



**V.TÜBERKÜLOZ LABORATUVAR
TANI YÖNTEMLERİ
UYGULAMALI KURS
KİTABI**

3-5 KASIM 2006

www.klimik.org.tr

DİYARBAKIR

EĞİTİMCİ ve YAZARLAR

PROF.DR. AYŞE YÜCE

PROF.DR. AHMET SANİÇ

DOÇ.DR. MUSTAFA ÖZYURT

PROF.DR. SÜHEYLA SÜRÜCÜOĞLU

DR. NEVİN SARIGÜZEL SAR

PROF.DR. MELTEM UZUN

DOÇ.DR. GÜLDEN ERSÖZ

YRD.DOÇ.DR. NURİ ÖZKÜTÜK

DR. VİLDAN AVKAN OĞUZ

DOÇ.DR. AHMET KİZİRGİL

YRD.DOÇ.DR. TUNCER ÖZEKİNCİ

YRD.DOÇ.DR. HÖRÜ GAZİ

DR. ERDAL ÖZBEK

DR. SEVİM MEŞE

İÇİNDEKİLER

Düzenleme kurulu.....	04
Önsöz	05
Kurs Programı	06
Kurs kuramsal programı	07
Uygulamalı eğitim konuları ve grupları.....	08
Uygulamalı eğitim-rotasyon programı	09
Tüberküloz laboratuvarında çalışma prensipleri (WHO kararı)	13
Klinik materyalin hastadan alınması ve laboratuvara gönderilmesi..... (Meltem UZUN)	15
Örneklerin işlemlenmesi ve kültür yöntemleri	22 (Gülden ERSÖZ)
Direk mikroskopi teknikleri ve değerlendirilmesi	27 (Nevin SARIGÜZEL SAR)
Auramine-Rhodamine floresan boyama.....	34 (Vildan AVKAN OĞUZ)
Tüberküloz basilinin klasik yöntemlerle identifikasyonu	39 (Süheyla SÜRÜCÜOĞLU)
Antibiyotik duyarlılık test yöntemleri	52 (Nuri ÖZKÜTÜK)
Tüberküloz tanısında klasik pcr.....	78 "PCR ve RFLP Yöntemleri ile Mycobacterium Türlerinin İdentifikasyonu" (Ahmet SANIÇ, Ahmet KIZIRGİL)
Tüberkülozun moleküler tanısında ticari sistemler.....	90 "İzotermal Dizi Yer Değiştirme Amplifikasyonu Tekniğinin Kullanımı" <i>Strand Displacement Amplification (SDA)</i> (Mustafa ÖZYURT)

KURS DÜZENLEME KURULU

KURS BAŞKANI

Prof. Dr. Ayşe YÜCE
Klimik Derneği Tüberküloz Çalışma Grubu Başkanı

DÜZENLEME KOMİTESİ

Ayşe YÜCE	(BAŞKAN)
Eralp ARIKAN	(BAŞKAN YARD. YEREL KOORDİNATÖR)
Ahmet SANIÇ	(BAŞKAN YARD.)
Mustafa ÖZYURT	(GENEL SEKRETER)
Süheyla SÜRÜCÜOĞLU	(ÜYE)
Nevin SARIGÜZEL SAR	(ÜYE)

ÖNSÖZ

Değerli Meslektaşlarımız,

Klimik Derneği Tüberküloz Çalışma Grubu olarak düzenlediğimiz “V.Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kursu”nda sizlerle Diyarbakır’da bir araya gelecek olmanın mutluluğunu yaşıyoruz.

Her geçen gün tanı ve sağaltımına yönelik önemli gelişmeler kaydedilmiş olmasına karşın dünyanın en önemli sağlık sorunlarından biri olmaya devam eden tüberkülozun eradikasyon ve kontrolünde erken tanı, doğru sağaltım ve izlemin önemli rolü olduğu bilinmektedir. Ancak ülkemizde ve dünyada tüberkülozun sağaltım ve izleminde olduğu kadar pek çok mikobakteriyoloji laboratuvarında standardizasyon sorunları bulunmaktadır.

Bu kursun ana hedefi, ülkemizde tanı yöntemlerinde bir standardizasyonun sağlanmasına katkıda bulunmaktır. Kurs için önceden de olduğu gibi 16 katılımcı kabul edilecek ve 12 kişilik eğitici grubu görev yapacaktır. Her bir kursiyere tüm testlerin bizzat yaptırıldığı uygulamalı kurslara bugüne değin öğretim üyesi, araştırma görevlisi ve dispanser hekimi olarak 66 meslektaşımız katılmıştır.

Kursun ev sahipliğini yapan sayın Prof.Dr.Eralp ARIKAN ve çalışma arkadaşlarına teşekkür eder, saygılar sunarız.

Prof. Dr. Ayşe YÜCE

Klimik Derneği Tüberküloz Çalışma Grubu Başkanı

V.TÜBERKÜLOZ LABORATUVAR TANI YÖNTEMLERİ UYGULAMALI KURS PROGRAMI

3 Kasım 2006

14.30-17.30 Kuramsal program (Uygulama Dersleri)
20.00 AKŞAM YEMEĞİ

4 Kasım 2006

8.30- 12.30 Uygulamalı Eğitim
12.30- 13.30 ÖĞLE ARASI
13.30- 17.30 Uygulamalı Eğitim
20.30 AKŞAM YEMEĞİ

5 Kasım 2006

8.30- 12.30 Uygulamalı Eğitim
12.30-13.30 ÖĞLE ARASI
13.30-17.30 Uygulamalı Eğitim
17.30-18.00 KURS DEĞERLENDİRMESİ VE KAPANIŞ

V. TÜBERKÜLOZ LABORATUVAR TANI YÖNTEMLERİ UYGULAMALI KURSU “KURAMSAL PROGRAM”

(3 Kasım 2006)

Oturum Başkanları: Ayşe YÜCE, Ahmet SANİÇ

- | | |
|-------------|---|
| 14.30-14.50 | Klinik materyalin hastadan alınması ve laboratuvara gönderilmesi
Meltem UZUN |
| 14.50-15.10 | Hasta örneklerinin işlenmesi ve kültürü
Güliden ERSÖZ |
| 15.10-15.30 | Mikroskopik inceleme teknikleri ve değerlendirilmesi

Ziehl-Neelsen boyama - Nevin SARIGÜZEL SAR
Auramin-rodamin floresan boyama - Vildan Avkan OĞUZ |
| 15.30-15.50 | Tüberküloz basilinin identifikasyonu
Süheyla SÜRÜCÜOĞLU |
| 15.50-16.10 | Kahve Arası |
| 16.10-16.30 | Antibiyotik duyarlılık test yöntemleri
Nuri ÖZKÜTÜK |
| 16.30-16.50 | Tüberküloz tanısında PCR
Ahmet SANİÇ |
| 16.50-17.10 | Moleküler tanıda ticari sistemler
Mustafa ÖZYURT |
| 17.10-17.30 | TARTIŞMA |

“UYGULAMALI EĞİTİM KONULARI VE GRUPLARI”

EĞİTİM GRUP-1 : Hasta örneklerinin işlenmesi ve kültürü

- a. Hasta örneklerinin işlenmesi (Homojenizasyon, Dekontaminasyon, Konsantrasyon)
Meltem UZUN

- b. Kültür (LJ, Middlebrook, Bactec besiyerlerine inokulasyon, İnkübasyon ve Değerlendirme)
Güliden ERSÖZ

EĞİTİM GRUP-2 : Mikroskopik inceleme teknikleri ve değerlendirme

- a. Ziehl-Neelsen boyama
Nevin SARIGÜZEL SAR
- b. Auramin-Rodamin floresan boyama
Vildan Avkan OĞUZ, Erdal ÖZBEK

EĞİTİM GRUP-3 : Klasik identifikasyon yöntemleri

Üreme hızı, üreme ısısı, pigment yapımı, mikrokoloni, niasin akümüasyonu, nitrat redüksiyonu, NAP testi, Katalaz testi, TCH Testi
Süheyla SÜRÜCÜOĞLU, Hörü GAZİ

EĞİTİM GRUP-4 : Antibiyotik duyarlılık test yöntemleri

LJ, Middlebrook 7H10, Bactec460, MGIT
Nuri ÖZKÜTÜK , Sevim MEŞE

EĞİTİM GRUP-5 : Tüberküloz tanısında PCR

Klasik PCR , RFLP
Ahmet SANIÇ, Ahmet KIZIRGİL

EĞİTİM GRUP-6: Moleküler tanıda ticari sistemler

İzotermal Dizi Yer Değiştirme Amplifikasyonu
(Strand Displacement Amplification - SDA, BD Probe Tec™ ET)
Mustafa ÖZYURT, Tuncer ÖZEKİNCİ

**V. TÜBERKÜLOZ LABORATUVAR TANI YÖNTEMLERİ
UYGULAMALI EĞİTİM ROTASYON PROGRAMI
(4-5 KASIM 2006)**

GÜN	SAAT	EĞİTİM GRUP-1	EĞİTİM GRUP-2	EĞİTİM GRUP-3	EĞİTİM GRUP-4	EĞİTİM GRUP-5	EĞİTİM GRUP-6
4 KASIM 2006	8.30- 10.30	A	B	C	D	E F	G H
	10.30-12.30	D	A	B	C	E F	G H
	13.30-15.30	C	D	A	B	G H	E F
	15.30-17.30	B	C	D	A	G H	E F

GÜN	SAAT	EĞİTİM GRUP-1	EĞİTİM GRUP-2	EĞİTİM GRUP-3	EĞİTİM GRUP-4	EĞİTİM GRUP-5	EĞİTİM GRUP-6
5 KASIM 2006	8.30- 10.30	E	F	G	H	A B	C D
	10.30-12.30	H	E	F	G	A B	C D
	13.30-15.30	G	H	E	F	C D	A B
	15.30-17.30	F	G	H	E	C D	A B

UYGULAMALAR

TÜBERKÜLOZ LABORATUVARINDA ÇALIŞMA PRENSİPLERİ

Dünya sağlık teşkilatı (WHO)'nın kararına göre bir hastaya kesin tüberküloz tanısı konabilmesi için uygun şekilde alınan klinik örneğin laboratuvara gönderilmesi, ekim yapılan besiyerlerinde üretilmesi ve tanımlanması gerekir. Bu amaçla laboratuvarı görevlendirilecek personel ve çevrenin güvenliği için aşağıdaki hususlara riayet edilmesi gereklidir.

Bunlar;

1. Personelin PPD deri testi bilinmeli, negatif ise BCG aşısı yapılmalıdır. Yılda bir toraks grafisi çekilmeli ve fizik muayenesi yapılmalıdır.
2. Personel tüberküloz hakkında bilgilendirilmeli ve laboratuvar kazalarında yapacağı işlemleri bilmelidir.
3. Canlı tüberküloz basili ile ilgili tüm işlemler Class II mikrobiyolojik emniyet kabiniinde yapılmalıdır.
4. Emniyet kabini açıldıktan 15 dakika sonra çalışmaya başlanmalıdır.
5. Personel koruyucu ekipmanlarla donanımlı olarak çalışmalıdır.
 - a. Sadece çalışma alanında kullanabileceği koruyucu önlük giymelidir.
 - b. Mutlaka eldiven kullanılmalıdır.
 - c. Hepa filtreli (N95 standartlarında) maske takarak çalışılmalıdır.
 - d. Olası sıçramalardan korunmak amacı ile gözlük veya yüz sperliği kullanılmalıdır.
6. Çalışma alanı gerektiğinde ve işlemler tamamlandığında 10-50 kat sulandırılmış TSE belgeye sahip sodyum hipoklorid solusyonu ile silinmelidir.
7. Ayrıca işlem sonrasında ortam ultraviyole ışığı ile dezenfekte edilmelidir.
8. Tüberküloz Laboratuvarının enfekte atıkları otoklavlanarak atılmalıdır.
9. Klinik materyal vortekslendikten sonra 15 dakika durağan bırakılmalıdır.
10. Çalışma alanına ancak görevli personel girmeli, personel çıkarken mutlaka önlüğünü laboratuvarı bırakmalıdır.
11. Çalışma esnasında odanın kapısı kapalı olmalıdır (Negatif basınçlı odalar önerilir)
12. M. tuberculosis complex için aşağıdaki durumlarda zaman geçirilmeden klinisyene bilgi verilmelidir.
 - a. Direkt mikroskopide AARB görülmesinde,
 - b. Direkt materyalden moleküler yöntemlerle M. tuberculosis complex'i

tanımlandığında,

- c. Kültürden üreyen tüberküloz basilinin moleküler veya klasik yöntemlerle tanısı konulduğunda,
- d. Antibiyotik duyarlılık sonuçlarının belirlenmesi durumunda

13. Tüberküloz ile ilgili materyal, üzerinde tehlikeli biyolojik materyal işareti bulunan i -içe geçmiş    kap sistemi ile gönderilmelidir.

KLİNİK MATERYALİN HASTADAN ALINMASI VE LABORATUVARA GÖNDERİLMESİ

Prof.Dr. Meltem UZUN

İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı

İnfeksiyon hastalıklarının tanısının doğru yapılabilmesi için uygulanan yöntemlerin duyarlılığının yanısıra, incelenecek klinik örneklerin alınmasında ve laboratuvara gönderilmesinde belirli kurallara uyulması gerekmektedir. Tüberküloz tanısı için de klinik örneklerin alınma, laboratuvara gönderilme ve işlenmesinde belirli kurallar vardır.

Örnek alınması ve laboratuvara ulaştırılması ile ilgili genel kurallar:

- Örnekler temiz, steril, sızdırmaz, burgulu kapaklı, dayanıklı ve tek kullanımlık kaplar içine yeterli miktarda alınmalıdır. Örnek enjektöre alınacak ve enjektörle gönderilecekse luer tipi kapaklı enjektörler kullanılmalıdır.
- Kabin üzerine örneğin kimden, ne zaman alındığı ve örnek tipi yazılmalı, ayrıca istek kağıdında (veya otomasyon programı olan kurumlarda elektronik ortamda) hasta ve örnek ile ilgili gerekli bilgiler belirtilmelidir.
- İlk örnekler antimikrobiyal tedavi başlamadan önce alınmalıdır.
- Endojen flora ve çevresel kontaminasyonu en aza indirmek için örnekler olabildiğince aseptik şartlarda alınmalıdır.
- Üremeyi engelleyici herhangi bir koruyucu kimyasal maddeler kullanılmamalıdır.
- Kontaminant bakteri ve mantarların üremesinden kaçınmak için alınan örnekler olası en kısa zamanda laboratuvara gönderilmeli ve işlenmelidir. Bu süre bir saati aşacaksa örnek 2-8 °C'de bekletilmelidir (kan hariç). Kabul edilmemesi gereken örnekler:
 - Sürüntü örnekleri;(Ancak başka bir şekilde örnek alınamıyorsa, kurumaya engel olmak için sürüntü örnekleri bir transport besiyerine konularak gönderilen örnekler kabul edilebilir)
- Uygun olmayan kapta gelen örnekler;
- 24 saatlik, biriktirilmiş örnekler;
- Dondurulmuş örneklerdeki canlı basil oranı azaldığından Kabul edilmeyen örnekler için yapılacak işlemler:
 - Hemen ilgili doktor telefonla aranır, örneğin kabul edilemez olduğu ve nedeni

açıklanır.

- Örnek ile ilgili bilgilere ek olarak, örneğin işlenmeme nedeni, telefonla bilgilendirilen kişinin adı ve görüşme zamanı not edilir.

İşlenmeyen örnekler 2-8°C 'de 3 gün bekletilir. Tekrar örnek alınamaması durumlarında mevcut örnek değerlendirilir.

I. Pulmoner Örnekler :

Ekspektore veya indüklenmiş balgam, açlık mide suyu, bronkoalveoler lavaj, transtrakeal aspirasyon, bronşial fırçalama ve laringeal sürüntü örnekleri pulmoner örneklerdir .

Balgam:

- Birbirini izleyen üç ayrı günde 5-10 ml(miktarı alındığı kabın 1/5 ini geçmemelidir;örn; 50 ml'lik kaplara en fazla 10 ml) sabah balgamı alınması tercih edilir. Ardı ardına 5-6 günden fazla örnek alınması gereksizdir.
- Tedavi takibinde, tedavinin başlamasından 3 hafta sonra ilk kez olmak üzere, birer hafta aralıklarla balgam örnekleri alınmalıdır.
- Alınan balgam örneği derin, prodüktif bir öksürükle akciğerlerden gelen koyu, eksüdatif örnek olmalıdır.
- Yiyecek artıkları ve ağız florası ile balgamın kontamine olmasını engellemek için balgam çıkarmadan önce hasta ağızını suyla çalkalamalıdır.
- Hastaya uygun balgamı nasıl vereceği, tükürüğün ve nasofaringeal sekresyonların balgam olmadığı anlatılmalıdır.
- Balgam özel bir odada veya açık havada çıkartılmalı, bu mümkün değilse gerekli korunma önlemleri alınmalıdır.

İndüklenmiş balgam:

Hasta balgam çıkaramazsa indüklenmiş balgam örneği alınabilir. Balgam indüksiyonu;

- Steril, ılık, aerosolize hipertonic tuzlu su (%10 NaCl) inhalasyonu ile yapılır.
- Bu solüsyon hastaya nebulizatör yardımı ile 10 dakika kadar derin ve yavaş solutulur, sonra derin ve kuvvetli bir öksürük ile balgam alınır.
- Örnek en az 10 ml olmalıdır.

İndüklenmiş balgam suludur ve tükürüğe benzer bu nedenle reddedilme riskine karşı indüklenmiş balgam olduğu istek kağıdında belirtilmelidir.

- Musluk suyundaki saprofit mikobakteriler yanlış pozitif sonuçlara neden olabileceğinden nebulizatör suyu ile balgamin kontaminasyonundan kaçınılmalıdır.

Bronkoalveoler lavaj (BAL):

- Steril kaplara en az 5 ml. örnek alınmalıdır.
- Kullanılan bronkoskobun musluk suyu ile kontaminasyonundan kaçınılmalıdır.
- Kontamine bronkoskop ile bulaş olabileceğinden bronkoskopun fiziksel temizliği ve yüksek düzey dezenfeksiyonu önemlidir.

Bronşiyal fırçalama:

Bronşiyal fırçalama ile elde edilen örnek Middelebrook 7H9 sıvı besiyeri içeren steril kaplara konulmalıdır.

Transtrakeal aspirat:

Çok sık gelen bir örnek değildir. Bazı olgularda yararlı olabilir. Enjektörle veya steril kaplara, olabildiğince fazla miktarda alınmalıdır.

Açlık mide suyu (gastrik lavaj sıvısı):

Tüberküloz tanısı için uygun bir örnek değildir ancak; tüberküloz olduğu radyolojik olarak kanıtlanmış balgamı negatif kalan hastalarda, balgam çıkaramayan ya da balgamını yutan hastalarda, nörolojik hastalıklar veya koma hali nedeniyle öksüremeyen hastalarda veya balgam alımının zor olduğu bebek/küçük çocuklarda başka yöntemlerle pulmoner örnek alınamıyorsa tercih edilebilir. Bu sıvı;

- En az 5-10 ml. olmalı ve birbirini takip eden üç gün boyunca, sabah erken aç karnına alınmalıdır.
- Örnek alımı hasta uyandıktan hemen sonra, tercihen yatağından kalkmadan önce yapılmalıdır.
- Örnek dört saat içinde işlenemeyecekse 100 mg sodyum karbonat bulunan steril kaplara alınarak laboratuvara gönderilerilmelidir.

Larenks sürüntüsü:

Sürüntü örneği, 1 ml kadar serum fizyolojik veya tampon çözeltisi içeren bir kap içinde gönderilmelidir.

II. Ekstrapulmoner Örnekler:

Laboratuvara en sık gönderilen ekstrapulmoner örnekler idrar, steril vücut sıvıları ve dokulardır. Nadir olarak kan ve dışkı örnekleri de gelebilir.

İdrar:

- Birbirini izleyen 3-5 gün süre ile en az 40 ml. olacak şekilde orta akım sabah ilk idrarı alınır.
- İdrar verilmeden önce dış üro-genital bölgenin temizlenmesi kontaminasyon riskini azaltır.
- Orta akım idrar alınamıyorsa kateter ile idrar alınabilir.
- 24 saatlik biriktirilmiş veya kateter torbasından alınan idrar kabul edilmemelidir.

Steril Vücut Sıvıları (plevral, perikardiyal, peritoneal sıvılar ve beyin omurilik sıvısı):

- Miktarı mümkün olduğunca fazla olmalı(mümkünse 50 ml) ve 10-15 mililitreden az olmamalıdır (BOS için en az 2 ml). Miktar daha az ise direkt olarak Bactec 13A şişesine veya diğer bir sıvı besiyerine (Middlebrook 7H9, Dubos tween albümin) ekilebilir.
- Bu sıvıların çoğu fibrinojen içerebileceğinden toplama kabına antikoagülan olarak sodyum polianetol sülfonat (SPS) veya heparin eklemek gerekebilir.

Abse örnekleri ve Aspirasyon sıvıları:

Örnek alımından önce alkol ile cilt temizliği yapılarak, mümkün olduğunca çok miktarda örnek enjektör ile aspire edilmelidir. Küçük miktarlardaki aspirasyon sıvılarının taşınması için Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri kullanılabilir. Aspirasyon için hacim yeterli olmadığı durumlarda sürüntü alınabilir. Sürüntü örneklerinden elde edilen negatif sonuçların güvenilir olmadığı rapor edilmelidir.

Doku örnekleri (lenf nodu, deri ve diğer biyopsi örnekleri):

- En az 1 gram doku parçası, mümkünse aseptik şartlarda steril kaplar içine alınmalıdır.Çok küçük miktarda biopsi örneği alınmışsa mutlaka serum fizyolojik içine koyulmalıdır. Alınan örnek gazlı beze sarılmamalıdır.
- Lezyonun kazeöz kısmı seçilmeli ve deri ülserlerinde lezyonun periferinden biyopsi alınmalıdır.
- Formalin içinde gönderilen örnekler kabul edilmemelidir.

Kan:

- Aseptik koşullarda alınan kan örneği direkt olarak hasta başında 10 ml'lik isolatör tüpe veya Bactec 13A şişesine ve bu amaçla kullanılan diğer kan kültür şişelerine 5 ml.olacak şekilde aktarılır.
- Hasta başında ekim yapılamadığı durumlarda 10 ml kan SPS veya heparin içeren steril tüplere alınır.
- EDTA (etilendiamintetraasetik asit)'lı tüplere toplanan kanlar ve koagüle kanlar kabul edilmez.

Dışkı:

- En az 1 gr dışkı örneği steril, tek kullanımlık, parafin içermeyen bir kap içine alınır.
- AİDS hastalarının dışkılarından Mycobacterium avium complex (MAC) sıklıkla üretilebilir.Ancak bu hastalar için rutin inceleme önerilmez.

Örneklerin Gönderilmesi:

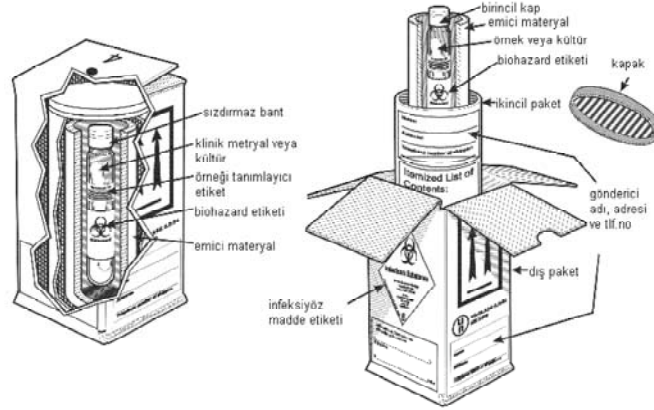
Dünya sağlık örgütü (DSÖ), CDC (Centers for Disease Control and Prevention) ve uluslararası yasal düzenlemeler klinik örneklerin ve mikobakteri kültürlerinin postalanmasında üçlü kap sistemini zorunlu kılmaktadır.Mikobakteri kültürlerinin postalanmasında burgulu kapaklı tüplerdeki katı besiyerine pasaj yapılmalı, petri kutusu veya sıvı besiyeri kullanılmamalıdır. (Resim 1)

Birincil kap (primer kap): materyalin konduğu, cam veya plastikten yapılmış burgulu kapaklı,sızdırmaz, şok ve basınç değişikliklerine dirençli kaplardır. Kapaklar ayrıca bir bant veya benzer materyal ile sarılabilir. Örneği tanımlayıcı bilgi veya numara kabın üzerine yazılmalıdır.

İkincil kap (sekonder kap): Bir veya daha fazla birincil kabın konulduğu sızdırmaz, dayanıklı bir kaptır. İkincil kap ile birincil kap arasındaki boşluğa (alt, üst ve yanlar) herhangi bir sızma durumunda tüm içeriği emebilecek ve birincil kapların birbiriyle temasını engelleyecek kuvvetli bir emici madde (bez, pamuk) yerleştirilmelidir. İkincil kap üzerine göndericinin adı, adresi ve telefon numarası yazılmalıdır.

Dış kap (postalama kabı): İkincil kabın konulduğu, dayanıklı, sert bir malzemeden yapılmış (tahta, oluklu mukavva, sert plastik, vs.) kaptır. Kabın içine ikincil kap ile beraber içeriğin ayrıntılı listesi de konulmalıdır. Kuru buz

kullanılacaksa bunlar ikincil kap ile dış kap arasına konulmalı ve kuru buz buharlaştığında ikincil kabın orijinal pozisyonu bozulmayacak şekilde desteklenmeli, buz kullanılacaksa su sızdırmaz şekilde olmalıdır. Dış kap üzerine gönderici ve alıcının adı, adresi, telefon numarası yazılmalı, enfeksiyöz (bulaşıcı) madde yazısı ve biyolojik tehlike (biohazard) etiketi yapıştırılmalıdır.



Resim 1: İnfeksiyöz maddelerin paketlenmesi ve etiketlenmesi (CDC'den)

KAYNAKLAR:

- 1 Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) HHS Publication (CDC), 4th Edition. May 1999.
- 2 Dunlap NE, Bass J, Fujiwara P, et all. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. Am J Respir Crit Care Med 2000; 161: 1376–1395.
- 3 Forbes BA,, Sahm DF, Wissfeld AS. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 10th. Ed. St.louse, Missouri: Mosby-Year Book. 2002:547-8.
- 4 WHO. Guidelines for the Safe Transport of Infectious Substances and Diagnostic Specimens WHO/EMC/97.3.
- 5 Kent PT, Kubica GP. Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory. Atlanta: HHS Publication (CDC),. 1985: 21-30.
- 6 Winn WC, , Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL.Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th. Ed. Philadelphia, Newyork: Lippincott Williams&Wilkins. 2006:1064-11244.
- 7 Master RN. Mycobacteriology. In: Isenberg HD (ed.). Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington DC: ASM, 1992: 3.2.1-6.

- 8 Pfyffer GE, Brown-Elliott BA, Wallace RJ. Mycobacterium: General characteristics, isolation and staining procedures. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC eds. Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington DC: ASM; 2003:532-59.
- 9 CDC. Packaging, Labeling and Shipping Infectious Substances. Public Health Practice Program Office, CDC (www.phppo.cdc.gov/nltn/pdf/2000/3.0/shipdoc4.pdf)
- 10 Strong BE, Kubica GP. Isolation and identification of Mycobacterium tuberculosis: A Guide for the Level II Laboratory. Atlanta: HHS Publication (CDC), 1979:35-42.

ÖRNEKLERİN İŞLEMLENMESİ VE KÜLTÜR YÖNTEMLERİ

Doç.Dr. Gülden ERSÖZ

M.Ü Tıp Fakültesi, İnfeksiyon Hastalıkları 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:

% 4 NaOH	+	% 2.9 Sodyum sitrat	+	NALC
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 sıgır 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 35-37OC'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 CO2 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 deneylerine diğer in vitro deneylerde inokulum hazırlanması amacıyla da kullanılır. Middlebrook

7H9 sıvı besiyeri genellikle hızlı kültür sistemlerinde temel besiyeri olarak kullanılmaktadır. Primer izolasyon amacıyla katı besiyerine ilave olarak sıvı besiyerlerinin kullanılması önerilmektedir.

Özel besiyerlerine inokulasyon ve inkübasyon;

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 rutin tanıda kullanılmaktadır. Radyometrik kültür tekniği ile mikobakteri üretici besiyerine değeri ölçülebilen substrat olarak radyoaktif karbon (^{14}C) eklenir. Bu substrat mikobakteri tarafından utilize edilir ve metabolizma sırasında $^{14}\text{CO}_2$ oluşur. BACTEC 460 ile radyoaktivite kantitatif olarak ölçülür. Antimikrobiyal olarak kullanılan PANTA (Polimiksim B-6000U/ml, Amfoterasin B-600g/ml, Nalidixik asit 2400g/ml, Trimetoprim laktat-600g/ml, Azlosilin 600g/ml) eklenir. Kontamine olmadığı düşünülen akciğer dışı örnekler bekletilmeden ekiliyorsa PANTA eklenmeyebilir.

Örnekler iğne ucu çıkmayan tüberkülin enjektörüyle PANTA eklenmiş 12B besiyerine 0.1-0.5 ml ekilir. Inkübasyon; 37°C 'de yapılır ve değerlendirme yoğunluğu fazla olmayan merkezlerde ilk 2-3 hafta haftada 3 defa yoğunluğu fazla merkezlerde ise ilk iki hafta iki sonra altı hafta boyunca haftada bir defa BACTEC 460 okuma cihazı ile yapılır. Üreme indeksi (GI) 10 altında ise negatif, 10 ise pozitif kabul edilir. İndeks 100'ün üzerine çıkınca ARB boyama yapılarak mikobakteri olup olmadığı doğrulanır.

MGIT (mycobacteria growth indicator tube); besiyeri olarak Middlebrook 7H9 broth kullanılır. OADC (oleic asid-albumin-dextroz-katalaz) ile zenginleştirilmiştir. Antimikrobiyal olarak PANTA kullanılır. İdrar ve kan hariç bütün örneklerin inkübasyonu için kullanılır. MGIT tüpleri de BACTEC'le aynı sıklıkta değerlendirilir. UV ışığı ile hem tüp altında hem de sıvı besiyerinin üstünde çizgi şeklinde turuncu ışıklanma kontrol edilir. Bactec Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) 960 (BD Biosciences, Sparks, MD) inkübatörü ile tam otomize bir sistemdir. VersaTREK (ESP Culture System - Trek Diagnostics, Inc., Westlake Ohio), MB/Bact T (bioMerieux, Hazelwood, Mo.), Bactec 9000 MB (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 bulunmamaktadır.

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 Press. 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 Press. 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, Tamási 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.

DİREK MİKROSKOPİ TEKNİKLERİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Nevin SARIGÜZEL SAR

Üsküdar Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
İstanbul

Mikobakteriler için başlıca iki boyama tekniği geliştirilmiştir:

- 1. Karbol fuksin yöntemi (Ziehl- Neelsen, Kinyoun):** Aside dirençli mikroorganizmalar ışık mikroskopunda kırmızı renkte görülür.
- 2. Florokrom yöntemi (auramin O, auramin-rhodamin):** Aside dirençli mikroorganizmalar florasan mikroskopta sarımsı - turuncu renkte floresan verirler. Aside dirençli boyama mikobakterilerin lipidden zengin hücre duvarlarının primer boya ile boyanması ve renk giderici ajan asit ve alkolle muameleden sonra boyalı kalması esasına dayanmaktadır. Bu nedenle mikroorganizma aside dirençli basil (ARB) olarak adlandırılır.

Direk mikroskopi ile görülebilmesi için, balgamin her ml' sinde 5000-10000 basil bulunması gereklidir. Direkt mikroskopik incelemenin duyarlılığı % 22-80 arasında değişkenlik gösterir.

Duyarlılığı etkileyen faktörler;

- Örneğin tipi,
- Enfekte eden mikobakteri türü,
- Dekontaminasyon ve kontaminasyon işleminin etkisi,
- Boyama tipi,
- Yaymanın kalınlığı,
- Yaymayı inceleyen laboratuvar personelinin deneyimi.

Yaymanın Hazırlanması: Lamin kırılması, boya başarısızlığı gibi problemler veya düşük miktarda organizma içeren pozitiflikleri doğrulamak için en az iki yayma hazırlanması gereklidir.

A. BOS dışı klinik örnekler :

- Etanol ile temizlenmiş çiziksiz her lama hasta protokol no'su yazılır.
- Yayma işlemi öncesi örnekler iyice vortekslenir.

- Örnek öze veya pipet kullanılarak lama transfer edilir. İşlem görmemiş örneklerle ait preparat hazırlamak için kanlı, mukoid ve nekrotik kısım kullanılır.
 - Örnek lam üzerine orta bölümde oval tarzda yayılır. Yoğun materyalden preparat hazırlandığı durumlarda; bir lam üzerine alınan materyal, ikinci bir lam ile bastırılır ve iki lam arasında yayılımı sağlayacak şekilde zıt yönde çekilir.
 - Öze yeniden kullanılmadan önce iyice alevden geçirilir.
 - Pipetler kullanım sonrasında dezenfektana veya tıbbi atık kabına bırakılır.
 - Preperatların biyolojik güvenlik kabininde kurutulması önerilir.
 - Yayma preparatlar aşağıdaki yöntemlerden biri ile lama tespit edilir.
 - a) Elektrikli lam ısıtıcısı (65-70°C)' nda en az 2 saat süreyle bekletilir. Gece boyunca kalması kabul edilebilir.
 - b) Lamalar, bek'in mavi alevinden 3 veya 4 kez geçirilir, fazla ısıtılmaz.
 - c) Lamalar saf metanolde 1 dakika süreyle bekletilir.
- Not: Isı ile tespit, tüm mikobakterileri öldüremeyebilir. Bu nedenle lamaların bulaştırıcı olabileceği unutulmamalı ve incelemeyi takiben tıbbi atık kaplarına atılmalıdır.

B. BOS örnekleri:

- BOS sedimenti vortekslenir
- Steril pastör pipeti ile lamın merkezine damlatılır.
- Preparat havada kurutulur.
- Damlatma işlemi iki kez daha tekrarlanır, her defasında yeni damla doğrudan önceki damlanın üzerine damlatılır.
- Daha önceden tanımlanan yöntemlerden biri ile tespit edilir.

A. KARBOL FUKSİN BOYAMA

1. Ziehl-Neelsen karbol fuksin

- a) Solüsyon 1. 10 ml % 95 etanolde 0.3 g bazik fuksin çözülür.
- b) Solüsyon 2. 100 ml distile suda 5.0 g fenol kristalleri çözülür (hafif ısıtma gerekebilir).

Çalışma solüsyonu : Solüsyon 2' nin 90 ml'si solüsyon 1' ile 100 ml' ye tamamlanır.

2. Kinyoun'un karbol fuksin

- a) Solüsyon 1 : 20 ml % 95 etanolde 4.0 g bazik fuksin çözülür.
- b) Solüsyon 2 : 100 ml distile suda 8.0 g fenol kristalleri çözülür. Isıtmak gereklidir.

Çalışma solüsyonu : Solüsyon 1 ve 2'nin tamamı birleştirilir.

B. RENK GİDERİCİ AJAN

% 3 asid - alkol

3 ml konsantre hidroklorik asidi, 97 ml % 95 etanol'e dikkatlice eklenir.

C. ZIT BOYA

Metilen mavisi veya brilliant yeşili zıt boya olarak kullanılabilir.

1) Metilen mavisi : 100 ml distile suda 0.3 g methylen blue chlorid'i çözülür.

2) Brilliant yeşili : 100 ml distile suda 1.0 g brilliant green çözülür.

NOT: Hazırlanan boya ve solusyonların adı, hazırlama ve son kullanma tarihi şişe üzerine etiketlenir. Hazırlanan solusyonlar 3 aydan sonra kullanılmamalıdır.

KALİTE KONTROL

Her boyama işleminde negatif ve pozitif kontrol çalışılmalıdır. Kalite kontrol yaymaları aşağıdaki şekilde hazırlanır.

- Escherichia coli (negatif kontrol) ve Mycobacterium tuberculosis H37Ra ATCC 25177 (pozitif kontrol) suşları, 1.0 ml fizyolojik tuzlu su veya steril distile suda ayrı ayrı No.1 Mc Farland bulanıklık standardında ve biyolojik güvenlik kabininde süspansiyonları hazırlanır.

Not: Mycobacterium kansasii gibi daha az patojenik organizmalar pozitif kontrol amaçlı kullanılabilir. Ancak hızlı üreyen mikobakteriler'in aside dirençli boya ları tutmaları değişkenlik gösterdiğinden kullanılmazlar.

- Kontrol lam lar etiketlenir. Üzerine hazırlama tarihi ve hazırlayanın adı kaydedilir.
- Negatif kontrol süspansiyonundan tek kullanımlık bir pipetle lamın ucuna yakın bir damla damlatılır.
- Pozitif kontrol süspansiyonu ile üçüncü basamak tekrarlanır, damla negatif kontrol ve lam etiketi arasına damlatılır.
- Yaymalar tercihen biyolojik güvenlik kabininde havada kurutulur ve tespit edilir
- Lam lar etiketli lam kutusunda saklanır.

Kontrol lam lar ticari olarak temin edilebilir.

DEĞERLENDİRME:

I. Hasta yaymaları okunmadan önce kontrol lamaları değerlendirilir.

Karbol fuksin (Ziehl-Neelsen veya Kinyoun):

- 1) Mycobacterium spp.: Kullanılan zıt boyaya bağlı olarak mavi veya yeşil zeminde kırmızı renkte,
- 2) N.asteriodes veya E.coli: Kullanılan zıt boyaya bağlı olarak mavi veya yeşil renkte görülür.

II. Kontrol lamın sonuçları kaydedilir. Sonuçlar kabul edilebilirse hasta yaymaları incelenir. Kontrol lamı uygun değilse, boyaların hazırlanması ve işlemleri yeniden gözden geçirilir.

Değerlendirme sonucu kabul edilemez kontrol lamaları şunlardır:

- 1) Pozitif kontrolde basiller kırmızı renkte görülüyorsa
- 2) Negatif kontrolde basiller kırmızı renkte görülüyorsa.
- 3) Zemin gereği şekilde dekolorize olmamışsa.

Problem ortaya çıktığı zaman tüm hasta lamaları ve bir kontrol lam yeniden boyanır.

BOYAMA İŞLEMLERİ

A. ZİEHL-NEELSEN (SICAK KARBOL FUKSİN) BOYAMA:

- Tüm lam karbol fuksin boya ile kaplanır.
- Bek veya elektrikli boyama rafı kullanarak buhar çıkacak kadar (sigara dumanı tarzında) lam alttan yavaşça ısıtılır.
- Düşük ısıyla veya aralıklı ısı kullanarak 3-5 dakika süreyle buharlaşması devam ettirilir.
- Lam soğumaya bırakılır ve takiben su ile yıkanır.
- % 3 asit-alkolle lam kaplanır ve renk akmayıncaya kadar renk giderme işlemi uygulanır.
- Lam su ile iyice yıkanır, fazla su lamdan akıtılır.
- Lam üzerine zıt boya (metilen mavisi veya brilliant yeşili) ilave edilir ve 20-30 saniye boyanır.
- Çeşme altında su ile iyice yıkanır ve fazla su lamdan akıtılır.
- Yayma havada kurutulur. (Kurutma kağıdı kullanılmamalıdır).
- Preparat 100'lük immersiyon objektifi ile incelenir.

B. KİNYOUN KARBOL FUKSİN (SOĞUK KARBOL FUKSİN) BOYAMA:

- Tüm preparat karbol fuksin ile kaplanır.
- Yayma 2 dakika süreyle boyanır.
- Lam suyla yıkanır.
- Lam % 3 asit-alkolle kaplanır ve renksizleştirme işlemi yapılır.
- Su ile yıkanır ve fazla su lamdan akıtılır.
- Lam zıt boya ile (metilen mavisi veya brilliant yeşili) kaplanır.
- Zıt boya ile 20-30 saniye boyanır.
- Su ile iyice yıkanır, fazla su lamdan akıtılır.
- Yayma havada kurutulur. Kurutma kağıdı kullanılmaz.
- Preparat 100'lük immersiyon objektifi ile incelenir

YAYMANIN İNCELENMESİ

A. İnceleme Yöntemi:

- Aside dirençli basilin varlığı için, her yayma en az 15 dakika süre ile incelenir.
- Yaymayı negatif olarak raporlamadan önce karbolfuksin boyama ile minimum 300 alan incelenmelidir.
- Yaymanın uzun kenarı boyunca 3, kısa kenarı boyunca 9 paralel tarama yapılmalıdır. Bu hem geniş bir okuma alanı sağlar, hem de aynı bölgenin birden fazla okunması olasılığını uzaklaştırır.

MORFOLOJİK ÖZELLİKLER:

- Aside dirençli basil yaklaşık olarak 1-10 µm uzunluğunda ve tipik olarak kırmızı, ince, tekli veya demetler halinde çomak şeklinde görülür.
- Bakteri, boncuk dizisi tarzında boyanma bölgeleri gösterebilir.
- M. tuberculosis dışında bazı mikobakteriler pleomorfik görünebilir, uzun basillerden kokoid formlara kadar değişmektedir.

SONUÇLARI RAPOR ETME:

Boyama sonuçları 24 saat içinde klinisyene bildirilmelidir.

ARB negatif : Aside dirençli basilin görülmediği tüm yaymalar “ Aside dirençli basil görülmedi ” şeklinde raporlanır. Negatif raporlanan yaymalar kültür rapor edilinceye kadar saklanmalıdır.

ARB pozitif : Bir yaymada aside dirençli basil görüldüğü zaman, “Aside dirençli basil görüldü ” şeklinde rapor edilir. Boyanma yöntemi belirtilerek yaymada gözlenen basil sayısına göre skora yapılır.

RAPOR	GÖRÜLEN ARB MİKTARI (BASİL SAYISI /İNCELEME ALANI)		
	<u>Fuksin boya</u> 1000 X	<u>Florokrom boya</u> 250 X 450 X	
Negatif	0	0	0
Şüpheli (örnek tekrarı)	1-2/300 alan	1-2/30 alan	1-2/70 alan
1+	1-9/100 alan	1-9/10 alan	2-18/50 alan
2+	1-9/10 alan	1-9/1 alan	4-36/10 alan
3+	1-9/1 alan	10-90/1 alan	4-36/1 alan
4+	>9/1 alan	>90/1 alan	>36/1 alan

Alışılmadık sıklıkta yayma pozitif (kültür negatif) sonuç ile karşılaşılır ise, yanlış pozitiflik nedenleri araştırılmalıdır.

- Su, su tankları ve boyalar aside dirençli mikroorganizmalarla kontamine olabilir.
- Boyama işlemi süresince materyalin lamdan lama transferi oluşabilir.
- İmmersiyon objektifi için kullanılan yağ ile aside dirençli organizmaların transferi oluşabilir. Pozitif bir yaymadan sonra lens mutlaka temizlenmelidir.

ARB boyama:

- A. Mikobakteriden başka *Rhodococcus* spp., *Legionella micdadei*, *Cryptosporidium* spp.’nin kistleri ve *Isospora* spp. gibi bazı mikroorganizmaların ARB boyanabildiği dikkate alınmalıdır.
- B. Hızlı üreyen mikobakteriler boyanmada değişkenlik gösterebilirler.
- C. Pozitif yayma preparatları bir başka uzman tarafından da doğrulanmalıdır.

1. Nolte FS, and Metchcock B. Mycobacterium. In Murray PR, Baron E Jo, Pfaller MA, Tenover FC, Yolklen RH (ed). Manual of clinical microbiology. Sixth edition. ASM Press, Washington DC. 1995; 400- 437.
2. Brown BA, Swenson JM, Wallace RJ, Jr. Acid- fast Stain Procedures. In Isenberg HD, (ed). Clinical microbiology procedures handbook. ASM Press, Washington DC, 1992; p.3.5.1- 3.5.11.
3. Dunlap NE, Bass J, Fujiwara P, Hopewell P, Hersburg CR, Salfinger M, Simone PM. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. Am J Respir Crit Care Med, 2000; 161: 1376- 1395.
4. Somoskövi A, Hotaling JE, Fitzgerald M, O'Donnell D, Parsons LM, Salfinger M. Lessons from a proficiency testing event for acid- Fast microscopy. Chest 2001; 120: 250- 257.
5. Woods GL. The mycobacteriology laboratory and new diagnostic techniques. Infect Dis Clin North Am, 2002; 16(1): 127- 144.
6. Saniç A, Çoban AY. Mikobakteriler ve laboratuar tanı. Ondokuz Mayıs Üni Tıp Fak Mik ve Kl Mik ABD, Samsun. 1999; 38-41.
7. Fukunaga H, Murakami T, Gondo T, Sugi K, Ishihara T. Sensivity of acid- fast staining for Mycobacterium tuberculosis in formalin-fixed tissue. Am J Respir Crit Care Med, 2002;166(7):994-7.
8. Ba F, Rieder HL. A comparison of fluorescence microscopy with the Ziehl- Neelsen technique in the examination of sputum for acid- fast bacilli. Int J Tuberc Lung Dis, 1999; 3(12): 1101- 5.
9. Kumar N, Tiwari MC, Verma K. AFB staining in cytodiagnosis of tuberculosis without classical features: a comparison of Ziehl- Neelsen and fluorescent methods. Cytopathology, 1998; 9(3):208-14.

Saceanu CA, Pfeiffer NC, McLean T. Evaluation of sputum smears concentrated by cytocentrifugation for detection of acid-fast bacilli. J Clin Microbiol 1993; 31:2371-2374.

AURAMİNE – RHODAMİNE FLORESAN BOYAMA

Dr. Vildan AVKAN OĞUZ

DEÜ Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD.

Direkt mikroskopi teknikleri konusunun girişinde verilen genel bilgiler ve yayma preparatın hazırlanması aşamaları hem karbol fuksin boyama hem florokrom boyama yöntemlerinde aynıdır. Rutinde tanı amaçlı en sık karbol fuksinli (Erich Ziehl Neelsen- EZN , Kinyon) boyama kullanılmakla birlikte, daha duyarlı ve hazırlanan preparatın daha hızlı taranmasını sağlayan florokrom boyalar da kullanılabilir. Bu boyama yöntemlerinde, daha küçük bir büyütme ile daha geniş bir alan taranabilir ve preparatın taranması için gereken zaman azalır. Bu nedenle özellikle zaman problemi olan ve fazla sayıda hasta örneğinin işlemlendiği laboratuvarlarda, florokrom boyama yöntemleri hem tanı için hem de antitüberküloz tedavi alan hastaların izleminde tercih edilebilir.

Florokrom boyamada ana ilke fenollü fuksin yerine floresan boyaların kullanılmasıdır. Floresan boyalar, mikobakterilerin lipitten zengin hücre duvarına bağlanarak, görünür hale gelmesini sağlar. Ancak boyaların hazırlanması, amaçlanan hedef (doku, mikroorganizma, antijen antikor kompleksi vs.) ve boyama işlemi sırasında ısı-süre değişikliklerinin uygulanması gibi, bazı kriterlere göre, farklı floresan boyama yöntemleri uygulanabilir. Bu yöntemler arasında Auramin-Fenol boyama yöntemi, Glikerson ve Kanner'in floresanlı boyama yöntemi, Auramine-Rhodamine boyama yöntemi, Truant'ın modifiye Auramine-Rhodamine boyama yöntemi sayılabilir. Kullanılan auramin'in karsinojen olduğu unutulmamalı, özellikle direkt temas-hava yolu izolasyon önlemleri alınmalıdır.

AURAMİN-RHODAMİNE BOYAMA İŞLEM BASAMAKLARI

A. Örneklerin Hazırlanması : Karbol Fuksin boyama yönteminde anlatıldı.

B- Kimyasal Maddelerin Hazırlanması

1. Auramine – Rhodamine Floresan Boyanın Hazırlanması

Auramin O-----	1,5 gr.
Rhodamin B-----	0.75 gr
Gliserol-----	75 ml
Sıvı fenol-----	10 ml
(Isıtılmış fenol 10 ml +dH ₂ O 50ml)	
Saf su -----	50 ml

Önce fenol sonra boyalar eklenerek suda eritilir. En son gliserol eklenir. Süzülerek 4°C'de koyu renkli bir şişede saklanır

2.Asit Alkol Hazırlanması

Etil alkol (% 70'lik) ----- 99.5 ml

Konsantre HCl----- 0.5 ml

3.Karşıt Boya Çözeltisi Hazırlanması

Potasyum permanganat (KMnO₄) ----- 0.5 gr

Distile su----- 100 ml

C- Kalite Kontrol

Her boyama için mutlak pozitif ve negatif kontroller hazırlanmalıdır.

Pozitif kontrol hazırlanması: Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içinde mikobakteri (mümkünse standart M tuberculosis H37Rv) süspansiyonu hazırlanır.Bu süspansiyondan lam üzerine bir damla konularak ya ısıtıcı blokta ya da havada kurutulup, tespit edilir.

Negatif kontrol hazırlanması: Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa ile sıvı besiyerinde hazırlanan süspansiyondan bir damla lam üzerine konularak ya ısıtıcı blokta ya da havada kurutulup, tespit edilir.

D- İşlemin Uygulanması

- Oda ısısında saklanan boyalar kullanılmadan önce mutlaka iyice çalkalanmalıdır.
- Hazırlanan lamalar alevde fiske edilir. (Resim 1)
- Hazırlanan lamaların üzerine AR boyası dökülür ve 15-20 dakika oda ısısında beklenir. Boya lamin üzerine tamamen kaplamalı ve eksilmemelidir (Resim 2,3).
- Distile su ile yıkanır. Klorsuz su kullanılmalıdır, çünkü klor floresanı azaltır (Resim 4).
- Yıkama sonrası % 0,5 asit alkol dökülerek 2-3 dakika beklenir. Yeterli dekolarizasyon işleminde çıplak gözle boya görülmez(Resim 5-7).
- Yıkama işlemi tekrarlanır (Resim 8).
- Zemin boyası olarak hazırlanmış KMnO₄ ile 2 dakika boyanır. Süre uzatılırsa floresan azalabilir (Resim 9).
- Yıkanır ve havada kurutulur (Resim 10).
- Pozitif bir yaymada mikobakteriler, karanlık bir zeminde sarı-turuncu parlak, ince, kıvrık içi tanecikli floresan veren bakteriler olarak görülür (Resim 11)
- Her örneğin boyanması sırasında, mutlaka pozitif ve negatif kontrol kullanılmalıdır.

- Boyanan preparatlar en kısa sürede 25x ya da 40x büyütme ile floresan mikroskopunda incelenmelidir. Basil morfolojisi x1,000 ya da x450 büyütme ile kontrol edilmelidir.
- Gerekirse pozitif değerlendirilen preparatlar, EZN ya da Kinyon boya ile boyanabilir.

E. SONUÇLARIN BİLDİRİMİ:

Negatif: Floresan görülmeyen tüm yaymalar “ Aside dirençli basil görülmeyen ” şeklinde raporlanır.

Pozitif: Karanlık bir zeminde sarı-turuncu parlak, ince, kıvrık içi tanecikli floresan veren bakteriler olarak görülür “Aside dirençli basil görüldü” şeklinde rapor edilir. Boyanma yöntemi belirtilir ve yaymada gözlenen aside dirençli basilin miktarı hakkında bilgi verilir. Basilin miktarı hakkındaki değerlendirmede karbol fuksin boyama yönteminde kullanılan tablo rehber olarak kullanılır.

Resim 1–11: Auramine – Rhodamine Floresan Boyama işleminin resimlerle izlemi



1



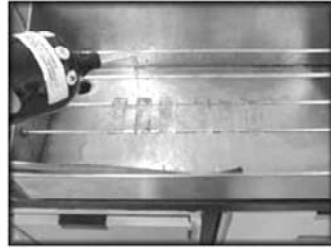
2



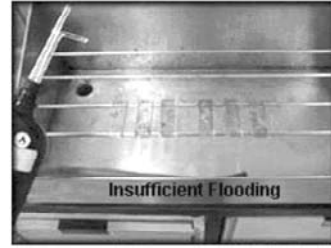
3



4



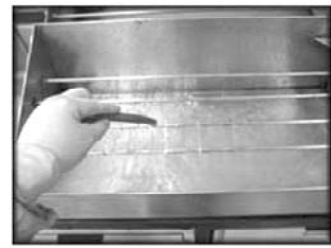
5



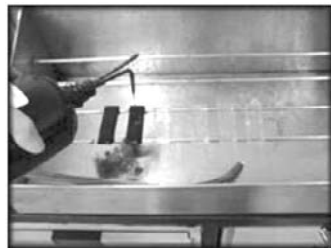
6



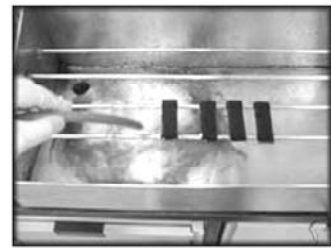
7



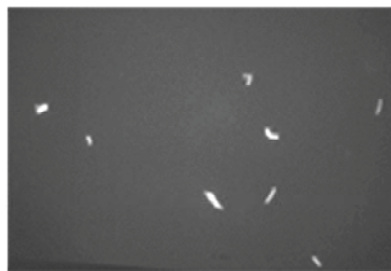
8



9



10



11

KAYNAKLAR

1. Weitzman I. Mycobacteriology and Antimycobacterial Susceptibility Testing. Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook ASM Press, Washington DC, 2004; 7.2.1- 7.3.1.
2. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. İkinci basım Barış yayınları. İzmir 1995 : 83-84.
3. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Fifth edition Lippincott, Philadelphia.1997: 903 – 905.
4. Uzun M. Tüberküloz tanısında Ehrlich-Ziehl-Neelsen, Fluorokrom boyama yöntemleri ile BACTEC ve Löwenstein-jensen Kültür yöntemlerinin sonuçlarının değerlendirilmesi Doktora tezi. İstanbul Tıp Fakültesi. 1994.
5. Baron JB, Peterson LR, Finegold SM. Bailey Scott's Diagnostic Microbiology 9th edition. Mosby-Year Book, St Louis, Missouri. 1995:605-608.
6. Nolte FS, Metchock B. Mycobacterium. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH eds. Manual of Clinical Microbiology 6th ed. Washington. ASM Press. 1995: 400-38.
7. http://www2.provlab.ab.ca/bugs/mycob/afb_stain/znstain.htm

TÜBERKÜLOZ BASİLİNİN KLASİK YÖNTEMLERLE İDENTİFİKASYONU

Prof.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) alimünyum 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. goodii 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 alimünyum 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-hydroxypropionophenone) 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 çukulata 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; inokülasyondan 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'in 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 ayıracılar 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 ayırtıran 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

- İncelencek 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 Pres. 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 kullanıldığı antimikobakteriyal duyarlılık test yöntemlerinden BACTEC 460TB ve BACTEC-MGIT 960 gibi hızlı ticari sistemler de yaygın olarak kullanılmaktadır. MD7H10'un kullanıldığı agar proporsiyon yöntemi ile 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.

Antibiyotik Solüsyonlarının Hazırlanması:

Antibiyotikler ticari toz şeklinde üretici firmadan alınmalı, klinik preparatları kullanılmamalıdır. Antibiyotikler üretici önerilerine göre veya olası ise vakumlu bir desikatör içinde –20oC’de saklanmalıdır.

- Antibiyotiklerin steril distile su ile veya uygun çözücüler ile (SM, INH ve EMB için su, RIF için metanol veya dimetilsülfoksit) 10 000µg/ml’lik (en az 1000 µg/ml olmalı) stok solüsyonları hazırlanır (yaklaşık olarak 100mg ilaç +10ml su).
- Stok solüsyonlar hazırlanırken gerekli miktar antibiyotik üzerinde belirtilen potense (% veya µg/mg) göre şu formüle göre hesaplanmalıdır.

$$\text{Ağırlık (mg)} = \frac{\text{Hacim (ml)} \times \text{İstenilen konsantrasyon (µg/ml)}}{\text{Potens (µg/mg)}}$$

Veya gerekli olan miktar hesaplanıp, potense bölünerek kullanılması gereken miktar bulunur. Ör: 100mg Streptomisin tartarak bir ilaç çözeltisi hazırlamak istediğimizde, ilacın potensi %80 (0.800µg/mg) ise 100/0.800=125mg tartmak gerekir. Stok solüsyonlar yaklaşık 100 mg’lık antibiyotik miktarı ile hazırlanmalıdır, çünkü daha küçük miktarlarda doğru tartım güç olabilir, daha büyük miktarlar ise ekonomik olmaz.

- Stok solüsyonu 0.22 µm por çaplı membran filtreden süzüp steril ettikten sonra, polipropilen tüplerde daha sonraki kullanımlara uygun küçük miktarlara bölünerek –20oC’nin altında (tercihen –70oC) 1 yıl kadar saklanabilir. Stok solüsyon kullanılacağı zaman oda ısısına getirilip, bekletilmeden kullanılır ve kalanı atılır.
- Antibiyotikler besiyerlerine eklenmeden önce stok konsantrasyonlardan çalışma konsantrasyonları hazırlanır ve besiyerlerine uygun miktarlarda eklenir.

Örnek:

1. 100mg EMB + 10ml steril distile su = 10 000µg/ml (stok solüsyon)
2. Vortex
3. Sterilizasyon (filtre ile)
4. 1ml stok solüsyon + 9ml steril distile su = 1 000µg/ml (çalışma solüsyonu)
5. Vortex
6. 1ml çalışma solüsyonu + 200ml besiyeri = 5.0µg/ml (final konsantrasyon)

İlaçların önerilen çözücüler, stok konsantrasyonları, çalışma konsantrasyonları besiyerine eklenecek miktarlar ve besiyerlerindeki final konsantrasyonları Tablo 1’de yer almaktadır.

İlaçlı ve İlaçsız Agar Besiyerinin Hazırlanması:

- Besiyerleri genellikle her biri 200ml'lik olacak şekilde 8 balon içinde hazırlanır. Her bir 200ml'lik 7H10 agar besiyerinin hazırlanması için; bir cam balon içinde, 180 ml distile su içine 3.8gr dehidrate 7H10 agar besiyeri ve 1 ml gliserol eklenerek eritilir (üretici firmanın önerdiği şekilde).
- Otoklavda 121 °C'de 15 dakika süreyle sterilize edilir.
- Daha sonra 50-56°C'lik su banyosunda soğumaya bırakılır.
- Besiyeri sıcaklığı 50-56°C'ye indiğinde içine zenginleştirici olarak 20 ml OADC (oleik asit, albumin, dekstroze ve katalaz karışımı) eklenir.

(Bu aşamaya kadar olan basamaklar 8 ayrı balon yerine tek bir 2lt'lik cam balonda gerçekleştirilip, daha sonra steril şartlarda 8 ayrı cam balona bölünebilir)

- 8 ayrı balondaki besiyerinden 6'sına her birine farklı bir ilaç veya farklı bir ilaç konsantrasyonu olacak şekilde, önceden hazırlanan SM, INH, RIF ve EMB solüsyonları tablo 1'de belirtilen miktarlarda eklenir. Diğer 2 besiyeri kontrol için ilaçsız besiyeri olarak kullanılır.
- Hazırlanan ilaçlı ve ilaçsız besiyerleri, önceden yazılmış-etiketlenmiş, 80 adet (40'arlık 2 set), dört bölmeli steril, plastik petri plaklarına, her bölmesine 5 ml (3-4mm kalınlığında) olacak şekilde, tablo 2'de belirtilen düzende dökülür. Besiyerleri dökülürken, balonlar tek tek su banyosundan alınıp iyice karıştırılmalı, agar katılaşmadan hemen plaklara paylaştırılmalı ve baloncukların oluşmamasına dikkat edilmelidir.
- Direkt ışıktan korunarak oda ısısında katılaştıran besiyerleri, kullanımdan veya saklamadan önce yüzeyleri iyice kuruyuncaya kadar birkaç saat steril kabin içinde, kapakları hafif aralık bırakılmalıdır.
- Daha sonra kurumaya engel olmak için deliksiz plastik torbalara konularak ve ışıktan korunarak 4-80C'de 1 ay saklanabilir.
- Dökülen her parti besiyerinden birkaç tanesi (ideali %10) kontaminasyon kontrolü için 350C'de 48 saat inkübe edilmelidir.

İnokulum Hazırlanması:

İndirekt yöntem:

Agar proporsiyon yönteminde standart bir inokulumun hazırlanması önemli olduğundan indirekt yöntem tercih edilir. İnokulum kaynağı olarak genelde katı besiyerinde üremiş 4-5 haftalıktan daha eski olmayan koloniler kullanılır. Primer

izolasyon kültürleri subkültüre tercih edilir.

- Katı besiyerinde üremiş koloniler, tüm üremeyi temsil edecek şekilde bol miktarda ve besiyerinden almamaya da dikkat edilerek, bir öze veya spatula yardımı ile kazınarak alınır. İçinde 6–10 adet cam boncuk bulunan 3-5ml tween-albuminli sıvı besiyerinde (ör; %0.05 tween80 içeren Middlebrook 7H9) emulsifiye edilir.
- 1–2 dakika süreyle vortekslenir.
- Büyük partiküllerin çökmesi ve oluşan aerosollerin azalması için 20–30 dk süreyle tüp bekletilir.
- Süpernatant steril pastör pipeti yardımıyla boş bir steril cam tüpe alınır.
- Sıvı besiyeri ekleyerek süspansiyonun bulanıklığı McFarland no 1'e ayarlanır (yaklaşık 10^7 CFU/ml).
- Daha sonra steril distile suyla (veya serum fizyolojik) bu süspansiyonun 10^{-2} (1/100) ve 10^{-4} (1/10.000) dilüsyonları hazırlanır.
örnek: 0.1ml ana süspansiyon (McFar.1) + 9.9ml steril distile su = 10^{-2} ;
0.1ml 10^{-2} süspansiyon + 9.9ml steril distile su = 10^{-4}
- Katı besiyerinde yeterli üreme yoksa alternatif bir yol olarak, alınan koloniler sıvı besiyerinde emulsifiye edildikten sonra inkübe edilerek bulanıklığın McFarland no 1'e ulaşması beklenilir ve buradan dilüsyonlar hazırlanır. İndirekt yöntemde inokulum kaynağı olarak katı besiyeri yerine sıvı primer izolasyon besiyeri kullanılacaksa, yine aynı şekilde dilüsyonlar hazırlanır.

Direkt yöntem:

Homojenize,dekontamine ve konsantre edilen hasta örneğinden hazırlanan yayma preparatta yaklaşık 20 mikroskop sahası incelendikten sonra görülen aside dirençli basil sayısına göre, örneğin steril distile su ile dilüsyonları hazırlanır (tablo 3). Daha sonra ki inokulasyon, inkübasyon ve değerlendirme aşamaları indirekt testtekine benzer. Hasta tedavi alan ve tedavi başarısızlığı söz konusu olan bir hasta ise, yayma sonuçlarını dikkate almaksızın mutlaka dilue edilmemiş hasta örneği de test edilir. Çünkü mikroskopide görülen basillerin tamamı kültürde üremeyecektir.

İnokulasyon ve İnkübasyon:

- Antibiyotik duyarlılığı test edilecek her bir mikroorganizma için; iki set test besiyeri (I ve II nolu plakların her birinden 2'şer) oda ısısına getirilir. Plak yüzeylerinin kuru olmasına dikkat edilir.
- Petri plakları hasta kültür numarası ve dilüsyon oranlarını gösterecek şekilde (setlerden birini 10^{-2} diğerini 10^{-4}) işaretlenir.
- Önce I nolu setin her bir bölmesine önceden hazırlanmış olan 10^{-2} basil dilüsyonundan steril bir pipet kullanarak 0.1'er ml inokule edilir (veya pastör pipeti kullanılarak her bölmeye 3'er damla damlatılır).
- Sonra II nolu set için aynı işlem 10^{-4} dilüsyon ile tekrarlanır.
- İnokulumun saf olup olmadığını kontrol etmek amacıyla dilue edilmemiş süspansiyondan 1–2 damla bir adet kanlı agar besiyerine de ekim yapılır.
- İnokulumun besiyerlerine absorbe olması için İnokule edilen plakları agarlı tarafı aşağıda olmak üzere oda ısısında yaklaşık 1 saat süreyle bekletilir (kapaklar hafif aralı şekilde steril kabin içinde bekletmek damlaların kurumasını kolaylaştırabilir). Bu işlem esnasında, formaldehit oluşumunu önlemek için, plaklar ışıktan korunmalıdır.
- Her bir petri plağı ayrı bir CO₂ geçirgen polietilen torbaya yerleştirilir ve 36°C'de % 5-10 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakılır.

Plakların Okunması ve Yorumlama:

- İnkübasyonun ilk 7 günü kontaminant bakteri varlığı yönünden kanlı agar incelenir. Kontaminasyon saptanırsa, test tekrar edilir.
- Test besiyerlerinde ise antibiyotiksiz kontrol bölmeleri üç hafta boyunca her hafta incelenir. Üçüncü hafta sonunda üreme yetersizse, test tekrar edilmelidir.
- Üç haftadan önce kontrol bölmesinde 50 koloni üzerinde üreme (+1 veya daha fazla) görülürse test değerlendirilebilir ve dirençli sonuçlar rapor edilebilir. Fakat duyarlı sonuçları rapor etmek için üç hafta beklemek gerekir. Üçüncü haftadan sonra plaklar değerlendirilmemelidir. Dördüncü haftadan sonra beliren koloniler direnci göstermeyebilir.
- İnkübasyon sonunda tüm kadranlardaki koloniler sayılır ve tablo 4'e göre kantite edilir ve bir kayıt formuna kaydedilir. Mikroskopik inceleme ile görülebilen mikrokoloniler var ise, not edilir.

- Aşağıdaki formül ile direnç oranı hesaplanır.

$$\text{Direnç oranı(\%)} = \frac{\text{İlaçlı bölmedeki koloni sayısı} \times 100}{\text{kontrol bölmesindeki koloni sayısı}}$$

- Direnç oranı $\geq 1\%$ ise sonuç dirençli; $< 1\%$ ise duyarlı olarak yorumlanır.
- Kontrol kadranında sayılabilir düzeyde kolonisi olan ve 50'den fazla kolonisi olan dilüsyonun sonucunu yorumlanır ve karşılaştırma aynı dilüsyonlar arasında yapılmalıdır.
- Fakat 10^{-2} dilüsyon ekim yapılmış kontrol bölümünde sayılamayacak kadar koloni varsa (+3,+4) ve 10^{-4} dilüsyon ekim yapılmış kontrol bölümünde 50'den az koloni varsa, 10^{-4} dilüsyon ekim yapılmış kontrol bölümündeki koloni sayısı 100'le çarpılıp 10^{-2} dilüsyon ekim yapılmış kontrol bölümündeki koloni sayısı hesaplanabilir.
- Tüm kontrol bölmelerinde koloni sayımının 4+ olduğu dilüsyonlar dikkatle değerlendirilmelidir, bu durumda mikroorganizma tüm antibiyotiklere duyarlı ise, sonucu bildirilir, herhangi bir antibiyotiğe direnç söz konusu ise, yoğun bir inokulum kullanılmış olabilir, test tekrar edilir.

Kalite Kontrol:

Her yeni besiyeri ve her yeni antibiyotik solüsyonu hazırlandığında veya en azından haftada bir kez, tüm ilaçlara duyarlı olduğu bilinen M tuberculosis H37Rv (ATCC 27294) kalite kontrol suşu ve tüm ilaçlara dirençli olduğu bilinen bir laboratuvar suşu da test edilmelidir. H37Rv suşu test sonucunda tüm anti tüberküloz ilaçlara karşı duyarlı olmalıdır.

II. LÖWENSTEİN-JENSEN (LJ) BESİYERİNDE PROPORSİYON YÖNTEMİ

Prensip:

Proporsiyon yönteminin prensibini temel alan bu test NCCLS tarafından önerilmemekle birlikte, ekonomik olması nedeniyle DSÖ tarafından önerilen ve tüm dünyada halen yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir.

Antibiyotik Solüsyonlarının Hazırlanması:

Antibiyotiklerin stok solüsyonlarının hazırlanması ve saklanması agar proporsiyon yönteminde anlatıldığı gibidir. Ancak antibiyotiklerin besiyerlerine eklenmeden

önce stok solüsyonlarından hazırlanan çalışma konsantrasyonları ve besiyerlerine eklenen miktarları farklıdır (tablo 5).

İlaçlı ve İlaçsız LJ Besiyerinin Hazırlanması:

Aşağıda 1600ml'lik Löwenstein-Jensen (LJ) besiyerinin hazırlanması örnek olarak verilmiştir. Besiyeri hazırlarken gerekli olan miktar hesap edilip ona göre hazırlık yapılmalıdır.

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

- Tuz solüsyonu bir balona konulup su banyosunda eritilir.
- 115°C'de 20 dk steril edilir.
- 25 adet temiz, taze, iri boy yumurta sabunlu su ile iyice fırçalanarak temizlenir. Yumurtalar geniş bir kap içinde varsa U.V. lamba altında 45 dk steril edilir (veya 15 dk %70'lik etanolde bırakılır). Sonra büyükçe, ağzı kapatılabilen, steril bir balona steril huni yardımı ile kırılarak konur. Homojen oluncaya kadar kuvvetlice çalkalanır.
- Daha önce hazırlanmış ve steril edilmiş tuz solüsyonuna önce %2'lik malaşit yeşili 20-25ml ilave edilir.
- Daha sonra homojen edilmiş 1000 ml yumurta temiz steril bir tülbent veya gazlı bez ile tuz solüsyonu içine süzülür. Böylece ana LJ besiyeri elde edilmiş olur.
- Biri kritik konsantrasyon olmak üzere her bir ilaç için üç farklı konsantrasyonda ilaçlı besiyeri dökmek için (Ör: INH 0.1 + INH 0.2 + INH 1.0); üzerleri etiketlenmiş üç balon jojeye 500'er ml besiyeri paylaşılır.
- Her birine tablo 5'de belirtilen miktarlarda ilacın çalışma konsantrasyonundan eklenir. Tüm ilaçlar için aynı işlem tekrarlanır.
- Ayrıca 1000ml'lik bir besiyeri ilaçsız kontrol besiyeri olarak bırakılır.
- Balonlar iyice çalkalanıp homojen olması sağlandıktan sonra üzeri etiketlenmiş, steril, vida kapaklı tüplere (16X160mm), her birine 5–7 ml olacak şekilde, aseptik şartlarda dağıtılır.

- Tüpler koagülatörde 78–80°C’de 1 saat (veya 85°C’de 45 dk) koagüle edilir.
- 18–24 saat 37°C’de sterilite kontrolü yapıldıktan sonra 2–8°C bir ay saklanabilir.

Not: Proporsiyon yönteminde dirence karar verirken kritik konsantrasyondaki üreme esas alınır. Diğer konsantrasyonlar direncin derecesini belirlemede kullanılır. İş yoğunluğunun yüksek olduğu durumlarda testi daha pratik hale getirmek için sadece kritik konsantrasyonlar test edilebilir (INH’ın yüksek konsantrasyonu da önerilmektedir). Tablo 5’de LJ besiyeri ile proporsiyon yönteminde kritik konsantrasyonlar ve önerilen diğer konsantrasyonlar görülmektedir..

İnokulum Hazırlanması:

İnokulum hazırlanması agar proporsiyon yönteminde anlatıldığı gibidir. Fakat indirekt yöntemde basil süspansiyonunun 10^{-3} ve 10^{-5} dilüsyonları önerilmektedir. Bu dilüsyonları hazırlamak için, McFarland no 1 bulanıklığındaki basil süspansiyonundan 1ml’si 9 ml steril distile suya eklenir, bu işlem seri dilüsyonlar şeklinde 5 kez tekrarlanır ve 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} dilüsyonlar elde edilir. Her bir dilüsyondan sonra tüp vortekslenmelidir. Sonra 10^{-3} ve 10^{-5} dilüsyonları inokulasyon için kullanılır.

İnokulasyon ve İnkübasyon:

- 10^{-3} (1/1000) ve 10^{-5} (1/100000) dilüsyonlardan, 2’şer adet ilaçsız kontrol besiyerine ve 1’er adet ilaçlı besiyerlerine 0.2ml ekilir. Ekimler steril, tüberkülin enjektörü, otomatik pipet veya pastör pipeti ile yapılabilir.
- Ekilen tüpler basillerin yüzeye yayılabilmesi için etüve yatık olarak konulur. İnokulumun buharlaşabilmesi için kapaklar hafifçe gevşek bırakılır.
- 24-48 saat sonra kapaklar sıkıca kapatılıp, $36\pm1^{\circ}\text{C}$ ’de inkübasyona bırakılır.

Sonuçların Değerlendirilmesi:

Değerlendirme agar proporsiyon yönteminde anlatılana benzer şekildedir. Basil dilüsyonunda amaç sayılabilecek koloni elde etme esasına dayanır. İndirekt testlerde bu dilüsyon 10^{-5} olabileceği gibi 10^{-3} de olabilir. Değerlendirmede değişik tüplerdeki koloniler sayılır, bu sayımlara göre dirençli basil oranı saptanır. Çıkan sonuçların her biri o ilaç için saptanmış olan kritik proporsiyon ile karşılaştırıp o ilaca karşı duyarlı ya da dirençli olduğuna karar verilir. LJ ile proporsiyon yönteminde farklı olarak bazı primer ve sekonder ilaçlarda kritik proporsiyon %1’değil %10 olarak belirlenmiştir (tablo 6).

DSÖ' sonuçların 28. ve 40. günlerde okunmasını önermiştir. DSÖ'nün bu rehberinde 28. günde dirençli koloni oranı KP'dan yüksek ise dirençli olarak rapor edilebileceğini; yine 28. günde kontrol besiyerinde yeterli üreme olmasına rağmen, en yoğun dilüsyon (10^{-3}) inokule edilmiş olan, ilacın en düşük konsantrasyonundaki besiyerinde üreyen koloni yok ise duyarlı olarak rapor edilebileceğini; bu iki durum dışındaki tüm sonuçların 40. günde değerlendirilmesi gerektiğini bildirmiştir.

III. BACTEC 460 TB (radyometrik) ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TEST YÖNTEMİ

Prensip: Mikobakteriler antibiyotik içeren ve içermeyen Bactec 12B (Middlebrook 7H12) şişelerine ekilir ve 37oC'de inkübe edilir. Kontrol şişesine ekilen mikroorganizma sayısı ilaç içeren şişeye göre 100 kat azdır. Şişeler günlük olarak Bactec 460 cihazında okunur. Antimikobakteriyel inhibisyon olmadığında, mikobakteriler ürer ve besiyerindeki 14C işaretli substratı kullanır. Böylelikle 14CO₂ oluşur ve Bactec 460 cihazında Growth Index (GI) terimiyle kantitatif olarak ölçülür. Duyarlılık sonuçları, kontrol ve ilaç içeren şişelerin günlük GI değeri artışlarının karşılaştırılmasıyla yorumlanır. Antitüberküloz ilaç içeren besiyerinde, duyarlı mikobakterilerin üremesi inhibe olur ve bu GI okumalarıyla kaydedilen günlük 14CO₂ üretiminde artmama veya azalmayla sonuçlanır. Mikobakteriler test edilen ilaca dirençliyse, üremenin inhibisyonu söz konusu olmayacak ve GI günlük olarak artacaktır. Günlük GI değerindeki artış, test kültürünün dirençlilik derecesiyle orantılıdır.

Tüberküloz basillerinin duyarlılık testi direkt veya indirekt yöntemle yapılabilir. Direkt testte, yayma pozitif işlenmiş hasta örneği direkt olarak antibiyotikli ve antibiyotiksiz besiyerlerine ekilir. İndirekt testte ise, primer izolasyon besiyerinde üreyen mikroorganizmanın saf kültürü test edilir.

İNDİREKT DUYARLILIK TEST YÖNTEMİ

Antibiyotik solüsyonlarının hazırlanması:

Antibiyotikler (streptomisin, izoniazid, rifampin ve ethambutol) Bactec SIRE kiti olarak, liyofilize halde üretici firma tarafından sağlanmaktadır. Liyofilize halde bulunan bu ilaç şişeleri sulandırılarak stok solüsyonlar hazırlanılır.

- Liyofilize antibiyotik şişelerinin kapağını alkollü pamukla silin.
- Her liyofilize antibiyotik şişesine 5 ml steril distile deiyonize su ekleyin ve tamamen çözünene kadar karıştırın.
- Antimikrobiyal ajanların dilüsyon şeması ve Bactec 12B besiyerindeki son konsantrasyonları tablo 7’de görülmektedir.
- Stok solüsyonlar ufak miktarlar halinde 2-8°C’de 3 gün, -5 ila -20°C arasında 3 aya kadar, -70°C’de 6 aya kadar saklanabilir.

Antibiyotikli ve antibiyotiksiz 12B şişelerinin hazırlanması:

- Her bir antibiyotik duyarlılık testi için beş adet Bactec12B şişesi ve bir adet Bactec dilüsyon sıvısı (DF) şişesi hazırlayın.
- Tüm şişelerin üzerine hasta kültür numarasını yazın.
- Beş adet 12B şişesinin birine kontrol, dördüne ise çalışılacak dört antibiyotiğin ismini yazın (S,I,R,E ve K)
- SM ve EMB’nin daha önce hazırlanmış olan stok solüsyonlarının 1ml’si aseptik şartlarda 2ml steril distile su içine ilave edilerek 1/3 dilüe edin.
- Her birinin üzerinde antibiyotiğin ismi yazan dört ayrı Bactec 12B şişesine, INH ve RIF için direkt stok solüsyondan, SM ve EMB için dilüe edilmiş stok solüsyondan 0.1ml.yi, tek kullanımlık tüberkülin enjektörüyle ekleyin. Her ilaç için ayrı bir enjektör kullanın.
- Kontrol şişesine herhangi bir antibiyotik eklemeyin.
- Hiçbir zaman 12B şişesine 0.1ml’den fazla miktarda antibiyotik solüsyonu eklemeyin. Daha yüksek konsantrasyonlarda çalışmak isterseniz antibiyotik stok solüsyonunu daha yüksek konsantrasyonda hazırlayabilirsiniz. Böylece 12B’ye ilave edeceğiniz miktar yine 0.1ml olarak kalmalıdır.
- Antibiyotik eklenen 12B şişesi 2-8°C’de saklanarak 7 gün içinde kullanılabilir.

İnokulum hazırlanması:

İndirekt duyarlılık test yönteminde, laboratuvarın kapasitesi ve çalışma şekline göre günlük (haftanın 7 günü) veya hafta içi (hafta sonu dahil olmayan) iki ayrı program vardır. Bu iki programda inokulasyon yoğunluğu, inkübasyon süresi ve şişelerin okutulmasında farklılıklar vardır.

İndirekt duyarlılık test yönteminde inokulum hazırlarken örnek olarak Bactec 12B besiyeri, diğer bir sıvı besiyerleri (MiddleBrook7H9 gibi) veya bir katı besiyerlerinde (LJ, M7H10 veya M7H11) üremiş saf kültürler kullanılabilir.

Pozitif Bactec 12B şişesinden inokulum hazırlanması;

- Eğer primer izolasyon şişesi kullanılacaksa, GI değeri 10'un üzerine çıktığında şişeleri günlük olarak test ederek, GI değerinin >500 olmasını bekleyin ve bunu inokulum olarak kullanın veya GI 300 olunca bir gün daha inkübe edin ve inokulum olarak kullanın.
- Eğer 12B şişesine subkültür yapıldıysa, aynı şekilde GI değeri >500 olana kadar şişeleri günlük olarak okutun.
- GI değeri >800 ise, 1ml pozitif kültürü 1ml DF içine ekleyerek dilue edin ve bunu inokulum olarak kullanın.
- Eğer hafta sonu dahil olmayan program uygulanıyorsa, GI değeri 500'ü geçen şişeyi buzdolabında cumaya kadar saklayın (1 hafta içinde kullanın).

MiddleBrook 7H9 besiyerindeki üremeden inokulum hazırlanması;

Besiyerinin bulanıklığını DF ile hafta sonu dahil olmayan program için McFarland 0.5'e, günlük program için McFarland 1.0'e ayarlayın, inokulum olarak kullanın. (kültür 1–4 haftalık olmalıdır)

Katı besiyerindeki üremeden inokulum hazırlanması;

Üreme saptandıktan sonra 4 haftadan uzun süre geçmemiş kültürler kullanılmalıdır.

- Katı besiyerinde üremiş koloniler sert bir öze yardımıyla kazınarak alınır ve içinde 6–8 adet cam boncuk bulunan 3 ml DF'de emulsifiye edilir.
- 1–2 dakika süreyle vortekslenir.
- Büyük partiküllerin çökmesi için 30 dk süreyle tüp bekletilir.
- Süpernatant steril pastör pipeti yardımıyla boş bir steril cam tüpe alınır.
- Bu süspansiyonun üzerine DF ekleyerek bulanıklığını, hafta sonu dahil olmayan program için McFarland 0.5'e, günlük program için McFarland 1.0'e ayarlayın.

Inokulasyon ve inkübasyon;

- Antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılacak tüm 12B şişelerini Bactec 460 cihazında test ederek şişelerin içinde % 5'lik CO2 ortamı sağlayın.
- Dört adet antibiyotikli, bir adet antibiyotiksiz kontrol besiyerini ve bir adet Bactec DF şişesini sıralayın.
- Şişelerin lastik kapaklarını alkollü pamukla silerek dezenfekte edin.
- İnokulum süspansiyonunu iyice karıştırın ve bir tüberkülin enjektörü ile ilaç içeren dört adet 12B şişesine 0.1ml inokule edin.

- Ayrıca yine 0.1ml bu süspansiyondan 9.9ml DF şişesine ekleyin ve karıştırın. Böylece standardize edilmiş inokulum süspansiyonunu DF ile 1/100 oranında dilue edin.
- DF ile 1/100 oranında dilue edilmiş süspansiyondan 0.1ml'yi kontrol şişesine inokule edin.
- Birkaç damla inokulum süspansiyonunu, bir adet kanlı agar ve bir adet M7H10 veya M7H11 agar plağına subkültüre edin.
- Her şişenin lastik kapağını dezenfektan emdirilmiş pamukla ve peşinden alkollü pamukla silin
- Şişeleri 37±1°C'de karanlıkta inkübe edin.

Sonuçların okunması:

Sonuçları okumadan önce kanlı agar ve M7H10 veya M7H11 plaklarını kontaminasyon yönünden inceleyin. Kontaminasyon saptanmaz ise günlük ya da hafta sonu dahil olmayan programa göre sonuçları okuyup, sonuçları kayıt formuna işleyin.

Günlük programda;

- Şişeleri hafta sonu ve tatiller dahil olmak üzere günlük olarak okutun.
- Her gün yaklaşık olarak aynı saatte (±2 saat) okutun.
- En az 4 gün okutun.
- Kontrol şişesinin GI değeri >30 ise sonuçlar yorumlanabilir.
- Kontrol şişesinin GI değeri bir iki gün içinde >30 olursa, muhtemelen inokulum çok yoğundur. Testi tekrar edin.
- Kontrol şişesinin GI değeri 3. okutmada >30 olursa, sonuçları yorumlamadan önce bir gün daha inkübe edin.
- Kontrol şişesinin GI değeri 14 günlük inkübasyondan sonra 30'a ulaşmazsa, testi tekrar edin.

Hafta sonu dahil olmayan programda;

- Testi Cuma günü yapın.
- Pazartesi'den itibaren günlük ve yaklaşık olarak her gün aynı saatte (±2 saat) okutun
- En az 3 gün okutun.
- Kontrol şişesinin GI değeri Pazartesi günü >30 olursa, muhtemelen inokulum çok yoğundur. Testi tekrar edin.

- Salı günü kontrol şişesinin GI değeri >30 olursa, çarşamba günü de okuttuktan sonra, sonuçları yorumlayın. Pazartesi gününe ait GI değerini dikkate almayın.
- Kontrol şişesinin GI değeri 14 günlük inkübasyondan sonra 30'a ulaşmazsa, testi tekrar edin.

Yorumlama:

- Kontrol ve ilaç içeren şişelerin, bir gün önceyle karşılaştırarak, günlük GI farklılıklarını (ΔGI) hesap edin.
- Sonuçları aşağıdaki gibi yorumlayın;
Kontrol şişesinin $\Delta GI >$ ilaçlı şişenin ΔGI = duyarlı
Kontrol şişesinin $\Delta GI <$ ilaçlı şişenin ΔGI = dirençli
Kontrol şişesinin $\Delta GI \approx$ ilaçlı şişenin ΔGI = sınırda veya kısmi dirençli
- İlaç içeren şişenin GI değeri 500'ü geçer ve bir sonraki gün de 500'ün üzerinde kalırsa, ΔGI 'e bakmaksızın, sonucu dirençli olarak yorumlayın (kontrol şişesinden inokulumun yoğun olmadığını kontrol ederek inokulumun yoğun olmadığından veya bir kontaminasyon olmadığından emin olun).
- Sınırdaki sonuçlar söz konusuysa, şişeleri ek olarak 2-3 gün daha okutun. Bu ek okumalar duyarlı veya dirençli yönünde bir trendin yakalanmasına neden olacaktır.

Kalite kontrol;

Her antibiyotik duyarlılık test gününde M.tuberculosis H37Rv (ATCC 27294) kalite kontrol suşunu da test edin. Bu suş test sonucunda tüm primer ve sekonder antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlı olmalıdır. M.tuberculosis H37Rv içeren kontrol şişesi 3-5 gün içinde 30'dan büyük bir GI değerine ulaşmalıdır. Kalite kontrol suşunun sonuçları uygun değilse, aşağıdaki parametreleri gözden geçirin. Kontrol şişesinin GI 30 değerine ulaşmasında gecikme varsa;

- Inkübasyon ısısının $37 \pm 1^\circ C$ olduğundan,
- Suşun canlılığından,
- İnokulum dilüsyonunun doğru yapıldığından emin olun.

M.tuberculosis H37Rv her hangi bir ilaca dirençli bulunursa;

- Tam dirençliyse, besiyerinde antibiyotik olmayabilir veya kontamine olmuş olabilir.
- Kısmi dirençliyse, antibiyotik aktivitesini kaybetmiş olabilir veya inokulum çok yoğun olabilir.

DİREKT DUYARLILIK TEST YÖNTEMİ :

ARB yayma pozitif tüm hasta örneklerine uygulanabilir. Hasta örneğindeki basil sayısına bağlı olarak 4–21 gün içinde sonuç verir. Primer izolasyon besiyeriyle aynı gün ekim yapılır. Tüm direkt test sonuçları indirekt testle doğrulanmalıdır.

- Sadece izoniazid, rifampin, streptomisin ve ethambutolü test edin.
- İnokulasyon öncesi kontrol ve antibiyotik içeren şişelere 0.1ml Bactec PANTA (Polimiksin B, Amfoterisin B, Nalidiksik asit, Trimetoprim ve Azlosilin) antibiyotik karışımı ekleyin.
- Homojenize, dekontamine ve konsantre edilmiş, ARB'si pozitif, iyice karıştırılmış primer hasta örneğinin 0.1ml.sini antibiyotik içeren dört adet 12B şişesine direkt olarak inokule edin.
- Ayrıca hasta örneğini DF sıvısıyla 1:10 dilue edip iyice karıştırdıktan sonra, 0.1ml kontrol şişesine inokule edin. (genellikle örnek az sayıda basil içerdiğinden inokulumun 1/100 yerine 1/10 dilüsyonu tercih edilir)
- Her 2–3 günde bir okutarak, 37±1°C'de üç haftaya kadar inkübe edin (yayma pozitifliği yüksek düzeyde olan örnekleri her gün okutun).
- Kontrol şişesinin GI değeri > 10 olduğunda, şişeleri her gün okutun
- Kontrol şişesinin GI değeri > 20 olduğunda, sonuçları yorumlayın.
- Kontrol şişesinin GI değeri 21 günlük inkübasyonla >20 olmaz ise, testi yorumlamayın.
- İnokulumdaki mikobakteri sayısı daha az ve inkübasyon süresi daha uzun olduğundan genellikle sonuçlar daha bariz olarak duyarlı veya dirençlidir. İlaçlı şişedeki GI'n, kontrol şişesindeki GI'e yakın olması (%20 içinde), kontrol 1/10 dilüe edilmiş olduğundan, %10 dirençli popülasyonu düşündürür.
- Rapora "sonuçlar, direk hasta örneğinin test edilmesiyle elde edilmiştir" şeklinde bir not koyun.
- İzolatın tüberküloz basili olduğu doğrulanmadan, duyarlılık test sonuçlarını rapor etmeyin.
- Kalite kontrol için, indirekt testte belirtilenler direkt testte de geçerlidir.

BACTEC 460 PZA (PİRAZİNAMİD) DUYARLILIK TESTİ

Pirazinamid (PZA), tüberküloz basillerine karşı sadece düşük pH'da aktif olan bir antimikrobiyal ajandır. Bactec PZA yönteminde, test pH 6.0'da yapılır.

PZA solüsyonunun hazırlanması:

- Bactec Liyofilize PZA, 5 ml Bactec Reconstituting Fluid (RF) ile sulandırılır (4.000 µg/ml).
- PZA stok solüsyonu ufak miktarlara bölünüp, SİRE stok solüsyonları gibi saklanabilir.

PZA içeren besiyerinin ve kontrol besiyerinin hazırlanması:

- Bactec PZA duyarlılık test besiyerine, RF ile sulandırılmış olan PZA solüsyonundan tüberkülin enjektörü ile 0.1ml, eklenir (pH 6.0) (final PZA konsantrasyonu 100 µg/ml).
- Kontrol besiyerine Bactec RF sıvısından 0.1ml eklenir. (RF üremeyi kolaylaştırıcı bir madde olan POES (polyoxyethylene stearate) içerir, bu nedenle inokule edilecek tüm şişelerde bu RF bulunmalıdır.

İnokulum hazırlanması:

- Aşağıda belirtilen besiyerlerinden herhangi birindeki üremeden 0.1ml'yi, 0.1ml Bactec RF eklenmiş Bactec 12B besiyerine subkültüre edin.
 - GI değeri 300-999 arası olan Bactec 12B besiyeri
 - Bulanıklığı McFarland no1 veya daha düşük olan M7H9 besiyeri
 - Katı besiyerinden hazırlanmış ve bulanıklığı McFarland no1'e yakın süspansiyon
- Karanlıkta 37±1°C'de inkübe edin.
- Subkültürü günlük olarak okutun.
 - GI 300-500 arasında ise, bunu inokulum olarak kullanın.
 - GI>500 ise aşağıdaki gibi dilue edin.
- a) GI 500-599 ise, 1.0ml 12B besiyeri ekleyin.
- b) GI 600-699 ise, 1.5ml 12B besiyeri ekleyin.
- c) GI 700-799 ise, 2.0ml 12B besiyeri ekleyin.
- d) GI 800-899 ise, 2.5ml 12B besiyeri ekleyin.
- e) GI 900-999 ise, 3.5ml 12B besiyeri ekleyin.
 - Pik GI değerine ulaştıktan sonra veya GI 999 okunduktan sonra 1 günden fazla geçen kültürleri inokulum olarak kullanmayın.

İnokulasyon ve inkübasyon:

- Tüm şişelerin lastik kapağını %70'lik alkolle silin.
- İnokulum süspansiyonunu iyice karıştırın ve bir tüberkülin enjektörü ile PZA içeren şişeye ve kontrol şişesine 0.1ml inokule edin. Kontrol şişesi için inokulumu dilüe etmeyin.
- Birkaç damla inokulum süspansiyonunu bir adet kanlı agar ve bir adet M7H10 veya M7H11 agara, inokulumun saf olup olmadığını kontrol etmek için, inokule edin.

- 37±1°C’de karanlıkta inkübe edin.

Sonuçların okunması:

- Kanlı agar ve M7H10 veya M7H11 plaklarını kontaminasyon yönünden inceleyin.
- Şişeleri günlük olarak okutun.
- Her gün yaklaşık olarak aynı saatte (±2 saat) okutun.
- En az 4 gün okutun.
- Kontrol şişesinin GI değeri ≥ 200 ise, sonuçlar yorumlanabilir.
- Kontrol şişesinin GI değeri 14 günlük inkübasyondan sonra 200’e ulaşmazsa, testi yorumlamayın.

Not: Hafta sonu dahil olmayan program kullanılacaksa SİRE için kullanılan programa benzer şekilde test Cuma günü yapılır, pazartesi gününden itibaren okutulmaya başlanılır.

Yorumlama:

Sonuçları aşağıdaki gibi yorumlayın;

- PZA şişesinin GI < kontrol şişesinin GI’sinin % 10 = duyarlı
 - PZA şişesinin GI > kontrol şişesinin GI’sinin % 10 = dirençli
- Direnci gösteren sonuçlar 4 günden önce yorumlanabilir, fakat duyarlılığı gösteren sonuçlar 4 günden önce raporlanmamalıdır.

Kalite kontrol:

M.tuberculosis H37Rv suşunun üreme kontrolü 3–8 gün içinde GI > 30 değerine ulaşmalıdır ve PZA’ya tamamen duyarlı olmalıdır.

IV. BACTEC MGIT 960 SİSTEMİ İLE DUYARLILIK TESTİ**Prensip:**

BACTEC MGIT 960 SIRE kiti kültürde izole edilen M.tuberculosis’i test etmek için nonradyometrik bir duyarlılık testidir. BBL MGIT 7-ml mycobacteria growth indicator tube (MGIT tube) mikobakterilerin üremesini ve saptanmasını sağlayan modifiye Middlebrook 7H9 broth içerir. MGIT tüpün dibindeki silikon içine floresan madde gömülüdür. Floresan madde sıvı besiyerinde çözülmüş oksijen varlığına

duyarlıdır. Çözölmüş oksijenin başlangıçtaki konsantrasyonu floresan maddeden floresans yayılımını baskılar. Üreyen mikroorganizmalar oksijeni tüketir ve floresan maddenin floresans yaymasına neden olur.

BACTEC MGIT 960 SIRE kiti 4–13 günde sonlanan kalitatif bir testtir. Test M.tuberculosis izolatlarının ilaçlı ve ilaçsız tüplerdeki üremelerinin karşılaştırılması esasına dayanır. MGIT 960 cihazı tüplerdeki floresans artışını sürekli izler. Cihaz yardımıyla ilaçlı ve ilaçsız tüplerdeki floresans analizleri karşılaştırılarak duyarlılık sonuçları belirlenir. BACTEC MGIT 960 cihazı otomatik olarak bu sonuçları yorumlar ve duyarlı ya da dirençli olarak bildirir.

Antibiyotik solösyonlarının hazırlanması:

Antibiyotikler (streptomisin, izoniazid, rifampin ve ethambutol) Bactec MGIT SIRE kiti içinde liyofilize halde üretici firma tarafından sağlanmaktadır. Liyofilize halde bulunan bu ilaç şişeleri sulandırılarak stok solösyonlar hazırlanılır.

- Liyofilize antibiyotik şişelerinin kapağını alkollü pamukla silin.
- Her liyofilize antibiyotik şişesine 4 ml steril distile su ekleyin ve tamamen çözünene kadar karıştırın.
- Liyofilize antibiyotiklerin dilösyon şeması ve BBL MGIT 7ml besiyerindeki final konsantrasyonları tablo 8’de görölmektedir.
- Özellikle INH için olmak üzere, eğer bir ilacın kritik konsantrasyonunda direnç görölürse, ilacın daha yüksek bir konsantrasyonu için duyarlılık testi yapılması önerilmektedir. Bu amaçla BACTEC MGIT SM 4.0 ve INH 0.4 kitleri mevcuttur. Bu konsantrasyonlarda da duyarlılık testi yapılacaktır; bu iki kitteki liyofilize ilaçlar 2ml steril distile su ile sulandırılmalıdır tablo 8. Diğer prosedür SIRE kiti ile benzerdir.

Antibiyotikli ve antibiyotiksiz MGIT tüplerinin hazırlanması:

- Her test izolatu için 5 tane MGIT tüpünü alın ve üzerlerini yazın (birine GC (Kontrol), diğerlerine S, I, R ve E olarak). Tüpleri uygun büyüklükte AST (antibiyotik duyarlılık testi) set taşıyıcısına doğru sırayla yerleştirin (soldan ilk tüp GC, sonra SIRE).
- Her tüpe aseptik şartlarda 0.8ml BACTEC MGIT SIRE supplementi ekleyin. Kitin içinden çıkan supplementin kullanılması önemlidir.

- Dört SIRE tüpünün her birine, üzerine yazdığımız antibiyotik adına uygun şekilde, daha önce hazırladığımız antibiyotik solüsyonlarından bir mikropipet yardımı 100µl pipetleyin (tablo 8).
- Kontrol (GC) tüpüne hiçbir antimikrobiyal ajan eklemeyin.

İnokulum hazırlanma:

MGIT yöntemi ile duyarlılık testleri M.tuberculosis'in saf kültürlerinden yapılır Katı besiyerinden İnokulum hazırlanması;

- Cam boncuklu steril bir tüpe 4 ml Middlebrook 7H9 veya MGIT broth koyun.
- Steril bir öze ile olabildiğince çok koloniyi kazıyarak alın ve 7H9 içinde süspanse edin.
- Büyük kümeleri dağıtmak için süspansiyonu 2–3 dakika vorteksleyin. Süspansiyon bulanıklılığı McFarland no1 standardını geçmelidir.
- Süspansiyonu 20 dakika bekletin.
- Süpernatantı başka bir kapaklı steril tüpe aktarın, 15 dk. daha bekletin.
- Süpernatantı yine başka bir kapaklı steril tüpe aktarın ve süspansiyonu McFarland no:0.5 standardına göre ayarlayın.
- Ayarlanmış süspansiyonun 1 ml'sini 4 ml steril serum fizyolojikte dilüe edin (1/5 dilüsyon)

Pozitif MGIT tüpünden inokulum hazırlanması;

- Pozitif bir MGIT tüpü, MGIT 960 cihazında pozitif olduktan sonraki gün (1.gün) dahil 5. güne kadar kullanılabilir.
- Tüpün 5 günden daha fazla bir pozitifliği varsa, Growth supplement eklenmiş yeni bir MGIT tüpüne subkültürü yapılmalı ve pozitif oluncaya kadar cihazda test edilmeli, pozitifliği takip eden 1–5. günlerde kullanılmalıdır.
- Tüpler 1–2 gündür pozitifse iyice karıştırılıp, inokulum olarak kullanılır.
- Tüpler 3–5 gündür pozitifse iyice karıştırılır, 1ml'si 4ml SF'de dilüe edilir ve bu 1/5 dilüe süspansiyon inokulum olarak kullanılır.

İnokülasyon:

- Dört adet ilaçlı MGIT tüpünün her birine (S,I,R,E) inokulum süspansiyonundan 0.5ml pipetleyin.
- 1/100'lük kontrol süspansiyonu hazırlamak için 9.9ml steril SF içine 0.1ml organizma süspansiyonu pipetleyin ve iyice karıştırın.

- 1/100'lük kontrol süspansiyonundan "GC" olarak etiketlenmiş MGIT tüpüne 0.5ml pipetleyin.
- Tüm tüpleri sıkıca kapatın. 3–4 kez hafifçe alt üst ederek karıştırın.
- MGIT 960 cihazına giriş kaydını yapın (BACTEC MGIT 960 cihazı kullanım kılavuzuna göre)
- İnokulum süspansiyonundan kanlı agara 0.1ml ekin, 35-37 oC'de inkübe edin.
- Bakteriyel kontaminasyon açısından kanlı agar plağını 48. saatte kontrol edin. Kanlı agar plağında üreme yoksa teste devam edin, üreme varsa AST (Antibiyotik Duyarlılık Testi) setini atın ve testi tekrar edin.

Sonuçların yorumlanması ve rapor edilmesi:

- İlaçlı tüpteki floresans kontrol tüpündekinden daha az olduğunda, MGIT 960 cihazı sonucu duyarlı olarak yorumlar.
- İlaçlı tüpteki floresans kontrol tüpündekine eşit olduğunda, cihaz sonucu dirençli olarak yorumlar.
- MGIT 960 cihazının yorumu esas alınarak sonuç "duyarlı" veya "dirençli" olarak rapor edilir.
- Test sonucunun etkilenebileceği bazı durumlar olduğunda, duyarlılık yorumu olmaksızın cihaz sonucu hata (X) olarak verir. Bu durumda sonuç rapor edilmez.
- Raporda test yöntemi, ilaç ve konsantrasyonlar bulunmalıdır.

Uyarılar:

- BACTEC MGIT 960 duyarlılık testi test edilen izolatın duyarlılık derecesini yorumlamaz. Sonuçlar test edilen ilaç ve konsantrasyon için S (duyarlı) ya da R (dirençli) olarak rapor edilir.
- STR, INH, RIF, EMB için BACTEC MGIT 960 SIRE testinde kullanılan kritik konsantrasyonlar, yanlış duyarlı sonuçlardan kaçınmak için, proporsiyon yönteminde kullanılan konsantrasyonlardan biraz daha düşüktür. Önerildiği gibi daha yüksek konsantrasyonlarda da test etmek izolatın düşük düzey direncini saptama olasılığını artıracaktır.
- BACTEC MGIT 960 duyarlılık testi sadece BACTEC MGIT 960 cihazı ile uygulanabilir. AST seti manuel olarak okunamamaktadır. M.tuberculosis'in sadece saf kültürü kullanılmalıdır. Kontamine olan veya çok sayıda mikobakteri

türü içeren kültürler yanlış sonuçlar verebilir ve test edilmemelidir. Klinik örneklerden direkt test önerilmemektedir. Katı besiyerinden yapılan süspansiyonlar standardize edilmeden çöktürmek için bekletilmelidir. Katı besiyerinden hazırlanan inokulum görsel olarak McFarland no: 0.5 bulanıklık standartına ayarlanmalıdır; bu yapılmadığında yanlış sonuçlar alınabilir veya cihaz hata verebilir.

- İlaçlı tüplere ve kontrol tüpüne inokule edilen organizma süspansiyonunun yukarıda önerilen dilüsyonları kullanılmadığında yanlış sonuçlar verebilir.
- İlaçların uygun volümde steril distile su ile sulandırılmaması yanlış sonuçlar verebilir.
- İnokule edilen tüplerin iyice karıştırılması önemlidir. Tüplerin yeterince karıştırılmaması yanlış dirençli sonuçlara yol açabilir.
- AST set rakına AST setinin doğru sıra ile konulmaması hatalı sonuçlar verebilir. İlaç tanımına uygun AST set rakının seçilmemesi geçersiz veya yanlış sonuçlarla sonuçlanabilir.
- AST setinin cihaz içine doğru şekilde yerleştirilmemesi bir isimsiz durum olarak sonuçlanacaktır, 8 saat içinde sorun çözülmelidir. Sorun 8 saatde çözülmez ise, AST seti atılmalı ve test tekrar edilmelidir.

AST setinde SIRE suplementi kullanılmaması yanlış sonuçlar verebilir. AST setine BACTEC MGIT 960 growth suplementi eklemeyin.

Kalite kontrol:

- MGIT 960 SIRE kit şişelerinin gelen her yeni parti veya lot numarasında, M.tuberculosis ATCC 27294 kalite kontrol (QC) suşları test edilmelidir. Ayrıca duyarlılık testi yapılacağı her hafta aynı kalite kontrol suşları çalışılmalıdır.
- Kalite kontrol stok suşları -70oC'de saklanır.
- Kalite kontrol testi, test edilecek ilaç kitleri için "duyarlılık test prosedürü" açıklamalarına uyularak uygulanmalıdır.
- 4-13 gün içinde kalite kontrol suşu GC tüpünde pozitif sonuç vermeli ve tüm antibiyotiklere duyarlı olmalıdır. Uygun sonuçlar alınmaz ise test tekrar edilir.

BACTEC MGIT 960 PZA (PİRAZİNAMİD) DUYARLILIK TESTİ

Prensip:

BACTEC MGIT 960 PZA kiti de SIRE kiti ile benzer prensiple çalışan, pirazinamid (PZA) duyarlılığını 4-21 günde test eden kalitatif bir testtir. PZA testi genel

yöntemlerin modifikasyonunu gerektirir, çünkü PZA in vitro sadece daha düşük pH değerlerinde aktiftir. MGIT 960 PZA besiyeri, pH'ı 5.9'a düşürülmüş modifiye Middlebrook 7H9 broth içerir.

Antibiyotik solüsyonlarının hazırlanması:

BACTEC MGIT 960 PZA kiti içinden çıkan liyofilize PZA, daha önce anlatılan MGIT SIRE duyarlılık testindeki gibi sulandırılır. Tek fark sulandırım için 2.5ml distile su kullanılmasıdır (tablo 8).

Antibiyotikli ve antibiyotiksiz MGIT tüplerinin hazırlanması:

- Her test izolatu için 2 tane BACTEC MGIT PZA tüpünün üzerini "GC" ve "PZA" olarak yazın. Tüpleri iki tüplük AST taşıyıcısına doğru sırayla yerleştirin (firma önerilerine göre).
- Her tüpe aseptik şartlarda 0.8ml BACTEC MGIT PZA suplementi ekle. Doğru supplementin kullanılması önemlidir.
- Bir mikropipet kullanarak, aseptik şartlarda, etiketine uygun MGIT tüpüne (PZA) 8.000µg/ml'lik MGIT PZA'dan 100µl pipetleyin.
- Kontrol tüpüne antimikrobiyal ajan eklemeyin.

İnokulum hazırlanması:

MGIT SIRE duyarlılık testinde anlatıldığı gibidir.

İnokülasyon:

İlaçlı tüplerin inokülasyonu MGIT SIRE duyarlılık testinde anlatıldığı gibidir. Fakat kontrol tüpü için 1/100'lük değil 1/10'luk kontrol süspansiyonu hazırlayın. 1/10'luk kontrol süspansiyonu hazırlamak için 4.5ml steril SF içine 0.5ml inokulum süspansiyonu pipetleyin, iyice karıştırın. "GC" olarak etiketlenmiş tüpe 1/10'lük kontrol süspansiyonundan 0.5ml pipetleyin.

Taşıyıcıda kontrol tüpünün pozisyonunun soldan ilk tüp olduğundan emin olun. AST setinin cihaza girişini yaparken, iki tüplük AST set tanımında ilaç olarak PZA'yı seçin.

Sonuçların yorumlanması ve rapor edilmesi:

SİRE yorumunun %1 proporsiyon düzeyinde yapıldığı gibi, PZA'da direnç %10 proporsiyon düzeyinde rapor edilir.

Sadece PZA'ya direnç (Monoresistance) nadirdir. Sadece PZA direnci bulunmuş ise, M.tuberculosis'in saflığını, identifikasyonunu ve diğer parametreleri kontrol ederek sonuçları doğrulayın.

Uyarılar:

- PZA duyarlılık testinde NCCLS, referans yöntem olarak BACTEC 460TB yöntemini önermektedir. Nonradyometrik BACTEC MGIT 960 PZA kiti, BACTEC 460TB yöntemi ile yaklaşık aynı sürede duyarlılık sonucu vermektedir. Benzer sonuçlar elde edebilmek için MGIT 960 PZA kitinde, BACTEC 460TB'de olduğu gibi PZA'nın 100g/ml konsantrasyonu kullanılmaktadır.
- Katı besiyerindeki üreme taze olmalıdır (14 günlük). Daha eski kültürlerden hazırlanan; McFarland no 0.5 standardı kullanılmadan hazırlanan; uygun dilüsyonlarda hazırlanmayan inokulumlar yanlış sonuçlar verebilir.
- Kontrol tüpüne inokulasyon için izolatın 1/10 dilüsyonunun kullanılmaması yanlış sonuçlar verebilir.
- PZA AST setinde MGIT 960 PZA suplementi kullanılmaması yanlış sonuçlar verebilir. PZA AST setine MGIT 960 SIRE suplementi veya BACTEC MGIT 960 growth supplement koymayın.

KAYNAKLAR

1. Hacek D: Modified proportion agar dilution test for slowly growing mycobacteria. Clinical Microbiology Procedures Handbook, Isenberg HD (Ed in Chief). ASM, Washington, D.C. 1992: 5.13.1–5.13.15.
2. NCCLS. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standart. NCCLS document M24-A, Pennsylvania, 2003.
3. Kent PT, Kubika GP. Public Health Mycobacteriology A Guide for the level III Laboratory-Diivision of laboratory training and consultation laboratory program office. Public Health Service-Centers for Disease Control, Atlanta 1985: 159-182.
4. Gümüřlü F, Ceyhan İ, Kocagöz T, Sönmez N. Tüberküloz laboratuvar rehberi.1.Baskı. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı. 1998.
5. WHO. Guidelines for drug susceptibility testing for second-line anti-tuberculosis drugs for DOTS-PLUS. WHO/CDS/TB/2001.288; World Health Organization, 2001.
6. Siddiqi SH. Radiometric (Bactec) tests for slowly growing mycobacteria. Clinical Microbiology Procedures Handbook, Isenberg HD (Ed in Chief). American Society

for Microbiology/Washington,D.C. 1992: 5.14.1–5.14.25.

7. Siddiqi SH. BACTEC 460TB System Product and Procedure Manual. Becton Dickinson and Company Maryland,USA, 1996.

8. NCCLS: Antimycobacterial susceptibility testing for Mycobacterium tuberculosis; tentative standart. NCCLS document M24-T, vol 15, no 16, 1995.

9. Della-Latta P. Mycobacteriology and Antimycobacterial Susceptibility Testing. In Clinical Microbiology Procedures Handbook, Isenberg HD (Ed in Chief), Second edition, ASM, Washington, D.C. 2004: 7.7.1–7.8.5.

Tablo 1. Middlebrook 7H10 Agar besiyerine eklenmek üzere hazırlanan ilk seçenек ilaçların stok ve çalışma konsantrasyonları, besiyerine eklenen miktarları ve besiyeri içindeki final konsantrasyonları

İlaç	Çözücü	Stok konsantrasyon (µg/ml)	7H10 agar için çalışma konsantrasyonu (µg/ml)	200ml 7H10 agara çalışma konsantrasyonundan eklenen miktar (ml)	7H10 agarda ilacın son konsantrasyonu (µg/ml)
INH	SDW	10.000	200	0.2	0.2 ^{KK}
				1.0	1.0
EMB	SDW	10.000	1.000	1.0	5.0 ^{KK}
RIF	DMSO (veya metanol)	10.000	1.000	0.2	1.0 ^{KK}
SM	SDW	10.000	1.000	0.4	2.0 ^{KK}
				2.0	10.0

SDW= Steril Distile Su; DMSO=Dimetil sulfoksit; KK=kritik konsantrasyon

Tablo 2. Middlebrook 7H10 Agar ile agar proporsiyon yönteminde ilaçlı ve ilaçsız besiyerlerinin dört bölmeli petri plaklarına dökülme düzeni ve ilaçların konsantrasyonları.

Plak	Bölme	Antimikrobiyal ilaç
1	I	İlaçsız (kontrol)
	II	İsoniazid (0.2 _g/ml)
	III	Streptomisin (2 _g/ml)
	IV	Rifampisin (1 _g/ml)
2	I	İlaçsız (kontrol)
	II	İsoniazid (1.0 _g/ml)
	III	Streptomisin (10 _g/ml)
	IV	Ethambutol (5 _g/ml)

Tablo 3. Direkt test yönteminde inokulum dilüsyonu

EZN boyama (ARB/alan) (X1000 büyütme)	Florokrom boyama (ARB/alan) (X200-400 büyütme)	Dilüsyonlar
<1	<25	Dilüsyon Ø
1-2	25-50	Dilüsyon Ø, 10^{-1}
2-10	50-250	Dilüsyon Ø, 10^{-2}
>10	>250	10^{-2} , 10^{-3}

(NCCLS document M24-A'ya göre)

Tablo 4. Agar plaklarındaki mikobakteri kolonilerinin üreme yönünden kantitasyonu

Koloni sayısı	Kantitasyon
0 - 50	gerçek koloni sayısı
50 - 100	1+
100 - 200	2+
200 - 500	3+
>500 (Aşırı üreme)	4+

Tablo 5. Proporsiyon yönteminde LJ besiyerine eklenmek üzere hazırlanan ilk seçenек ilaçların stok ve çalışma konsantrasyonları, besiyerine eklenen miktarları ve besiyeri içindeki final konsantrasyonları

İlaç	Çözücü	Stok konsantrasyon (µg/ml)	LJ için çalışma konsantrasyonu (µg/ml)	500ml LJ'ye eklenen miktar (ml)	LJ'de ilacın son konsantrasyonu (µg/ml)
INH	SDW	10.000	100	0.5	0.1
				1.0	0.2 ^{KK}
				5.0	1.0
EMB	SDW	10.000	1.000	0.5	1.0
				1.0	2.0 ^{KK}
				2.0	4.0
RIF	Metanol	10.000	10.000	0.5	10.0
				1.0	20.0
				2.0	40.0 ^{KK}
SM	SDW	10.000	1.000	1.0	2.0
				2.0	4.0 ^{KK}
				4.0	8.0

SDW= Steril Distile Su; KK=kritik konsantrasyon

Tablo 6. Proposiyon yönteminde Middlebrook 7H10 agar için ve LJ için önerilen Kritik Konsantrasyon (KK) ve Kritik Proporsiyonlar (KP).

Antitüberküloz ilaç	7H10		LJ		Antitüberküloz ilaç	7H10		LJ	
	KK (µg/ml)	KP (%)	KK (µg/ml)	KP (%)		KK (µg/ml)	KP (%)	KK (µg/ml)	KP (%)
Izonlazid (INH)	0.2	1	0.2	1	Amikasin (AMK)	4.0	1		
Rifampin (RIF)	1.0	1	40	1	Kapreomisin(KAP)	10.0	1	40	1
Streptomisin (SM)	2.0	1	4.0	10	Kanamisin (KAN)	5.0	1	20	10
Ethambutol (EMB)	5.0	1	2.0	1	Etyonamid (ETH)	5.0	1	20	10
Pirazinamid (PZA)*	25-50	1	100.0	10	Klofazimin (CLF)	1.0	1		
					Sikloserin (CYC)	30.0	1	30	10
					Ofloksasin (OFL)	2.0	1	2	1
					PAS	2.0	1	0.5	1

*PZA'nın Bactec 12B besiyerinde pH 6'da test edilmesi önerilir.

Tablo 7: Bactec 460TB duyarlılık testinde liyofilize antibiyotiklerden stok solüsyon hazırlama ve 12B besiyerindeki final antibiyotik konsantrasyonları.

Antibiyotik	şişedeki liyofilize miktar	Sulandırım için steril distile su	Sulandırım sonrası konsantrasyon	12B'ye aktarılan miktar	12B'deki final konsantrasyon
Streptomisin	1.2 mg	5 ml, sonra 1:3 dilüsyon	80 µg/ml	0.1 ml	2.0 µg/ml
İzoniazid	0.02 mg	5 ml	4 µg/ml	0.1 ml	0.1 µg/ml
Rifampin	0.4 mg	5 ml	80 µg/ml	0.1 ml	2.0 µg/ml
Ethambutol	1.5 mg	5 ml, sonra 1:3 dilüsyon	100 µg/ml	0.1 ml	2.5 µg/ml

Tablo 8: MGIT liyofilize antibiyotiklerinin dilüsyon şeması ve 7ml'lik MGIT tüpteki final konsantrasyonları

Liyofilize antibiyotik	Sulandırım (Steril distile su)	Sulandırıldıktan sonraki ilaç konsantrasyonu (µg/ml)	MGIT tüpe eklenen miktar (µl)	MGIT tüpteki final konsantrasyon (µg/ml)
MGIT SM	4ml	83	100	1.0
MGIT INH	4ml	8.3	100	0.1
MGIT RIF	4ml	83	100	1.0
MGIT EMB	4ml	415	100	5.0
MGIT SM 4.0	2ml	332	100	4.0
MGIT INH 0.4	2ml	33.2	100	0.4
MGIT PZA	2.5ml	8000	100	100

Örnek: Agar proporsiyon testi kayıt formu

Hasta adı soyadı :

İnokulasyon tarihi :

Hasta no :

Okuma tarihi :

Örnek adı :

Test yöntemi :

Plak	Bölme	10 ⁻²			10 ⁻⁴			Sonuç
		Koloni sayısı	Kantitasyon	% Direnç	Koloni sayısı	Kantitasyon	% Direnç	
1	kontrol							
	INH 0.2							
	SM 2.0							
	RIF 1.0							
2	Kontrol							
	INH 1.0							
	SM 10.0							
	EMB 5.0							

Örnek: BACTEC radyometrik duyarlılık testi kayıt formu

Hasta adı soyadı :

İnokulasyon tarihi :

Hasta no :

İnokulum kaynağı :

Örnek adı :

İnok. GI değeri :

Test yöntemi :

Rapor tarihi :

Okuma programı:
(günlük/haftasonu hariç)

	GI															Sonuç
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	ΔGI	
Kontrol																*****
Streptomisin 2.0																
Izoniazid 0.1																
Rifampin 2.0																
Ethambutol 2.5																

TÜBERKÜLOZ TANISINDA KLASİK PCR:

“PCR ve RFLP Yöntemleri ile Mycobacterium Türlerinin İdentifikasyonu”

Prof.Dr. Ahmet SANIÇ¹ , Doç. Dr. Ahmet KIZIRGİL²

¹Kafkas Üniversitesi Rektörlüğü, Azerbaycan

²Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Elazığ.

Mikroskopi ve kültür gibi klasik tanı yöntemleri Mycobacterium'lara bağlı infeksiyonların tanısında önemini eskisi gibi korumakla birlikte daha uzun zaman almakta ve yeni etkenlerin tanımlanmasında yetersiz kalabilmektedir. Moleküler yöntemler oldukça hızlı olmaları ve tanımlama aralıklarının genişliği nedeniyle Mycobacterium infeksiyonlarının tanısında da yaygın kullanım alanı bulmuştur. Mycobacterium infeksiyonlarının tanısında kullanılan moleküler yöntemlerin amacı, şu ana başlıklar altında toplanabilir:

- Mycobacterium'ların klinik örneklerde varlığının saptanması,
- Klinik örneklerde bulunan veya kültürde üretilen bakterilerin türlerinin saptanması veya tiplendirilmesi,
- Mycobacterium'ların antimikrobiyal ilaçlara karşı dirençli olup olmadıklarının araştırılması,
- Moleküler epidemiyolojik araştırmalar ile Mycobacterium infeksiyonlarının kaynağının ortaya çıkartılması.

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR)

PCR ilk defa Kary Mullis tarafından 1985 yılında tanımlanmıştır (1). Bu yöntemde çoğaltılması (replikasyon) istenen DNA örneği, replikasyon için gereken maddelerle birlikte bir tüpe konarak, üç değişik ısıda bir döngü (siklus) içerisinde tutulur.

- **Denatürasyon:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nda ilk basamak DNA'nın denatürasyonudur. 94-95°C'ye ısıtılan DNA'nın iki zinciri birbirinden ayrılır.
- **Bağlanma (annealing):** İkinci basamak bağlanmadır Ortama konmuş ve sadece çoğaltılmak istenen DNA bölgesine özgül iki primer, sıcaklığın (50-70°C'ye) düşürülmesiyle, ilk basamakta ayrılmış olan kalıp DNA'nın özgül oldukları bölgelerine bağlanırlar.

- **Uzama (ekstansiyon):** Üçüncü basamak primerlerin uzamasıdır. Ortama konmuş ve optimum sentez sıcaklığı 72-74 °C olan *Thermus aquaticus* (Taq) polimerazı (ya da ısıya dayanıklı başka polimerazlar) bu ısıda hedef DNA'ya yapışmış primerlerin 3' ucundan başlayarak istenen DNA bölgesinin sentezini yapar.

PCR Uygulamasında Karşılaşılan Sorunlar

- Yalancı pozitif ve negatiflik
- Deneyimli personel ve hassas çalışma gerektirme
- Uzun süre ve iş yoğunluğu
- Özel laboratuvar alt yapısı ve ekipman gerektirme
- Sonuçların deneyimli kişiler tarafından yorumlanması
- Standardizasyon gerekliliği
- Maliyet

RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP)

Restriksiyon enzimlerinin (RE)'leri çift zincirli DNA dizisini belli nükleotit dizelerinden (ör. ATGC gibi) tanıyan ve kesen enzimlerdir. Günümüzde yaklaşık 1200 RE tanımlanmış ve sınıflandırılmıştır. Sınıflandırmada ilk üç harf enzimin kaynağı olan bakteriyi; romen rakamları da tanımlanma sırasını ifade eder. Örneğin PvuI enzimi *Proteus vulgaris*'ten elde edilen ilk RE'ni ifade eder. RFLP tüm kromozomal DNA veya PCR sonrası elde edilen DNA'nın RE'leri ile kesilerek DNA parçalarının agaroz jelde büyüklüklerine göre ayrıldıktan sonra ethidium bromid ile boyanarak değerlendirilmesi esasına dayanır.

UYGULAMA

PCR ve RFLP YÖNTEMLERİ İLE MYCOBACTERIUM TÜRLERİNİN İDENTİFİKASYONU

Gereken Maddeler

EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit)	Sigma
Trizma Base	Sigma
Borik asit	Sigma

Chelex-100	Sigma
Standard agaroz	Sigma
NuSieve GTG agaroz	FMC BioProduct
Ethidium bromid	Sigma
Taq polimeraz (5 U/μl)	Promega, Roche veya Fermentas
dNTP	Promega, Roche veya Fermentas
Primer TB11: 5'-ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT-3'	50 nmol
Primer TB12: 5'-CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT-3'	50 nmol
Enjeksiyonluk distile su	Eczacıbaşı ilaç
Muhtelif Filtreli pipet uçları: 1-10, 10-100, 50-200 ve 100-1000 μl hacimlerinde	
Muhtelif Eppendorf tüpleri: 0.2 ml (ince cidarlı), 0.5 ml, (thermal cyclers'da kullanılacaksa ince cidarlı) ve 1.5 ml (yazı yazmak için yan yüzleri pürüzlü) hacimlerinde	

Gereken Aletler

Su banyosu veya kuru ısıtıcı blok	Nüve, Clifton veya diğer markalar
Vorteks	Techne veya diğer markalar
Derin dondurucu (-20oC)	Nuarie veya diğer markalar
Buzdolabı 2 adet (temiz ve kirli odada) -20 oC'lik bölmesi olan ve No frost değil	
Laminer hava akımlı kabin	CB 1204, dan LAF veya yerli üretim
Mikrosantrifüj	en az 14.000 devir, soğutmalı olabilir
Thermal cyclers	Birçok üretici var
Agaroz Jel Elektroforez Sistemi	Birçok üretici var
pH metre	Birçok üretici var
UV transilluminatör	Birçok üretici var
Mikrodalga fırın veya küçük elektrik ısıtıcısı	Birçok üretici var
Mikropipetler (1-10, 10-100, 50-200, 100-1000 l)	Rainin, Biohit, Costar

Çalışmanın Üç Aşaması Bulunmaktadır:

1. Mycobacterium DNA'sının izole edilmesi: DNA izolasyon kiti kullanılacaktır.
2. Mycobacterium DNA'sının çoğaltılması: Spesifik 65 kilo daltonluk ısı şok proteini (hsp65) bölgesinin PCR ile çoğaltılması: Tüberküloz basilleri kompleksi dışındaki mikobakterilerde de bu gen bulunur. Ancak Mikobakteri türleri arasında polimorfizm gösterir.
3. Tüm mycobacterium'lara spesifik 65 kilo daltonluk ısı şok proteini bölgesine ait PCR ürününün restriksiyon enzimleri ile kesilerek mycobacterium türlerinin identifikasyonu.

I. Mycobacterium DNA'sının İzole Edilmesi:

Nükleik asitlerin hücrelerden ayrılarak, fiziksel ve/veya kimyasal işlemlerden geçirilip saflaştırılma işlemi ekstraksiyon olarak tanımlanmaktadır. Bu işlem esnasında nükleik asitlerin parçalanmaya karşı korunması, amplifikasyon inhibitörlerinin ortamdaki uzaklaştırılması ve hedef nükleik asidin saflaştırılarak konsantre edilmesi amaçlanmaktadır. Değişik ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmiştir: Fenol-kloroform yöntemi, distile suda kaynatma, deterjanlar + proteinaz K, değişik kimyasalların kullanımı (Chelex-100, Guanidium vb.) ve sonikasyon gibi yöntemler DNA ekstraksiyonu için kullanılmıştır. Ayrıca ticari olarak kullanılan DNA/RNA ekstraksiyon kitleri mevcuttur. Mikobakterilerin DNA izolasyonu ekstraksiyon kitleri ile yapılması planlanmıştır.

II. Mycobacteriumlara spesifik hsp65 bölgesinin PCR ile çoğaltılması:

DNA'nın çoğaltılabilmesi için PCR tepkime karışımında gerekli olan elemanlar :

- **DNA Ekstraktı:** Ekstraksiyonu yapılmış, DNA ekstraksiyon kiti yardımı ile amplifikasyona hazır hale getirilmiş DNA örneğidir.
- **Primer'ler:** Çoğaltılacak bölgeyi sağdan ve soldan sınırlayan, çoğaltılması istenen bölgenin iki ucundaki DNA dizisini özgül olarak tanıyıp bağlanacak olan bir çift sentetik DNA parçalarıdır. Primerler liyofilize halde geldi ise DNAz ve RNAz free distile suda 10 veya 50 pmol/μl olacak şekilde sulandırılır. Daha sonra küçük hacimlere (10-20 örneklik) bölünerek -20oC'de saklanır. Tüm mycobacterium'ların PCR ile saptanması için primer TB11: 5'-ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT-3' ve TB12: 5'-CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT-3' kullanılır .

- **dNTP Karışımı:** Amplifikasyon esnasında denatüre edilen zincirlerin tamamlanmasında kullanılacak olan deoksi nükleotit trifosfatlar (dNTP'ler: eşit oranda dATP, dGTP, dCTP, dTTP)'lardan oluşur. 100 mM konsantrasyonda olan stok dNTP'ler 10 defa DNAz ve RNAz free distile suda sulandırılarak küçük hacimlere (25-50 örneklik) bölünerek -20oC'de saklanır. Sulandırılan bu solüsyondan 50 µl PCR karışımı için 1µl dNTP eklenir.
- **DNA Polimeraz:** PCR çalışmalarının büyük çoğunluğunda *Thermus aquaticus* (Taq) bakterilerinden elde edilen termostabil Taq DNA polimeraz enzimi kullanılmaktadır. Taq DNA polimeraz optimal sıcaklıkta (70-80oC) saniyede 35-100 nükleotidin polimerizasyonu ve 5'-3' ekzonükleaz aktivitesini gerçekleştirme yeteneğine sahiptir (1,16). Taq polimeraz genellikle 5 ünite/µl konsantrasyonda gelir ve -20oC'de saklanır.
- **Tamponlar ve MgCl₂:** 10x PCR tamponunda 100 mM Tris ve 500 mM KCl bulunur. Taq DNA polimeraz MgCl₂ varlığında etkindir. MgCl₂'ün PCR'ın özgüllüğü ve ürün verimi üzerinde çok önemli bir etkisi vardır. Genellikle optimum MgCl₂ konsantrasyonu olarak 1.5 mM tercih edilir. Düşük Mg+2 iyon konsantrasyonu zayıf ürün oluşumuna, yüksek Mg+2 iyon konsantrasyonu ise spesifik olmayan ürün oluşumuna sebep olmaktadır. 10x PCR bufer ve MgCl₂ (25 mM) genellikle Taq enzimi ile birlikte gelir ve aşağıda belirtilen konsantrasyonda kullanılır.

Tablo 1: PCR Karışımının Hazırlanması*:

Distile su	30.75	µl
PCR Bufer (10x konsantrasyonda)	5	µl
MgCl ₂ (25 mM)	3	µl
dNTP (10 mM)	1	µl
Primer 1 (TB11, 10 pmol/µl)	2.5	µl
Primer 2 (TB12, 10 pmol/µl)	2.5	µl
Taq polimeraz (5 U/µl)	0.25	µl
Örnek DNA	5	µl
Toplam	50	µl

**Karışım kırık buz üzerindeki 1.5 ml'lik reaksiyon tüpünde hazırlanır:*

Yukarıdaki karışım vortekslenerek karıştırıldıktan sonra santrifüje edilir. Çalışılacak

örnek sayısının çarpımı kadar hazırlanan karışım 45'er µl olarak örnek numaraları yazılmış 0.2 veya 0.5 ml'lik (Thermal cycler'a bağlı olarak) eppendorf tüplerine dağıtılır. Üzerine 5 µl Mycobacterium DNA'sı eklenerek thermal cycler aletine yerleştirilir. Thermal cycler aletinde aşağıdaki siklus programı uygulanır:

Tüm Mycobacterium'lara Spesifik PCR Programı:

94 oC'de	5 dk	1 siklus
94 oC'de	1 dk	35 siklus
55 oC'de	1 dk	
72 oC'de	2 dk	
72 oC'de	8 dk	1 siklus

c) Agaroz Jel Elektroforezi:

Amplifiye edilen PCR ürünleri değişik yöntemlerle belirlenebilir. En yaygın olarak kullanılanı agaroz jel elektroforezidir. PCR ile elde edilen ürünler agaroz jel kullanılarak elektrik alanında büyüklüğüne göre ayrılır. Agaroz jelde DNA bantlarının görülebilmesi için PCR ürünlerinin flouresan bir boyayla (ör. Ethidium bromid) muamele edilmesi gerekir. Ethidium bromid'le boyanan DNA bantları ultraviyole (UV) transilliminatör veya epiilliminatör ışığı altında görünür hale gelir. Beklenen PCR ürünlerinin varlığı DNA molekül ağırlık standartları (DNA marker) veya pozitif kontroldeki bant büyüklüğü ile karşılaştırılarak belirlenir. Beklenen PCR ürünü büyüklüğüne göre agaroz konsantrasyonu aşağıdaki tablodan belirlenir.

Tablo 2: Agaroz Konsantrasyonu ile DNA Ayırma Gücü Arasındaki İlişki.

Agaroz Konsantrasyonu (%)	DNA Ayırma Aralığı (baz çifti)
0.3	5000 - 60000
0.6	1000 - 20000
0.7	800 - 10000
0.8	500 - 7000
1.2	400 - 6000
1.5	200 - 3000
2.0	100 - 2000

PCR Ürününün Agaroz Jelde Yürütülmesi:

- İlk olarak PCR ürününü büyüklüğü hesaplanarak kullanılacak jelin agaroz yüzdesine karar verilir (Tablo). 200 ile 3000 baz çifti arasındaki bir ürün için % 1.5'lik agaroz yeterlidir.
- Önce agaroz ve terazinin bulunduğu odaya girilir. Elektroforez tankının büyüklüğüne göre dökülecek jel miktarı belirlenir. Örnek: 40 ml'lik tank için; 0.6 gram agaroz tartılıp 40 ml 0.5X TBE tamponuna ilave edilir.
- Stok 5X TBE bufer (50 gr Tris base, 27.5 gr Boric acid, 20 ml 0.5 M EDTA pH:8.0, 1 litre distile suda eritilir) on defa distile suda sulandırılarak 0.5X TBE bufer kullanma solüsyonu hazırlanır.
- 40 ml 0.5X TBE bufer behere konulur. Üzerine tartılan agaroz eklenerek karıştırılır.
- Mikrodalga fırında 1 dakika 400 Watta tutulur. Mikrodalga yoksa ocak üzerinde arada bir karıştırılarak agaroz eritilebilir.
- Karıştırıldıktan sonra soğuması için beklenirken agaroz jelin döküleceği plate hazırlanır. Örnek sayısına göre 8'li veya 12'li tarak yerleştirilir.
- 50oC civarına kadar soğuyan 40 ml'lik agaroz 4 µl ethidium bromide (5 mg/ml) eklenip karıştırıldıktan sonra jel dökülür.
- Jel donduktan sonra (yaklaşık 30 dakika oda ısısında) plate'nin iki tarafındaki lastikler ve tarak çıkarılır.
- Her örnek için parafilm üzerine 2 µl yükleme solüsyonu (5x Loding bufer: 250 mg Bromophenol blue, 3 ml gliserol, 7 ml distile su) konur. 10'ar µl PCR ürünü 2 µl yükleme solüsyonu ile karıştırıldıktan sonra sırayla agaroz jele yüklenir.
- 125 voltta 20 dakika veya 90 voltta 60 dakika elektroforez uygulanır.
- Elektroforez durdurulduktan sonra jel UV transilluminatörde incelenir. Beklenen bant görülen örnekler pozitif kabul edilir. Gerekirse poloroid fotoğraf makinası veya jel dökümantasyon sistemi ile jeller fotoğ aflanır.

III. Tüm Mycobacterium'lara Spesifik 65 Kilo Daltonluk Isı Şok Proteini Bölgesine Ait PCR Ürününün Restriksiyon Enzimleri ile Kesilerek Mycobacterium Türlerinin İdentifikasyonu (10)

Uygun bant görülen (beklenen yerde ve yeterli yoğunlukta) örneklerin 11'er µl'si HaeIII (BsuRI) ve BstEII (Eco91I) enzimleri ile kesilerek Mycobacterium türleri identifiye edilir.

Tablo 3: HaeIII ile PCR ürününün kesilmesi:

Distile su	2.0	µl
Bufer R ⁺	1.5	µl
<i>HaeIII</i> (10 U/µl, Fermentas)	0.5	µl
PCR ürünü	11.0	µl
Toplam	15.0	µl

Tablo 4: BstEII ile PCR ürününün kesilmesi:

Distile su	2.0	µl
Bufer O ⁺	1.5	µl
<i>BstEII</i> (10 U/µl, Fermentas)	0.5	µl
PCR ürünü	11.0	µl
Toplam	15.0	µl

- Enzim ve bufer karışımları örnek sayısınınca temiz odada hazırlandıktan sonra 0.2 veya 0.5 ml'lik eppendorf tüplerine 4'er µl olarak bölünür.
- Daha sonra kirli odada üzerlerine 11'er µl PCR ürünü eklenir ve 37oC'de 4 saat su banyosu veya thermal cycler'da tutulur.
- Daha sonra Mycobacterium türlerinin identifikasyonu için restriksiyon enzimleri ile kesilen ve kesilmeyen ürünler birlikte %3'lük NuSieve GTG agaroz (FMC BioProduct)'da yürütülür.
- PCR ürününün kesilmesi ile jel elektroforezde ortaya çıkan bantların bp uzunlukları değerlendirilerek Mycobacterium türleri identifiye edilir (Şekil 1, 2)

KAYNAKLAR

1. Sambrook J, Russell DW. (2001). Molecular Cloning A laboratory Manual. Third edition. CSHL Press, New York, 8.1-8.24.
2. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. American Journal of Respiratory Critical

Care Medicine, 161, 1376–1395.

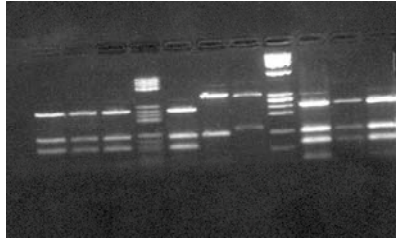
3. Durmaz R. Nükleik Asit Amplifikasyon Yöntemlerinde Sorunlar ve Standardizasyon. (2001). Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Durmaz R (Eds.) 2. Baskı. Kozan Ofset, Ankara, 45-56.
4. Sambrook J, Russell DW. (2001). Molecular Cloning A laboratory Manual. Third edition. CSHL Press, New York, 5.1-5.17.
5. Hellyer TJ, DesJardin LE, Assaf MK, Bates JH, Cave MD, Eisenach KD. (1996). Specificity of IS6110-based amplification assays for Mycobacterium tuberculosis complex. J Clin Microbiol. 34:2843–2846.
6. Gillespie, S. H., & McHugh, T. D. (1997). Monitoring the therapy of pulmonary tuberculosis by nested polymerase chain reaction. Journal of Infection, 35, 324–325.
7. Davies, A. P., Newport, L. E., Billington, O. J., & Gillespie, S. H. (1999). Length of time to laboratory diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection: comparison of in-house methods with reference laboratory results. Journal of Infection, 39, 205–208.
8. Carrino, J. J., & Lee, H. H. (1995). Nucleic acid amplification methods. Journal of Microbiological Methods, 23, 3–20.
9. Wittwer C. Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications. Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications. Meuer S, Wittwer C, Nakagawara KI (Eds.) Page:1-8.
10. Taylor TB, Patterson C, Hale Y, Safranek WW. (1997). Routine Use of PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Identification of Mycobacteria Growing in Liquid Media. J Clin Microbiol. 35:79-85.
11. Pao CC, Yen B, You JB, et. al. (1990). Detection and identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA amplification. Journal Clinical Microbiology, 28: 1877-1880.
12. Almeda J, Garcia A, Gonzales J, et. al. (2000). Clinical evaluation of an in-house IS6110 polymerase chain reaction for diagnosis of tuberculosis. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 19: 859-867.
13. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. (1991). Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques, 10: 505-513.
14. Torres M, Criado A, Polomares J, et. al. (2000). Use of real-time PCR and fluorimetry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance-associated

- mutations in *M. tuberculosis* . *Journal of Clinical Microbiology*, 38(9): 3194-3199.
15. Henegariu O, Heereme NA, Dlougy SR et. al. (1997). Multiplex PCR: critical parameters and step by step protocol. *Bio Techniques*, 23: 504-511.
16. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et. al. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487-491.
17. Pershing DH. (1991). Polymerase chain reaction: trenches to benches. *Journal Clinical Microbiology*, 29: 1281-1285.

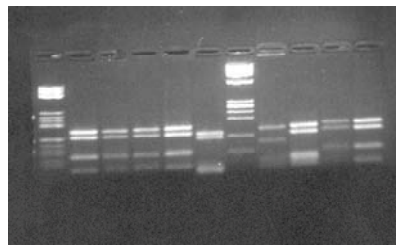
EK:

1. Bazı mycobacterium türlerinin DNA amplifikasyon ürünlerinin BstEII ve HaeIII enzimleri ile kesim sonucu oluşan DNA bant paternleri (Şekil 1)
2. PCR-RFLP ile mikobakterilerin identifikasyon tablosu (Şekil 2)

Şekil 1 : Isı şok proteinini kodlayan gen bölgesinin ampifikasyon ürününün BstEII enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen bant patern görüntüleri



Şekil 2: Isı şok proteinini kodlayan gen bölgesinin ampifikasyon ürününün HaeIII enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen bant patern görüntüleri



PCR-RFLP ile MİKROBAKTERİLERİN İDENTİFİKASYON TABLOSU*

BstEII	HaeIII	Türlerin Adı
	170-130-0	<i>M.trivale</i> type 1
	160-85-55	<i>M.flavescens</i> type 3
	145-130-0	<i>M.lentiflavum</i> type 1
440	140-100-90	<i>M.new</i> type 1
	140-55-50	<i>M.flavescens</i> type 1
	130-115-70-55	<i>M.aurum</i> type 2
	130-110-0	<i>M.new</i>
	130-105-70	<i>M.szulgai</i> type 1
325-130	200-60-55	<i>M.chelonae</i> type 1
	160-110-0	<i>M.haemophilum</i> type 1
	185-140-0	<i>M.terrae</i> type 1
	170-140-0	<i>M.neoaurum</i> type 1
	145-130-50	<i>M.simiae</i> type 4
	140-85-55	<i>M.chitae</i> type 1
325-120	140-60-55	<i>M.nonchromogenicum</i> type 2
	130-115-60	<i>M.gordonae</i> type 4
	130-110-70-55	<i>M.gordonae</i> type 8
	130-105-0	<i>M.genavense</i> type 1
	130-95-75-60	<i>M.kansasii</i> type 5
	200-70-60	<i>M.abscessus</i> type 1
	180-135-70-50	<i>M.thermoresistibile</i> type 1
	180-130-0	<i>M.simiae</i> type 1
	180-100-50	<i>M.new</i> type 1
	145-140-100-55	<i>M.peregrinum</i> type 1
	145-130-95	<i>M.scrofulaceum</i> type 1
	145-130-0	<i>M.intracellulare</i> type 3
240-210	145-105-80	<i>M.marinum</i> type 1
	145-105-60	<i>M.new</i> type 1
	145-70-60-50	<i>M.abscessus</i> type 1
	140-120-100-60	<i>M.pregrinum</i> type 2
	140-105-80	<i>M.intracellulare</i> type 2
	140-80-60-50	<i>M.phlei</i> type 1
	130-115-0	<i>M.gordonae</i> type 5
	130-105-80	<i>M.kansasii</i> type 1
		<i>M.branderi</i> type 1
	130-105-60	<i>M.avium</i> type 1
	130-105-0	<i>M.aium</i> type 2
	130-80-60	<i>M.celatum</i> type 1
240-210	125-110-0	<i>M.interjectum</i> type 1
	120-115-110	<i>M.intracellulare</i> type 4
	110-105-0	<i>M.asiaticum</i> type 1
240-135-80	140-105-70	<i>M.shimodei</i> type 1

	160-85-55	<i>M.species</i> type 1
	145-140-100-60	<i>M.peregrinum</i> type 3
	145-125-60	<i>M.smegmatis</i> type 1
	130-105-80	<i>M.celatum</i> type 2
240-130-85	130-105-70	<i>M.gastrit</i> type 1
	130-105-0	<i>M.kansasii</i> type 2
	130-100-75	<i>M.kansasii</i> type 6
	130-90-70	<i>M.kansasii</i> type 3
	130-95	<i>M.lentiflavum</i> type 4
	165-115-0	<i>M.gordonae</i> type 9
	160-110-60	<i>M.gordonae</i> type 7
	145-130-60	<i>M.intracellulare</i> type 1
240-120-100	145-130-0	<i>M.lentiflavum</i> type 3
	140-105-80	<i>M.malmoense</i> type 1
	140-60-0	<i>M.hibemiae</i> type 1
	130-110-0	<i>M.gordonae</i> type 3
	130-95-60	<i>M.intracellulare</i> type 4
	220-110-0	<i>M.gordonae</i> type 2
	185-140-50	<i>M.senegalense</i> type 1
	160-115-60	<i>M.gordonae</i> type 1
	160-105-60	<i>M.xenopi</i> type 1
240-120-85	150-130-70	<i>M.tuberculosis</i> complex
	150-60-55	<i>M.nonchromogenicum</i> type 1
	145-120-55-50	<i>M.fortuitum</i> type 1
	140-125-55-50	<i>M.farcinogenes</i> type 1
	140-95-90	<i>M.fortuitum</i> type 2
	130-115-70-50	<i>M.kansasii</i> type 4

TÜBERKÜLOZUN MOLEKÜLER TANISINDA TİCARİ SİSTEMLER

“İzotermal Dizi Yer Değiştirme Amplifikasyonu Tekniğinin Kullanımı” *Strand Displacement Amplification (SDA)*

Doç.Dr.Mustafa ÖZYURT

GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi,
İstanbul

Tüberküloz (TB), dünyada önemi hergün artmakta olan ve halk sağlığını tehdit edebilen major tehlikelerden biri olup en sık ölüme neden olan enfeksiyon hastalıklarından biridir. TB olgularının %95'ten fazlası gelişmekte olan ülkelerde görülmekte olup dünya nüfusunun yaklaşık üçte birinden fazlası *M.tuberculosis* ile enfektedir. TB hastalarının erken tanı ve tedavisi bu hastalıktan toplumun korunmasında en etkili yoldur. Bu nedenle ulusal TB kontrol programları çerçevesinde mikobakteriyoloji laboratuvarlarının birincil amacını, insidansı düşürmek için enfeksiyöz akciğer tüberküloz olgularının en kısa sürede tespiti, doğru identifikasyonu ve tedavisinin takibi oluşturur. Bu nedenle klinik mikobakteriyoloji laboratuvarları, tüberkülozun yayılımını önlemede ve kontrol altına alabilmede önemli bir role sahiptir.

Tüberkülozda ilk tanı klinik verilerle yapılmış olsa bile kesin tanı için etken mikroorganizmanın konvansiyonel olarak direkt bakıda tespiti ve laboratuvarda üretilerek tanımlanması esastır. Bu nedenle tanıda “gold standart” kültür ve klinik tanı birlikteliğidir. Laboratuvar tanı için her iki yöntemin de önemli eksiklikleri vardır. Mikroskopik incelemede aside dirençli basilin görülebilmesi için örneğin mililitresinde 5.000-10.000 kadar bakteri bulunması gerekmektedir. Kültür ile örnekteki birkaç canlı bakterinin dahi gösterilebilmesi mümkündür ancak mikobakteriler, yavaş üreyen mikroorganizmalar olduklarından bu testlerin tamamlanması için ortalama 2-8 haftaya gereksinim duyulur. Son yıllarda TB ilaçlarına dirençli basillerin izolasyonlarındaki artış ve tanıya yönelik konvansiyonel testlerin pratik olmamaları, uzun zaman gerektirmeleri ve tür düzeyinde tiplendirmede yetersiz kalmaları rutin kullanımda sorunların çözümüne yönelik arayışları yeniden gündeme getirmiştir.

Bu amaçla son 15-20 yıl içinde mikobakterilerin hastalık örneklerinden ve katı-sıvı kültür ortamlarından saptanması, tür düzeyinde tanımlanması ve duyarlılık testleri için, özgüllük ve duyarlılığı yüksek, güvenilir, hızlı sonuç verebilen ve kolay uygulanabilir yöntemler üzerinde çalışmalar hız kazanmıştır. Bunlardan, Radyometrik (*BACTEC*) ve kromotografik (*HPLC*) sistemler, nukleik aside dayalı moleküler yöntemler, mikobakteriyofajlarla RIF direnç tayini (Faj amplifikasyonu)

gibi fenotipik ve genotipik teknikler tanı süresini kısaltmada ve tedaviye yönelik antibiyotik direnci ile ilgili mutasyonların saptanmasında umut verici yöntemlerdir.

Bu amaçla günümüzde, hasta örneklerinden direkt olarak MTBC varlığını araştırmak amacıyla nükleik asit amplifikasyon (NAA) esaslı sistemler ile kültürde üreyen mikobakterilerin kısa sürede tür düzeyinde tanımlanmasını ve/veya TB ilaçlarına karşı direnç ile ilişkili mutasyonları saptamada, Klasik PCR ve RFLP'nin yanısıra DNA prob hibridizasyonu esaslı ürünler, DNA sequence analiz kitleri ve moleküler biyoloji ile bilgisayar teknolojisini birleştiren DNA microarray teknolojisi ürünler tanıya hız kazandırmıştır.

Özellikle Smear pozitif solunum örneklerinde kullanımına FDA tarafından onay verilen nükleik asit amplifikasyon temeline dayanan ticari moleküler sistemlerden (Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (MTD, Gen-Probe) ve Cobas AMPLICOR MTB Assay (Roche Diagnostic System)) ile FDA onayı olmamakla birlikte diğer kuruluşlardan onay almış ve satışa sunulmuş olan **BD ProbeTec™ET Mycobacterium tuberculosis complex DIRECT TB (DTB, BD Biosciences)**' e ait çalışma sonuçları klinik değerlendirmelerde yüksek sensitivite ve spesifite gösterebilmektedir.

CDC (Center for Disease Control and Prevention)'nin önerileri doğrultusunda tüberkülozun laboratuvar tanısına yönelik hızlı testler arasında yer alan DNA amplifikasyon teknikleri günümüzde rutin tanıda önemli bir yere sahiptir. Bu tekniklerden biri de Dizi Yer Değiştirme Amplifikasyonu "Strand displacement amplification, SDA" dır.

Bu kursta, SDA teknolojisi prensibi ile çalışan ve 3.jenerasyon bir ticari sistem olan **BD ProbeTec™ET**'nin doğrudan solunum örneklerinde *Mycobacterium tuberculosis* complex'in saptanması amacı ile üretilmiş Direct TB saptama kitinin (DTB) uygulamalı eğitimi verilecek BDProbe Tec ET sistemi ve SDA tekniği tanıtılacaktır.

BDProbe Tec ET sistemi, nükleik asit amplifikasyonu (NAA) esasına dayalı bir yöntem olan SDA prensibi ile çalışan ve floresan enerji transfer saptama teknolojisiyle birleştirilmiş, direkt olarak hastaya ait solunum örneklerinde (balgam, indüklenmiş balgam, BAL ve diğer solunum örnekleri) ve/veya pozitif kültürlerde *M.tuberculosis* complex'e ait genetik materyali izotermal olarak hedef çoğaltıp saptayabilen, kullanım kolaylığı olan yarı otomatize bir sistemdir.

Hedef DNA, özgül primerler, DNA polimeraz, restriksiyon enzimi ve floresan işaretli saptama probu SDA tekniğinin ana bileşenlerini oluşturur. Bu sistem için primer amplifikasyon hedefleri IS 6110 insersiyon dizisi ve 16S rRNA genidir. Söz konusu sistem, örneklerdeki hedef DNA'nın amplifikasyonu ve saptanmasını kapalı bir sistem formatında, SDA için gerekli reaktiflerle kaplanmış

koparılabılır stripler halindeki kuyucuklarda gerçekleştirirken aynı zamanda kontaminasyona karşı kısmen güvenli bir ortam sağlar. Sistemde, inhibitör varlığını saptamak amacıyla internal amplifikasyon kontrolü (IAC) kullanılır. Böylece yalancı negatiflikler önlenabilmekte ayrıca kalite kontrol amaçlı pozitif ve negatif kontroller kullanılarak test sonuçlarının güvenilirliği arttırılabilmektedir. Bu testin duyarlılık ve özgüllüğü smear pozitif solunum örneklerinde oldukça iyidir. Testin tedavi görmekte olan hastalarda kullanımı önerilmemekle birlikte tedaviye yeni başlanmış (1haftadan daha kısa süreli) hastalarda takip amaçlı kullanılabilmektedir. Hasta örneğinden *M.tuberculosis complex*'in BDProbeTec ET sistemi ile saptanma süresi total olarak yaklaşık 3.5 saat'tir

BD ProbeTec™ ET Mycobacterium tuberculosis complex DIRECT TB (DTB)

TESTİN ÇALIŞMA PRENSİBİ

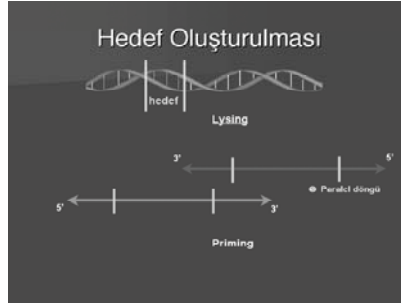
BD ProbeTec™ ET, *Mycobacterium tuberculosis complex* (DTB) Direct Detection Testi, amplifikasyon primerleri ve floresan işaretli dedektör problar kullanılarak şüpheli hastalara ait özellikle NALC-NaOH ile dekontamine edilmiş solunum örneklerinde bulunan *M.tuberculosis complex*'e (*M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.bovis* BCG, *M.africanum* ve *M.microti*) ait hedef DNA (IS6110 insersiyon dizisi)'nin aranması ve eş zamanlı amplifikasyonu esasına dayanır.

Bu amaçla, kurutulmuş, oda ısısında saklanabilen, SDA için gerekli reaktiflerle kaplı, koparılabılır stripler halindeki disposable priming ve amplifikasyon kuyucukları kullanılır. Test sırasında çalışmaya ayrıca bir reaktif eklemeye gerek duyulmaz. Hazırlanmış hasta örneği, ilk önce içerisinde primerler, floresan işaretli detektör prob ve amplifikasyon için gerekli diğer reaktifleri içeren priming kuyucuklarına inokule edilir. İnkübasyonu takiben kuyucuklardaki reaksiyon karışımı, içerisinde SDA için gerekli bir DNA polimeraz (*Bst* DNA polimeraz) ile bir restriksiyon enzimi (*BsoB*-I) ve dNTP'ler ile kaplı amplifikasyon kuyucuklarına aktarılır. Amplifikasyon kuyucuklarının üzeri kontaminasyonu önlemek amacıyla kapatılır ve cihaza yerleştirilerek inkübasyona bırakılarak test edilir. Sistemde, reaksiyonlar örnek ve kontroller birarada eş zamanlı olarak gerçekleşir. DNA polimeraz , tek sarmallı zincir üzerinde 5' – 3' yönünde uzamayı başlatır, çoğaltılan çift sarmallı DNA üzerinde 4-8 baz çiftlik spesifik hedef bölge restriksiyon enzimi ile tanınarak kesilir. Kesme işlemi sonrası paralel döngüye gönderilen hedef DNA, ortamda bulunan saç tokası yapısı gösteren floresan işaretli detector problarla hybridize olarak, sistem tarafından Floresan Enerji Transferinin eşzamanlı amplifikasyonu sonucu saptanır.

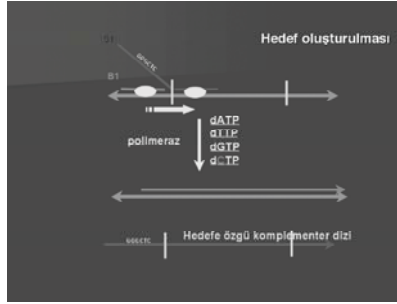
Bu reaksiyonu detaylı olarak açıklarsak; Öncelikle hasta örneğinde aranılan hedef DNA, ısı veya kimyasallarla denature edilerek heliks yapıdaki iki

zincir birbirinden ayrılır ve tek zincirli yapıya dönüştürülür. DNA zinciri üzerinde yer alan ve sadece aranılan patojene spesifik bir alan, SDA ' için hedef bölge olarak kullanılır. Yöntemde kullanılan primerler ise hibrit çifti oluşturmak üzere bu hedefe bağlanan komplementer DNA problemleridir. SDA için diğer bileşenlerden olan DNA polimeraz ortamdaki serbest nükleotidlerin (dNTP) bir şablon halinde DNA zincirine bağlanarak zincirin 5' ucundan 3' ucuna doğru uzamasını ve kalıp (template) DNA oluşumunu katalize eder. SDA'da iki primer (S1 ve B1) zincire 5' ucundan bağlanır. Polimeraz etkisi ile ortamdaki serbest nükleotidler kullanılarak 5'-3' istikametinde uzama gerçekleşir ve komplementer tarzda DNA zinciri oluşmaya başlar. S1 ve B1 in her ikisinde B1 yönünde uzarken S1 zinciri, orjinal 5'-3' hedefin komplementeri tek zincire dönüşür. Uzama bir uca sonlanır ve içerisine dCTPS (*deoksisitidin 5'- tiotrifosfat sitozin*) dahil olur. Bu zincir ona bağlanan S2 ve B2 primerlerine komplementer olan sekansları içerir. Bu zincire bağlanan S2 ve B2 primerleri uzatarak S1 ve S2 orjinal primerleri ile sınırlandırılmış bir hedef bölgesi içeren tek zincir oluşturur. Artık S1 komplementeri ve orjinal hedef dCTPS içerir. Buna S1 primeri bağlanır ve çift sarmallı DNA oluşturmak üzere uzar. Restriksiyon enzimi (*BsoB-I*, restriction endonuclease) S1orjinal primeri spesifik sekansından keser. Ancak S1 komplementeri dCTPS içerdiğinden S1 komplementer kopyasını kesemez. Bu kesilmiş kısım polimerazın etkisiyle uzadıkça geride kalan S1 primeri itilmek suretiyle hedef kopya paralel döngüye gönderilir. Bu döngü test süresince süreklilik arzeder ve ortamda milyonlarca kopya oluşur.(Şekil 1-6) Oluşan bu hedef DNA'lar, ortamda bulunan ve "saç tokası" yapısı gösteren floresan işaretli detector problemlerle eşzamanlı hybridize olur. Bu reaksiyonda her iki floresan molekül birbirlerine yakın iken floreseine gönderilen enerji, floreseinden Rodamini active etmek için transfer edilir. Sonuçta system otomatik olarak pleyttteki kuyucuklardan gelen floresan sinyalleri 60 dakikalık test süresince otomatik okuyucuda dakikada bir kez okuyarak RFU (*rölatif floresan ünitesi*) olarak saptayıp hesaplama yapar (Şekil 7-10) . Bu değerlendirme için MOTA (*Method other than acceleration*) skoru belirlenir. Bu skor, reaksiyon sonrasında oluşan sinyalin değerlendirilmesi ve ölçülmesinde kullanılır. Ortamda aranılan hedefin var olup olmadığı, hesaplanan MOTA değeri ile hasta örneği veya kontrol için daha önceden belirlenen "cut-off MOTA" değerlerinin karşılaştırılması ile kalitatif olarak saptanır.

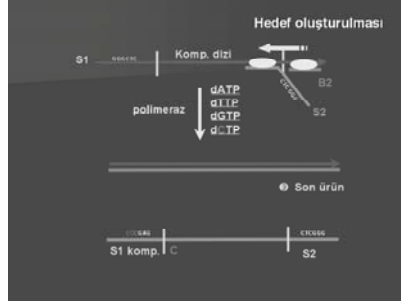
Şekil 1



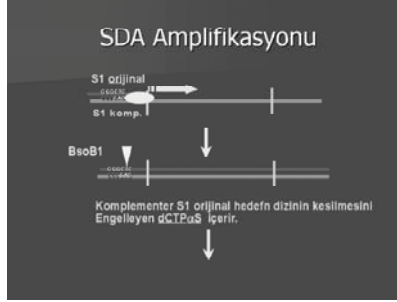
Şekil 2



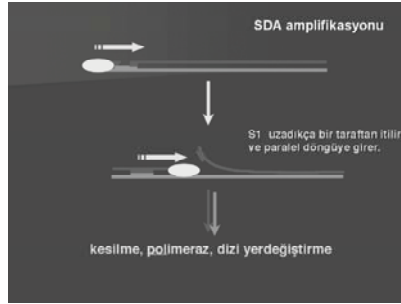
Şekil 3



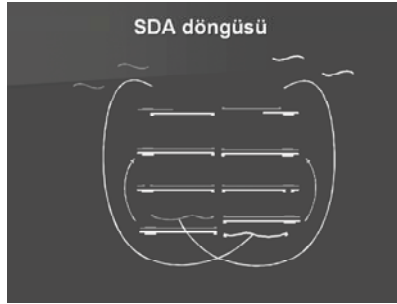
Şekil 4



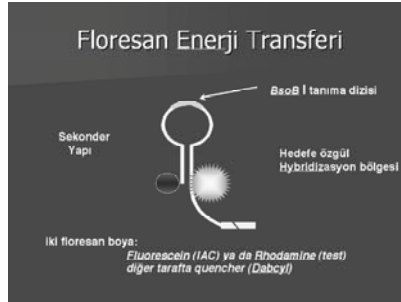
Şekil 5



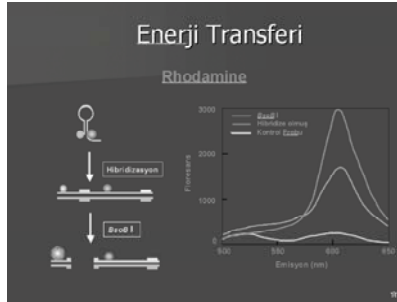
Şekil 6



Şekil 7



Şekil 8



Şekil 9



Şekil 10



BD ProbeTEC ET Genel Özellikler

1. SDA (Dizi yer değiştirme reaksiyonu) tekniği ile çalışır.
2. Amplifikasyon, İzotermal (tek ısıda çoğaltma) olarak gerçekleşir.
3. Amplifikasyon ve floresan saptama eş zamanlı olarak 1 saatte gerçekleşir
4. SDA için gerekli bütün primer, prob, enzim gibi reaktifler koparılabilir striplere ait kuyucuklara kaplıdır,
5. Test sırasında ayrıca reaktif eklemeye gerek yoktur. Kitler 96 kuyucukludur.
6. Amplifikasyon aşamasında kuyucukların üzeri bir bant ile kapatılarak kontaminasyon engellenir
7. Tek odada çalışma kolaylığı sağlar
8. Güvenilirdir, internal amplifikasyon kontrolü (IAC) kitin içinde mevcuttur
9. Kitler oda ısısında saklanabilir
10. Yarı otomatize bir system olup cihaz bakımı ve test prosedürü kolaydır
11. Kinetik okuma ile sonuçların yorumu kolaydır.
12. DTB kit prosedürü, balgam bronco alveolar lavaj, broşiyal ve trakeal aspirate gibi solunum örnekleri için test edilmiştir. Diğer numuneler için performansı değerlendirilmemiştir.
13. DTB testi *M.tuberculosis* complex'i diğer *M. tuberculosis*, *M.bovis*, *M.bovis BCG*, *M.africanum*, ve *M.micoti*'den ayıramaz.
14. *M. tuberculosis* complex probe sekansı , IS6110 *M. tuberculosis*, *M.bovis*, *M.bovis BCG*, *M.africanum*, ve *M.micoti* için spesifiktir.
15. Testin optimal performansı için uygun numune alımı ve transportu gerekmektedir.
16. DTB Testi *M.tuberculosis* complex varyantlarını IS6110 insersiyon sekans eksikliği olduğundan saptamaz.
17. DTB testi kalitatif sonuçlar verir. MOTA değerleri ile pozitif numunedeki hücre sayısı arasında korelasyon yoktur.

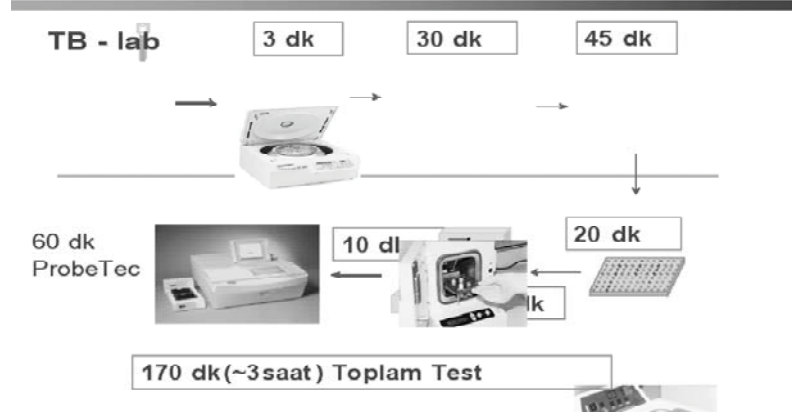
DİKKAT EDİLMESİ GEREKLİ HUSUSLAR

1. Test performansı , solunum örnekleri dışındaki diğer numunelerden (Kan, BOS, gaita, ve idrar için) *M. tuberculosis complex*'in saptanmasına yönelik değerlendirme yapılmamıştır.
2. Priming kuyucuklarında insan Plasental DNA'sı kullanıldığından reaktifler enfeksiyöz olarak değerlendirilmelidir.

3. Isı inaktivasyonu işlemine kadar numune işlemleri Class II Biyolojik Emniyet Kabininde yürütülmeli, bu peryoda kadar olan santrifüj işlemleri aresol koruyuculu rotor kullanılarak yapılmalıdır. Aerosol koruyuculu rotor güvenlik kabininde açılmalıdır. Standart rotor ısı ile inaktivasyon işleminden sonra kullanılmalıdır.
4. Örnekler CDC önerileri dikkate alınarak NALC-NaOH metodu ile dekontamine edilmeli veya alternative olarak aynı içerikli hazır dekontaminasyon kitleri (Ör: BBL Mycoprep kiti) kullanılmalıdır.
5. Örnekler hemen çalışılmayacaksa NaCl/NaOH sedimentleri 2-8 C'ta 5 güne kadar bekletilebilir. 5 günden daha uzun süre çalışılmayacaksa 3 ay'a kadar -20 C veya daha soğukta dondurularak bekletilebilir. Dondurulmuş örnekler, çalışmadan önce oda ısısına getirilerek çözölmelidir.
6. Tüm numuneler, MOTT yönünden de araştırılmalı ve Antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması amacıyla kültürleri yapılmalıdır.
7. Numunelerde HIV veya Hepatit B gibi patojenik infeksiyonlar mevcut olabileceğiden numuneler enfeksiyöz olarak kabul edilerek gerekli laboratuvar prosedürleri , uluslararası öneriler takip edilmelidir.
8. DTB Wash Buffer 1 ve DTB Nötralizasyon Buffer 3 dimetilsulfoksit içerir. Dimetil sulfoksit bulunduğu veya cilt ile temasta yüksek toksiktir. Göze sıçraması halinde bol su ile yıkama yapılmalıdır. Kontamine kıyafetleri hemen üzerinizden çıkartın ve cildinizi su ve sabunla yıkayın.
9. DTB Wash Buffer1 ve DTB Lysis Buffer yüksek alkalidir. Cilt ,göz ve mukoz membran ile kontak edilemesinden sakınılmalı. Kontak edilmesi durumunda derhal bol su ile yıkama yapılmalıdır . Yıkama yapılmadığı durumlarda yanıklar oluşabilir.
10. Pipet uçlarını, numune tüplerini, Priming kapaklarını atarken uygun laboratuvar prosedürlerini uygulayın.
11. Özel santrifüjleme önerileri uygulanmalıdır, uygunsuz santrifüjleme yalancı negatifliğe sebep olabilir.
12. DTB testi antibiyotik tedavisi için kültür yönteminin yerini tutamaz.
13. Pirimer ve Amplifikasyon Mikrokuyucuk poşetleri kullanımdan sonra dikkatlice yapıştırılmalıdır. İçerisinde nem tutucu pedlerin olduğundan emin olunmalıdır

BD ProbeTEC ET *M. tuberculosis* Complex DİREKT TB ÇALISMA PROSEDÜRÜ

Şekil 11



I-ÖRNEK HAZIRLAMA PROSEDÜRÜ (Şekil12)

A.ÖRNEK HAZIRLAMA (BİYOEMNİYET KABİNİ DİŞİ İŞLEMLER)

- Tüm buffer'lar oda ısısında tutulmalı ve kullanım öncesi iyice karıştırılmalıdır. Stok buffer solusyonlarından örnekler aşağıdaki gibi hazırlanır;
 - DTB Wash Buffer-1:** Her NALC-NaOH sedimenti için kaba 1 ml aktarılır. Ayrıca pipetleme hatası göz önüne alınarak 1-2 ml ekstra ilave edilir.
 - DTB Lysis Buffer-2:** Her NALC-NaOH sediment ve kontroller için kaba 0.1 ml aktarılır. Ayrıca pipetleme hatası göz önüne alınarak 0.5-1 ml ekstra ilave edilir.
 - DTB Nötralizasyon Buffer-3:** Her NALC-NaOH sediment ve kontroller için kaba 0.6 ml aktarılır. Ayrıca pipetleme hatası göz önüne alınarak 0.5-1.0 ml ekstra ilave edilir.
- Daha sonra artan bufferlar stok solusyonların içerisine konmaz atılır .
- Çalışılacak her hastaya ait NALC-NaOH sediment için 2 ml'lik örnek tüpleri hazırlanır ve üzerleri örnek numarası ile etiketlenir.
- Tüplerin kapakları açılarak her tüpe 1ml DTB Wash Buffer-1eklenir ve tüplerin kapağı kapatılır.
- Hasta örneklerine ait **DTB Wash Buffer-1** ilave edilmiş tüpler biyoemniyet kabinine (BSC) bırakılır.

B. İŞLENMİŞ HASTA NUMUNELERİNDEN YAPILAN İŞLEMLER

(BİYOEMNİYET KABİN İÇİ İŞLEMLER)

Kontamine örnekleri dökmek için kabin içinde infekte sıvı atık kabı bulundurulur.

- a) Falkon tüplerindeki NALC-NaOH sedimentleri 5 sn vortexlenir
- b) Filtreli pipet ucu kullanarak sedimentlerden 500 µL alınıp içerisinde **1 ml DTB Wash Buffer-1** içeren tüpe eklenerek tüpün kapağı kapatılır.
- c) Buraya kadarki işlemler her hasta numunesi için uygulanır.
- d) **ELDİVEN DEĞİŞTİRİLİR**
- e) Her tüp 5sn. Vortexlenir
- f) Tüpleri aerosol koruyuculu rotora yerleştirilip rotor kapağı iyice kapatılarak mikrosantrifujede 12,200 X g 'de 3 dk. çevrilir . Uygun şekilde santrifüj edilmemesi yanlış negatifliğe sebep olabilir.
- g) Santrifüj sonrası süpernatant kabin içerisinde sıvı atık kabına dökülür.
- h) Tüpler, kapakları kapatılarak numune rakına yerleştirilir.
- i) **ELDİVEN DEĞİŞTİRİLİR**

C. ÖRNEKLERE ISI UYGULAMA

- a) Tüplerin kapaklarının sıkıca kapalı olduğu kontrol edilir.
- b) Numune rakındaki numuneler fırına yerleştirilir, kapağı kapatılır
- c) RUN #01 seçilir ve OK'e basılır
- d) Uygulamayı başlatmak için "Start" tuşuna basılır, 30 dk. süreyle ısı uygulaması gerçekleştirilir.
- e) Isıtma başladıktan sonra aşağıdaki basamaklar takip edilir
 - Sonikatör hazırlanır (Sonikatör musluk suyu ile su seviyesi dikkate alınarak doldurulur, içerisine banyo rakı yerleştirilir, Isıtıcı 65°C'ye ayarlanır ve ısıtma işlemi başlatılır. Cihaz kapağı kapalı halde iken 60 dk Degas işlemi yapılır.)
 - Santrifüje standart motoru yerleştirilir
- f) 15 dk'lık ısıtmadan sonra, ısının $\geq 95^{\circ}\text{C}$ 'e ulaşp ulaşmadığını kontrol et.
- g) Fırındaki ısıtma bittiğinde sesli kapıyı açarak numune rakını çıkartılır.

Not: Numune tüplerindeki muhtemel mikobakterilerin artık öldüğü varsayılır. Bu aşamadan sonraki işlemlere kabin dışında devam edilebilir. Ancak numunelere yinede biyolojik tehlikeli madde olarak muamele edilmelidir.

D. ÖRNEK DNA' NIN AÇIĞA ÇIKARILMASI (Lysis)

- a) Isıtma işlemi tamamlanan numune tüpler mikrosantrifüje konur.
- b) Santrifijün kapağı kapatılır ve kısa süreli (10 sn.) çevrilir.
- c) Santrifüj sonrası tüplerdeki yoğunluk kontrol edilir ve gerekirse işlem tekrarlanır.
- d) Tüpler numune rakına yerleştirilir.
- e) Filtreli pipet ucu ile her bir tüpe **100 µL DTB Lysis Buffer 2** eklenir.
- f) Her bir numune için ayrı bir pipet ucu kullanılmalıdır.
- g) ELDİVEN DEĞİŞTİRİLİR.
- h) Tüm tüpler 5 sn. vortexlenir ve tüpler numune rakına iyice yerleştirilir. Bununla maksimum düzeyde ultrasonik enerjiye maruziyet sağlanır.
- i) Ultrasonik banyoda su seviyesi ve ısının 65 (+/- 5)°C olup olmadığı dijital termometre ile kontrol edilir.
- j) Tüpler numune rakından Sonik Banyo Rakına yerleştirilir ve kapağı kapatılır.
- k) 45 dk. Süreyle sonikasyon gerçekleştirilir.
- l) Sonikasyon sonunda numune rakı kurutma amacıyla havlu kağıd üstüne konur .

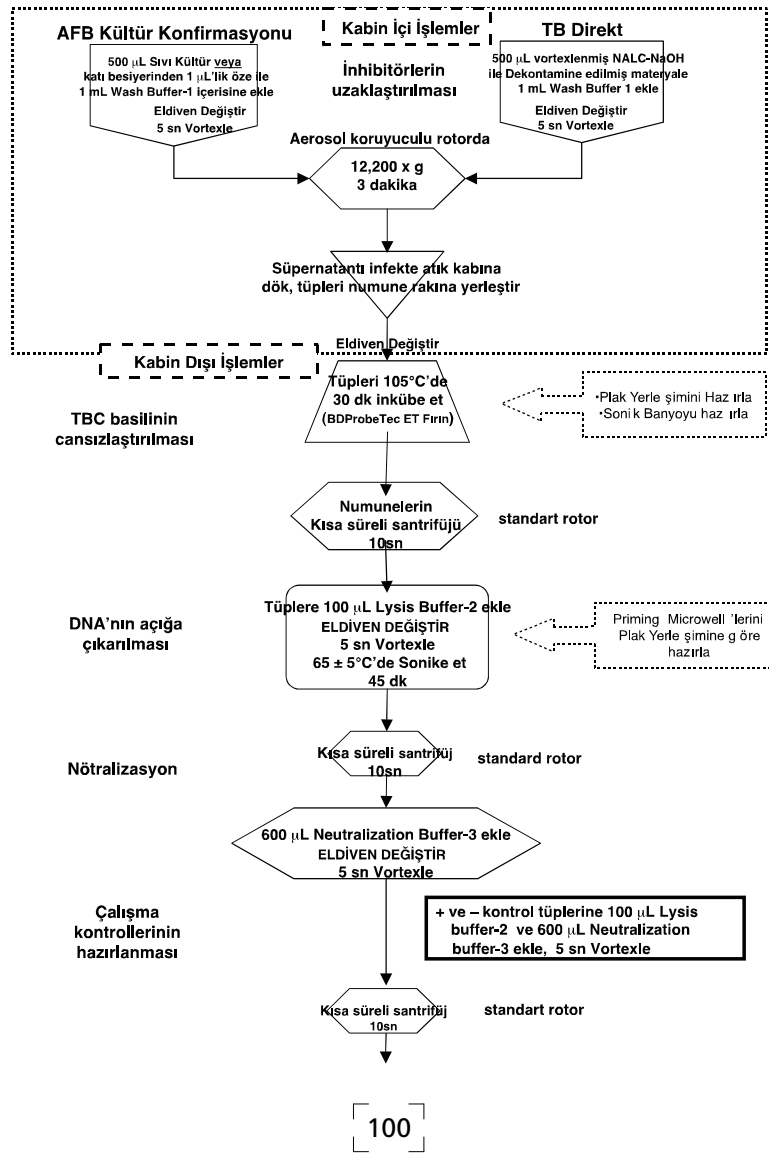
E. NÖTRALİZASYON

- a) Sonike edilmiş numune tüpleri standart rotor yerleştirilmiş mikrosantrifüje konur.
- b) Santrifijün kapağını kapatılır ve kısa süreli (10 sn.) çevrilir.
- c) Santrifüj sonrası yoğunluk kontrol edilir gerekirse santrifüj işlemi tekrarlanır.
- d) Tüpler temiz pipetleme rakına yerleştirilir.
- e) Filtreli pipet ucu ile her bir tüpe **600 µL DTB Nötralizasyon Buffer 3** eklenir.
- f) Her bir numune için ayrı bir pipet ucu kullanılmalıdır.
- g) ELDİVEN DEĞİŞTİRİLİR
- h) Her tüp 5 sn. Vortexlenir
- i) Tüpler, tekrar temiz pipetleme rakına yerleştirilir.

Numuneler artık BDProbeTec ET Sisteminde amplifikasyon için hazırdır. Ancak bu aşamada numuneler opsiyonel olarak bekletilebilir. Bu amaçla;

- 18-33°C'de 12 saate kadar.
- 2 – 8°C'de 4 güne kadar saklanabilir. Çalışmadan önce numuneler için ısıtma aşaması tekrarlanmalıdır.
- -20°C veya daha düşük ısılarda 3 aya kadar dondurulmuş olarak saklanabilir.
- Bu numunelere çalışma öncesi oda ısısında çözündürülerek ve ısıtma aşaması tekrarlanmalı ve 10 sn kadar santrifüj edilerek yoğunluğu kontrol edilmelidir.

Şekil 12 : BDProbeTec™ ET Direkt TB Örnek Hazırlama Prosedürü



II. TEST PROSEDÜRÜ

A. TEST CİHAZLARINI HAZIRLAMA

Test işlemi öncesi sistemle ilgili tüm cihazların çalışma ısıları ayarlanarak durumları stabil hale getirilir.

- Priming heater 72.5°C ve Warming Heater 54°C olmalı
- BDProbeTec ET cihazı ekranında ısı 47.5-55.0 °C okunmalıdır

B. BDProbeTec ET Pipettor PROGRAMLAMA

- **Program 1** Çalışma örneklerinden 200 µL ul çekilir –Priming kuyucuklarına 150 µL ul dağıtılır.
- **Program 5** Priming kuyucuklarından 100 µL çekilir – Amplifikasyon kuyucuklarına 100 µL dağıtılır, 50µL ile 3 kez karıştırılır

C. BDProbeTec ET CİHAZINA ÖRNEK YÜKLEME DÜZENİNİ PLANLAMA

Hasta örneklerine ait bilgi girişi, kit ve kontrol lot numaraları sisteme girilir. Priming ve Amplifikasyon kuyucuklarının ayırımı ve örnekleme için koparılabılır striplerin yerleşimi ayrı ayrı düzenlenir.

D. ÇALIŞMA KONTROLLERİNİN HAZIRLANMASI

- DTB Lysis Buffer 2 ve DTB Nötralizasyon Buffer 3 kullanım öncesi oda ısısında bekletilir ve iyice karıştırılır.
- Her çalışmaya bir **DTB Negatif** ve bir **DTB Pozitif Kontrol** tüpü ilave edilir. Bu tüplerin her birine yeni bir pipet ucu ile **100 µL DTB Lysis Buffer 2** ve **600 µL DTB Nötralizasyon Buffer 3** eklenir.
- Tüpler 5sn vortexlenir .
- Vortekslemeyi takiben mikrosantrifüjde 10 sn santrifüj edilir ve tüpler temiz pipetleme rakına yerleştirilir.

E. TEST PROSEDÜRÜ (Şekil : 13-19)

a) Kontrol ve numune tüp kapakları açılır.

b) ELDİVEN DEĞİŞTİRİLİR

c) Plate yerleşim planına göre Priming kuyucukları hazırlanır,

d) Pipet programı seçilir (DTB Pipet Prog 1), pipetörün uç aralıkları ayarlanır

e) Numune ve kontrol tüplerinden 200 µl çekilir.

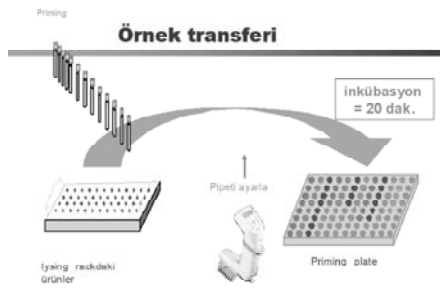
f) Pipet aralığı kapatılır ve Priming kuyucuklarına 150 µL numune aktarılır (Aktarma yapılırken kuyucukların duvarına doğru bırakmak kross kontaminasyonun önlenmesi için önemlidir).

g) Pipet uçları atılır ve numune tüpleri yeni kapaklarla kapatılarak kaldırılır.

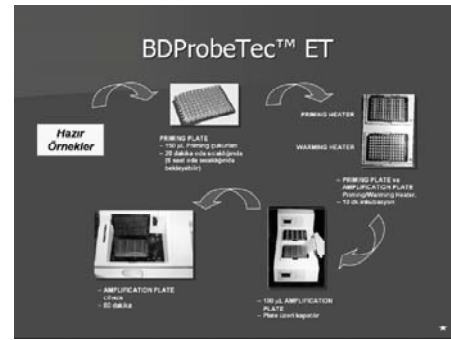
h) Priming kuyucuklarının üzeri plastik kapağı ile kapatılarak 20 dk oda ısısında inkübasyona bırakılır (Bu süre 6 saate kadar uzatılabilir)

i) ELDİVEN DEĞİŞTİRİLİR

Şekil 13



Şekil 14



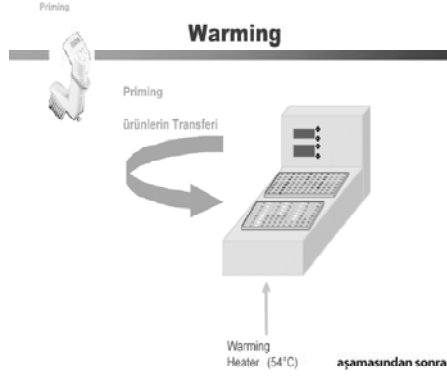
a) Inkübasyon süresinin sonuna doğru Priming kuyucuklarının hazırlanışına benzer şekilde Amplifikasyon kuyucukları hazırlanır

b) Süre sonunda Priming kuyucukları üzerindeki plastik kapak çıkartılır ve Priming Isıtıcısına (72C) konulur. Buna paralel olarak aynı zaman dilimi içerisinde hazırlanan Amplification kuyucuklarında Amplifikasyon ısıtıcısına yerleştirilir (54 C). 10 dk. (+ / - 1 dk.) beklenir. Bu aşamada süre oldukça kritiktir.

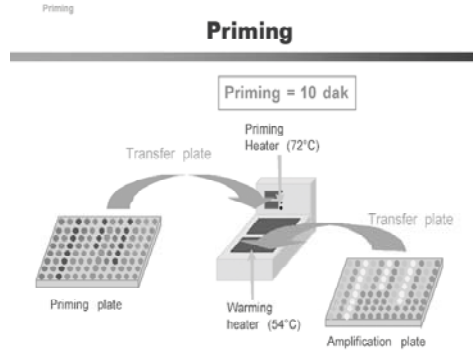
c) Inkübasyon sırasında Pipetörde "DTB Pipet Prog 5" seçilir. Süre bitiminde Priming kuyucuklarından 100 µL alınıp Amplifikasyon kuyucuklarına aktarılır ve hava kabarcığı oluşturmada pipet programının 50 µL 'lik hacmi ile üç kez karıştırılır.

d) İşlem tamamlandığında Amplifikasyon kuyucuklarının üzeri yapışkan bir kart ile tüm test kuyucukları tamamen kapatılır. Yapışkanlı kapak plağın dışına çıkmamalıdır (aksi takdirde cihazdaki okumalarda hata çıkabilir)

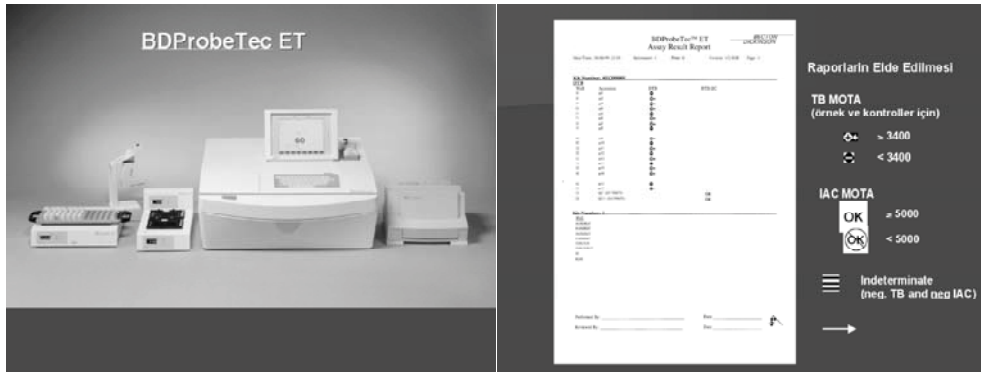
Şekil 15



Şekil 16



- Amplifikasyon kuyucuklarını taşıyan plak 30 sn içinde **BDProbeTec ET cihazına** yerleştirilir ve cihaz çalıştırılır. (Şekil 17)
- Çalışma tamamlandığında rapor otomatik olarak cihazın yazıcısından alınır (Şekil 18)
- Cihazdan işlemi tamamlanmış plak dışarı çıkartılır. Kuyucukların yapıştırıcısı açılmadan metal plaktan çıkartılarak atık poşetine konur. Poşetin ağzı kapatılarak atık kabına bırakılır.
- Metal Plak %1 sodyum hipoklorit ile temizlenir distille veya deiyonize su ile silinir ve temiz bir kağıt havlu ile kurutulur.



Şekil :17
BDProbeTec ET amplifikasyon ve
detection cihazı

Şekil 18:
Çalışma Raporu ve Yorumu

Tablo : 1 Beklenen Cut-off MOTA değerleri

Örneğin MOTA Değeri	IAC MOTA Değeri	Açıklama
> 3.400	Bakılmaksızın	Pozitif
<3.400	>5.000	Negatif
<3.400	<5.000	Testin tekrar edilmesi gerekli

G. KALİTE KONTROL

Her çalışma için ve farklı kit lot numarası için 1 Pozitif ve 1 Negatif Kontrol birlikte çalışılmalıdır. DTB Pozitif kontrolü reaktif hatalarını, pipetleme ve inkübasyon gibi çalışma prosedür hatalarını denetler. DTB Negatif kontrolü ise reaktif ve dış çevre kontaminasyonlarını denetler. Numunelerin raporlanması için Negatif kontrol negatif, Pozitif kontrol pozitif olarak sonuçlanmalıdır. Kontroller beklendiği gibi sonuçlanmaz ise sonuçlar değerlendirilemez ve rapor edilemez. Bu durumda tüm çalışma yeni kontroller, kuyucuklar ve işlenmiş numuneler ile tekrar edilmelidir.

Internal Amplifikasyon Kontrolü (IAC) Priming kuyucuklarının içinde bulunmaktadır. IAC, Amplifikasyonu, reaksiyonu ve örnekteki potansiyel inhibisyonun varlığını denetler.

Çalışmada örnek hazırlamadaki etkinliği test etmek amacıyla her laboratuvar kural olarak *M.tuberculosis* H37Ra ATCC kontrol suşuna ait 1 Mc Farland yoğunluktaki bir süspansiyonu prosedür kontrolü olarak rutin çalışmalara dahil etmelidir.

KAYNAKLAR

1. Alp A.: Mikobakterilerin tanı ve identifikasyonunda moleküler yöntemler. 3.Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Program ve Bildiri Özet Kitabı, Ankara, Sayfa: 95-99, 2004
2. Barret A, Magee J.G , Freeman R .: An evalution of the BD ProbeTec ET system for the direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* (2002) Oct; 51(10):895-98
3. Bemer MP, Germaud P, Drugeon HB. : *Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis*

by a commercial polymerase chain reaction kit. *Pathol Biol (Paris)* 1998 Oct ; 46 (8):597-603

4. Bergmann J.S, Keating W.E, Woods G.L.: Clinical evaluation of the BD ProbeTec ET system for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* (2000) Feb; 38(2):863-65

5. Bogard M, Vincelete J, Antinozzi R, et all. : Multicenter study of Commercial, Automated Polymerase Chain Reaction System for the Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Respiratory Specimens in Routine Clinical Practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2001) 20 : 724-731

6. Gerdes R.: Evaluation of BD Probe Tec ET System for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* from Clinical respiratory specimens using Strand Displacement Amplification technology. Abstr.U-68 , ESM 2000

7. Johansen I.S, Thomsen V, Johansen A, Andersen P, Lundgren B.: Evaluation of a New Commercial Assay for Diagnosis of Pulmonary and Nonpulmonary Tuberculosis . *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2002) 21 : 455-460

8. Kocagöz T.: Tübeküloz tanısında yenilikler. H.Eraksoy, O.Ş.Yenen (Edt.),İnfeksiyon hastalıkları ve Klinik mikrobiyoloji 2000, Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği Yayınları. No.19 , sayfa :25-33, 2000

9. Piersimoni C, Scarparo C, Piccoli P, Rigon A, Ruggiero G, Nista D, Bornigia S.: Performans assesment of two commercial amplification assays for Direct Detection for *Mycobacterium tuberculosis* Complex from respiratory and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol* (2002) Nov; 40(11):4138-42

10. Scarparo C, Picolli P,Rigon A, Ruggiero G, Nista D, Piersimoni C.: Direct identification of mycobacteria from MB/BacTalert 3D bottles: comparative evaluation of two commercial probe assays. *J Clin Microbiol* (2001) Sep; 39(9): 3222-27

11. Schmidt E., Feldman K.: Clinical evaluation of BD Probe Tec ET System for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* from Clinical respiratory specimens.Abst.M004, ESM 2000

12. Wang S.X, Sng L.H., Tay L.: Preliminary study on rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by the BD Probe Tec ET system. *Journal of Medical Microbiology*, 2004, 53; 57-59

13. Woods GL.The mycobacteriology laboratory and new diagnostic techniques. *Infect Dis Clin North Am.* 2002 Mar;16(1):127-44

14. Woods GL.: Molecular Techniques in Mycobacterial Detection. *Arch Pathol Lab Med.*2001; 125: 122-126

This image shows a full page of blank white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page, providing a guide for handwriting or typing. There are no margins, text, or other markings on the paper.

[illegible]

This image shows a full page of blank, lined paper. It features approximately 20 evenly spaced horizontal grey lines across its entire width, providing a guide for handwriting or typing. The paper itself is a clean, off-white color.

This image shows a single sheet of white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.

This image shows a single sheet of white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.

This image shows a single sheet of white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.