

TÜBERKÜLOZ TANISINDA TÜBERKÜLOZ LABORATUVARININ ROLÜ : TANI VE İLAÇ DUYARLILIK TESTLERİNDE RUTİN LABORATUVAR YÖNTEMLERİNİN DEĞERİ

Y. Doç. Dr. Cüneyt Özakin, Prof. Dr. Suna Gedikoğlu

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa

Yirminci yüzyılda tüberküloz ile savaşta oldukça önemli mesafeler alınmış olmasına karşın, dünyamızda hala her yıl 2 ila 3 milyon insan bu hastalıktan yaşamını yitirmektedir. Dünya nüfusunun yaklaşık üçte biri *Mycobacterium tuberculosis* ile enfekte kabul edilmektedir.

Tüberkülozdan korunmanın en etkin yolu hastalığın erken tanınması ve tedavi edilmesidir. Tüberkülozun ön tanısı klinik verilere dayanmakla birlikte, kesin tanı laboratuvar yöntemlerle konulmaktadır. Laboratuvar tanı, etkenin hasta örneklerinde gösterilmesi ve izolasyonu ile sağlanır. Etkenin izolasyonu hastalığın tanısı yanında epidemiyolojik değerlendirmeye ve etkenin duyarlılığının belirlenmesine de olanak sağlamaktadır. Duyarlılığın belirlenmesi de tedavinin yönlendirilmesi açısından oldukça önemlidir.

Tüberkülozun tanısı için rutin çalışan laboratuvarlarının yapılanması Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından belirlenmiş olup, bu 3 aşamadan oluşmaktadır. Birinci

aşama laboratuvarlar, hasta örneklerinde sadece mikroskopik inceleme ile asit ve alkaliye dirençli bakteri (ARB) varlığını araştırmaktan sorumlu iken, 2. aşama laboratuvarlarda bu işleme kültür ve *M tuberculosis* complex'in diğer mikobakterilerden ayırt edilmesi eklenmiştir. En üst düzey laboratuvar olarak düşünülmüş olan 3. aşama laboratuvarlar ise diğer laboratuvarların işlemlerine ek olarak, *M tuberculosis* complex dışındaki mikobakterilerin tür düzeyinde identifikasyonu ve tüberküloz ilaçlarına duyarlılıklarının çalışılması ile görevlendirilmiştir. Ülkemiz bu açıdan değerlendirildiğinde, DSÖ'nün önerdiği laboratuvar derecelendirmesine benzer bir yapılanmanın, Sağlık Bakanlığı Verem Savaşı Daire Başkanlığına bağlı laboratuvarlarda mevcut olduğunu, birçok Üniversite hastanesi, özellikle eğitim veren bazı Devlet ve SSK hastaneleri ile ihtisaslaşmış hastanelerin 3. aşama laboratuvar hizmeti verdiklerini söyleyebiliriz.

Tüberküloz tanısı için tüberküloz laboratuvarlarında rutin olarak yapılan işlemler; direkt mikroskopik inceleme, kültür ve sonrasında identifikasyon ile primer tüberküloz ilaçlarına duyarlılık testleridir.

Direkt Mikroskopik İnceleme:

Mikroskop ile hasta örneğindeki tüberküloz basillerinin saptanması, tüberküloz hastalığının tanısını koymak için en hızlı, en ucuz ve pratik bir yöntemdir. Tüberküloz basilinin ikiye bölünme süresi ortalama 18 saat olduğundan, kültür ile üretilerek izole edilmesi uzun zaman almaktadır. Bu nedenle de tüberküloz için mikroskopik tanı günümüze kadar önemini korumuştur. Hasta örneklerinden hazırlanan preparatlara, değişik boyama yöntemleri uygulanmakta ve mikroskop ile değerlendirilmektedir. En yaygın kullanılan boyama yöntemi asit fast boya yöntemi olan Erlich-Ziehl Neelsen (EZN) boyama yöntemidir. EZN ile boyanmış bir preparatta en az 300 mikroskop sahası tarandıktan sonra negatif olduğuna karar verilmelidir. 300 mikroskop alanında saptanan 1-2 basil şüpheli olarak değerlendirilirken 100 alanda 1-9 basil görülmesi (+), 10 alanda 1-9 basil görülmesi (++), her alanda 1-9 basil görülmesi (+++) olarak değerlendirilirken her alanda 10'dan fazla basilin görülmesi (+++++) olarak yorumlanmalıdır. Bol miktarda hasta örneğinde basilin incelenmesine olanak sağlayan, bu nedenle örnekte az sayıda bulunan bakterinin bile saptanabildiği, değerlendirmenin daha hızlı ve kolay olarak yapılabilirdiği diğer bir boyama yöntemi, florokrom boya (Auramin) yöntemidir. Auramin boyama yöntemi ile pozitif saptanan örneklerin EZN boyama yöntemi ile teyit edilmesi önerilmektedir.

Direkt preparat hazırlama aşaması, aerosol oluşturan bir işlem olması nedeniyle çalışan personel ve çevreyi korumak için güvenlik kabini içinde yapılmalıdır. Hazırlanan preparat 65-75°C'da kurutulmalı, tespit işleminden sonra da basilin canlı kalabileceği unutulmamalıdır. EZN boyama yönteminin her hafta pozitif bir suş, florokrom boya yönteminin ise her hafta pozitif ve negatif suşlar ile çalışılarak kalite kontrolü yapılmalıdır.

Kültür Yöntemleri:

Tüberküloz tanısı için laboratuvara oldukça değişik özelliklere sahip klinik örnekler gelmektedir. Örneklerin bazıları steril örnekler olup bu örnekler sadece santrifüj edildikten sonra oluşan çökelti uygun kültür ortamlarına aktarılır. Steril olmayan örnekler öncelikle homojenizasyon ve dekontaminasyon aşamalarından geçirilerek (tercihen N asetil L-sistein ve NaOH ile) yine bakterinin yoğunlaşmasını sağlamak amacı ile soğutmalı santrifüjde 3000g'de 20 dakika çöktürme yapılarak, oluşan çökelti mikobakterinin izolasyonu sağlanmak için uygun kültür ortamlarına aktarılır. DSÖ, mikobakterilerin izolasyonu amacıyla sıvı ve katı özellikte iki ayrı tüberküloz besi yerinin beraber kullanılmasını önermektedir. Bu uygulama ile mikobakteri izolasyon oranlarını artırmak hedeflenmektedir.

Konvansiyonel olarak mikobakteri izolasyonu amacıyla kullanılan besiyerleri özelliklerine göre sıvı ve katı besiyerleri olarak ayrılabilir. Sıvı besiyerlerine, Middlebrook 7H9 ve Dubos Tween albumin sıvı besiyeri örnek verilebilir. Katı özellikteki

besiyerleri de, yumurta bazlı ve agar bazlı besiyerleri olmak üzere ikiye ayrılabilir. Yumurta bazlı besiyerleri bütün yumurta veya yumurta sarısı, patates unu, tuz ve gliserol içermektedir. Yumurta bazlı besiyerlerine, Löwenstein-Jensen besiyeri, Petraghani besiyeri ve American Trudeau Society besiyeri, agar bazlı besiyerlerine ise Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11 örnek olarak verilebilir.

Günümüzde; tüberküloz basilinin daha hızlı üremesini ve üremenin erken dönemde tespit edilmesini sağlamayı amaçlayan, 'hızlı sonuç veren kültür sistemleri' mikobakteri laboratuvarlarının rutinleri arasına girmiştir. Bu sistemlerde kullanılan besi yerlerinin içerikleri oldukça zengindir ve mikobakterilerin üreme şansını artırmak amaçlanmaktadır. Sistemlerin bir diğer amacı, gerçekleşen mikobakteri üremesini erken dönemde saptamaktır. Bu değişik mekanizmalar ve indikatörler ile sağlanmaktadır.

Hızlı kültür sistemleri manuel veya otomatize sistemler veya radyometrik, floresan, kolorimetrik olarak gruplanabilir. Bilgisayar destekli ve süregen değerlendirme yapan gelişmiş otomatize kültür sistemlerinde üremenin saptanması bireysel değerlendirmeden uzaklaştırılarak, bilgisayar sistemleri ile daha standart ve objektif hale getirilmiştir. Hızlı kültür sistemlerinde ağırlıklı olarak sıvı besiyerleri kullanılmakla beraber, bifazik ve katı besiyerlerinin de kullanıldığı sistemler mevcuttur. Ülkemizde kullanım alanı bulmuş olan bu hızlı kültür sistemleri; BACTEC 460 TB Sistemi (radyometrik esaslı sistem), BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) 960 Sistemi

(floresan esaslı sistem), BACTEC 9000 MB Sistemi (flouresans esaslı sistem), BacT/ALERT MB (MB/BacT) Sistemi (kolorimetrik esaslı sistem), Dio-TK Scan Kültür Sistemi (katı özellikte kolorimetrik esaslı sistem) dir.

Yapılan çalışmalar göstermektedir ki, konvansiyonel yöntem ile 24.1 gün gibi bir sürede *M tuberculosis*'in %79'u izole edilebilirken, BACTEC 460 TB ile bu süre ortalama 15.2 gün, BACTEC MGIT 960 ile ise ortalama 14.4 güne kadar kısaltılmaktadır. Konvansiyonel solid besiyerleri ile BACTEC 460 TB'nin birlikte kullanılması ile izolasyon oranları %97 düzeylerine çıktığı ifade edilmektedir.

İdentifikasyon :

Tüberküloz laboratuvarı izole ettiği mikobakterinin, *M tuberculosis complex* (*M tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti* ve *Mycobacterium cannetti*) mi yoksa MOTT (*Mycobacteria other than M tuberculosis*) mi olduğunu rutin olarak ayırabilmelidir. Bu amaçla kord faktör oluşumu, MacConkey agarda, kanlı agarda üreme testi, NAP (p-nitro- α -acetylamino- β -hydro-xypropioiphenone) testi gibi testler yanı sıra Katalaz testi, Niasin testi, Pirazinamidaz testi, Thiophene-2 karboksilik asit hidrazid testi birçok biyokimyasal test kullanılmaktadır. Bu biyokimyasal testlerin bir arada kullanılması ile sağlanacak identifikasyon oldukça zor ve zaman alıcı olduğundan rutinde birkaç test *M tuberculosis complex* ve MOTT'ların ayırımı için kullanılmaktadır. Hızlı kültür sistemlerinin çoğunda, mikobakterilerin izolasyonu yanı sıra, tür düzeyinde tanımlanmaları da yapılabilmektedir.

BACTEC 460TB'de NAP testi ile *M tuberculosis* complex ve MOTT ayırımı yapılabilmektedir. MOTT'ların tür düzeyindeki ayırımları için günümüzde biyokimyasal yöntemler yerine moleküler tiplendirme yöntemleri kullanılmaktadır. İdentifikasyon işlevini süregen olarak yapan rutin laboratuvarlarda identifikasyon için kullanılan tüm testler, her gün en az bir pozitif suş ile çalışılarak kalite ve kontrolü yapılmalıdır.

Duyarlılık Testleri :

Center for Diseases Control and Prevention (CDC), her hastadan izole edilen *M tuberculosis* complex'in primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılık testinin yapılmasının gerektiğini bildirmektedir. Mikobakteriler için uygulanan duyarlılık test yöntemlerini konvansiyonel ve hızlı kültür besi yerleri ile yapılan duyarlılık testleri olarak iki bölümde incelemek mümkündür. Konvansiyonel duyarlılık test yöntemleri, ilaç ilave edilmiş klasik kültür besi yerlerinde, *M tuberculosis* suşlarının üremesinin inhibe olup olmadığının değerlendirilmesi esasına dayanır. Bu amaçla sıklıkla Löwenstein Jensen ve Middlebrook besi yerleri kullanılır. Besi yerlerine eklenen ilaç miktarını belirlerken, mikobakterilerin üremesinin inhibe ettiği serum konsantrasyonu esas alınır. Konvansiyonel duyarlılık testlerinin dezavantajı, kullanılan ilaçların besi yerinin içeriğindeki bazı maddelere bağlanma eğiliminde olmaları, ilaç ilave edilen besi yerinin hazırlığı aşamasında ısıya maruz bırakılma gibi işlemler nedeniyle ilağın serbest ve aktif miktarının değişmesi ve duyarlılığın test edilmesi için ortalama 21 gün gibi bir süreye ihtiyaç olmasıdır.

Konvansiyonel yöntemlere Cannetti, Rist ve Grosset'in 1963'de tanımladıkları Orantı (proporsiyon) yöntemi, Mitchisson tarafından 1957'de tanımlanan Direnç Oranı (ratio) yöntemi ve Meissner'in 1961'de tanımladığı Mutlak Derişim (absolute concentration) yöntemi örnek olarak verilebilir. Bu yöntemler arasında Orantı yöntemi, halen daha kullanılan, mikroskopik olarak ARB pozitif bulunan klinik örneğinden direkt olarak veya üremenin saptandığı kültürden çalışmaya imkan sağlayan ve majör tüberküloz ilaçları yanı sıra minör ilaçlar içinde uygulanma imkanı olan bir yöntemdir. Laboratuvarlarımızda giderek yaygın kullanım alanı bulan hızlı kültür sistemleri ile izolasyon-identifikasyon yanı sıra majör tüberküloz ilaçlarının duyarlılık testlerini de çalışılabilmektedir. Hızlı kültür sistemleri ile duyarlılık testleri 4-12 gün gibi kısa sürelerde değerlendirilebilmektedir. BACTEC 460 TB, MGIT 960 ve BacT/ALERT MB'nin yanı sıra Dio-TK Scan kültür sistemleri majör tüberküloz ilaçlarının duyarlılığının çalışıldığı hızlı kültür sistemleridir.

Tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçların duyarlılıklarını rutin çalışan laboratuvarlar her hafta duyarlı bir suş ile duyarlılık testlerini tekrarlamalıdır. Ayrıca dirençi bilinen standart suşlar ile de kontrol yapılarak kalite değerlendirilmelidir.

Rutin tüberküloz tanı laboratuvarları ayrı bir mekanda yer almalıdır. Çalışılan örneklerin sayısı, pozitiflik oranı ve örneğin içerdiği basil miktarı laboratuvarın bulaş riskini belirlemektedir. Laboratuvarların bulaş riskini azaltmak için 3. düzeyde güvenlik önlemlerinin alınmalı ve sürdürülmesine

özen gösterilmelidir. Laboratuvarında, iki aşamalı kapı sistemi, tek yönlü hava akımının sağlanması, yüzey ve yerlerin dezenfeksiyona dayanıklı materyal ile kaplı olması önerilmektedir.

Bulaş riskini azaltmak için laboratuvar işlemleri bir program ve düzen içinde sürdürülmelidir. Bulaş durumunda yapılması gerekenler önceden belirlenmelidir. Çalışan personelin tüberküloz açısından diğer laboratuvar çalışanlarına göre 3-5 kat, genel popülasyona göre 100 kat fazla risk altında olduğu unutulmamalı ve düzenli sağlık taramaları yanı sıra hizmet içi eğitimlerine de önem verilmelidir.

KAYNAKLAR:

1. Alpaslan A. Mikobakterilerin tiplendirilmesinde klasik ve yeni yöntemler. XXX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı Kemer-Antalya 30 Eylül- 5 Ekim 2002 138-140.
2. Drobniewski FA, Caws M, Gibson A, Young D. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. The Lancet Infect Dis 2003; 3:141-7.
3. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglioni MC. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. JAMA 1999; 282: 677-686.
4. Hana BA, Ebrahimzadeh A, Eliot LB, et al. Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria. J Clin Microbiol 1999;37:748-52.
5. Heifets LB, Good RB. Current laboratory methods for the diagnosis of tuberculosis. In: Blood BR, ed. Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control. ASM press, Washington DC. 1994:85-110.
6. Kocagöz T. Mycobacterium tuberculosis için uygulanan fenotipik ve genotipik direnç testleri. 4. Ulusal Mikobakteri Simpozyumu 31 Ekim - 2 Kasım 2002 Abant. Simpozyum Kitabı, 115-124.
7. Özakin C. Tüberküloz kültüründe kullanılan yeni yöntemler. 4. Ulusal Mikobakteri Simpozyumu 31 Ekim - 2 Kasım 2002 Abant. Simpozyum Kitabı, 49-56.
8. Özkara Ş, Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H. Türkiye'de tüberkülozun kontrolü için başvuru kitabı. T.C. Sağlık bakanlığı Verem Savaşı Daire Başkanlığı Yayını, Ankara, 2003.
9. Somoskovi A, Kodmon C, Lantos A, Bartfai 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 Löwenstein-Jensen Medium, J Clin Microbiol 2000; 38:2395-7.
10. Shinnich MT, Good RC. Diagnostic mycobacteriology laboratory practices. Clin Infect Dis 1995;2:291-9.
11. Wayne LG. Cultivation of Mycobacterium tuberculosis for research purpose. Bloom BR (ed). Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control, ASM press, Washington DC. 1994:73-109.
12. Woods GL. Susceptibility testing for mycobacteria. Clin Infect Dis 2000;31:1209-15.
13. WHO. Laboratory services in Tuberculosis Control Part I. Organization and Manangement 1998 (WHO/TB/98.258).