

ÖRNEKLERİN İŞLEMLENMESİ ve KÜLTÜR YÖNTEMLERİ

Doç. Dr. Meltem Uzun

İ.Ü İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

Tüberküloz tanı yöntemlerinin amacı, klinik örneklerde mikobakterilerin varlığını göstermek ve hastalık etkeni olan türü izole etmektir. Bu nedenle, tüberküloz tanısı için alınan klinik örneklerden hazırlanan preparatlar ilk olarak özel yöntemlerle boyanır ve mikroskopta incelenir. Ancak kültür yapılmaksızın klinik örneğin yalnızca mikroskopta incelenmesi, enfeksiyona karar vermek açısından yeterli değildir. Bu nedenle, etkenin tanımlanması, antitüberküloz duyarlılık deneylerinin uygulanması ve epidemiyolojik açıdan incelenebilmesi için, klinik örneklerin mikobakterilerin üreyebileceği özel ortamlara ekilmesi gereklidir. Kültür yöntemleri, uzun yıllardır tüberküloz tanısında en güvenilir yöntem olarak varlığını korumaktadır.

ÖRNEKLERİN İŞLEMLENMESİ

Mikobakterilerin araştırılması amacıyla laboratuvara gönderilen birçok klinik örnek, mikobakterilerle birlikte, kontaminasyona neden olan bakteri ve mantarları ve bu mikroorganizmaların çoğunluğunun etrafını

sararak çevre şartlarına dirençli hale gelmelerine neden olan lökosit, eritrosit, vücut sıvıları ve doku gibi organik kalıntıları da içerir. Kontaminasyona neden olan bu mikroorganizmalar çok daha kısa sürede üreyebildikleri için, besiyerlerinde mikobakterilerin üremesini baskırlar. Bu nedenle normal flora içeren ve alım ve transport işlemleri sırasında sterilizasyon kurallarına uyulmadığı düşünülen klinik örnekler; organik kalıntıları **sindirmek(digestion)** ve kontaminasyona neden olan bakteri ve mantarları elimine etmek amacıyla **dekontaminasyon** işlemi uygulanır. Bazı yöntemlerde her iki işlem için tek bir madde kullanılırken (% 4 NaOH); bazı yöntemlerde bu iki işlem için ayrı ayrı maddeler kullanılır. Bugün mikobakteriyoloji laboratuvarlarında bu işlemler için en çok **N-Asetil-L-Sistein(NALC)+Sodyum hidroksit(NaOH)** yöntemi tercih edilmektedir. Bu yöntemde **NALC** mukolitik, % **4'lük NaOH** dekontaminan ve % **2.9'lük sodyum sitrat** klinik örnekte bulunabilecek ağır metal iyonlarını bağlayarak NALC'ın inaktive olmasını önlemek amacıyla kullanılır. Son yıllarda sodyum dodesil sülfat-

sodyum hidroksit ve C 18-karboksipropilbetain (CB-18) ile de çalışmalar yapılmakta ve sonuçlar değerlendirilmektedir.

% 4 NaOH	% 2.9 Sodyum sitrat	NALC
50 ml	50 ml	0.5gr

NALC oksijene duyarlı olduğu için hazırlanan bu karışım en fazla 24 saat kullanılabilir ve NALC ın tartım işlemleri sırasında ambalajın ağzı uzun süre açık bırakılmamalıdır

Yöntem:

İncelenecek klinik örneğin bulunduğu 50 ml'lik steril burgulu kapaklı tüplere (Falkon tüpü), klinik örneğin miktarı kadar NALC-NaOH solüsyonu ilave edilerek oda ısısında 15 dakika bekletilir ve bu süre aşılmamalıdır. Bekleme süresinin başlangıcında tüpler 30 saniyeyi geçmeyecek şekilde vortekslenir ve daha sonra ara sıra el ile çalkalanır. Süre tamamlandığında falkon tüpünün 50 ml - işaretine kadar 0,067 M fosfat tamponu (pH 6.8) ilave edilerek nötralizasyon sağlanır ve dekontaminasyon işlemi durdurulur. Kullanılan fosfat tamponunun sterilitesinin korunması önemlidir. NALC-NaOH veya NaOH ile yapılan dekontaminasyon işleminden sonra uygulanılacak her işlemde sterilizasyon kurallarına dikkat edilmelidir. Aksi halde kültür için kullanılacak besiyerleri kontamine olur. Fosfat tamponu ilave edilmiş tüpler bakteri yoğunluğunu artırmak (konsantrasyon) için $\geq 3000 \times g$ 'de 15-20 dakika santrifüjde çevrilir, sonra üst sıvı içinde dezenfektan(

% 0.1-1 sodyum hipoklorit, % 70 alkol, % 5 fenol v.s.) bulunan bir kaba boşaltılır ve sedimente 1-2 ml steril fosfat tamponu (pH 6.8) veya %0.2'lik sığır albumin fraksiyon V ilave edilir. Kültür işlemi için radyometrik Bactec yöntemi kullanılıyorsa fosfat tamponu tercih edilmelidir. . Bu işlem tamamlandıktan sonra kullanılan kültür yöntemine uygun olarak klinik örnekler besiyerine ekilmelidir.

Normalde steril olduğu düşünülen BOS ,vücut sıvıları ve kan gibi örnekler dekontaminasyon işlemi uygulanmaz ve bu örnekler direkt olarak veya santrifüjde çevrildikten sonra sedimentten besiyerlerine ekilirler. Ancak steril boşluklardan örnek alımı ve transportu esnasında sterilizasyon kurallarına uyulmadığı kuşkusu var ise, bu örnekler de dekontaminasyon işlemi uygulanır.

KÜLTÜR YÖNTEMLERİ

Mikobakterilerin ikiye bölünmesi için gerekli süre 16-18 saat kadardır ve izole edilmeleri için besiyerlerinin uzun süre inkübe edilmesi gerekir.Zorunlu aerop olan mikobakterilerin bulunduğu ortamda oksijen miktarının azalması,üreme hızlarının da azalmasına neden olur.Uygun sıvı ve katı besiyerlerinde 7-21 gün gibi uzun bir sürede ürerler ve uygun üreme 35-37 °C'de sağlanır.Kültür süreleri ise 6-8 hafta kadardır.

Mikobakterilerin izole edilmeleri ve çeşitli özelliklerinin incelenmesi amacıyla kullanılan konvansiyonel besiyerleri katı ve sıvı olmak üzere iki tiptir.Katı özellikteki besiyerlerini ise yumurta bazlı ve agar bazlı olmak üzere iki bölümde incelemek mümkündür.Tam yumurta yada yumurta sarısı içeren yumurta temelli

besiyerleri arasında bugün en yaygın kullanılanı **Löwenstein-Jensen** (L-J) besiyeridir. Ancak Petragnani ve American Trudeau Society gibi besiyerleri de tercih edilebilir. Tipik koloni morfolojisi oluşturmaları ve daha bol üremeleri nedeniyle özellikle primer izolasyonda L-J besiyerinin kullanılması önerilir. Yumurta temelli besiyerlerinin opak görünümlü olmasına karşın, agar temelli besiyerleri şeffaftır. Bu nedenle, ekim yapılan besiyerleri 10-12 gün sonra mikroskop altında incelenirse, oluşan kolonileri görmek mümkündür. **Middlebrook 7H10** ve **Middlebrook 7H11** en çok tercih edilen agar temelli besiyerleridir. Bunun yanı sıra kontaminasyona neden olan mikroorganizmaların üremesini etkin bir şekilde engellemek amacıyla selektif besiyerleri olan, L-J Gruft, Mycobactosel L-J, Mitchison selektif 7H 11 de kullanılabilir. Primer izolasyonda besiyerlerinden en az birisinin selektif olması önerilir.

Sıvı besiyerleri içinde yer alan **Middlebrook 7H9** ve **Dubos tween albumin**, mikobakterilerin stok suşlarının subkültürlerinin yapılması, duyarlık deneyleri ve diğer in vitro deneylerde inokulum hazırlanması amacıyla kullanılır. Ayrıca bakteri sayısının az olduğu steril bölgelerden alınan klinik örneklerde, bakteriyi çoğaltmak ve dolayısıyla izolasyon şansını artırmak amacıyla da kullanılabilir. Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri, çoğu hızlı kültür sisteminde temel besiyeri olarak kullanılmaktadır.

Günümüzde birçok laboratuvar da, konvansiyonel besiyerlerinin

yanısıra tüberküloz etkeni bakterilerin izolasyon süresinin çok daha kısa ve izolasyon oranının çok daha yüksek olduğu **hızlı kültür sistemleri** rutin inceleme amacıyla kullanılmaktadır. Çoğunda sıvı besiyeri kullanılmakla birlikte, bifazik ve katı besiyerlerinin kullanıldığı sistemler de mevcuttur ve bu sistemlerde gaz basıncındaki değişiklikler, CO₂ oluşumu ve oksijen kullanımı fluorometrik veya kolorimetrik olarak ölçülür. Primer izolasyonda sıvı besiyerlerine ilave olarak bir de katı besiyeri kullanılması Centers for Disease Control (CDC) tarafından önerilmiştir ve bu kombinasyonla mikobakterilerin izolasyon şansının arttığı bilinmektedir.

Hızlı kültür 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 başarı ile kullanılmaktadır. Sistemde izolasyonun yanı sıra, *Mycobacterium tuberculosis* (M.tb.) kompleksi ile tüberküloz dışı mikobakterilerin (MOTT) ayrımı yapılabilmekte ve M.tb. kompleksi suşlarının primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılığı denenmektedir. Bactec 12B (Middlebrook 7H12) ve Bactec 13A (Middlebrook 7H13) olmak üzere iki tip besiyeri içeren bu sistem; besiyerlerinde bulunan C14 işaretli palmitik asitin kullanılması ve metabolizma sonucu oluşan 14 CO₂ nin 0-999 sayısal değerleri arasında üreme indeksi (GI) olarak ölçülmesi prensibi ile çalışmaktadır. Ekim işleminden önce besiyerlerine polimiksin B, azlosilin, nalidiksik asit, trimetoprim ve amfoterisin B (PANTA)

içeren antibiyotik karışımı ilave edilmelidir. Başarı ile kullanılmakla beraber, sistemde yeralan besiyerlerinin radyoaktif madde içermesi ve cihazda yapılan rutin kontroller sırasında meydana gelen çapraz kontaminasyon sorun oluşturmaktadır.

Günümüzde alternatif izolasyon sistemlerinin geliştirilmesi için çalışmalar devam etmektedir. **Myco-ESP** (Extra Sensing Power) II, (Trek Diagnostics, Inc., Westlake, Ohio), **MB/Bact T** (Organon Teknika, Durham, NC), **Bactec 9000 MB** (BD Biosciences, Sparks, MD) ve **Bactec Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) 960** (BD Biosciences, Sparks, MD) mikobakterilerin tanısı için geliştirilmiş **otomatize** sistemlerdir. Sistemler arasında izolasyon oranı açısından önemli bir fark olmamakla birlikte, konvansiyonel katı besiyerlerine göre daha yüksek; Bactec 460 TB sistemine göre daha düşük oranda izolasyon sağladıkları bildirilmektedir. Mikobakterileri üretme süreleri açısından sistemler karşılaştırıldığında, Bactec 460 TB sisteminin, ESP II ve MB/BacT sistemlerine oranla daha avantajlı olduğu belirlenmiştir. Birçok çalışmada tam otomatize sistemlerde üretme süresi ortalama ≤ 14 gün olarak saptanmış ve en yüksek izolasyon oranının Bactec 460 TB ve katı besiyeri kombinasyonu ile sağlandığı bildirilmiştir. Kontaminasyon oranları açısından tam otomatize sistemler birbiri ile karşılaştırıldığında önemli bir fark bulunamamıştır ancak bu sistemlerde

oran, Bactec 460 TB ve katı besiyerlerine göre daha yüksektir.

Myco-ESP II, selüloz sünger ve Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içeren bir sistemdir. Sistemde mikroorganizmaların üremesi sonucu oluşan gaz basıncındaki değişiklikler ölçülerek değerlendirme yapılır. Bilgisayar destekli bir sistemdir ve besiyerinde oluşan gaz basıncındaki değişiklik grafiksel olarak bilgisayarda görüntülenir. Besiyerlerine ekim yapılmadan önce, mikobakterilerin üremesini destekleyen oleik asit-albumin-dekstroza katalaz (OADC) ve kontaminasyonu engellemek amacıyla antibiyotik karışımı ilave edilir. Sistem tüm klinik örnekler için uygundur.

MB/Bac T, besiyerinin dip kısmında kolorimetrik bir sensor içeren ve oluşan CO₂ düzeyini ölçerek üremeyi değerlendiren bir sistemdir. Bilgisayar desteği bulunan sistemde besiyerleri sürekli kontrol altındadır. Steril örnekler ekilmeden önce besiyerlerine reconstitution sıvısı ilave edilirken; steril olmayan örneklerin ekiminden önce antibiyotik karışımı ilave etmek gereklidir. Sistem kan dışındaki tüm örnekler için uygundur.

Bactec 9000 MB, besiyerlerindeki oksijen kullanımının floresans ile belirlendiği bir sistemdir. Modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyerlerine ekimden önce PANTA ilave edilir. Sistemde balgam ve diğer solunum yolu örnekleri için Myco/F sputa, kan ve diğer steril vücut bölgelerinden alınan örnekler için MycoF/lytic besiyeri kullanılır.

Bactec MGIT 960 sisteminde kullanılan tüplerde, Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri ve dip kısımlarında oksijene duyarlı rutenyum metal

kompleksi içeren silikon bulunur. Klinik örnekler ekilmeden önce besiyerlerine OADC ve PANTA ilave edilir. Kullanılan besiyerlerinde herhangi bir üreme olmadığında oksijen varlığına bağlı olarak silikon tabakaya gönderilen UV ışınına karşı floresans oluşmazken; mikobakteri veya diğer mikroorganizmalar ürettiğinde oksijenin kullanılması sonucunda UV ışınına karşı floresans oluşmakta ve oluşan floresans miktarı üreme indeksi olarak değerlendirilmektedir. Tam otomatize bir sistem olmakla birlikte, UV ışığı altında makroskopik olarak da değerlendirme yapılabildiğinden manuel olarak kullanılmaya da uygundur. Kan dışındaki diğer tüm klinik örnekler için kullanılabilir.

Fazla sayıda örneği aynı anda kontrol edebilen Bactec MGIT 960 (960 örnek), Bactec 9000 MB (240 örnek) , MB/BacT (240 örnek) ve ESP II (128/256/384 örnek inceleyen üç farklı cihaz) genellikle yüksek kapasite ile çalışan laboratuvarlarda tercih edilmekle birlikte; daha düşük kapasite ile çalışan laboratuvarlar için **Septi-Chec AFB** (BD Biosciences, Sparks, MD), **MGIT** (BD Biosciences, Sparks, MD) ve **MB Redox** (Biotest Diagnostics Corp., Danville, NJ) gibi manuel sistemler önerilmektedir.

Septi-Check AFB, sıvı (Middlebrook 7H9) ve üç tip katı (L-J, Middlebrook 7H11, çukulatamsı agar) besiyerinin kullanıldığı bifazik bir kültür sistemidir. Çukulatamsı agar kontaminasyonu belirlemek amacıyla kullanılır. Kültür işleminden önce besiyerine glukoz, gliserin, oleik asit, pridoksal HCl, katalaz, albumin, azlosilin, nalidiksik asit,

trimetoprim, polimiksin B ve amfoterisin B içeren supleman ilave edilir. Klinik örneklerin ekiminden sonra besiyerleri ilk 24 saat ters olarak bekletilir ve süre sonunda dik konuma getirilir. Kültür süresince besiyerleri ara sıra hafifçe çalkalanarak sıvı besiyerinin katı besiyerlerine teması sağlanmalıdır. Sistem kan dışındaki tüm klinik örnekler için uygundur.

Cihaz gerektirmeyen **MB Redox** sisteminde mikobakterilerin izolasyonu amacıyla antibiyotik karışımı ve renksiz tetrazolium tuzu içeren modifiye Kirchner besiyeri kullanılır. Tetrazolium tuzu mikobakterilerin redoks sistemi sayesinde, hücre yüzeyinde granüler formda biriken pembe, kırmızı ve menekşe renginde formazona indirgenir ve üreme sonucu oluşan mikrokoloniler renkli partiküller şeklinde makroskopik olarak görülebilir.

Drancourt ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *M.tuberculosis*'in primer izolasyonunda **%5 koyun kanlı agar** kullanılabileceği de bildirilmiştir.

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. 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.
4. Drobniewski FA, Caws M, Gibson A, Young D. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. The Lancet Infect Dis 2003; 3: 141-7.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Woods GL. The mycobacteriology laboratory and new diagnostic techniques. Infect Dis Clin North Amer 2002; 16: 127-44.