

## ÖRNEKLERİN İŞLEMLENMESİ VE KÜLTÜR YÖNTEMLERİ

Doç.Dr. Gülden ERSÖZ<sup>1</sup>, Doç.Dr.Gönül ARSLAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>M.Ü Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AB Dalı, Mersin

<sup>2</sup>M.Ü Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AB Dalı, Mersin

Tüberküloz etkeni bakterilerin izolasyonu için klinik örnekler lökosit, eritrosit, vücut sıvıları ve doku gibi organik kalıntılardan arındırmak amacı ile homojenizasyon/dekontaminasyon ve örnekteki bakteri yoğunluğunu artırmak için konsantrasyon işlemi uygulanır.

Homojenizasyon-dekontaminasyon-konsantrasyon işleminde en sık N-Asetil-L-Sistein (NALC) + Sodyum hidroksit (NaOH) ve NaOH (%3-4) gibi yöntemler kullanılmakla birlikte; zefiran-trisodyum fosfat, oksalik asit, setilpridinyum klorid-sodyum klorid gibi farklı yöntemlerden de yararlanılabilir.

### **N-Asetil-L-Sistein(NALC)+Sodyum hidroksit(NaOH) yöntemi**

NALC mukolitik, NaOH dekontaminan ve sodyum sitrat klinik örnekte bulunabilecek ağır metal iyonlarını bağlayarak NALC'ın inaktive olmasını önlemek amacıyla kullanılır.

#### **NALC-NaOH solusyonunun hazırlanması:**

|                 |          |                            |          |             |
|-----------------|----------|----------------------------|----------|-------------|
| <b>% 4 NaOH</b> | <b>+</b> | <b>% 2.9 Sodyum sitrat</b> | <b>+</b> | <b>NALC</b> |
| 50 ml           |          | 50 ml                      |          | 0.5 gr      |

NALC oksijene duyarlı olduğu için bu karışım hazırlandıktan sonra 24 saat içinde kullanılmalıdır. NALC' ın tartım işlemleri sırasında ambalajın ağzı uzun süre açık bırakılmamalıdır.

**Yöntem:**

- Klinik örnek 50 ml'lik polipropilen, dibi konik, burgulu kapaklı steril tüplere (Falkon tüpü) aktarılır ve üzerine klinik örneğin miktarı kadar NALC-NaOH solüsyonu ilave edilir. Örnek 10 ml'den fazla ise en pürülan, mukoid ve kanlı kısmından 10 ml alınmalıdır. Mukoid olmayan örnekler santrifüjde çevrildikten sonra elde edilen sediment dekontamine edilir.
- Örnek + NALC-NaOH karışımını içeren tüpler 30 saniyeyi geçmeyecek şekilde vortekslenir . Tüpler oda ısısında ara sıra elle çalkanarak 15 dakika bekletilir. Bu süre aşılmamalıdır.
- Dekontaminasyon işlemini takiben yapılacak her işlemde asepsi-antisepsi kurallarına uyulmalıdır.
- Süre tamamlandığında nötralizasyon amacı ile Falkon tüpünün 50 ml – işaretine kadar 0,067 M fosfat tamponu (pH 6.8) ilave edilip, karışım el yardımı ile alt-üst edilir ve dekontaminasyon işlemi durdurulur.
- Fosfat tamponu ilave edilmiş tüpler, bakteri yoğunluğunu artırmak için 3000 x g'de 15-20 dakika santrifüj edilir.
- Süpernatant, içinde 1/10-1/50 dilüe edilmiş sodyum hipoklorid bulunan bir kaba boşaltılır.
- Sedimente 1-2 ml steril fosfat tamponu (pH 6.8) veya % 0.2'lik sığır albumin fraksiyon V ilave edilir.
- Resüspanse işlemi uygulanır ve kullanılan kültür yöntemine uygun olarak besiyerine ekilir.
- Ayrıca direkt mikroskopik inceleme için lam üzerine yayma işlemi yapılır.

Normalde steril olduğu düşünülen BOS, vücut sıvıları ve kan gibi örneklerle dekontaminasyon işlemi uygulanmaz. Bu örnekler santrifüj edildikten sonra besiyerlerine ekimleri yapılır. Ancak örnek alımı ve transportu esnasında asepsi-antisepsi kurallarına uyulmamış ise bu örneklerle de dekontaminasyon işlemi uygulanır.

**KÜLTÜR YÖNTEMLERİ**

M.tuberculosis complex, uygun sıvı ve katı besiyerlerinde 35-37 C'de , 7-21 günde ürerler. Kültürler 8 haftaya kadar ürememişlerse negatif sonuç verilir. Mikobakterilerin izole edilmeleri ve çeşitli özelliklerinin incelenmesi amacıyla

kullanılan konvansiyonel besiyerleri katı ve sıvı olmak üzere iki tiptir. Katı özellikteki besiyerleri, yumurta bazlı ve agar bazlı olmak üzere iki bölümde incelenir. Özellikle primer izolasyonda Löwenstein-Jensen (L-J) besiyerinin kullanımı yaygındır. Petragnani ve American Thoracic Society diğer yumurta bazlı besiyerleridir. Agar bazlı besiyerleri 10-12 gün sonra mikroskop altında incelendiğinde koloniler gözlenebilir. Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11 en çok tercih edilen agar temelli besiyerleridir. L-J Gruft, Mycobactosel L-J, Mycobactosel Middlebrook 7H10, Mitchison's selektif 7H 11 antibiyotik ve antifungal içermeleri nedeniyle kontaminasyon daha az sıklıkta gözlenir. Eğer iki katı besiyeri kullanılacaksa besiyerlerinden birinin selektif olması önerilir.

### **KÜLTÜR İŞLEMİ**

- Homojenizasyon-dekontaminasyon-konsantrasyon sonrası elde edilen sediment steril bir pipet yardımı ile alınarak 3 damla kadar L-J besiyerine ekilir ve besiyeri yüzeyine yayılması sağlanır. Ekim yapılan besiyerleri kapakları gevşetilerek 1-5 gün (biriken sıvı kaybolana kadar) yatık konumda bekletilir.
- Middlebrook 7H10 ve/veya 7H11 gibi agar temelli besiyerleri kullanılıyorsa, 1 damla sediment besiyeri yüzeyine iyice yayılır ve her besiyeri CO<sub>2</sub> geçiren plastik torbalara yerleştirilir.
- Hızlı kültür sistemlerine ekim firma önerileri doğrultusunda yapılır.
- M.marinum ve M.ulcerans ile infekte olduğu düşünülen deri ve yumuşak doku örneklerinden izolasyon için 30°C'de , M.haemophilum ile infekte olduğu düşünülen klinik örnekler özel besiyerine ekilir ve 35-37°C'de inkübe edilir.
- Ekim yapılan besiyerleri inkübasyondan 3-5 gün sonra ve takiben haftada bir kez kontrollerine devam edilir.
- Petrideki agar bazlı besiyerleri parafilm ile kapatılarak inkübe edilir ve ters çevrilerek mikroskop altında mikrokoloniler oluşumu ve morfolojik yapısı incelenir.
- Besiyerlerinde üreyen koloniler aside dirençli boyama yöntemlerinden biri ile incelenir.
- AARB pozitif olan izolatların tür tanısı yapılır.

Sıvı besiyerleri içinde yer alan Middlebrook 7H9 ve Dubos tween albumin, mikobakterilerin stok suşlarının subkültürlerinin yapılmasında , duyarlık deneyleri

ve diğ er in vitro deneylerde inokulum hazırlanması amacıyla da kullanılır. Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri genellikle hızlı kùltür sistemlerinde temel besiyeri olarak kullanılmaktadır. Primer izolasyon amacıyla katı besiyerine ilave olarak sıvı besiyerlerinin kullanılması önerilmektedir.

Hızlı kùltür sistemleri içinde yer alan yarı otomatize Bactec 460 TB (Becton Dickinson Diagnostic Instruments, Sparks,MD) sistemi, izolasyon, identifikasyon ve duyarlılık deneylerinin uygulandığı bir sistem olarak uzun yıllardır rutin tanıda kullanılmaktadır. VersaTREK (ESP Culture System - Trek Diagnostics,Inc.,Westlake Ohio), MB/Bact T (bioMerieux, Hazelwood, Mo.) , Bactec 9000 MB (BD Biosciences,Sparks,MD) ve Bactec Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) 960 (BD Biosciences,Sparks,MD) mikobakterilerin tanısı için geliştirilmiş tam otomatize sistemlerdir. Ancak bunlardan Bactec 460 TB ve MGIT 960 için FDA onayı bulunmaktadır. Üreme süresi, oranı ve kontaminasyon sıklığı açısından tam otomatize sistemler arasında önemli bir fark bulunamamaktadır.

#### KAYNAKLAR

1. Benjamin WH, Waites KB, Moser SA. The MB/Bac T is a sensitive method of isolating Mycobacterium tuberculosis from clinical specimens in a laboratory with a low rate of isolation. J Clin Microbiol 2000; 38: 3133-4.
2. Della-Latta P.,Weitzman I.Mycobacteriology. In: Isenberg HD (ed). Essential Procedures for Clinical Microbiology. Washington DC: ASM Press.1998: 169-75,175-83.
3. Della-Latta P. Digestion-decontamination procedures.In: Isenberg HD (ed).Clinical Microbiology Procedure Handbook.Vol 2, 2nd ed. Washington DC:ASM Pres.2004: 7.1.2.1
4. Lillian VL.Solid media for isolation. In: Isenberg HD (ed).Clinical Microbiology Procedure Handbook.Vol 2, 2nd ed. Washington DC:ASM Pres.2004: 7.3.1
5. Drancourt M, Carrieri P, Gevaudan MJ, Raoult D. Blood agar and Mycobacterium tuberculosis: the end of a dogma. J Clin Microbiol 2003; 41: 1710-11.
6. Drobniewski FA, Caws M, Gibson A, Young D. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. The Lancet Infect Dis 2003; 3: 141-7.
7. Manterola JM, Thornton CG, Padilla E, Lonca J, Corea I, Martinez E, Ausina

- V. Comparison of the sodium dodecyl sulfate-sodium hydroxide specimen processing method with the C18-Carboxypropylbetaine specimen processing method using the MB/Bac T liquid culture system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22: 35-42.
8. Metchock BG, Nolte FS, Wallace RJ. *Mycobacterium* In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed. Washington DC: ASM Press. 1999: 399-437.
9. Somoskovi A, Ködmön C, Lantos A, Partfai Z, Tamasi L, Füzy J, Magyar P. Comparison of recoveries of *Mycobacterium tuberculosis* using the automated Bactec MGIT 960 system, the Bactec 460 TB system, and Löwestein-Jensen medium. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2395-7.
10. Strong BE, Kubica GP. *Isolation and Identification of Mycobacterium tuberculosis. A guide for the level 2 laboratory.* Centers for Disease Control. Atlanta, HHS Publication no.(CDC) 81-8390.
11. Whyte T, Hanahoe B, Collins T, Corbett-Feeney G, Cormican M. Evaluation of the Bactec MGIT 960 and MB/Bac T systems for routine detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3131-2.
12. Williams-Bouyer N, Yorke R, Lee HI, Woods GL. Comparison of the Bactec MGIT 960 and ESP Culture system II for growth and detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4167-70.
13. Woods GL. The mycobacteriology laboratory and new diagnostic techniques. *Infect Dis Clin North Amer* 2002; 16: 127-44.