndirekt Yöntemler; Antikorların Saptanması: Bu testler de, antijen saptanan testler gibi, rutin tüberküloz tanı laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmamaktadırlar. Özellikle tüberküloz insidansının yüksek olduğu ülkelerde, yüksek seropozitiflik oranı nedeniyle bu tür testlerin tanısallık değeri düşmektedir. Antikor aranması amacıyla çeşitli testlerde kullanılan antijenler arasında lipoarabinomannan, 38 kDa antijen, MBP 64 antijeni ve ESAT 6 antijeni bulunmaktadır.

KAYNAKLAR:

1. Albay A, Kisa O, Baylan O, Doganci L. Evaluation of FASTPlaqueTB for the rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infections. Diagn Microbiol Infect Dis 2003; 46:211-215.
2. Baylan O. Tüberkülozun kültüre dayalı tanı yöntemleri. Mikrobiyol Bul 2005 39:107-24.
3. Del Prete R, Picca V, Mosca A, et al. Detection of anti-lipoarabinomannan antibodies for the diagnosis of active tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis 1998; 2:160-164.
4. Fujiki A: Direct smear examination, p.26-33. In, TB Microscopy. 1998, The Research Institute of Tuberculosis, Japan.
5. Gil-Setas A, Torroba L, Fernandez JL, et al. Evaluation of the MB/BacT system compared with Middlebrook 7H11 and Löwenstein-Jensen media for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. Clin Microbiol Infect 2004;10:224-228.
6. Hale YM, Pfyffer GE, Salfinger M: Laboratory diagnosis of mycobacterial infections: new tools and lessons learned. Clin Infect Dis 2001, 33:834-846.
7. Mejia GI, Castrillon L, Trujillo H, Robledo JA. Microcolony detection on 7H11 thin layer culture as an alternative for rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection. Int J Tuberc Lung Dis 1999; 3:138-142.
8. Piersimoni C, Scarparo C, Callegaro A, et al. Comparison of MB/BacT ALERT 3D system with radiometric BACTEC system and Löwenstein-Jensen Medium for

recovery and identification of mycobacteria from clinical specimens: a multicenter study. J Clin Microbiol 2001; 39: 651-657.

9. Salfinger M, Pfyffer GE: The new diagnostic mycobacteriology laboratory. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994, 13:961-979.

10. Siddiqi SH: Procedure for primary isolation of mycobacteria from clinical specimens. p. II.1-II.13. In BACTEC TB System Product and Procedure Manual 1989, Becton Dickinson, Maryland.

11. Yan JJ, Huang AH, Tsai SH, et al. Comparison of the MB/BacT and BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria from clinical specimens. Diagn Microbiol Infect Dis 2000; 37:25-30.