

TÜBERKÜLOZ BASİLİNİN KLASİK YÖNTEMLERLE İDENTİFİKASYONU

Doç.Dr. Süheyla SÜRÜCÜOĞLU

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD,
Manisa

Tüberküloz basillerinin tanımlanmasında kullanılan klasik yöntemler bakterilerin üreme hızına, üreme ısısına, koloni görünümüne, pigment üretimine ve biyokimyasal özelliklerine dayalı yöntemlerdir. Bu yöntemler zaman alıcı ve uygulanması zor olmakla birlikte maliyetleri yeni yöntemlere göre oldukça düşüktür. Tüberküloz basillerinin identifikasyonunda klasik yöntemler altın standart özelliğini halen korumaktadırlar.

A. ÜREME ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

1. Koloni ve Mikrokoloni Görünümü

M. tuberculosis

- Lowenstein Jensen (LJ) besiyerinde veya Middlebrook agarda 370C'de 14-28 günlük inkübasyondan sonra pigmentsiz, düzensiz, kuru, krem renkli koloniler oluşturur.
- Middlebrook 7H10 veya 7H11 agarda 5-10 günlük inkübasyondan sonra oluşan mikrokoloniler mikroskop altında incelendiğinde "yılanvari kordon" görünümü izlenir.
- Petrilere ince dökülmüş agarlı besiyerindeki mikrokoloniler 10X objektif ile mikroskopta incelenmelidir.

M. bovis

- Çok yavaş (disgonik)ürer. LJ'de görünür kolonilerin oluşması için 6-8 haftalık inkübasyon gereklidir.
- En iyi üreyebildiği ortam gliserolsüz %0.4 pirüvatlı LJ'dir. Yumurtalı besiyerinde düzgün veya bazen düzensiz kenarlı, krem renkli, küçük koloniler oluşturur. Middlebrook 7H11 agarda çok küçük, su damlasına benzer koloniler oluşturur.

2. Üreme Hızının ve Pigment Üretiminin Saptanması

Mikobakteriler üreme hızları, tercih ettikleri üreme ısıları ve ışıktaki veya ışık olmadan pigment üretme özelliklerine göre sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırma (Runyon) 1950'li yıllardan beri geçerliliğini korumaktadır. Tüberküloz basilleri yavaş üreyen, nonfotokromojen (veya nonkromojen) koloniler yapar.

Gereçler:

- 1 Middlebrook 7H9 broth veya Dubos Tween broth ve LJ yatık besiyeri
- 2 Steril vidalı kapaklı tüpler (20 X 110 veya 20 X 125 mm)
- 3 Steril plastik çubuklar ve pastör pipetleri
- 4 Besiyerinin üzerini kapatacak büyüklüklerde (yaklaşık 10X15 cm) alüminyum folyo parçaları
- 5 60-W aydınlatma gücünde lamba

Kalite Kontrol:

Aşağıda verilen kontrol suşları ile test ayda bir kez kontrol edilmelidir.

- 1 *M. terrae* ATCC 15755: Yavaş ürer, oda ısısında $\pm$ ürer, ışıktaki veya karanlıkta pigment yapmaz (nonkromojen).
- 2 *M. fortuitum* ATCC 6841: Hızlı ürer, oda ısısında iyi ürer, ışıktaki veya karanlıkta pigment yapmaz (nonkromojen).
- 3 *M. gordonae* ATCC 14470: Yavaş ürer, oda ısısında zayıf ürer, ışıktaki ve karanlıkta turuncu pigment yapar (skotokromojen).
- 4 *M. kansasii* ATCC 12478: Yavaş ürer, oda ısısında çok zayıf ürer, ışıktaki turuncu pigment yapar, karanlıkta pigment yapmaz, ışık testinden sonra pigment oluşumu gözlenir (fotokromojen).

Yöntem:

- Test edilecek koloniler Middlebrook 7H9 broth besiyerine ekilir. Bir çubuk ile tüpün kenarında iyice ezilerek kolonilerin sıvı besiyeri içinde dağılması sağlanır.
- Tüpler vorteks aracılığı ile 10 saniye karıştırıldıktan sonra bir pastör pipeti aracılığı ile altışar damla kültür süspansiyonu alınarak üç ayrı LJ besiyerine ekilir.
- LJ besiyerlerinden iki tanesi besiyerinin tamamını örtecek şekilde hemen alüminyum folyo ile kapatılır. Tüplerin kapakları gevşek bırakılmalıdır.
- Kapalı tüplerden biri oda derecesinde (220-250C), diğer kapalı tüp ile açık bırakılan tüp 370C'de %10 CO₂'li ortamda inkübe edilir.
- Açık tüp haftada bir kez olmak üzere üç hafta süre ile üreme miktarı ve pigment üretimi yönünden incelenir. Üçüncü haftanın sonuna kadar alüminyum folyo açılmaz.
- Koloni rengi kaydedilir. Üreme skoru (0) – (2+) olarak belirlenir (Tablo 1)
- Üçüncü haftanın sonunda folyo açılır. Açılan tüplerde üreyen kolonilerin rengi kaydedilir. Açık tüpler daha fazla ışığa maruz kaldığından bu tüplerde üreyen kolonilerin pigmentleri kapalı olanlara oranla genellikle daha koyudur.

Aynı zamanda oda ısısında üreyen kolonilerin pigmentleri ısı derecesine bağlı olarak daha açık renktedir. Renk tonu kıyaslanmamalı, sadece sarı veya turuncu pigmentin olup olmadığı incelenmelidir.

Tablo 1. Besiyerinde üreme hızı*

37° de	Üreme Miktarı		
Üreme hızı	1. Hafta	2. Hafta	3. Hafta
Hızlı	1+ - 2+		
Orta	± - 1+	2+	
Yavaş	0 - ±	1+	2+

* 0; görünür koloni yok, ±; yüzeyde çok az sayıda küçük kolonilerin görülmesi veya çok hafif pigment oluşumunu düşündüren görünüm, 1+; az sayıda iyi üremiş kolonilerin görülmesi, kolonilerin arasından LJ besiyeri seçilebilir, 2+; çok sayıda iyi üremiş kolonilerin görülmesi, koloniler birbirine çok yakındır veya temas halindedir ve kolonilerin arasından besiyerinin yüzeyi görülemez.

Değerlendirme

- Açık ve kapalı tüplerde üreyen kolonilerde pigment yok (krem rengi); Nonkromojenik
- Açık ve kapalı tüplerde üreyen kolonilerde pigment var (sarı-turuncu); Skotokromojenik
- Işık testi : Açık tüpte üreyen koloniler pigmentli, kapalı tüpte üreyenler renksiz ise kapalı tüpe ışık testi uygulanır. Kapalı tüpte bulunan pigmentsiz kolonilerde, ışıkla karşılaştıktan sonra pigment üretimi var; Fotokromojenik

Bu amaçla besiyeri 25 cm uzaklıkta bulunan 60 W gücündeki lambanın altında bir saat tutulur. Daha sonra başlangıçta tüpün bekletildiği ısıda inkübe edilir. Kapağı gevşek bırakılmalıdır. 24 saatlik inkübasyonun sonunda koloniler pigment oluşumu yönünden yeniden incelenmelidir. Sarı veya turuncu pigment varlığı kaydedilir. Pigmentin koyuluğu değil, varlığı aranmalıdır.

3. Bactec NAP (p-Nitro-a-acetylamino-β-hydroxypropylphenone) Testi
NAP M. tuberculosis complex'in üremesini selektif olarak inhibe eder. Diğer

mikobakteri türleri NAP ile inhibe olmaz veya kısmen inhibe olabilir. Üreme yoksa bakterinin *M. tuberculosis complex*'e ait olduğu düşünülür. Ancak NAP testinin nükleik asit prob, kromotografik yöntemler veya konvansiyonel yöntemler ile doğrulanması önerilmektedir.

İnceleme Örneği

BACTEC 12B besiyeri (Growth index > 50 ise)

Gereçler

- BACTEC 460 cihazı (Becton Dickinson Diagnostic Systems)
- Middlebrook 7H12 (BACTEC 12B) besiyeri (7H9 broth, sığır serum albümini, kazein hidrolizat, katalaz ve 14C işaretli substrat içerir.)
- BACTEC NAP flakonları (5 µg NAP diski taşır).
- Steril tüberkülin enjektörleri
- Pamuk veya gazlı bezli petler, antimikobakteriyel dezenfektan ve %70 etil alkol

Kalite Kontrol Suşları

M. tuberculosis ATCC 27294 ve *M. kansasii* ATCC 35775; *M. tuberculosis*'in growth index'inde (GI) $\geq$ %20 azalma gözlenirken, *M. kansasii*'nin GI inkübasyon sürdükçe yükselen bir eğri çizer.

Yöntem

- BACTEC 12B şişesinde GI 10 olduğunda çukolata agara ekilir, kontaminasyon olmadığı doğrulanır. GI yaklaşık 50-100'e ulaşıncaya kadar besiyerleri günlük olarak okunur ve yayma hazırlanarak ARB'nin varlığı gösterilir.
- 12B şişesinin GI'i 50-100'e ulaştığında, besiyeri iyice karıştırılır. Aseptik koşullarda 1 ml besiyeri NAP flakonuna aktarılır Kalan 3 ml besiyeri kontrol olarak kullanılır.
- GI 100'ü geçen kültürler için NAP testinden önce ekim yapılmamış BACTEC 12B besiyeri (Middlebrook 7H12) ile dilüsyon yapmak gereklidir. Dilüsyon oranları aşağıda gösterilmiştir.

GI Miktarı	Dilüsyon
50-100	Dilüsyon yapılmaz
101-200	0.8 ml
201-400	0.6 ml
401-600	0.4 ml
601-800	0.3 ml
801-999	0.2 ml
999>1 gün	0.1 ml

- Dilüsyon yapıldıktan sonra besiyerinin 1 ml'si NAP flakonuna aktarılır.
- Artan besiyeri kontrol olarak kullanılmak üzere inkübe edilir.
- Flakonun ağzı etil alkolle dekontamine edilir ve iyice karıştırılır.
- Hem inokülasyon yapılan primer izolasyon şişesi (kontrol), hem de NAP flakonları günlük olarak 2-7 gün süre ile okunur, GI kaydedilir.

Değerlendirme:

- Sonuçlar 2-7 gün içinde değerlendirilir. Kontrol şişesinin GI'i artmasına rağmen NAP testi şişesinin GI'i azalıyor veya değişmiyorsa M. tuberculosis kompleks, artış gösteriyorsa tüberküloz dışı mikobakteri (MOTT) olarak değerlendirilir.
- Test sonucu dört günden daha kısa sürede değerlendirilmemelidir.
- M.tuberculosis kompleks dışında diğer mikobakterilerden M. kansasii, M. gastri, M. szulgai, M. terrae ve M. triviale'nin bazı suşları NAP ile kısmen inhibe olabilir. Bu durumda ilk 2-4 günlük okuma sonuçları yanlış değerlendirilebilir. Sonuç vermeden önce inkübasyonun 2-3 gün daha uzatılması bu hatayı önleyecektir.
- NAP testinde optimal inkübasyon ısısı önemlidir. Bazı mikobakteriler (M. marinum, M. chelonae) 300C'de ürer. 370C'de yapılan NAP testinde üremeleri inhibe olur. Bu nedenle yara veya deri örneklerinden üreyen mikobakterilerin ayrımı için NAP testinde inkübasyon ısısı hem 370C hem de 300C olmalıdır.
- Kontrol şişesindeki (orijinal kültür şişesi) günlük GI artmaya devam etmelidir, artış göstermiyorsa NAP sonucu değerlendirmeye alınmamalıdır.
 - o M. tuberculosis kompleks: İnokülasyondan sonra ardışık iki GI'de önemli bir azalma (%20); ilk iki gün hafif, fakat önemli olmayan bir artış ve ardından artışın olmaması veya azalma olması = TB kompleks
 - o Tüberküloz dışı mikobakteri: Günlük GI'in dört gün içinde 400 ve üzerine

çıkması; inoküasyondan sonra ilk 1-2 gün içinde artış olmaması veya hafif bir azalma, iki günün ardından önemli bir artış (%20) olması = Tüberküloz dışı mikobakteri

o Kültürlerin birden fazla mikobakteri türü ile veya diğer bakteriler ile kontamine olması, GI'n yükselmesine neden olur ve yanlış olarak tüberküloz dışı mikobakteri olarak değerlendirilir. Bu nedenle kuşkulu durumlarda ARB ve Gram boyama yapılmalıdır.

B. BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİN İNCELENMESİ

I. Niasin Testi

Bütün mikobakteriler niasin ribonükleotid üretir. Ancak *M. tuberculosis* ile *M. simiae* ve *M. chelonae*'nin bazı suşları niasini nikotinamid adenin dinükleotide (NAD) dönüştürecek enzime sahip değildir. Besiyerinde biriken niasin gösterilebilir. Niasin olumsuz *M. tuberculosis* suşları çok nadirdir. Niasin testi *M. tuberculosis*'in identifikasyonunda tek başına kullanılmamalıdır. *M. tuberculosis* identifikasyonunda sonuçlar nitrat redüksiyonu ve ısıya stabil katalaz testi ile doğrulanmalıdır. Niasin testi ticari olarak hazırlanmış kağıt stripler ile de yapılabilir. İnceleme Örneği : Niasin testi için LJ besiyerinde yoğun olarak üremiş dört haftalık kültürler kullanılmalıdır. Diğer besiyerlerinde yeterince niasin birikmediğinden yanlış negatif sonuç alınabilir. Diğer bakteriler ile kontamine kültürlerde niasin metabolize olduğundan yanlış negatif sonuçlar alınabilir.

Gereçler

1. %4'lük anilin

4 ml renksiz anilin 96 ml %95'lik etanole eklenir. Karıştırılır ve 20-80C'de koyu renk bir şişede saklanır. Solüsyonun rengi sarıya dönüştüğünde kullanılmamalıdır. Anilin karsinojeniktir. İnhalasyonu veya deri ile teması zararlıdır.

2. %10'luk siyanojen bromid eriyiği

Siyanojen bromidin doymuş bir çözeltisidir. Siyanojen bromid kristallerine steril distile su eklenerek hazırlanır. Boşalan şişeler atılmadan önce bol miktarda %10 NaOH ile yıkanmalıdır. Bu çözelti ile çalışırken son derece dikkatli olunmalıdır. Kuru kristaller patlayıcıdır. Ayrıca siyanojen bromid asitle birleştiğinde zehirli siyanür gazı oluşur.

3. Steril vidalı kapaklı tüpler (20 X 110 veya 20 X 125 mm), steril pastör pipetleri ve steril 5 ml'lik pipetler

Kalite kontrol

Pozitif kontrol; *M. tuberculosis* ATCC 25177

Negatif kontrol; MAC ATCC 13950 ve ekim yapılmamış besiyeri

Yöntem

- Dört haftalık ve yoğun üremesi olan LJ kültürleri kullanılmalıdır. Koloni sayısı az olduğunda yanlış negatif sonuçlar alınabilir.
- Besiyerine bir pastör pipeti dolusu steril su veya serum fizyolojik eklenir. Pipet ile koloniler yerlerinden kaldırılıp yana çekilerek suyun besiyeri ile teması sağlanır. Bu işlemin yapılmaması yanlış negatif sonuca neden olabilir.
- Tüpler horizontal olarak oda ısısında bir saat bekletilir. Bir pastör pipeti dolusu geri alınan sıvı temiz bir tüpe aktarılır.
- Tüpe birer pastör pipeti dolusu % 4 anilin ve siyanojen bromid eklenir.
- Kağıt strip yönteminde ise ayıraçlar yerine tüp içine strip konur ve hemen tüpün ağzı kapatılır. Tüp ara sıra çalkalanarak oda ısısında 15 dakika bekletilir.

Değerlendirme : Beş dakika sonra sarı renk oluşması pozitif sonuç olarak kaydedilir. Renk değişikliğinin görülmemesi negatif olarak değerlendirilir. Tüpler atılmadan önce eşit miktarda %10 NaOH eklenmelidir. Kağıt strip yöntemi ile ilgili olarak , beyaz zeminde değerlendirildiğinde sarı renk gözlenmesi pozitif kabul edilir. Kağıt stripler tehlikeli ayıraçların kullanımını gerektirmediğinden ve raf ömürleri uzun olduğundan avantajlıdır. Ancak az miktardaki niasini saptamada duyarlılıkları düşüktür.

II. Nitrat Redüksiyonu Testi

Mikobakteriler nitroredüktaz enzimi üreterek nitratları nitritlere indirgeyebilirler. Nitrat redüksiyonu testi; koloni morfolojisi, üreme hızı ve pigment üretme özellikleri birbirine benzer olan mikobakterileri ayırt etmede değerlidir. *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. szulgai*, bazı saprofit nonkromojenler, *M. smegmatis* ve *M. fortuitum* grubu nitrat redüktaz pozitifdir. Test niasin kağıt strip yöntemi ile de kombine edilebilir.

İnceleme Örneği: LJ veya diğer yumurtalı besiyerinde üreyen 3-4 haftalık kültürler

Gereçler

1. Steril pastör pipetleri
2. M/45 fosfat tampon eriyiği (0.02M, pH 7.0) içindeki nitrat test substratı (0.01M)

NaNO ₃	0.8 g
KH ₂ PO ₄	1.17 g
Na ₂ HPO ₄	1.93 g
H ₂ O	1000.0 ml (final volüm)

pH: 7.0 olmalıdır.

Çözelti otoklavda steril edildikten sonra buzdolabında 1-2 ay saklanabilir.

3. Sulfanilamid'in sudaki %0.2'lik eriyiği

0.1 gram sulfanilamid 50 ml distile suda çözünür. Tam çözünürlük için su banyosu gerekebilir. Çözelti koyu renkli şişelerde, buzdolabında bir aya kadar saklanabilir.

4. N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride'in sudaki %0.1'lik eriyiği
Koyu şişelerde, buzdolabında bir aya kadar saklanabilir.

Kalite Kontrol

Pozitif kontrol; M. tuberculosis ATCC 25177

Negatif kontrol; M. intracellulare ATCC 13950, ekim yapılmamış besiyeri

Yöntem

- Bir öze dolusu koloni 2 ml nitrat substratı içinde ezilir ve elle karıştırıldıktan sonra 350-370C'de iki saat inkübe edilir.
- Sırası ile aşağıdaki ayıraçlar eklenerek karıştırılır.
 - 1 damla konsantre HCl
 - 2 damla %0.2 sulfanilamid
 - 2 damla N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride'in sudaki %0.1'lik eriyiği
- Karışım oda ısısında 5 dakika bekletilir ve pembe-kırmızı renk değişiminin varlığı araştırılır.

Değerlendirme: Pembe-kırmızı renk oluşması pozitif olarak kabul edilir. Bazı laboratuvarlarda renk değişimi kantitatif olarak değerlendirilmektedir. Beklendiğinde renk değişimi kaybolabildiğinden değerlendirme hemen yapılmalıdır.

III. Katalaz Testi

Katalaz hidrojen peroksidi (H₂O₂) su ve oksijene ayırıştırır hücre içi bir enzimdir. Oksijenin oluşumu hava kabarcıklarının ortaya çıkması ile anlaşılır. Katalaz

enziminin bazı formları 680C'de 20 dakika ısıtıldığında inaktive olur. Enzimin ısı ile inaktivasyonu bazı mikobakteri türlerinin ayırt edilmesinde değerli bir tanı yöntemi olarak kullanılmaktadır. Mikobakteri türlerinin identifikasyonunda kullanılan H₂O₂, diğer bakterilerde bulunan enzimin araştırılmasında kullanılan ayıraçtan farklıdır. Hidrofobik ve kümeli olan mikobakterilerin dağılmasını ve enzimin kolayca açığa çıkmasını sağlamak için testte %30 H₂O₂ (Superoxol) ile güçlü bir deterjan olan %10 Tween 80'nin karışımı kullanılır. Ayıraçlar taze hazırlanmış olmalıdır.

İnceleme Örneği : LJ veya Middlebrook 7H10 agarda üreyen gelişmiş mikobakteri kolonileri

Gereçler

1. Middlebrook 7H9 broth
2. 25 X 150 mm büyüklüğünde vidalı kapaklı tüplerde hazırlanmış dik LJ besiyeri
3. %30 Hidrojen peroksit (Superoxol)
4. %10 Tween-80 (90 ml distile su+10 ml Tween 80 karışımı, her ikisi de ısıtılırsa karışımı hazırlamak kolaylaşır).
5. M / 15 fosfat tampon (0.067 M)

Kalite Kontrol

Negatif kontrol: M. tuberculosis ATCC 15177, 22-250C'de hava kabarcıkları oluşur, 680C'de oluşmaz.

Pozitif kontrol: M. fortuitum ATCC 6841, her iki derecede de hava kabarcıkları oluşur.

Yöntem : İki farklı yöntem uygulanır.

a. Isıya stabil katalaz testi

- İki ayrı tüpte test edilecek birkaç mikobakteri kolonisi (2-4 haftalık) 0.5 ml fosfat tampon içine inoküle edilir. Tüplerden biri 680C'lik su banyosunda 20 dakika bekletilir. Diğer tüp kontrol için kullanılır.
- Isıtılmış tüpün oda ısısında soğuması için bekletildikten sonra her iki tüpe de 0.5 ml Tween-H₂O₂ karışımı (1/1 oranda) eklenir ve gaz kabarcıklarının oluşumu gözlenir. Tüpler çalkalanmamalıdır. Negatif sonuç verilmeden önce 20 dakika beklenmelidir.

b. Semikantitatif katalaz testi

- Middlebrook 7H9'a bir öze dolusu koloni inoküle edildikten sonra tüp 370C'de yedi gün bekletilir.
 - İnkübasyonun sonunda vorteks ile 5-10 saniye karıştırılır ve altı damla dik LJ besiyerine aktarılır. Besiyerleri 14 gün 370C'de inkübe edilir. Kapak gevşek bırakılmalıdır.
 - İnkübasyonun sonunda besiyerine 1 ml H2O2-Tween karışımı eklenir (%30 peroksit cildi yakar, eldiven giyilmeli ve deri ile teması olduğunda soğuk su ile yıkanmalıdır). Tüp oda ısısında beş dakika bekletilir.
- Oluşan hava kabarcıklarının yüksekliği ölçülür.

Değerlendirme : Isıya stabil katalaz testi: Çok az miktarda gaz kabarcığının oluşması bile pozitif olarak değerlendirilir. M. tuberculosis ve diğer bazı mikobakteriler 680C'de ısıtıldıklarında katalaz aktivitelerini kaybederler. Semikantitatif katalaz testi:

- Güçlü katalaz reaksiyonu: Hava kabarcıklarının yüksekliğinin ≥ 45 mm oluşması M. kansasii, hızlı üreyen mikobakteriler ve sıklıkla izole edilen skotokromojenler güçlü katalaz reaksiyonu verir.
- Zayıf katalaz reaksiyonu: Hava kabarcıklarının yüksekliğinin < 45 mm olması. M. tuberculosis ve MAC zayıf katalaz reaksiyonu verir
- Negatif sonuç: Hava kabarcığının oluşmaması

Not: Çok eski kültürlerden veya yetersiz üreyen kolonilerden yapılan deneylerden yanlış olarak zayıf reaksiyon sonuçları alınabilir. Kültürler diğer bakteriler ile kontamine ise yanlış olarak güçlü reaksiyon sonuçları alınabilir.

IV. Thiophene-2-Carboxylic Acid Hydrazide (TCH; T2H) İle Üremenin İnhibe Edilmesi

M. tuberculosis ve diğer yavaş üreyen mikobakterilerin çoğu TCH'ye dirençlidirler. M. bovis ise (Bazı INH dirençli suşlar hariç) düşük konsantrasyonda TCH'ye duyarlıdır ve TCH'li besiyerinde üreyemez. Bu test özellikle M. bovis ve M. tuberculosis'in ayırımında yardımcıdır. TCH testi Middlebrook 7H10 agarda uygulanabildiği gibi, antibiyotik duyarlılık testine benzer şekilde BACTEC sistemi kullanılarak da uygulanabilir.

İnceleme Örneği: LJ veya Middlebrook 7H10 agarda üreyen 3-4 haftalık kültürler

Gereçler

1. TCH duyarlılık besiyeri
2. 35-370C, %10 CO2 atmosfer koşulları için inkübatör
3. Steril distile su
4. Bölmeli petri plakları

Kalite Kontrol

Pozitif kontrol: M. bovis ATCC 35734 (10 µg/ml TCH'e duyarlı)

Negatif kontrol: M. tuberculosis ATCC 25177 (dirençli)

TCH duyarlılık besiyerinin hazırlanması

- İki adet 200 ml.lik Middlebrook 7H10 besiyeri hazırlanır. Besiyerleri otoklavda sterilize edilir. Su banyosunda 500C'ye kadar soğutulur.
- Soğumuş besiyerlerinden birinden 5.0'er ml pipet aracılığı ile petri plakların I. ve III. kadrana dökülür.
- Diğer besiyerine 1000 µg/ml'lik TCH stok solüsyonundan 2.0 ml eklenir ve iyice karıştırılır (final konsantrasyon; 10 µg/ml). Bu besiyerinden 5.0'er ml, II. ve IV. kadrana dökülür.
- Besiyerleri karanlıkta (koyu renk kağıda sarılı olarak), 2-80C'de bir ay süre ile saklanabilir.

Yöntem

- İncelenecek mikobakteri kolonilerinin steril distile suda 1 McFarland standardına uygun dilüsyonları yapılır.
- Üçer damla bakteri süspansiyonu, bir kontrol kadrana ve bir TCH'li kadrana inoküle edilir.
- Besiyerlerinin ışıktan korunması için kağıtla kapatıldıktan sonra, inokülumun absorbe olması için oda ısısında yaklaşık bir saat bekletilir. Besiyerleri ters çevrilerek 370C'de %10 CO2'li ortamda üç hafta inkübe edilir.
- İnkübasyonun sonunda kontrol kadranda ve TCH'li kadranda üreyen koloniler sayılır.

Değerlendirme : TCH'li besiyerinde üreyen koloni sayısı, kontrol besiyerinde

üreyen koloni sayısının %1'inden fazla ise dirençli kabul edilir.

V. Pirazinamidaz Testi

Pirazinamidaz enzimi pirazinamidi (PZA) pirazinoik asit ve amonyağa hidrolize eder. Pirazinoik asit besiyerine ferröz amonyum sülfat eklenmesi ile saptanabilir. Bu test *M. marinum*'u *M. kansasii*'den ve *M. bovis*'i *M. tuberculosis*'den ayırt etmede yardımcıdır. *M. tuberculosis* dört gün içinde pozitif sonuç verir. PZA direnci olan *M. tuberculosis* suşlarında ise test sonucu negatiftir. İnceleme Örneği: LJ agar veya Middlebrook 7H10 agarda üreyen koloniler

Gereçler

1. Pirazinamidaz substrat besiyeri:

6.5 g Dubos broth base bir litre distile suda çözünür. Besiyerine; 0.1 g PZA, 2.0 g sodyum pirüvat ve 15 g agar eklenir. Besiyeri ısıtılarak çözündürülür. Vidalı kapaklı tüplere 5.0 ml miktarında dökülür. Tüpler 15 dakika 1210C'de steril edildikten sonra dik durumda agarın katılaşması için bekletilir. Besiyeri 2-80C'de altı ay saklanabilir.

2. %1 ferröz amonyum sülfat: Steril tüpler içinde ve steril distile su ile kullanılmadan hemen önce hazırlanmalıdır.

Kalite Kontrol

Pozitif kontrol: *M. intracellulare* ATCC 13950

Negatif kontrol: *M. kansasii* ATCC 12478

Yöntem

- Bir öze dolusu genç koloni iki adet pirazinamidaz agarın yüzeyine inoküle edilir. Tüplerin kapakları gevşek bırakılarak inkübe edilir.
- Dört gün sonra tüplerden biri çıkarılarak besiyerinin üzerine 1 ml taze hazırlanmış %1 ferröz amonyum sülfat eriyiği eklenir. Oda ısısında 30 dakika bekletildikten sonra agarda pembe bir bant oluşumu gözlenir.
- Negatif tüpler dört saat daha buzdolabında bekletildikten sonra renk oluşumu yönünden yeniden incelenir.

Değerlendirme: Dört saat sonra agar yüzeyinde ayıraç tabakasında pembe renk oluşumu pozitif kabul edilir. Negatif sonuç alındığında ikinci tüpün inkübasyonu

yedi güne uzatılarak test tekrarlanır.

Tüberküloz basillerinin identifikasyonu için uygulanacak algoritma, laboratuvarda kullanılan besiyerine ve olanaklara göre değişkenlik gösterir. Katı besiyeri kullanan laboratuvarlarda üreme hızı, pigmentasyon, koloni görünümü ve mikrokoloni incelemesinden sonra niasin testi, nitrat redüksiyon testi ve ısıya stabil katalaz testinin uygulanması ile *M. tuberculosis* identifikasyonu yapılabilir. *M. bovis* ve *M. tuberculosis* ayrımı için TCH ile inhibisyon testi tercih edilmelidir. BACTEC sistemi kullanan laboratuvarlar için *M. tuberculosis* kompleksin identifikasyonunda NAP testi hızlı ve güvenilirdir. Aynı zamanda sıvı besiyerinde kord faktör oluşumu aranmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Lee LV. Procedures for identification from culture; conventional biochemicals. In Isenberg HD (ed): Clinical Microbiology Procedure Handbook. Washington DC, American Society for Microbiology, 2004; p: 7.6.11-7.6.1.12.
2. Metchock BG, Nolte FS, Wallace RJ. Mycobacterium. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds): Manual of Clinical Microbiology, Washington D.C: ASM Press. 1999: 399-437.
3. Siddiqi S. Procedures for identification from culture; BACTEC NAP Test. In Isenberg HD (ed): Clinical Microbiology Procedure Handbook. Washington DC, American Society for Microbiology, 2004, p: 7.6.3.1-7.6.3.3.

ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TEST YÖNTEMLERİ

Yrd.Doç.Dr. Nuri ÖZKÜTÜK

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD,
Manisa

M.tuberculosis complex'in (MTBC) anti tüberküloz ilaçlara karşı duyarlılığını belirlemede en güvenilir ve en hızlı yöntemi bulmak amacıyla çok sayıda duyarlılık test yöntemi geliştirilmiştir. Bunlar arasında proporsiyon yöntemini temel alan, kültüre dayalı klasik testler en yaygın kullanılan testlerdir. Proporsiyon yönteminde katı besiyeri olarak sıklıkla yumurta bazlı besiyerlerinden Löwenstein-Jensen (LJ), agar bazlı besiyerlerinden Middlebrook (MD) 7H10 kullanılmaktadır. Modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyerinin antimikobakteriyal duyarlılık test yöntemlerinden BACTEC 460TB ve BACTEC-MGIT 960 gibi hızlı ticari sistemler de yaygın olarak kullanılmaktadır. MD7H10'un kullanıldığı agar proporsiyon yöntemi, BACTEC 460TB ve BACTEC-MGIT 960 yöntemleri NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory) tarafından önerilen yöntemlerdir. LJ'nin kullanıldığı proporsiyon yöntemi ise ekonomik olması nedeniyle DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü'nün) tarafından önerilmektedir.

I. MIDDLEBROOK 7H10 BESİYERİNDE PROPORSİYON YÖNTEMİ (AGAR PROPORSİYON YÖNTEMİ)

Prensip: Proporsiyon yöntemi belli bir ilaç konsantrasyonunda (Kritik Konsantrasyon) dirençli olan organizmaların oranının belirlenmesini sağlar. Test edilecek bakteri suşu ilaçlı ve ilaçsız katı besiyerlerine inkübe edilir. İlaçlı besiyerinde üreyen kolonilerin sayısı, kontrol besiyerindeki kolonilerin sayısı ile karşılaştırılır. Belli bir ilaca dirençli basillerin oranı hesaplanıp, test edilen popölasyona yüzdesi olarak belirtilir. Bu oran %1'e (Kritik Proporsiyon) eşit veya daha yüksek ise test edilen suş o ilaca karşı dirençli olarak rapor edilir. NCCLS, katı besiyeri olarak MD7H10 besiyerinin kullanıldığı proporsiyon test yöntemini (Agar Proporsiyon Yöntemi) referans yöntem olarak kabul etmektedir.