

TÜBERKÜLOZ LABORATUVAR TANI YÖNTEMLERİ LÖWENSTEİN JENSEN BESİYERİ İLE ANTİTÜBERKÜLOZ DUYARLILIK TESTİ (MODİFİYE ORANTILAMA DİLÜSYON TESTİ)

Uz. Dr. Engin SEBER

Şişli Etfal Eğitim Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve
Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul

Yavaş üreyen *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium kansasii* türlerinin antimikrobiyal duyarlık testleri üç nedenden dolayı önemlidir:

- a. Sonuçlar tedavi girişim rehberi olarak kullanılabilir.
- b. Tedaviye başarılı yanıt vermeyen hastada ilaç direncinin onaylanması açısından değerli olabilir.
- c. Toplumdaki primer ve edinilmiş ilaç direnci hakkında bilgi edinilebilir.

Yavaş üreyen mikobakterilerin duyarlılığını ölçmekte kullanılan en yaygın yöntem modifiye orantılama yöntemidir.

Klasik mikobakteriyolojide genel olarak üç ilaç duyarlılık yöntemi vardır.

1. Rasyo yöntemi (Mitchisson 1957)
2. Absolü konsantrasyon yöntemi (Meissner 1961)
3. Modifiye orantılama yöntemi (Canetti- Rist- Grosset 1963)

Modifiye orantılama yöntemi, çoğu yavaş üreyen mikobakteriler için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem hızlı üreyen mikobakteriler için kullanılmamalıdır.

İlke

Modifiye orantılama yönteminde, test edilecek tüberküloz basilinin standardize süspansiyonu, antitüberküloz ilaç içeren agara ve/veya (L.J. besiyerine) ve aynı zamanda antitüberküloz ilaç içermeyen bir kontrol agarına ve/veya (L.J. besiyerine) ekilir.

3-4 hafta 37 °C’de bekletildikten sonra ilaç içeren besiyeri ile, ilaç içermeyen besiyerindeki üreme karşılaştırılır. Üremenin miktarına bağlı olarak organizma duyarlı veya dirençli olarak sınıflandırılır.

Duyarlılık testi doğrudan (direkt) veya dolaylı (indirekt) yöntem ile yapılabilir.

Doğrudan yöntemde dekontamine edilmiş, yoğunlaştırılmış yayma-pozitif örnek doğrudan antitüberküloz ilaç içeren besiyerine ekilir.

Dolaylı yöntemde ise primer izolasyon besiyerinde üreyen saf organizma kültürü kullanılır.

Proporsiyon yöntemi bugün için yaygın kullanılan bir yöntemdir. Basitleştirilmiş şekli bütün dünyada kullanılmaktadır.

Esası, deneyde kullanılan canlı basil sayısının bilinmesi ve suş içindeki dirençli basil oranının saptanmasıdır.

Bu teknikte, ekim özellik gösterir. Sıklıkla iki dilusyon yapılır (10^3 ve 10^5), bunlardan biri, tüpler üzerine (10^5) sayılabilecek oranda basil düşmesini sağlar. İlaçsız tüpler üzerindeki koloni sayısı, ekilen canlı basillerin tüm sayısını, ilaçlı tüplerdeki koloni sayısı ise, yalnız suşta bulunan dirençli basillerin toplamını gösterir.

Bu basillerin ilaçsız tüplerdeki koloni sayısına oranı bize, suşun direnç orantısını verir.

Bu yöntemin geçerli olması için:

- Önce belirlenmiş iki basil dilusyonu kullanılması
- Sayılabilecek miktarda koloni vermesi
- Değişik suşlarda yapılan çeşitli deneylerin her zaman aynı dirençli basil oranını göstermesine bağlıdır.

Gerçekten de 10^{-5} dilusyonunda normal olarak 50-200 koloni elde edilmektedir.

Defalarca yapılan deneyler dirençli basil oranının değişmediğini göstermiştir.

Belirli bir yüzdenin üstü, suşu dirençli olarak kabul etmenize yeterli olmaktadır.

Malzemeler

A. Besiyeri ve saklama koşulları

- Lowenstein-Jensen besiyeri (2° - 8°)
- 1000 µg olarak hazırlanan antimikrobiyal stok solusyonu (-20° C ve üstü ısıda)
 - İzoniazid (INH)

- Streptomisin (SM)
- Rifampisin (RF)
- Etambutol (EMB)
- Pirazinamid (PZA)

- Dimetil sulfoksit veya metanol(rifampisin ve etionamid için çözücü 25° C)
- Steril distile su (25° C)

İlaçlar koagulasyondan önce katılır ($\approx$ 16 x 200 mm çapında 7 ml besiyeri içeren kalın, darbeye dayanıklı, kapaklı deney tüpleri).

B. Gereçler

- Steril $\approx$ 16x 200 mm çapında kapaklı, dayanıklı cam tüpler
- 1.0 Mc Farland bulanıklık standardı tüp
- Cam boncuk (3 mm çapında) yeteri kadar.
- 1 adet 2 lt erlenmeyer
- 1 adet 1 lt erlenmeyer
- 6 adet 500 ml'lik balon. 2 adet 6 lt'lik balon. 50 ml'lik balonlar.
- Manyetik karıştırıcı veya çalkalayıcı
- 1 adet 100 ml'lik ölçekli mezür.
- 1 adet 500 ml'lik ölçekli mezür.
- 1,5 ve 10 ml'lik steril serolojik pipet ve pipet pompası veya ayarlanabilir

otomatik pipet ve steril uçları

11. Steril cam veya polypropylene tüpler (13x100 mm, 17x100 mm)
12. Steril öze (3 mm), dispoziibl steril özeler
13. Eldiven steril
14. Maske
15. Huni- Tülbent (gazlı bez) steril.

C. Donanım

1. Biyolojik güvenlik kabini sınıf II
2. Otomatik pipetler
3. Karıştırıcı
4. Vorteks
5. $36 \pm 1^\circ \text{C}$ inkübatör
6. Koagulatör ($78^\circ - 80^\circ$) tüp kalıbına uygun (aral Gürsel tüpü vbg).

Tablo 1: Katı besiyerinde (LJ) mikobakteriyel kolonilerin üremesinin belirlenmesi

Koloni Sayısı	Sonuç
0-50	Gerçek Sayı
50-100	1+
100-200	2+
200-500	3+
Yoğun üreme	4+

Kalite kontrol:

A. Besiyerinin sterilite kontrolü

1. Her besiyeri döküldüğünde, tüplerin %10'unu 36°C 'de (CO_2) 48 saat bekletin.

2. İnkübasyonu takiben bakteriyel ve fungal bulaşmayı kontrol edin. Eğer birden çok besiyerine bulaş varsa hazırlanmış besiyerlerini atınız.

Yöntem

Tüm ekim hazırlık ve basamakları ve besiyerine ekimler biyolojik güvenlik kabininde yapılmalıdır.

Ekime hazırlanma.

1. Doğrudan yöntem (yayma pozitif primer örnekten)
 - a. Örnekten dilüsyon hazırlayın, konsantre örnekten saf su ile sulandırıldığında 20 alanda bir aside dirençli basil rastlanacak şekilde sulandırın.
2. Dolaylı yöntem (katı besiyerindeki üremeden)
 - a. Doğrudan inokulasyon süspansiyonu- 3-5 koloniden örnek alın (besiyeri almamaya dikkat edilir).
3. Vortekslenir (1-2 dk)
4. Bulanıklığı Mc Farland 1.0 standardına gelinceye kadar steril saf su ilave ederek ANA SÜSPANSİYON hazırlanır.
5. Bu ana süspansiyondan direnç testinde kullanılacak dilüsyonlar hazırlanır.

Tablo 2: İnokulasyon hazırlığı için test organizmaların sulandırılması

Test organizması (Ana suspansiyon)	Steril Saf Su	Oluşan suspansiyon
1	9	10^{-1}
10^{-1} 'den 1	9	10^{-2}
10^{-2} 'den 1	9	10^{-3}
10^{-3} 'den 1	9	10^{-4}

Veya

Ana suspansiyon	Steril saf su	Oluşan suspansiyon
1.0 ml	9.0 ml	1/10mg/ml'lik 10^{-1}
10^{-1} 'den 0.1 ml	9.0 ml	1/1000 mg/ml'lik 10^{-3}
10^{-3} 'den 0.1 ml	9.0 ml	1/100.000 mg/ml'lik 10^{-5}

Her dilusyonda pipet değiştirilmeli, her dilusyon vortekslenmelidir.

Ekimlerin yapılması:

1. 10^{-3} (1/1000) ve 10^{-5} (1/100000) dilusyonlardan
 - a. Kontrol olarak ilaçsız L.J besiyerlerine 0.2 ml ekiniz
 - b. İlaçlı L.J besiyerlerine 0.2 ml ekilir
 - c. Ekilen tüpler basillerin yüzeye yayılabilmesi için etüve yatık olarak konulur. $36 \pm 1^\circ$ C'de 3-4 haftalık inkubasyondan sonra okunur.

Sonuçların değerlendirilmesi:

1. 10^{-3} ve 10^{-5} lik dilusyonlara mutlaka ekilmelidir.
2. En az 10^{-5} dilusyonlardan kontrol ekimleri yapılabilir ve sonuçlar ona göre değerlendirilir.

Değerlendirme iki önemli tanıma göre yapılır:

a. KRİTİK

KONSANTRASYON (KK):

ilaç-metod-besiyeri etkileşimleri sonucu ulaşılmış, standardize edilmiş bir kavramdır. Belli bir oranda veya miktarda üremesine izin verilen konsantrasyondur.

b. KRİTİK

PROPORSİYON (KP):

Kritik konsantrasyonda üremesine izin verilen basil popülasyonu oranıdır.

Tablo 3: L.J. besiyeri için KK ve KP oranları (başka besiyerleri için bu değerler değişik olabilir)

İlaç	Kritik Konsantrasyon (KK)µg	Kritik Proporsiyon (KP) %
İsoniazid (INH)	0.2	1.0
Rifampisin (RF)	40	1.0
Streptomisin (SM)	4	10.0
Pirazinamid (PZA)	100.0	10.0
Etambutol (EMB)	2.0	1.0

PROPORSİYON METODUNU DEĞERLENDİRME: Konsantrasyon esas olarak sayılabilecek (<100) koloni elde etme esasına dayanır.

İndirekt testlerde bu dilusyon 10^{-5} olabileceği gibi 10^{-3} de olabilir.

Değerlendirme 3 basamakta yapılır:

- Değişik tüplerdeki koloniler sayılır

- Bu sayımlara göre dirençli basil oranı saptanır
- Çıkan sonuçların her biri ilaç için saptanmış olan kritik proporsiyon (KP) ile karşılaştırıp o ilaca karşı duyarlı yada dirençli olduğuna karar verilir.

Örnek 1: İndirek (dolaylı) Proporsiyon yöntemi INH test

Sulandırma	İlaçsız	Kontrol tüplerdeki koloni	İlaçlı tüpler µg/ml		
			0.1	0.2	1.0
(1/1000) 10^{-3}	0	0	0	0	80 koloni
(1/100.000) 10^{-5}	30	38	35	4	1 koloni

Not: suş INH'ya dirençlidir

Örnek açıklaması:

0.2 ml'lik ekimde, ilaçsız kontrol tüpündeki koloni adedi ortalaması $(30+38)/2=34$ cfu

(colony forming unit) saptamaya göre 10^{-5} dilusyonda kontrol tüpte ortalama 34 koloni üremiştir.

İlaçlı (INH) içeren tüplere bakıldığında: 0.1 µg/ml INH içeren tüpte 35 koloni var ise ilaçsız tüpteki koloni sayısı ile

benzerlik göstermekte, bu konsantrasyonda suşun %100 dirençli olduğu anlaşılır.

0.2 µg/ml INH içeren tüpte, 4 koloni görülmektedir. $4/34 = \%12 \pm$. Bu bize yapılan deneylerde %12 dirençli suş bulunduğunu göstermektedir. Diğer yandan KP (kritik direnç eşiğini) gösteren tabloya baktığımızda 0.2 µg/ml'de %1 ve fazlasının direnç gösterdiğine göre, elimizdeki suşun INH'a dirençli olduğunu söyleyebiliriz. Sonuç dirençli verilmelidir.

Örnek 2: INH için

Sulandırma	İlaçsız (Kontrol tüpleri)		İlaçlı tüpler µg/ml		
			0.1	0.2	1.0
10 ⁻³	+++	+++	++	80	0
10 ⁻⁵	100	80	1	0	0

10⁻⁵ sulandırmada her bir tüpe ekilen bakteri adedi (100+80)/c= 90 cfu dur.

10⁻³ sulandırmada her bir tüpe ekilen bakteri sayısı hesaplanırsa: 10⁻³ sulandırma 10⁻⁵ sulandırmanın 100 katıdır. O halde 10⁻³ sulandırmada 90x100=9.000 bakteri olup

KK'daki (kritik konsantrasyon) 80 cfu, 9.000 sayısının % kaçdır? Basit bir orantı ile 80/9.000 x 100 = %0.88 bulunur. % 0.88, INH için KP %1'den küçük (%0.88< %1) olduğu için suş INH'a duyarlıdır

Örnek 3: Rifampisin (RF) için

Sulandırma	İlaçsız (Kontrol tüpleri)		İlaçlı tüpler µg/ml		
			10	20	40
10 ⁻³	+++	+++	++	+	65
10 ⁻⁵	100	92	76	0	0

Rifampisinde Kritik Konsantrasyon (KK) 40, Kritik Proporsiyon (KP) %1 olduğundan, ((100 + 92)/2 = 96 cfu, 65/96 x

100 = 0.67). 0.67< %1 olduğundan suş Rifampisine duyarlıdır.

Örnek 4: Streptomisin (SM) için

Sulandırma	İlaçsız (Kontrol tüpleri)		İlaçlı tüpler µg/ml		
			2	4	8
10 ⁻³	+++	+++	+++	0,7	0
10 ⁻⁵	32	26	18	0	0

10⁻⁵ kontroller (32 + 26)/2 = 29 cfu, 10⁻³ tüplere (29x100)=2900'er basil ekilmiş ve bunların

97/2900x100=%3.34'ü KK'a dirençlidir. Ancak 3.34<%10 (KP) olduğu için suş ilaca duyarlıdır.

Örnek 5: Etambutol (EMB) için

Sulandırma	İlaçsız (Kontrol tüpleri)		İlaçlı tüpler µg/ml		
			1.0	2.0	4
10 ⁻³	++	++	++	80	0
10 ⁻⁵	12	18	0	0	0

10^{-5} sulandırmada her bir tüpe ekilen bakteri adedi $(12+18)/2=15$ cfu, 10^{-3} sulandırmada 80 bakteri vardır.

Antitüberküloz ilacın seçimi

Rutin kullanımda 5 birincil ilaç direnç testlerine alınır. Bunlardan Pirazinamid'den

Etambutolde KK 2.0, KP %1 olduğundan $80/15=5.33$, $5.33>\%1$ suş Etambutole dirençlidir.

(PZA) pH uyumsuzluğu nedeni ile sağlıklı sonuç alınması güçtür.

Tablo4: Kullanılan ilaç konsantrasyonları

İlaç	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$
İsoniazid (INH)	0.1	0.2	1.0
Streptomisin (SM)	2.0	4.0	8.0
Etambutol (EMB)	1.0	2.0	4.0
Rifampisin (RF)	10.0	20.0	40.0

**Antitüberküloz ilaçlar için
çözücüler**

Birincil

Etambutol.....Steril Saf Su
INH.....Steril Saf Su
Streptomisin.....Steril Saf Su
Rifampisin.....Dimeti Sulfoksit
veya Metanol

İkincil

Kapreomisin.....Steril Saf Su
Sikloserin.....Steril Saf Su
Etionamid.....Dimetil Sulfoksit
Kanamisin.....Steril Saf Su

Bütün ilaçlarda tartılacak miktar dikkatle hesaplanmalıdır. İlacın miktarı ile potens'i (etkisi) farklı olabilir. Potensi %100 olan ilaçlar için aynı miktar tartılır. Potensi %96 olan ilaç için ise (0.960) , $100/0.960=104.166$ mg. tartmak gerekir.

**İLAÇ KONSANTRASYONLARIN
HAZIRLANMASI**

Isoniazid (INH)

A solusyonu: 100 mg INH etken madde 10 cc steril saf su içinde eritilir. (10.000 µg/ml).

B solusyonu: 0.1 ml A solusyonu 9.9 ml steril saf su içine konularak 100 µg/ml ilaç oranı elde edilir. İlaç solusyonu uygun sulandırmalar için aşağıdaki gibi hazırlanır:

INH için konsantrasyon µg/ml	500 ml L.J. besiyeri için eklenmesi gerekli B solusyon miktarı (ml)
0.1 için	0.5
0.2 için	1.0
1.0 için	5.0

Streptomisin (SM)

Dihidro-streptomisin sulfat
(C₂₁H₄₁N₇O₁₂) kullanılması gerekir.
Bulunmadığında ticaretteki streptomisin sulfat (C₂₁H₃₉N₇O₁₂) kullanılmaktadır.

A solusyonu: 1 gr streptomisin 10 ml saf suda eritilir (100.000 µg/ml)

B solusyonu: 0.1 ml A solusyonu 9.9 ml steril saf su içine katılarak 1000 µg/ml ilaç oranı elde edilir.

Streptomisin (SM) için konsantrasyon (µg/ml)	500 ml L.J. besiyeri için eklenmesi gerekli B solusyon miktarı (ml)
2	1.0
4	2.0
8	4.0

Etambutol (EMB)

A solusyonu : 100 mg etken madde 10 ml steril saf su içinde eritilir (10.000 µg/ml).

B solusyonu: 1.0 ml A solusyonu 9.0 ml steril saf su içine konularak 1000 µg/ml ilaç oranı elde edilir.

Etambutol (EMB) için konsantrasyon (µg/ml)	500 ml L.J. besiyeri için eklenmesi gerekli B solusyon miktarı (ml)
1	0.5
2	1.0
4	2.0

Rifampisin (RİF)

A solusyonu: 10 mg rifampisin 10 ml metanolde eritilir. Bu eriyikten doğrudan:

Rifampisin (RİF) için konsantrasyon (µg/ml)	500 ml L.J. besiyeri için eklenmesi gerekli B solusyon miktarı (ml)
10	0.5
20	1.0
40	2.0

Lowenstein (L.J) besiyerinin hazırlanması:**A.Tuz solusyonu**

Monopotasyum fosfat.....2400 mg
 Magnezyum sulfat.....240 mg
 Magnezyum sitrat.....600 mg
 L- Asparajin.....3600 mg
 Gliserin.....12 ml
 Saf su.....600 ml

Yandaki maddeler bir balona konulup benmaride eritilir. Sonra 115° C'de 20 dk steril edilir.

B. Yumurtanın hazırlanması:

- 25 adet temiz, taze iri boy yumurta alınır. Sabunlu su ile iyice fırçalanarak temizlenir.
- Yumurtalar geniş bir kap içinde varsa U.V. Lamba altında 60-120 dk steril edilir. Sonra 5-6 lt'lik ağzı lastikli steril bir balona steril huni yardımı ile kırılarak konur. Homogenize oluncaya kadar kuvvetlice çalkalanır veya vortekslenir.
- Tuz solusyonu (A), temiz steril bir tülbent veya gazlı bez ile süzülür, %2'lik malaşit yeşilinden 25-30 ml ilave edilerek **Ana L.J. besiyeri** elde edilir.
- Hazırlanacak ilaçlı besiyerine göre uygun oranı sağlayacak miktarda ilaç çözeltileri balon jojelere hazırlanır. Üzerine ana L.J. besiyerinden istenen konsantrasyonu sağlayacak miktarda konur.Üzerleri etiketlenmiş (RİF 20,

INH1, SM4 vb.) steril tüplere dağıtılır. Örnek: 0.2µg/ml INH'li L.J. besiyeri hazırlayacak olalım:

Ana L.J. BESİYERİ'nin 500 ml'si steril ayrı bir balon joje içine konur ve üzeri yazılarak işaretlenir. Üzerine 100 µg/ml'lik INH çözeltilisinden 1.0 ml'si ilave edilerek tüplere dağıtılır.

- Koagülatörde 78-80° C'de 1 saat koagüle edilir. 18-24 saat 37° C'de sterilite kontrolü yapıldıktan sonra soğutucu'da (2-8° C) saklanır.

Basitleştirilmiş proporsiyon

yöntemi: Kısaltılmış pratik bir tekniktir. Besiyeri ve değerlendirme klasik proporsiyon yöntemindeki gibidir.

Farkları:

- Yalnız indirekt test yapılabilir.

- b. Her ilaç için bir konsantrasyon kullanılır.
- c. Ekim standart öze ile yapılır.

Yöntem:

Üreyen suşlardan 1 öze dolusu alınarak 1 ml saf su konulmuş boncuklu balona ilave edilir. 20-30 sn. iyice çalkalanarak karıştırılır (Vortex' lenir). Bir süre büyük partiküllerin dibe çökmesi beklenir. Üstte kalan sıvıdan 50 µg alınarak 10 ml saf su içeren balona ilave edilir. Karıştırılır (Vortex' lenir) yeni karışım 10^{-2} bakteri içermektedir.

10^{-2} karışımdan 10 ml saf su bulunan balona 50 µg ilave edilerek 10^{-4} solüsyon elde edilir.

10^{-2} solüsyondan 1. kontrol besiyerine ve önceden hazırlanan ilaçlı tüplere 0,2 ml ekim yapılır. 10^{-4} solüsyondan 2. kontrol besiyerine 0,2ml

ekim yapılır. Tüplerin ağzı kapatılarak 37°C lik etüvde 28 gün enkübe edilir.

Okuma:

Genellikle 28. ve 40. günlerde iki okuma yapılır. Dikkatli şekilde ilaçlı ve ilaçsız tüplerdeki koloniler sayılır. Ekilen basil miktarı bulunur, suştaki mevcut dirençli basillerin oranı kolayca hesaplanır.

Bu oran bilinen kritik proporsiyon (tabloda gösterilmiştir) ile karşılaştırılır ve suşun dirençli veya duyarlı olup olmadığı rapor edilir.

İlaç	Kritik Konsantrasyon (K.K.)	Kritik Proporsiyon (K.P.)
INH	0,2µg/ml - (1)	%1,0
SM	4.0µg/ml - (8,0)	%10,0
EMB	2.0µg/ml - (2.5 – 5)	%1.0
RF	40.0µg/ml - (20 – 40)	%1,0

KAYNAKLAR

1. Ülgenalp, I. "Tüberküloz Bakteriyolojisi " Ana Basım Sanayii AŞ. Ankara.
2. Isenberg HO. Clinical Microbiology Procedures Handbook, American Society of Microbiology. 1992.
3. Tüberküloz ve Toraks, (1973) , 21 , 90
4. Çetin ET. Pratik Mikrobiyoloji . 2. baskı Menteş Matbaası İstanbul 1968.
5. Sağlık Bakanlığı Verem Savaşı Daire Başkanlığı Bölge Tüberküloz Laboratuvarı Eğitim Programı Notları Ankara, 1997

