



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

25 - 27 EYLÜL 2009

www.klimik.org.tr

ERZURUM

İÇİNDEKİLER

Kurs Düzenleme Kurulu	3
Önsöz	4
Kurs Programı	5
Uygulamalı Eğitim Konuları ve Grupları	7
Uygulamalı Kurs Konuları	9
Tüberküloz Laboratuvarında Çalışma Prensipleri	10
Klinik Örneklerin Alınması ve Laboratuvara Gönderilmesi	11
Örneklerin İşlenmesi ve Kültür Yöntemleri (Meltem UZUN)	
Direk Mikroskopi Teknikleri ve Değerlendirilmesi	24
(Nevin SARIGÜZEL SAR)	
Auramine-Rhodamine Floresan Boyama	31
(Vildan AVKAN OĞUZ)	
Tüberküloz basilinin klasik yöntemlerle identifikasyonu	36
(Süheyla SÜRÜCÜOĞLU)	
Antibiyotik Duyarlılık Test Yöntemleri	49
(Nuri ÖZKÜTÜK)	
Tüberküloz Tanısında Klasik PCR	75
“PCR ve RFLP Yöntemleri ile Mycobacterium Türlerinin İdentifikasyonu” (Ahmet SANIÇ, Ahmet KIZIRGİL)	
Tüberkülozun Laboratuvar Tanısında Kullanılan Moleküler Ticari Tanı Sistemleri	87
(Mustafa ÖZYURT)	

KURS DÜZENLEME KURULU

KURS BAŞKANI

Prof. Dr. Ayşe YÜCE
Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği
Tüberküloz Çalışma Grubu Başkanı

DÜZENLEME KOMİTESİ

Ayşe YÜCE	(Başkan)
Ahmet AYYILDIZ	(Yerel Koordinatör)
Mustafa ÖZYURT	(Sekreter)
Meltem UZUN	(Üye)
Süheyla SÜRÜCÜOĞLU	(Üye)
Nevin SARIGÜZEL SAR	(Üye)

ÖNSÖZ

Değerli Meslektaşlarım,

Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği Tüberküloz Çalışma Grubu olarak düzenlediğimiz **VIII. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kursunda** sizlerle Erzurum’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, uygun sağaltım ve izlemin önemli rolü olduğu bilinmektedir. Ancak ülkemizde ve dünyada tüberkülozun sağaltım ve izleminde olduğu kadar pek çok mikrobiyoloji laboratuvarında standardizasyon sorunları bulunmaktadır. Bu kursun ana hedefi ülkemizde tanı yöntemlerinde bir standardizasyonun sağlanmasına katkıda bulunmaktır. Kurs için önceden olduğu gibi 16 katılımcı kabul edilecek ve 10 kişilik eğitici grubu görev yapacaktır. Her bir kursiyere tüm testlerin bizzat yaptırıldığı uygulamalı kurslara bugüne değin öğretim üyesi, araştırma görevlisi ve dispanser hekimi olmak üzere 114 meslektaşımız katılmıştır.

Kursun ev sahipliğini yapan Sayın Prof. Dr. Ahmet AYYILDIZ ve çalışma arkadaşları ile katılarak bize güç veren tüm değerli meslektaşlarımıza teşekkür eder, saygılar sunarız.

Prof. Dr. Ayşe YÜCE

Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği
Tüberküloz Çalışma Grubu Başkanı

KURAMSAL PROGRAM

25 Eylül 2009, Cuma

9.00-9.20	AÇILIŞ VE TANIŞMA
	I. OTURUM
9.20-10.00	Klinik materyalin hastadan alınması, laboratuvara gönderilmesi, işlenmesi ve kültürü Meltem UZUN
10.00-10.40	Mikroskopik inceleme teknikleri ve değerlendirilmesi Ziehl-Neelsen boyama Nevin SARIGÜZEL SAR Auramin-rodamin boyama Vildan AVKAN OĞUZ
10.40-11.00	Tüberküloz basilinin identifikasyonu Süheyla SÜRÜCÜOĞLU
11.00-11.20	Kahve Arası ☕
	II. OTURUM
11.20-11.40	Antibiyotik duyarlılık test yöntemleri Nuri ÖZKÜTÜK
11.40-12.00	Tüberküloz tanısında PCR Ahmet SANIÇ
12.00-12.20	Moleküler tanıda ticari sistemler Mustafa ÖZYURT
12.20-12.30	TARTIŞMA
12.30-13.30	Öğle Yemeği 🍴
14.00-17.00	SOSYAL PROGRAM
19.00	Akşam Yemeği 🍴

UYGULAMALI EĞİTİM PROGRAMI

26 Eylül 2009, Cumartesi

8.30- 12.30	Uygulamalı Eğitim	
12.30- 13.30	Öğle Arası	
13.30- 17.30	Uygulamalı Eğitim	
20.00	Akşam Yemeği	🍴

27 Eylül 2009, Pazar

8.30- 12.30	Uygulamalı Eğitim	
12.30-13.30	Öğle Arası	
13.30-17.30	Uygulamalı Eğitim	
17.30-18.00	Kurs Değerlendirmesi ve Kapanış	

Uygulama Yeri

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Tüberküloz Laboratuvarı, Erzurum

Kurs, TTB-STE Kredilendirme Kurulu tarafından kredilendirilecektir.

Kurs, Becton Dickinson ve Bio RAD firmaları tarafından koşulsuz eğitim desteği ile desteklenmiştir.

“UYGULAMALI EĞİTİM KONULARI VE GRUPLARI”

EĞİTİM GRUP-1 : Hasta örneklerinin işlenmesi ve kültürü

- a. Hasta örneklerinin işlenmesi (Homojenizasyon, dekontaminasyon, konsantrasyon)

Eğitimci - Dilek ŞATANA

- b. Kültür (LJ, Middlebrook, Bactec, MGIT besiyerlerine inokülasyon, inkübasyon ve değerlendirme)

Eğitimci - Meltem UZUN

EĞİTİM GRUP-2 : Mikroskopik inceleme teknikleri ve değerlendirme

- a. Ziehl-Neelsen boyama

Eğitimci - Nevin SARIGÜZEL SAR

- b. Auramin-rodamin fluoresan boyama

Eğitimci - Vildan AVKAN OĞUZ

EĞİTİM GRUP-3 : Klasik identifikasyon yöntemleri

Üreme hızı, üreme ısısı, pigment yapımı, mikrokoloni, niasin birikimi, nitrat redüksiyonu, NAP testi, katalaz testi, TCH testi

Eğitimci - Süheyla SÜRÜCÜOĞLU, Hörü GAZİ

EĞİTİM GRUP-4 : Antibiyotik duyarlılık test yöntemleri

LJ, Middlebrook 7H10, Bactec460, MGIT 960

Eğitimci - Nuri ÖZKÜTÜK, Ayşe Esin AKTAŞ

EĞİTİM GRUP-5 : Tüberküloz tanısında PCR

Klasik PCR, RFLP

Eğitimciler - Ahmet SANIÇ, Ahmet KİZİRGİL

EĞİTİM GRUP-6 : Moleküler tanıda ticari sistemler

Real Time PCR, MTB testi

Eğitimci - Mustafa ÖZYURT, Mustafa Tamay ÖZER

**UYGULAMALI KURS
KONULARI**

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 laboratuvarında 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 kabininde 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 laboratuvarında 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 basilinın moleküler veya klasik yöntemlerle tanısı konulduğunda,
 - d. Antibiyotik duyarlılık sonuçlarının belirlenmesi durumunda
13. Tüberküloz ile ilgili materyal, üzerinde tehlikeli biyolojik materyal işareti bulunan iç-içe geçmiş üç kap sistemi ile gönderilmelidir.

KLİNİK ÖRNEKLERİN ALINMASI VE LABORATUVARA GÖNDERİLMESİ / ÖRNEKLERİN İŞLENMESİ VE KÜLTÜR YÖNTEMLERİ

Prof.Dr. Meltem UZUN

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çapa - İSTANBUL

E-posta: meltemuzuntr@yahoo.com

A] KLİNİK ÖRNEKLERİN ALINMASI VE LABORATUVARA GÖNDERİLMESİ

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.
- Kabın 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 başlanmadan önce alınmalıdır.
- Endojen flora ve çevresel kontaminasyonu en aza indirmek için örnekler olabildiğince aseptik şartlarda alınmalıdır.
- Üremeyi engelleyici herhangi bir koruyucu kimyasal madde 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 bir transport besiyerine konularak gönderilirse kabul edilebilir)

- Uygun olmayan kapta gelen ve etiketsiz örnekler;
- 24 saatlik, biriktirilmiş örnekler;
- Dondurulmuş örnekler.

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 bekletilebilir. Tekrar örnek alınamaması durumunda mevcut örnek değerlendirilir.

I. Pulmoner Örnekler :

Öksürerek çıkartılan 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 e dilir . Ardıardına 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 balgamın 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 Middlebrook 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 bir sıvı besiyerine (Middlebrook 7H9, Dubos tween albümin) ekilebilir.
- Bu sıvıların çoğu fibrinojen içerebileceğinden toplama kabına antikoagülan olarak sodyum poliyenetol 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.Kutanöz lezyon varlığında, lezyon kenarının altından örnek aspire edilmelidir.Bu tip örneklerin kültürleri, optimum üreme sıcaklığı düşük olan mikroorganizmalar da (örneğin, *M.haemophilum*, *M.marinum* veya *M.ulcerans*)etken olabileğinden 30°C'de de inkübe edilmelidir.

Aspirasyon için hacim yeterli değilse 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 alınarak, kültür yapılan besiyerleri hem 30°C hem 37°C'de inkübe edilmelidir.
- Formalin içinde gönderilen örnekler kabul edilmemelidir.

Kan:

* Disemine mikobakteri infeksiyonlarının büyük çoğunluğu Mycobacterium avium kompleksi (MAC) tarafından oluşturulur. Bu nedenle, bu mikroorganizmalar kandan izole edildiklerinde mutlaka klinik hastalık düşünülmelidir.

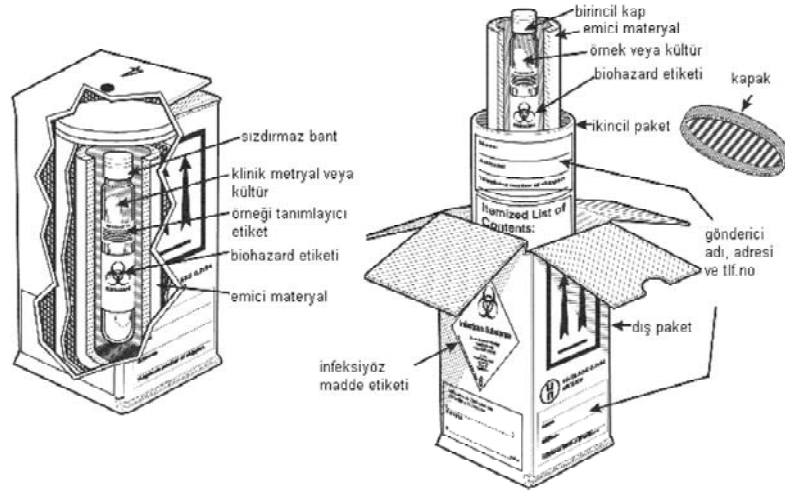
- Aseptik koşullarda alınan kan örneği direkt olarak hasta başında Isolatör lysis santrifüj tüpüne(Wampole Laboratories, Cranbury, N.J.) veya bu amaçla kullanılan diğer kan kültürü besiyerlerine(Bactec Myco/F litik, MB/BacT Alert) aktarılır.Isolatör tüpündeki sediment,Bactec 12B besiyerine ekilmemelidir.Katı besiyerine ekim önerilmez.
- Hasta başında ekim yapılamadığı durumlarda SPS, heparin veya sitrat antikoagülan olarak kullanılır.
- EDTA (etilendiamin tetraasetik asit)'lı tüplere toplanan kanlar ve koagüle kanlar kabul edilmez.

Dışkı:

- > 1 gr dışkı örneği steril, tek kullanımlık, parafin içermeyen bir kap içine alınır.
- AIDS hastalarının dışkılarından sıklıkla MAC üretilebilir .

Ancak bu hastaların tanımlanması için rutin dışkı incelemesi önerilmez.

Örneklerin postalanması: World Health Organisation (WHO), Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 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)



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

Birincil kap (primer kap):

Materyalin koyulduğu, 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 malzemedan 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, infeksiyöz (bulaşıcı) madde yazısı ve biyolojik tehlike (biohazard) etiketi yapıştırılmalıdır.

B] ÖRNEKLERİN İŞLENMESİ VE KÜLTÜR YÖNTEMLERİ

Tüberküloz etkeni bakterilerin izolasyonu için klinik örneklere 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.

NN-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 oksijene duyarlı olduğu için bu karışım hazırlandıktan sonra 24 saat içinde kullanılmalıdır. NALC' ın tartım işlemleri sırasında ambalajın ağız uzun süre açık bırakılmamalıdır.

NALC-NaOH ve Fosfat Tamponu Çözeltilerinin Hazırlanması

1. NaOH (%4'lük) çözeltisi

NaOH.....40gr
Distile su.....1000ml

2. Sodyum Sitrat (%2.9'luk) çözeltisi

Sodyum sitrat.....29gr
Distile su..... 1000ml

Her iki çözelti de (1 ve 2 nolu) otoklavda steril edildikten sonra eşit miktarlarda karıştırılarak, aşağıdaki tabloya göre NALC ilave edilir.NALC oksijene duyarlı olduğu için (18-24 saat kullanılabilir) bu karışımın hergün ekimden önce "yeni" olarak hazırlanması gereklidir.

Gereken toplam hacim(ml)	%4 NaOH	%2.9 sodyum sitrat	İlave edilecek NALC(gr)
50	25	25	0.25
100	50	50	0.50
200	100	100	1.00
500	250	250	2.5
1000	500	500	5.00

3. Fosfat tamponu (0.067M)

Tampon çözeltisi, istenen pH değerinin elde edilmesi için iki stok çözeltinin belirli miktarlarda karıştırılması ile hazırlanır.

a. Stok çözeltiler

1. Disodyum fosfat (0.067M) solusyonu

Anhidroz Na₂HPO₄.....9.47gr

Distile su.....1000ml

2. Monopotasyum fosfat (0.067M) solusyonu

KH₂PO₄.....9.07gr

Distile su..... 1000ml

b. pH 6.8 tampon çözeltisi

Her iki çözelti de (1 ve 2 nolu) otoklavda steril edildikten sonra, 50 ml (1) nolu çözeltiden, 50 ml (2) nolu çözeltiden alınarak karıştırılır ve pH 6.8'e ayarlanır.

Yöntem

Tüm işlemler biyolojik emniyet kabinde yapılmalıdır.

- Klinik örnek 50 ml'lik polipropilen, dibi konik, burgulu kapaklı steril tüplere (Falkon tüpü) aktarılır ve üzerine klinik örneğin miktarı kadar NALC-NaOH solusyonu 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, dekontaminasyon işlemi durdurulmalıdır.
- Fosfat tamponu ilave edilmiş tüpler, bakteri yoğunluğunu artırmak için 3000x g'de 15-20 dakika santrifüj edilir.

KÜLTÜR YÖNTEMLERİ

M.tuberculosis kompleksi, uygun sıvı ve katı besiyerlerinde 35-37°C'de, 7-21 günde ürerler. Kültürlerde 8 haftaya kadar üreme olmamışsa 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. Bu besiyerinin kullanım süresi, buzdolabında saklamak koşuluyla birkaç aydır. Petragnani ve American Trudeau Society diğer yumurta bazlı besiyerleridir. Agar bazlı besiyerleri şeffaftır ve ekimden 10-12 gün sonra mikroskop altında incelendiğinde mikrokoloniler gözlenebilir. Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11 en çok tercih edilen agar temelli besiyerleridir. Bu besiyerlerinin kullanım süresi buzdolabında saklamak koşuluyla bir aydır. Kontamine örneklerin kültür işlemi için selektif besiyerlerine ekim yapılması önerilir. Bu amaçla kullanılan L-J Gruft (penisilin+nalidiksik asit), Mycobactosel L-J (siklohekzimit+linkomisın+nalidiksik asit), Mitchison selektif 7H11 agar (karbenisilin+polimiksin B+trimetoprim laktat+amfoterisin B) gibi besiyerlerinde kontaminasyon, antibiyotik ve antifungal içermeleri nedeniyle daha az sıklıkta gözlenir. Eğer iki adet katı besiyeri kullanılacaksa besiyerlerinden birinin selektif olması önerilir. Yapılan ön çalışmalar, *M.tuberculosis*'in, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin olarak kullanılan kanlı agar besiyerinde ürediğini ve bu besiyerinin duyarlılık deneylerinde kullanılabileceğini göstermektedir.

Löwenstein-Jensen besiyerinin hazırlanması

Asparagin.....	3.6gr
KH ₂ PO ₄ (anhidroz).....	2.4gr
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0.24gr
Magnezyum sitrat.....	0.6gr
Gliserol.....	12.0ml
Patates unu.....	30.0gr
Distile su.....	600.0ml

Patates unu, diğer maddeler suda eritildikten sonra azar azar eklenerek homojen bir sıvı elde edilir. Otoklavda steril edildikten sonra soğutulur; malaşit yeşili ilave edilir.

Malaşit yeşili (taze hazırlanmış %2'lik aköz çözelti).....20.0ml

En fazla bir haftalık taze yumurtalar, üzerleri sabunlu su ile 30 saniye fırçalandıktan sonra durulanır; sonra %70'lik alkol içinde 15 dakika bekletilir. Yumurtalar temiz bir elle içinde cam boncuk bulunan steril bir balona kırılarak elle çalkalanır ya da mikser ile karıştırılarak homojen hale getirilir. Dört katlı steril gazlı bezden geçirilerek 1000 ml olacak şekilde yukarıda hazırlanmış olan besiyerine ilave

edilir. Tüm içerik karıştırıldıktan sonra, besiyerleri 6-8 ml olacak şekilde 20x150 mm'lik steril burgulu kapaklı tüplere dağıtılarak 85°C'de 50 dakika koagüle edilir. Besiyerleri 37°C'de 48 saat bekletilerek steril olup olmadıkları kontrol edilir. Kapakları sıkıca kapatılmak şartıyla besiyerleri birkaç ay buzdolabında saklanabilir.

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 bir gün 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 örnekleri izolasyon için 30°C'de, *M. haemophilum* ile infekte olduğu düşünülen klinik örnekler ise özel besiyerine ekilerek 35-37°C'de inkübe edilir.
- Ekim yapılan besiyerlerinin inkübasyondan 3-5 gün sonra ve takiben haftada bir kez kontrollerine devam edilmelidir.
- Petrideki agar bazlı besiyerleri parafilm ile kapatılarak inkübe edilir ve ters çevrilerek mikroskop altında mikrokolonilerin oluşumu ve morfolojik yapısı incelenir.
- Besiyerlerinde üreyen koloniler aside dirençli boyama yöntemlerinden biri ile incelenir.
- Aside dirençli boyama sonucu pozitif olan izolatların tür tanısı yapılır.

Sıvı besiyerleri içinde yer alan Middlebrook 7H9 ve Dubos tween albumin, mikobakterilerin stok suşlarının subkültürlerinin yapılmasında, duyarlık deneyleri ve 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** sistemi, izolasyon, identifikasyon ve duyarlılık deneylerinin uygulandığı bir sistem olarak uzun yıllardır rutin tanıda kullanılmaktadır. Besiyeri değeri ölçülebilen substrat olarak radyoaktif karbon (¹⁴C) işaretli palmitik asit içerir. Bu substrat mikobakteri tarafından kullanılır ve metabolizma sırasında ¹⁴CO₂ oluşur. Oluşan ¹⁴CO₂ BACTEC 460 TB cihazında 0-999 sayısal değerleri arasında üreme indeksi (GI) olarak ölçülür. Antimikrobiyal olarak kullanılan PANTA, ekim öncesi besiyerlerine (Polimiksin B-6000U/ml, Amfoterisin B-600g/ml, Nalidiksik asit 2400g/ml, Trimetoprim laktat-

600g/ml, Azlosilin 600g/ml) eklenir. Kontamine olmadığı düşünölen akciğer dışı örnekler bekletilmeden ekiliyorsa, PANTA eklenmeyebilir.

Örnekler iğne ucu çıkmayan tüberkülin enjektörüyle, PANTA eklenmiş Bactec 12B besiyerine 0.1-0.5 ml olacak şekilde ekilir. İnkübasyon; 37oC'de yapılır ve değerlendirme yoğunluğu fazla olmayan merkezlerde ilk 2-3 hafta haftada 3 kez yoğunluğu fazla merkezlerde ise ilk iki hafta iki, sonraki altı hafta boyunca haftada bir kez olmak üzere BACTEC 460 TB cihazı ile yapılır. Cihazda GI'i okunan besiyerleri, GI değeri 10'un altında ise negatif, 10 ise pozitif kabul edilir ve pozitif olan bu besiyerleri günlük kontrole alınır. İndeks 100'ün üzerine çıkınca aside dirençli boyama yapılarak üreyen mikroorganizmaların aside dirençli bakteri olup olmadığı doğrulanır.Doğrulandıktan sonra identifikasyon ve duyarlılık deneylerine geçilir.

Bactec Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) 960 (BD Biosciences, Sparks, MD) sisteminde kullanılan tüplerde, Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri ve dip kısımda oksijene duyarlı rutenyum metal kompleksi içeren silikon bulunur. Ekimden önce besiyerlerine OADC ve PANTA eklenmelidir.Kullanılan besiyerlerinde üreme yoksa, oksijen varlığına bağılı olarak silikon tabakaya gönderilen UV ışınına karşı floresans oluşmazken; mikobakteriler veya diğör mikroorganizmalar ürettiğinde oksijenin kullanılması sonucunda UV ışınına karşı floresans oluşmakta ve oluşan bu floresans miktarı üreme indeksi olarak değerlendirilmektedir. Kan hariç diğör tüm klinik örnekler için uygundur.

VersaTREK (ESP Culture System - Trek Diagnostics,Inc.,Westlake Ohio), Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri ve selüloz sünger içeren bir sistemdir. Mikroorganizmaların üremesi sonucu oluşan gaz basıncındaki değışiklikler ölçölerek, grafiksel olarak bilgisayar sistemine aktarılır. Ekimden önce besiyerlerine OADC ve antibiyotik karışımı ilave edilir. Sistem tüm klinik örnekler için uygundur.

MB/BacT (bioMerieux, Hazelwood, Mo.) sistemi, besiyerinin dip kısmında kolorimetrik bir sensör içeren ve oluşan CO₂ düzeyini ölçerek üremeyi değerlendiren bir sistemdir. Bilgisayar destekli sistemde besiyerleri sürekli olarak kontrol altındadır. Kan hariç diğör tüm klinik örnekler için uygundur.

Bactec 9000 MB (BD Biosciences, Sparks, MD), besiyerindeki oksijen kullanımının floresans ile belirlendiğı bir sistemdir. Modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyerine ekimden önce PANTA ilave edilir. Balgam ve diğör solunum yolu örnekleri için Myco F/sputa, kan ve diğör steril örnekler için MycoF/lytic kullanılır.

Tam otomatize olan bu sistemler arasında üreme süresi, oranı ve kontaminasyon sıklığı açısından önemli bir fark bulunmamaktadır ve bu sistemler yüksek kapasite ile çalışan laboratuvarlar için önerilir.Daha düşük kapasite ile çalışan laboratuvarlar için, **Septi-Chec AFB** (BD Biosciences, Sparks, MD), **MGIT** (BD Biosciences, Sparks, MD) ve **MB Redox** (Biotest Diagnostics Corp., Danville, N.J.) gibi manuel sistemler önerilmektedir.

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. CDC. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories (BMBL), HHS Publication 4th ed. May 1999.
3. CDC. Packaging, labeling and shipping of infectious substances. Public Health Practice Program Office, www.phppo.cdc.gov/nltn/pdf/2000/3.0/shipdoc4.pdf
4. Çoban AY, Cihan CC, Bilgin K, Uzun M, Akgüneş A, Çetinkaya E, Durupınar B. Blood agar for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis against first line drugs. *Int J Tubercle Lung Dis* 2006; 10: 450-53.
5. Çoban AY, Martin A, Uzun M, Bilgin K, Palamino JC, Durupınar B. Evaluation of blood agar for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis against first-line antituberculous drugs: Results from two centers. *J Chemother* 2008; 20:388-90.
6. Della-Latta P, Weitzman I. Mycobacteriology. In: Isenberg HD (ed). *Essential Procedures for Clinical Microbiology*. Washington DC: ASM Press. 1998: 169-75, 175-83.
7. 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
8. 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.
9. Drobniewski FA, Caws M, Gibson A, Young D. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. *The Lancet Infect Dis* 2003; 3: 141-7.
10. Dunlap NE, Bass J, Fujiwara P, et al. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1376-1395.
11. Forbes BA, Sahm DF, Wissfeld AS. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*, 10th. ed. St. Louis, Missouri: Mosby-Year Book. 2002:547-8.
12. 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
13. 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.

14. Pfyffer GE. Mycobacterium: General characteristics, isolation and staining procedures. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds). Manual of Clinical Microbiology, 9th ed. Washington DC:ASM; 2007:543-72.
15. Somoskovi A, Ködmön C, Lantos A, Partfai Z, Tamasi L, Füzy J, Magyar P. Comparison of recoveries of Mycobacterium tuberculosis using the automated Bactec MGIT 960 system, the Bactec 460 TB system, and Löwenstein-Jensen medium. J Clin Microbiol 2000; 38: 2395-7.
16. Strong BE, Kubica GP. Isolation and identification of Mycobacterium tuberculosis: A Guide for the Level II Laboratory. Atlanta: HHS Publication no.(CDC).81-8390, 1979; s.35-42.
17. WHO. Guidelines for the safe transport of infectious substances and diagnostic specimens WHO/EMC/97.3.
18. 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.
19. 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.
20. 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. 2006:1064-1124.
21. Woods GL. The mycobacteriology laboratory and new diagnostic techniques. Infect Dis Clin North Amer 2002; 16: 127-44.

DİREK MİKROSKOPİ TEKNİKLERİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ

Uzm. Dr. Nevin SARIGÜZEL SAR

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

E-posta: sariguzel@hotmail.com

Mikobakteriler için başlıca iki boyama tekniği geliştirilmiştir:

1. Karbol fuksin yöntemi (Ziehl- Neelsen, Kinyoun): Aside dirençli mikroorganizmalar ışık mikroskobunda 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, balgamın 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: Lamın 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.
 - Preparatların 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) Lamlar, bek'in mavi alevinden 3 veya 4 kez geçirilir, fazla ısıtılmaz.
 - c) Lamlar saf metanolde 1 dakika süreyle bekletilir.
- Not: Isı ile tespit, tüm mikobakterileri öldüremeyebilir. Bu nedenle lamların 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 boyaları tutmaları değişkenlik gösterdiğinden kullanılmazlar.

- Kontrol lamlar 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
- Lamlar etiketli lam kutusunda saklanır.

Kontrol lamlar 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) 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. ZIEHL-NEELEN (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 (BASIL SAYISI / İNCELEME ALANI)		
	<u>Fuksin boya</u>	<u>Florokrom boya</u>	
	1000 X	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 *Isoptora 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.

KAYNAKLAR

1. Nolte FS, and Metchbock B. Mycobacterium. In Murray PR, Baron E Jo, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC (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 KI 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 cytodagnosis 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

Doç. Dr. Vildan AVKAN OĞUZ

DEÜ Tıp Fakültesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD.

E-posta: vildan.oguz@deu.edu.tr

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
(İstilmış fenol 10 ml +dH ₂ O 50ml)	
Saf su -----	50 ml

Önce fenol sonra boyalar eklenecek 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 lamın üzerini 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 görülmüdü " şeklinde raporlanır.

Pozitif: Karanlık bir zeminde sarı-turuncu parlak, ince, kıvrık içi tanecikli floresan veren bakteriler olarak görüldü "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



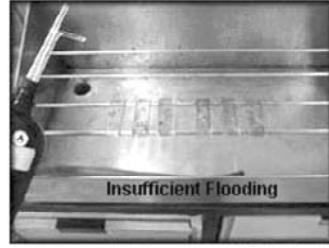
3



4



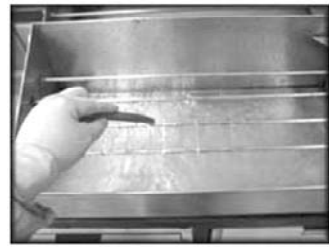
5



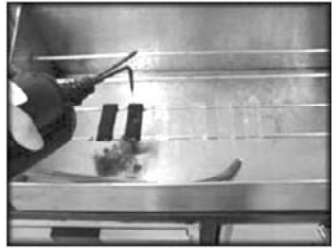
6



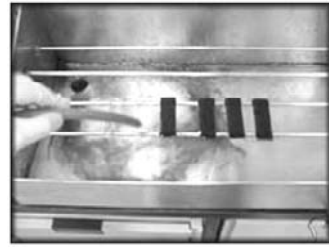
7



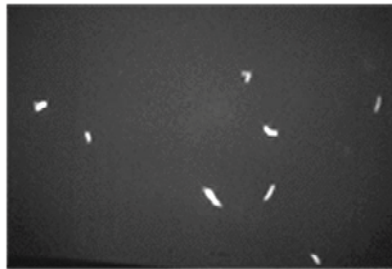
8



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

E-posta: suheylasurucuoglu@yahoo.com

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.

A. ÜREME ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

1. Koloni ve Mikrokoloni Görünümü

M. tuberculosis

- Lowenstein Jensen (LJ) besiyerinde veya Middlebrook agarda 37°C'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 ışıkta 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, ışıktta veya karanlıkta pigment yapmaz (nonkromojen).
- 2- M. fortuitum ATCC 6841: Hızlı ürer, oda ısısında iyi ürer, ışıktta veya karanlıkta pigment yapmaz (nonkromojen).
- 3- M. gordonae ATCC 14470: Yavaş ürer, oda ısısında zayıf ürer, ışıktta ve karanlıkta turuncu pigment yapar (skotokromojen).
- 4- M. kansasii ATCC 12478: Yavaş ürer, oda ısısında çok zayıf ürer, ışıktta 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 (220-25°C), diğer kapalı tüp ile açık bırakılan tüp 37°C'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 hızı	Üreme Miktarı		
	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-hydroxypropiophenone) 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 sürdüğüçe 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'ı artmasına rağmen NAP testi şişesinin GI'ı 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*) 30°C'de ürer. 37°C'de yapılan NAP testinde üremeleri inhibe olur. Bu nedenle yara veya deri örneklerinden üreyen mikobakterilerin ayrımı için NAP testinde inkübasyon ısısı hem 37°C hem de 30°C 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 ayıraçlar eklenerek karıştırılır.
 - 1 damla konsantre HCl
 - 2 damla %0.2 sulfanilamid
 - 2 damla N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride'in sudaki %0.1'lik eriyiği
- Karışım oda ısısında 5 dakika bekletilir ve pembe-kırmızı renk değişiminin varlığı araştırılır.

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

III. Katalaz Testi

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

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

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

Gereçler

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

Kalite Kontrol

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

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

Yöntem : İki farklı yöntem uygulanır.

a. Isıya stabil katalaz testi

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

b. Semikantitatif katalaz testi

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

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

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

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

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

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

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

Gereçler

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

Kalite Kontrol

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

Negatif kontrol: M. tuberculosis ATCC 25177 (dirençli)

TCH duyarlılık besiyerinin hazırlanması

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

Yöntem

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

E-posta: nozkutuk@hotmail.com

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 CLSI (Clinical Laboratory Standarts Institutes) 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 popülasyona yüzdesi olarak belirtilir. Bu oran %1'e (Kritik Proporsiyon) eşit veya daha yüksek ise test edilen suş o ilaca karşı dirençli olarak rapor edilir. CLSI, 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 –20°C’de saklanmalıdır.

- Antibiyotiklerin steril distile su ile veya uygun çözücüler ile (streptomisin [SM], izoniazid [INH] ve ethambutol[EMB] için su, rifampin [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 (0.800 mg) ise $100/0.800=125\text{mg}$ 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 –20°C’nin altında (tercihen –70°C) 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 çözücülerini, 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, dekstroz 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 bölümüne 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 4-80°C'de 1 ay saklanabilir.
- Dökülen her parti besiyerinden birkaç tanesi (ideali %10) kontaminasyon kontrolü için 350°C'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 kurummasını 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.

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

- 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 CLSI 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 (L.J) 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 sterilit 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, $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ ’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 37°C'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 $14CO_2$ 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 $14CO_2$ 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 (SM, INH, RIF ve EMB) 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 ile -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 ederek 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 steril bir 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.

İnokulasyon 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 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ '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 $\Delta GI =$ duyarlı
Kontrol şişesinin $\Delta GI <$ ilaçlı şişenin $\Delta GI =$ dirençli
Kontrol şişesinin $\Delta GI \approx$ ilaçlı şişenin $\Delta GI =$ sınırdaki 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;

- İnkübasyon ısısının $37 \pm 1^\circ C$ olduğundan,
 - Suşun canlılığından,
 - İnokulum dilüsyonunun doğru yapıldığından emin olun.
- M. tuberculosis* H37Rv herhangi 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 SM, INH, RIF ve EMB'yi 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, $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ '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'in, 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 $\mu\text{g/ml}$).
- 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.

- $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ '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 solüsyonlarının hazırlanması:

Antibiyotikler SM, INH, RIF ve EMB Bactec MGIT SIRE kiti içinde 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 4 ml steril distile su ekleyin ve tamamen çözünene kadar karıştırın.
- Liyofilize antibiyotiklerin dilüsyon şeması ve BBL MGIT 7ml besiyerindeki final konsantrasyonları tablo 8’de görölmektedir.
- Özellikle INH için olmak üzere, eğer bir ilacın kritik konsantrasyonunda direnç görülürse, 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 yapılacaksa; 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 suplementi 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 100 l pipetleyin (tablo 8).
- Kontrol (GC) tüpüne hiçbir antimikrobiyal ajan eklemeyin.

İnokulum hazırlanma:

MGIT yöntemi ile duyarlılık testleri *M.tuberculosis*'in saf kültürlerinden yapılırlar
Kati 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 süspansiyon 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 dil  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 pozitifliğı varsa, Growth supplement eklenmiş yeni bir MGIT tüpüne subk lt r  yapılmalı ve pozitif oluncaya kadar cihazda test edilmeli, pozitifliğı 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 dil  edilir ve bu 1/5 dil  süspansiyon inokulum olarak kullanılır.

İnokülasyon:

- Dört adet ilaçlı MGIT tüpünün her birine (S,I,R,E) inokulum süspansiyonundan 0.5ml pipetleyin.
- 1/100'l k 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 °C'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.
- SM, 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 -70°C'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 supplementi ekleyin. 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:

SIRE 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 CLSI, 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 supplementi kullanılmaması yanlış sonuçlar verebilir. PZA AST setine MGIT 960 SIRE supplementi 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-Division of laboratory training and consultation laboratory program office. Public Health Service-Centers for Disease Control, Atlanta 1985: 159-182.
4. Gümürlü F, Ceyhan İ, Kocagöz T, Sönmez N. Tüberküloz laboratuvar rehberi.1.Baskı. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzıssıhha 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 seçenek 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 aşarca 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	İzoniazid (0.2 _g/ml)
	III	Streptomisin (2 _g/ml)
	IV	Rifampisin (1 _g/ml)
2	I	İlaçsız (kontrol)
	II	İzoniazid (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 seçenek 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 (%)
Izoniazid (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
Izoniazid	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.

E-posta: rector@qafqaz.edu.az

E-posta: ahmet.kizirgil@firat.edu.tr

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 dizilerinden (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/ μ l)	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 μ l hacimlerinde	
Muhtelif Eppendorf tüpleri: 0.2 ml (ince cidarlı), 0.5 ml, (thermal cycler'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 cycler	Birçok üretici var
Agaroz Jel Elektroforez Sistemi	Birçok üretici var
pH metre	Birçok üretici var
UV transilliminatör	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)'lerden 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 kırk 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) transilluminatör veya epiilluminatör 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 agarozu 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 transilliminatorde 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 sayısınca 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 Iaboratory 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.

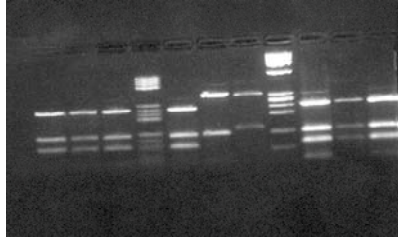
3. Durmaz R. Nükleik Asit Amplifikasyon Yöntemlerinde Sorunlar ve Standardizasyon. (2001). Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Durmaz R (Eds.) 2. Baskı. Kozan Ofset, Ankara, 45-56.
4. Sambrook J, Russell DW. (2001). Molecular Cloning A Laboratory Manual. Third edition. CSHL Press, New York, 5.1-5.17.
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.

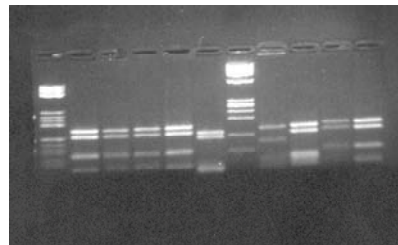
EK:

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 MIKROBAKTERILERIN İDENDİFİKASYON TABLOSU*

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

	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.hibermiae</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 LABORATUVAR TANISINDA KULLANILAN MOLEKÜLER TİCARİ TANI SİSTEMLERİ

Doç.Dr.Mustafa ÖZYURT

GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Servisi İstanbul

E-posta: ozyurtm2002@yahoo.com

Dünya genelinde mikobakteriyel enfeksiyonların insidansı, beklenenin aksine 1990'lardan beri önemli artış göstermektedir. Tüberküloz (TB), pandemik ve oldukça bulaşıcı bir hastalık olup yaklaşık 6.1 milyar dolayında olan dünya nüfusunun 1/3' ne yakın bir bölümü M.tuberculosis ile enfektedir. TB ile enfekte popülasyonun %1'lik bir bölümü her yıl taşıyıcı olarak ortaya çıkmakta ve bunların 7-8 milyonunda tüberküloz gelişmekte olup, önlenemez bir hastalık olmasına rağmen yaklaşık 2 milyon insan sadece TB'dan ölmektedir. TB olgularının %95'ten fazlasının geri kalmış ve gelişmekte olan ülkelerde görülmüş olması dikkat çekicidir. Dünya Sağlık Örgütü tahminlerine göre, hastalık kontrolü ile mücadele daha fazla etkinleştirilmezse 2000 ile 2020 yılları arasında yaklaşık 1 milyar insanın daha enfekte olabileceğini ve 35 milyon insanın TB'dan ölebileceği bildirilmiştir. Bu tablo göz önüne alındığında TB, dünyada önemini hergün arttırmakta olan ve halk sağlığını tehdit edebilen major tehlikelerden biri olma özelliğini günümüzde de devam ettirmektedir.

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 TB'un yayılımını önlemede ve kontrol altına alabilmede önemli bir role sahiptir.

Tüberkülozda ilk tanı klinik verilerle yapılmış olsa bile kesin tanı için etkenin direkt bakıda tespiti ve kültürde üretilerek tanımlanması esastır. Bu nedenle tanıda "gold standart" kültür ve klinik tanı birlikteliğidir. Mikroskopik incelemede aside dirençli basilin görülebilmesi için hasta örneğinde 5×10^3 - 5×10^4 /ml basil bulunması gerekmektedir. Kültür ile örnekte mevcut birkaç canlı bakterinin dahi gösterilebilmesi mümkün olmakla birlikte 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. Hastane infeksiyonlarının kontrolüne yönelik uygulamalarda, halk sağlığı ve hasta takibine yönelik mevcut sorunların çözümü amacıyla CDC (*Center for Disease Control and Prevention*) tarafından, tanısal mikobakteriyolojide mevcut en hızlı metodların kullanımı önerilmektedir.

Bu amaçla son 20-25 yıl içinde hasta örneklerinden ve kültür ortamlarından mikobakterilerin saptanması, tür düzeyinde tanımlanması ve duyarlılık testleri için, özgüllük ve duyarlılığı yüksek, güvenilir, hızlı sonuç verebilen ve kolay uygulanabilir yöntemler geliştirilmiş olup halen bu konudaki çalışmalar hızla devam etmektedir. Özellikle son 10 yıl içerisinde doğrudan hasta örneklerinden ve/veya kültür ortamından mikobakterilerin saptanması, tür düzeyinde tanımlanması ve antitüberküloz ilaç direncinin saptanmasına yönelik bir çok nükleik asit amplifikasyon (NAA) esaslı moleküler testler kullanıma sunulmuştur. Bunlar iki ana başlık altında incelenebilir.

I. Klinik örneklerden direkt olarak *Mycobacterium tuberculosis complex*'in tanımlanmasında kullanılan moleküler tanı testleri

Bu amaçla özellikle hasta örneklerinden tanımlamaya yönelik olarak; direkt bakısı pozitif solunum örneklerinde kullanımına FDA tarafından onay verilen, nükleik asit amplifikasyon temeline dayanan ticari moleküler sistemlerden Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu(PZR) esaslı Cobas AMPLICOR MTB (*Roche Diagnostic System*) testi ile Transkripsiyon esaslı amplifikasyon (TMA) yöntemi olan Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (AMTD,*Gen-Probe*) ve FDA onayı olmamakla birlikte diğer kuruluşlardan onay almış İzotermal Dizi Yer Değiştirme Amplifikasyonu (SDA) esaslı BD ProbeTecTMET MTB Direct Detection Test (*Becton Dickinson, Sparks, Md*) en yaygın olarak kullanımdaki ticari moleküler tanı sistemleridir. Benzer amaçla kullanımı gittikçe yaygınlık kazanmaya başlayan nükleik asit amplifikasyon esasına dayalı bir yöntem olan Real-Time PZR (LightCycler-Roche, iCycler- BioRad, *ABI 7700 – Applied Biosystem*) sistemleri ile uyumlu ticari kitlerle (COBAS TaqMan MTB Test-*Roche Diagnostic, fluorion MTBC QLP 2.1, Iontec*), DNA•STRIP[®] teknolojisi ile üretilen ve Nükleik asit dizi bazlı amplifikasyon (NASBA) tekniği esasına dayalı GenoType[®] Mycobacteria Direct test stripleri (Hain Lifescience, Germany) günümüz laboratuvarlarında hasta örneğinden TB tanısı için kullanılmaktadır.

Cobas Amplicor MTB Test (Roche Diagnostic Systems, Inc.. Branchburg, N.J.): Amplicor, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) temeline dayanan ancak PZR ürünlerinin elektroforez işlemi yapılmaksızın saptanabilmesi amacıyla geliştirilen

bir sistemdir. Bu yöntemde öncelikle *M.tuberculosis* 16S rRNA geninin çevresinde cinse özgül diziler bulunantüre özgül bir bölgeyi içeren 584 baz çiftlik bir kısım, biyotinle işaretli primerler kullanılarak amplifiye edilir, oluşan amplikonların denatürasyonunu takiben elde edilen tek zincirler, özgül oligonükleotid problarla hibridize edilir. Daha sonra ortama ilave edilen avidinle bağlı yabanturpu peroksidaz (Av-HRP) konjugatı, biyotinle işaretli amplikona bağlanır. Bağlanmış konjugat hidrojen peroksit varlığında 3,3' , 5,5' – tetrametil bezidin (TMB) ile reaksiyona girerek renkli bir kompleks oluşturur. Sonuçlar fotometreye ölçülerek değerlendirilir. Amplicor'da kontaminasyonu önlemek için urasil-N-glikozilaz (UNG) enzimi kullanılır. Bu sistemde ayrıca örneklerdeki inhibitör madde varlığı, Internal amplifikasyon kontrol (IAC) ile monitörize edilir. Cobas Amplicor örnek hazırlama dahil test işlem süresi yaklaşık 6 saat'tir. Bu işlemlerin tamamı, kapalı bir sistem olan Cobas Amplicor cihazında (Roche Diagnostics) gerçekleştirilir. **Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test** (Gen-Probe, San Diego California): Amplifiye örnekten doğrudan *M.tuberculosis*'i tanımlayan bir sistemdir. Bu sistemde, Transkripsiyon esasına dayalı amplifikasyon (TMA) ve Gen-Probe Hibridizasyon Protection Assay (HPA) tekniği birleştirilmiş olup amplifikasyon ve arama iki aşamalı olarak ard arda gerçekleşir. Hedef, mikobakterinin rRNA'sı olup test süresi yaklaşık 3.5 saattir.

Hazırlanan örneklerden sonikasyonla elde edilen mikobakteri hedef nükleik asidi (16S rRNA) izotermal olarak TMA yöntemi ile 42°C'de tek bir tüpte amplifiye edilir. Ribozomal RNA her mikobakteri hücresinde yaklaşık 2000 kopya olarak bulunur Bu yöntemde kendi kendine devam eden bir dizi kopyalama işlemi olur. Oluşan amplikonlar HPA aşamasında akridinyum esterle işaretli DNA probları ile birleşerek kararlı RNA:DNA hibridleri oluşturur. İşaretli RNA:DNA hibritleri luminometrede Bağlı Işık Birimi (Relative Light Unite-RLU) cinsinden ölçülür. İnhibitör varlığını araştırmak için sistemde internal amplifikasyon kontrol bulunmamaktadır. MTD için inhibitör testi, kuşkulu durumlarda veya gerektiğinde ekstrakte edilmiş balgamın içerisine yaklaşık 10-100 MTBC basili konularak test tekrarı ile yapılır. Negatif sonuç inhibitör varlığını gösterir.

BD ProbeTec™ET MTB Direct Detection Test (*Becton Dickinson, Sparks, Md*): BDProbe Tec ET sistemi, nükleik asit amplifikasyonu (NAA) esasına dayalı bir yöntem olan SDA (İzotermal Dizi Yer Değiştirme Amplifikasyonu) 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 önlenilmekte ayrıca kalite kontrol amaçlı pozitif ve negatif kontroller kullanılarak test sonuçlarının güvenilirliği artırılmaktadır. 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 kullanılabilir. Hasta örneğinden *M.tuberculosis complex*'in BDProbeTec ET sistemi ile saptanma süresi yaklaşık 3.5 saat'tir

GenoType® Mycobacteria Direct Test (Hain Lifescience, Nehren- Germany) : GenoType Mycobacteria line probları ; genellikle birden fazla türde ortak olan 23S rRNA parçalarıdır. Bu durumda tanımlama tek bir bantın özgüllüğüne değil, her bir türü karakterize eden çoklu bantların farklı kombinasyonlarının değerlendirilmesi temeline dayanır. Hasta örneklerinden direkt olarak çalışılmak üzere DNA strip teknolojisi ile üretilen bir testtir. Test süresi yaklaşık 4 saat olup hazırlanan hasta örneklerinden ekstrakte edilen mikobakteriye ait hedef rRNA, öncelikle izotermal olarak NASBA (Nükleik asit dizi bazlı amplifikasyon) yöntemi ile 41°C'de amplifiye edilir. (Thermalcycler ihtiyacı yoktur). Amplifikasyonu takiben Revers hibridizasyon reaksiyonu esasına göre üretilmiş striplerde hibridizasyon işlemi gerçekleştirilerek identifikasyon sağlanır. Yüksek özgüllüğe sahip olan bu test ile, klinik olarak önemli mikobakteri türlerinden; *M. tuberculosis complex*, *M. malmoense*, *M. avium*, *M. kansasii* ve *M. intracellulare* tanımlanabilmektedir.

Real-Time PZR MTB Assay (*LightCycler- Roche, iCycler - BIO-RAD, ABI 7700 – Applied Biosystem, Smart Cycler-Cepheid, TaqMan-Roche, RotorGene-Corbett*): Bu ticari sistemler, hasta örneğinde *M.tuberculosis complex* varlığını, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalinin ölçülmesi prensibi ile saptayabilen PZR esaslı sistemlerdir.

Saptama işlemi, yayılan ışımının sistemin optik parçası ile okunması temeline dayanır. Gerçek zamanlı PZR'ı oluşturan öğeler; Floresan boyaları uyaran ve onlardan yayılan ışımayı ölçen bir optik düzenek, alınan sinyalleri bir PC aracılığı

ile grafiğe dönüştüren ve yorumlayan bir yazılım ve bir thermal cyler'dan ibarettir. Ölçülen floresans PZR sırasında artan amplifikasyon ürününün miktarı ile orantılıdır. Sikluslar sırasında "reporter" boyaların yaydığı floresans sistem tarafından kaydedilerek bilgisayar ortamında değerlendirilir. Real time PZR ile reaksiyonda amplifiye olan nükleik asitlerin tespitinde kullanılabilecek çeşitli florojenik maddeler mevcuttur. Bunlar, amplikondaki belli bir dizi ile hibridize olan özgül oligonukleotid problemleri ile (TagMan veya hidroliz problemleri (5'nukleaz problemleri), Floresans Rezonans Enerji Transfer -FRET- Probu, Moleküler "beacon", Scorpion) veya amplifiye olan herhangi bir nükleik asidi tespit eden özgül olmayan moleküllerle (SYBR green I) olabilir. Real Time PZR ile elde edilen ürünlerdeki mutasyonlar çift sarmallı DNA'ya bağlanma özelliği gösteren boyalar (SYBR green, etidyum bromür v.b) veya özgül problemler yardımıyla saptanır. I Real-Time PZR tekniklerini geleneksel PZR tekniklerinden farklı kılan amplikon tespit yöntemi olup bunun en önemli avantajları testin hızı ve daha düşük bir kontaminasyon riskidir. Duyarlılığı yüksek olup pek çok örneğin aynı anda çalışabilme söz konusudur. PZR'nın kinetiği hakkında anında bilgi sağlar. Pahalı ekipman ve kimyasal ayıraç ile tecrübeli teknik personel gerekliliği belli başlı dezavantajlarını oluşturur. Real-Time PZR teknikleri M. tuberculosis suşlarına ve çok yakın bir sürede doğrudan klinik örneklerle de uygulanmaktadır. Sonuçlar genellikle DNA ekstraksiyonunu takiben ortalama 1.5-2.0 saat içinde elde edilir. Sonuç olarak, tekniği tam anlamıyla uygulayabilme kapasitesine sahip referans laboratuvarlarında ve TB hastalarının takibinin yapılabilirdiği ortamlarda Real-Time PZR uygulanabilmektedir. Bu sistemde, ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapıldığından agaroz jel elektroforezi ve DNA bantlarının görüntülenmesi gibi PZR sonrası analizlere gerek duyulmamaktadır. Bu amaçla hedefe (16S rRNA) özgül primer veya problemler kullanılır. Günümüzde, direkt bakışı pozitif hasta örnekleri ile kültür pozitif solunum örneklerinde *M.tuberculosis* complex'in varlığını ortaya koyabilmede ve diğer mikobakterilerden ayırımında geliştirilmiş en hızlı yöntem olup, geliştirilmiş NAA esaslı teknolojiler içinde ileriye yönelik iyi bir alternatif olduğu düşünülmektedir.

Tüberküloz tanısında kullanım alanı bulmuş çeşitli Real-Time PZR yöntemi mevcut olup bu yöntemle elde edilmiş ürünlerin saptanması SyberGreen boyası , özgül problemlerle (Fluorescence Resonance Energy Transfer:FRET, *flourion MTBC*, *Iontec*) veya TaqMan problemleri (*Cobas TaqMan MTB*, *Roche Diagnostic*) kullanarak gerçekleştirilebilir.

Moleküler Tanıda Kullanılan Ticari sistemlerin Kullanımlarına Yönelik Öneriler

Ticari sistemlerin en önemli avantajları, konvansiyonel tekniklere göre

daha hızlı sonuç verebilmeleri, emniyetli ve güvenilir olmasının yanısıra, kontaminasyon riskinin düşük, buna bağlı olarak duyarlılık ve özgüllüklerinin yüksek olmasıdır. Ayrıca bir çoğunun teknik olarak otomatize veya yarı otomatize olmaları, reaktif ve standartlarının kullanıma hazır olması laboratuvar kullanımlarını kolaylaştıran diğer faktörler olarak önemlidir.

En önemli dezavantajları ise pahalı olmaları, çoğunun henüz FDA onayı olmaması ve bir kısmında faz çalışmalarının tamamlanmamış olmasıdır. Bunun yanısıra, direkt bakısı negatif balgam örnekleri ile ekstrapulmoner örneklerde göreceli olarak duyarlılıklarının düşük olması, bazan ekstraksiyon işlemleri sırasında hedefin yetersiz ekstraksiyonu ile örneklerde bulunabilen nukleaz ve proteaz'ların amplifikasyonu inhibe ederek yalancı negatif sonuçlara neden olabilmeleri önemli sorunlardır. Tedavi alan hastalarda canlı ve ölü basil ayırımı yapamadığı için yanlış pozitif sonuçlar verebilmesi nedeniyle 7 günden fazla antitüberküloz tedavisi gören hastalar ile tedavileri tamamlanmış olanlarda bitimi takiben 2 ay sonrasına kadar bu testlerin uygulanmasının önerilmeyişi ve tüberküloz dışı mikobakterilerin saptanamayışı bu testlerin diğer önemli dezavantajlarıdır.

Bu nedenle nükleik asit amplifikasyon esaslı testlerin özellikle tüberküloz olma olasılığı çok yüksek ve çok düşük olanlarda kullanımı konusu, kaynakların maliyet etkin olarak kullanılması için pek önerilmemektedir. Ancak, bu yöntemlerin özellikle direkt bakısı negatif olmasına rağmen klinisyen tarafından TB olma olasılığı yüksek şüpheli hastaların, özellikle solunum örneklerinde, tanısal amaçla kullanımı konusu oldukça değerlidir. Bu testlerin özellikle Amerikan Toraks Cemiyeti'nin sınıf 2 ve 3 standartlarını yakalayan, konvansiyonel yöntemlerin kullanımında yüksek standartlara sahip, sağlık kurum laboratuvarlarında kullanımı konusu genel olarak kabul gören bir yaklaşımdır. Bu nedenle bu sistemlere ait mevcut ticari ürünlerin tarama testi olarak kullanılmamaları gerekir.

Center for Disease Control and Prevention (CDC), 2000 yılında FDA onayı almış NAA esaslı ticari moleküler sistemlerin kullanıldığı laboratuvarlarda tanıya yönelik yararlanmak üzere yeni bir algoritma rehberi hazırlamıştır. Buna göre, Ehrlich Ziehl Neelsen (EZN) boyaması ile direkt mikroskopi ve mikobakteri kültürü için hastalardan üç ayrı günde üç balgam örneği alınmalıdır. İlk örnekte direkt bakıda asit fast bakteri (AFB) ve NAA test sonuçları pozitif ise; hastanın tüberkülozlu olduğu kabul edilir, test tekrarına gerek yoktur. Eğer ilk balgam AFB pozitif, ancak NAA test sonucu negatif ise; örnekte inhibitör varlığı araştırılmalıdır. Araştırma sonucu herhangi bir inhibitör madde tesbit edilemez ise; ikinci bir balgam örneği ile NAA test tekrarı yapılmalıdır. İkinci balgamda da AFB pozitif,

NAA test sonucu negatif bulunup herhangi inhibitör madde saptanmaz ise; hastanın muhtemel olarak MOTT basili ile infekte olduğu kabul edilir. Eğer inhibitör varlığı tespit edilmiş ise bu durumda NAA test sonucunun tanı değeri yoktur. Böyle bir durumda ikinci balgam örneğinde NAA test işlemi tekrarlanmalıdır (*Test tekrarının üçten fazla yapılmasının yararı yoktur*).

Üç Ayrı Ticari Sistemin Performanslarının Değerlendirilmesi:

Bu sistemlerin direkt bakısı pozitif örneklerdeki duyarlılığı, %95-96; özgüllüğü %100 olmasına karşın direkt bakısı negatif solunum örneklerinde Amplikor, AMTD ve MTB Direct testleri için duyarlılık oranları sırasıyla, % 50-71.7; %75-83 ve %33-100 arasında değişkenlik göstermekle birlikte genel olarak özgüllükleri %96-99 arasında değişiklik göstermektedir.

Direkt bakısı ve kültür pozitifliği olan ekstrapulmoner örneklerdeki duyarlılık performansları ise Amplikor için % 87.5-100, AMTD için %92.3-100 ve MTB Direct için % 90-98.5 arasında değişmekle birlikte, direkt bakısı ve kültür negatif olan ekstrapulmoner örneklerdeki oranlar ise, sırasıyla; %17.2-70.8; %63.6-88.9; %40.3-85.7 olarak saptanmıştır. Bu üç sistem içerisinde AMTD'nin internal amplifikasyon kontrolünün olmayışı, MTB Direct için örnek hazırlama işlemlerinin emek yoğun olması önemli dezavantajları olarak değerlendirilmektedir.

II. Kültürde üretilen mikobakterilerin identifikasyonu ve TB ilaç direnci ile ilgili mutasyonların saptanmasına yönelik moleküler tanı testleri

Bu amaçla, günümüzde klasik PZR ve RFLP yöntemlerinin yanısıra piyasada mevcut bulunan DNA prob hibridizasyon esaslı ürünler, DNA dizi analiz kitleri ile DNA microarray teknolojisi ürünleri mikobakterilerin laboratuvar tanılarına hız kazandırmıştır. Mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanmasında genellikle hsp65 geni, 16S rRNA geni ve 16S-23S rRNA ITS gen bölgesi ile ilaç direnci ile ilgili mutasyonların saptanmasında rpoB gen bölgesini hedef alan dizi analizleri kullanılır.

Günümüzde epidemiyolojik çalışmalar ile katı veya sıvı kültür ortamlarında sıklıkla üreyen *M.tuberculosis complex*, *M.avium complex*, *M.kansasii*, *M.gordona* gibi mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanmaları için mikobakterilerin rRNA'sı ile hibridize olan özgül DNA problemleri geliştirilmiştir. Prob teknolojisi ile mikobakterilerin tür düzeyinde tanısı için en sık kullanılan ürünler arasında; AccuProbe (*Gen-Probe*) ile INNO-LiPA Mycobacteria v2 ; (*Inno-Genetics NV, Ghent, Belgium*) ve GenoType® MTBC / CM / AS (Hain Lifescience, Nehren-Germany) yer alır. Test süresi, AccuProbe ile 1-2 saat, Line Probe Assay ile yaklaşık 3 saatlik bir periyottur.

DNA microarray ve DNA dizileme analizleri de mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanması ve antibiyotik direnci ile ilgili mutasyonların saptanmasında kullanılan yöntemlerdir.

DNA microarray (NanoChip Electronic Microarray, Nanogen), mikobakteriden PZR ile elde edilen amplikonların, çok sayıda farklı oligonukleotid prob içeren minyatür analitik araçlar üzerinde (*DNA chipleri'nde*) kendine uyan prob ile hibridize olması sonrasında ortama yayılan floresan sinyallerin bir tarayıcı tarafından saptanmasıyla gerçekleşir. Testin ortalama sonuçlanma süresi yaklaşık 4 saattir.

Mikobakterilerin idantifikasyonunda altın standart olarak düşünülen DNA dizileme analizi en yüksek seviyede doğru sonuç veren güvenilir bir yöntem olmasına rağmen, manuel dizileme işleminin zorluğu ve deneyim gerektirmesi, otomatize sekans cihazlarının (ABI PRISM 310 Genetic analyzer , *Perkin-Elmer/Applied Biosystems, Toster city, California*) pahalı olması kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Bu amaçla ticari olarak geliştirilen MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Sequencing Kit (*PE Applied Biosystems*) kullanılarak 16S rRNA geninin 500 bp lik bir bölümüne ait DNA dizilemesi yapılabilmektedir. Bu yöntem ile *M.tuberculosis'* in diğer MTBC üyelerinden ayrımı mümkün olabilmekle birlikte sıkça izole edilen bazı mikobakteri türleride tanımlanabilmektedir.

İlaç direncini saptama amacıyla, revers hibridizasyon esasına dayalı, DNA strip teknolojisi (LİPA) ile hazırlanan ticari ürünler arasında INNO-LİPA Rif TB (*Inno-Genetics NV, Ghent, Belgium*) ve GenoType® MTBDR (*Hain Lifescience GmbH, Germany*) yer alır. Bu ürünler, nitrosellülöz membran üzerinde dirençten sorumlu gen bölgesine ait duyarlı ve mutant dizileri içeren probler ihtiva ederler. Direnç geni araştırılacak izolat için PZR ile çoğaltma işlemini takiben dirençten sorumlu gen bölgelerine ait DNA molekülleri bu probler ile hibridizasyona bırakıldığında mutant dizilere bağlanması durumunda dirençli olarak yorumlanmaktadır. Test süresi yaklaşık 3-4 saat kadardır. Araştırmalarda INNO-LİPA Rif TB sonuçları, fenotipik duyarlılık test sonuçlarıyla %90 uyumlu bulunmuştur. Ayrıca Rifampin direncinin saptanmasında kullanılan real-time PZR yönteminin diğer bir uygulama şeklinde "molecular beacon" olarak adlandırılan yeni hibridizasyon problarından yararlanılmaktadır. Bu yöntemin duyarlılığı %97 ve özgüllüğü %100 bulunmuş olup direkt bakısı pozitif örneklere doğrudan uygulanabileceği gösterilmiştir.

Nükleik asit çoğaltma yöntemlerine ait değerlendirmeler

Çoğaltma yöntemleri, tüm dünyada yaygın olarak kullanılmalarına karşın klinik mikobakteriyolojide devrim yaratabilmiş değildir. Mikroskopik inceleme ile desteklenmiş kültür altın standart olmaya devam etmektedir. Moleküler yöntemler bazı olgularda tüberkülozun hızlı tanısında değerlidir. Çoğaltmaya dayalı yöntemlerin kullanımına yönelik kısıtlamaların en önemli nedeni duyarlılık düzeylerinin tatmin edici olmamasıdır. Bakterilerin yoğun olmadığı örneklerde moleküler çoğaltma yöntemleri ile saptama şansıda düşüktür. Duyarlılığın düşük olmasına neden olan başlıca etmenler arasında bakterilerin örneklerde homojen dağılımının olmaması, etkin olmayan nükleik asit saflaştırma yöntemlerinin kullanılması ve bazen de örnekte inhibitör varlığıdır. Tartışmasız bir şekilde fenol kloroform ile saflaştırma en iyi verimi sağlamasına karşılık, zaman alıcı ve karmaşık olması, bulaş riskini de yükseltmektedir. Bir çoğaltma yöntemi seçilirken, bir iç (internal) kontrolün da kullanılması, dikkate alınması gereken çok önemli bir noktadır. Çoğaltma yöntemlerinin özgüllüğü genelde iyi olmakla birlikte yalnızca pozitiflik olasılığı hem mikrobiyologlar hem de klinisyenler tarafından gözardı edilmemelidir. Tüberkülozda olduğu gibi, uzun ve sıkça yan etkileri görülen bir tedaviye sadece pozitif bir nükleik asit çoğaltma testi sonucuna bakarak başlanmamalıdır. Yalnızca pozitif sonucun en büyük nedeni bazen preanalitik, ama daha çok analitik aşamada örneğin kontaminasyonudur. Çalışma ortamının sık sık %10'luk çamaşır suyu ile silinmesi ve çalışma yapılmadığı sırada pipetlerin, pipet uçlarının ve çalışma yüzeylerinin ultraviyole ışığına tutulması gibi uygulamaların yapılması önemli olmakla birlikte uygulayıcıların eğitimi de kontaminasyonun engellenmesinde önemli rol oynamaktadır.

Farklı çoğaltma yöntemlerini değerlendiren çok sayıda ve doğrudan karşılaştırma yapan az sayıda çalışmanın hiçbiri ikna edici bir şekilde birinin diğerine üstünlüğünü göstermemiştir. Tümü, iyi özgüllük ancak yetersiz duyarlılık niteliğindedir.

Bu kursta, *Fluorion* MTBC QLP 2.1 tanı kiti (*iontek*) kullanılarak nükleik asit amplifikasyon prensibine dayalı bir PZR teknolojisi olan Real Time PZR (*iCycler iQ Real-Time Saptama Sistemleri, BioRad*) sistemi ile doğrudan solunum örneklerinden *Mycobacterium tuberculosis complex*'in saptanması konusunda uygulamalı eğitimi verilecek ve sistem tanıtılacaktır.

MOLEKÜLER TANIDA TİCARİ SİSTEMLER

Fluorion MTBC QLP 2.1 Test Kiti (*iontek*) kullanarak

Real Time PZR sistemi (iCycler iQ , BioRad) ile *M. tuberculosis complex arama*

Doç.Dr.Mustafa ÖZYURT

(UYGULAMALI KURS NOTLARI)



Mycobacterium tuberculosis (MTBC) Testi, otomatize Real-Time PZR cihazında (iCycler iQ, BioRad) in vitro olarak gerçekleştirilen kalitatif bir testtir. Test işleminde, özellikle homojenizasyon, dekontaminasyon ve yoğunlaştırma işlemleri yapılmış şüpheli balgam, bronşial fırçalama, bronkoalveolar lavaj (BAL) ve diğer solunum örneklerinin kullanımı önerilir.

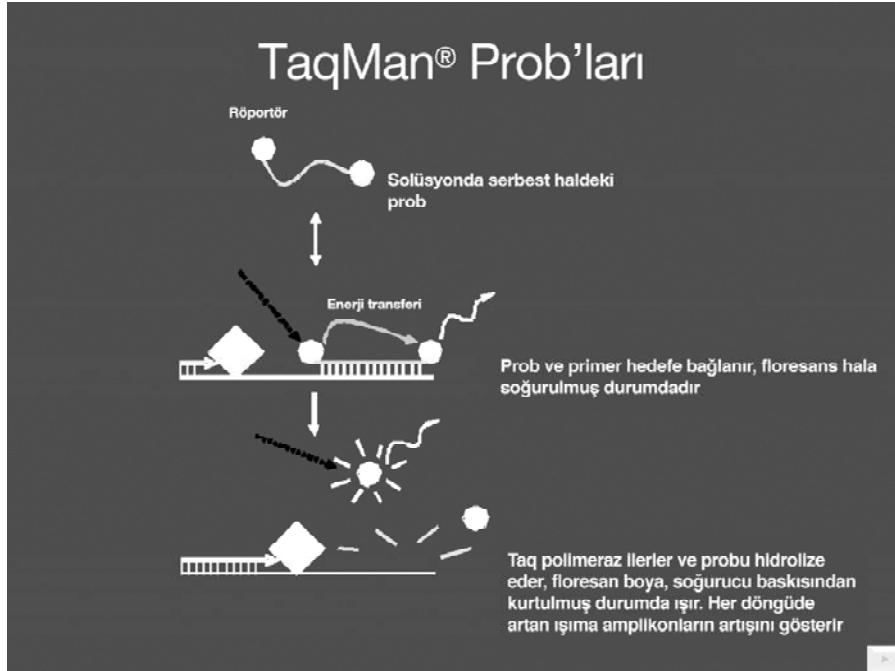
TEST İŞLEMİNİN PRENSİBİ

Cobas Amplicor MTB Testi ile tüm mikobakteri türlerinde ortak olarak bulunan ve yaklaşık olarak 1500 nükleotid'ten oluşan 16S rRNA gen bölgesine ait 584 nükleotid'lik bir parça dört aşamalı bir işlemlerle saptanır. Bunlar; örneklerin hazırlanması; biyotinle işaretli primerler (KY18 ve KY 75) kullanılarak hedef DNA'nın PZR ile çoğaltılması (amplifikasyonu) ; oluşan DNA ampliconlarının *M. tuberculosis complex*'e spesifik oligonükleotid problemleri ile hibridizasyonu; ve prob-bağlı ampliconların kolorometrik olarak saptanması aşamalarıdır. Özellikle smear pozitif solunum örneklerinde tanısal amaçla kullanılmak üzere FDA onayı almış olan testte, internal amplifikasyon kontrolü bulunmakta ve carry-over kontaminasyonu engellemek amacıyla Urasil-N-glikozilaz ve deoksi üridin trifosfat ile düzenlemeler yapılmıştır.

1. Örnek Hazırlama: Ekspektore veya indüklenmiş balgam, açlık mide suyu, BAL, transtrakeal aspirasyon (TTA), bronşiyal fırçalama ve laringeal sürüntü örnekleri pulmoner örnekler olarak kabul edilir. Bu örnekler lökosit, eritrosit, vücut sıvıları ve doku gibi organik kalıntılardan arındırmak amaçlı homojenizasyon/dekontaminasyon ve örnekteki bakteri yoğunluğunu arttırmak için konsantrasyon işlemi uygulanır. Bu amaçla en sık N-Asetil- L-Sistein (NALC) + Sodyum Hidroksit (NaOH), NaOH (%3-4) veya Sodyum dodesil sülfat (SDS)+NaOH

TEST İŞLEMİNİN PRENSİBİ

Real Time PZR (Gerçek zamanlı PZR) sistemi , floresan boyaları uyaran ve onlardan yayılan ışığı ölçen bir optik düzenek, alınan sinyalleri bir bilgisayar aracılığı ile grafiğe dönüştüren ve yorumlayan bir yazılım ve bir thermal cycler öğelerinden oluşur. Bu sistem ile uyumlu tanı kitlerinden biri olan Fluorion MTBC QLP 2.1 Real-Time PZR kiti, nükleik çoğaltma yöntemlerinden biri olan Real-Time PZR esasına dayanır. Patojen, oligonükleotid problemler üzerine yerleştirilmiş floresan boyalar aracılığı ile saptanır. Test, PZR'ın primer uzatma aşaması sırasında, çifte işaretli bir floresan probu parçalamak için Taq Polimeraz'ın 5' ekzonükleaz aktivitesinden yararlanır. Prob,5' ucundan floresan bir röportör molekül ile, 3'ucundan ise röportörü baskılayan ve "quencher" olarak adlandırılan başka bir floresan molekül ile işaretlenmiştir. Röportör, iki florofor birbirine yakınken ışıkla uyarıldığında floresan sinyal yayamaz. PZR'ın primer uzatma aşaması sırasında, Taq polimeraz DNA kalıbına bağlı bulunan proba karşılaşıp onu parçalar. Röportör, quencher'in baskılayıcı etkisinden kurtulur ve floresan sinyal oluşturur. Reaksiyonun her döngüsünde, oluşan PZR ürünü floresans düzeyinin artışı aracılığı ile hassas bir biçimde saptanır. Röportör tarafından yayılan floresans, PZR ürünü biriktikçe artar (Şekil-1).



Şekil-1: TaqMan problemleri ile MTBC saptamada floresan sinyalin oluşum mekanizması

Sinyalin arka plan seviyesinin üzerine çıktığı ve ayırtedilebilir hale geldiği noktaya eşik döngüsü (threshold cycle: C_T) adı verilir. Bir DNA kalıbının log başlangıç miktarı ile eşik döngüsü arasında lineer bir ilişki vardır, bu yüzden miktarı bilinmeyen kalıpların başlangıç miktarları, başlangıç miktarı bilinen hedef kalıpların C_t değerleri kullanılarak oluşturulan standart eğriler aracılığı ile belirlenebilir.

Fluorion MTBC QLP 2.1 Real Time PZR Kiti

M.tuberculosis DNA'sını saptamada kullanılan kitin analitik duyarlılığı 8.08×10^2 kopya/ml'dir. *M.tuberculosis* genomunun insertion sequence (IS) dizisi üzerinde 105 bp'lik bir bölüm diziye özgü primerler kullanılarak çoğaltılır ve saptama FAM filtre çifti kullanılarak gerçekleştirilir. PZR inhibisyonunu kontrol etmek için sisteme bir internal kontrol eklenmiştir. Internal kontrol veri toplama aşamasında Cy5 ile görüntülenir. Internal kontrol PZR reaksiyon karışımına eklenir.

Kit İçeriği ve Özellikleri

a. dH₂O (PZR Grade)

Distile su, PZR için uygun olarak hazırlanmış, DNase –RNase 'dan arınmış haldedir.

b. MTBC QLP 2.1 Probe PZR Mix (X100)

1) *HotStar Taq DNA Polimerazı: Thermus aquaticus*'tan izole edilmiş, E.coli'ye klonlanmış 94kDa'luk rekombinant DNA polimerazın modifiye edilmiş bir formudur. Enzim inaktif bir formda verilir ve 95 °C'de 15 dakikalık bir inkübasyon sonrası aktif hale gelir. Bu özelliği sayesinde hatalı bağlanan primerlerin ya da primer-dimerlerin önüne geçilir ve daha yüksek PZR spesifitesi ve kantitasyon hassasiyeti sağlanır.

2) *QuantiTect Probe PZR Tamponu*: Tris-Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄.8mM MgCl₂ içerir. 20°C'de pH 8.7'dir.

3) dNTP Karışımı: Ultrasaf dATP, dGTP, dCTP ve dTTP/dUTP içerir.

c. MTBC QLP 2.1 Deteksiyon Mix 1 (X100)

Deteksiyon mix 1, *M.tuberculosis* genomuna özgü forward ve reverse primerler (0.8µM) ve iki ucu işaretli prob (0.24µM) içerir

d. MTBC QLP 2.1 Deteksiyon Mix 2 (X100)

Deteksiyon mix 2, internal kontrole özgü forward ve reverse primerler (0.076µM) ve iki ucu işaretli prob (0.14µM) içerir.

e. MTBC QLP 2.1 İnternal kontrol (X100)

PZR inhibisyonunu kontrol etmek amacıyla, kitin içine bir internal kontrol dahil edilmiştir. İnternal kontrol, insan genomundan elde edilmiş sentetik bir DNA

molekölüdür. PZR hazırlanırken master mix'e her reaksiyon başına 0.3 µl internal kontrol eklenmelidir. Real-time PZR sonrasında internal kontrolün kabul edilebilir Ct değeri (eşik döngüsü) 32±3 olmalıdır. Daha yüksek Ct değeri PZR inhibisyonuna işaret eder. Bu durumda, DNA izolasyonu ve PZR işlemi tekrar edilmelidir. Yüksek bakteriyel yüke sahip örneklerde, internal kontrol baskılanabilir ve floresan sinyal artışı görülmez. Internal kontrol verilerinin yorumu Tablo'da verilmiştir.

Mtbc (FAM)	İnternal Kontrol (Cy5)	Yorumu
+	+	Örnek MTBC pozitif
+	-	Örnek MTBC pozitif
-	+	Örnek MTBC negatif
-	-	Test tekrarı gerekir

f. MTBC QLP 2.1 Pozitif kontrol (X100)

Pozitif Kontrol MTBC DNA'sı içermektedir. Reaksiyon verimini test etmek amacıyla PZR'a dahil edilebilir. Pozitif kontrolün Ct değeri (eşik döngüsü) 32±3 olmalıdır. Eşik değerinin daha yüksek olması reaksiyonda verim kaybı olduğuna işaret edebilir.

Çalışma sonuçları kabul edilebilir kriterlere uymadığı, ürünün performansında bir bozukluk saptanması durumunda test sonuçları rapor edilmemeli, test tekrarlanmalıdır.

Kit İçeriğinin Saklama Koşulları :

dH₂O (PZR Grade) hariç, Fluorion MTBC QLP 2.1 Real-Time PZR kiti bileşenlerinin tümü -20°C'ta saklanmalıdır. Kitin hassasiyetini azaltabileceği için bileşenleri 3 kezden fazla dondurup çözdürmekten kaçınılmalıdır. İdeal olarak bileşenler küçük miktarlarda bölümlenerek dondurulup saklanır. Bileşenler oda sıcaklığında 10-15 dakikadan fazla bekletilmez. Özellikle Detection Mix bileşenleri floresan boya içerdiğinden 1-2 dakikadan fazla ışığa maruz bırakılmamalıdır.

Kitle Birlikte Verilmeyen, Kullanıcının Sağlaması Gerekli Ekipman Ve Malzemeler

- iCycler Real Time PZR cihazı ve yazılımı (BioRad iQ Serisi)
- iCycler için 96 kuyucuklu 0.2 ml ince çeperli PZR pleyt'ler (BioRad)
- iCycler için optik kalitede yapıştırma bandı (BioRad)

- d. QIAamp DNA Mini Kiti (Qiagen)
- e. Class II Biyoemniyet kabini
- f. Derin dondurucu (-20 °C)
- g. Soğuk blok (buz aküsü)
- h. Vortex
- i. Tüp taşıyıcı
- j. 0.2-2 ml.'lik ependorf tüpleri için rotorlu tezgah üstü santrifüj
- k. Ayarlanabilir (10µl, 100µl ve 1000 µl 'lik) mikropipetler
- l. Steril, filtreli mikropipet uçları (DNA'se ve RNA'se dan arındırılmış)
- m. Steril 1.5 veya 2 ml. mikrosantrifüj tüpleri
- n. Disposabl eldiven

TEST PROSEDÜRÜ

Örnek Hazırlama: Ekspektore veya indüklenmiş balgam, açlık mide suyu, BAL , transtrakeal aspirasyon (TTA), bronşiyal fırçalama ve laringeal sürüntü örnekleri pulmoner örnekler olarak kabul edilir. Bu örnekler lökosit, eritrosit, vücut sıvıları ve doku gibi organik kalıntılardan arındırmak amaçlı

homojenizasyon/dekontaminasyon ve örnekteki bakteri yoğunluğunu arttırmak için konsantrasyon işlemi uygulanır. Bu amaçla en sık N-Asetil- L-Sistein (NALC) + Sodyum Hidroksit (NaOH), NaOH (%3-4) veya Sodyum dodesil sülfat (SDS)+NaOH yöntemlerinden biri kullanılır. Bu aşamayı takiben hazırlanan örneklerden DNA izolasyonuna geçilir. Çalışılmakta olan örnekleri -70°C 'ta 6 ay veya 2-8 °C 'ta 4 güne kadar muhafaza etmek mümkün olmakla birlikte dekontamine edilmiş örnekler -70 °C 'ta 8 ay kadar saklanabilir.

DNA izolasyonu: DNA izolasyonu için QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) önerilmektedir. Çok sayıda örneğin aynı anda çalışılması için ideal olan QIAamp spin prosedürü ile doğrudan amplifikasyon reaksiyonuna hazır halde saf DNA elde edilmesini sağlar. DNA izolasyonu, kit üreticisinin talimatları doğrultusunda yapılmalıdır. Elde edilen DNA, PZR reaksiyonlarına eklenmeye hazır halde, Buffer AE içine geri alınır (elüsyon). Alternatif olarak daha sonra kullanılmak üzere -20° C'de güvenle saklanabilir.

DNA İzolasyon Kit İçeriği:

Kit içeriği (QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) 50 test'lik), aşağıdaki sarf malzemelerinden oluşur ve oda ısısında (15-25 °C) saklanır.

- 1) QIA Amp Spin Kolon (50 adet)
- 2) Toplama tüpleri, 2ml (150 adet)
- 3) Buffer AL (Lysis buffer) 12 ml : Tahriş edici kaotropik tuz olan Guanidin hidroklorit içerir. Kullanım sırasında, eldiven kullanımı ve laboratuvar güvenlik önlemleri gerektirir. Kullanım öncesi iyice çalkalanır. Oda sıcaklığında 1 yıl boyunca aktivitesini sürdürür.
- 4) Buffer ATL (Tissue Lysis buffer) 10 ml: Örnekte bulunan hücrelerin 1. basamak lizis (parçalama) işlemi için kullanılır.
- 5) Buffer AW1(Konsantre Wash buffer 1) 19 ml : Tahriş edici ve zararlı bir kaotropik tuz olan Guanidin hidroklorit içerir. Kullanım sırasında, eldiven kullanımı ve laboratuvar güvenlik önlemleri gerektirir. Konsantre halde olan AW1'e ilk kullanım öncesi şişe üzerinde belirtilen miktarda (25 ml) Etil alkol (%96-100'lük) ilave edilir.
- 6) Buffer AW2 (Konsantre, Wash buffer 2) 13 ml : Koruyucu olarak sodyum azid içerir. Kullanım sırasında, eldiven kullanımı ve laboratuvar güvenlik önlemleri gerektirir. Konsantre halde olan AW 2'e ilk kullanım öncesi şişe üzerinde belirtilen miktarda (30 ml) Etil alkol (%96-100'lük) ilave edilir.
- 7) Buffer AE (Elution buffer) (22 ml) : Saflaştırılan DNA'nın saklanması için kullanılır ve DNA -20 °C'de saklanmalıdır.
- 8) Proteinase K (1.25 ml) : Hassasiyet yaratıcı, tahriş edicidir. Kullanım sırasında, eldiven kullanımı ve laboratuvar güvenlik önlemleri gerektirir

Kullanıcının Sağlaması Gerekli Ekipman Ve Malzemeler

- a. Etanol (%96-100)
- b. 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri (ependorf tüpler)
- c. Ayarlanabilir (10µl, 100µl ve 1000 µl 'lik) mikropipetler
- d. Steril, filtreli mikropipet uçları (DNA'se ve RNA'se dan arındırılmış)
- e. Soğutmalı santrifüj (2 ml tüpler için rotoru bulunan)
- f. Ayarlanabilir Isı bloğu (56-70 °C) veya su banyosu
- g. Tüp taşıyıcı
- h. Vorteks
- i. Laboratuvar saati

Hastaya Ait Solunum Örneğinden MTBC DNA izolasyonu

1. Dekontaminasyon ve konsantrasyon işlemi tamamlanmış hasta örnekleri,

daha önceden etiketlenerek hazır hale getirilmiş 1.5 ml'lik ependorf tüplerine 200'er µl olarak pipetlenir

2. Üzerine 180 µl ATL buffer eklenir. Kısa süreli (7-10 saniye) vortekslenerek homojenize edilir ve ardından 1000 rpm' i geçmiyecek şekilde kısa santrifüjleme yapılır.

3. Üzerine 20 µl Proteinaz K eklenir. Kısa süreli (7-10 saniye) vortekslenerek homojenize edilir ve ardından 1000 rpm' i geçmiyecek şekilde kısa santrifüjleme yapılır.

4. Isı bloğu veya su banyosunda 56 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılır.

5. 1000 rpm' i geçmiyecek şekilde kısa santrifüjleme yapılır.

6. Üzerine 200 µl AL buffer (Lysis buffer) pipetlenir. Kısa süreli (7-10 saniye) vortekslenerek homojenize edilir.

7. Isı bloğu veya su banyosunda 70 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakılır.

8. 1000 rpm' i geçmiyecek şekilde kısa santrifüjleme yapılır ve üzerine 200 µl etanol (%96-100'lük) pipetlenerek 15 saniye vortekslenir.

9. Kısa santrifüjleme yapılarak ependorf tüpündeki tüm karışım spin kolonlara aktarılır.

10. Spin kolon 8000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenir.

11. Filtrat atılır ve spin kolon yeni bir toplama tüpüne aktarılır.

12. Üzerine 500 µl AW1 buffer pipetlenir ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenir.

13. Filtrat atılır ve spin kolon yeni bir toplama tüpüne aktarılır.

14. Üzerine 500 µl AW2 buffer pipetlenir ve 14000 rpm'de 3 dakika santrifüjlenir

15. Filtrat atılır ve spin kolon yeni bir ependorfa aktarılır.

16. Spine 200 µl AE buffer pipetlenir ve 5 dakika oda ısısında inkübe edilir.

17. Takiben 8000 rpm'de 1 dakika santrifüjleme işlemi yapılır.

18. Filtrat'daki örnek DNA'sı, amplifikasyon işlemi için kullanıma hazırdır.

3. PZR Amplifikasyonu

a) PZR Öncesi Hazırlık (Master mix hazırlama):

1. Tüm kit bileşenleri kullanım öncesi çözdürülür ve Class II Biyoemniyet kabini içerisinde her bir hasta için aşağıdaki tabloya uygun olarak reaksiyon karışımı (master mix) hazırlanır.

Probe PZR Mix	12.5 ml
Detection Mix 1	1.4 ml
Detection Mix 2	1.4 ml
İnternal Kontrol	0.3 ml
dH ₂ O	7.4 ml
Örnek DNA	2.0 ml
Pozitif Kontrol	
Negatif Kontrol	
Toplam Hacim	25.0 ml

2. Belirtilen miktarlar test sayısı (*hasta örneği/pozitif kontrol / negatif kontrol toplam sayısının bir fazlası kadar*) ile çarpılarak çalışma için yeterli total hacim hesaplanır ve 1.5 ml'lik ependorf'a pipetlenir. Bu işlem sırasında genellikle büyük hacimden küçük hacime doğru pipetlemek daha uygundur.
 3. Bu karışım pipetle veya vorteksle homojenize edilir ve kısa süreli santrifüjlenir.
 4. Her test için total 23 µl master mix, 96 kuyucuklu pleyt'in kuyucuklarına hava kabarcığı oluşturmadan pipetlenir.
 5. Aynı uygulama pozitif (*MTBC DNA'sı*) ve negatif (*steril dH₂O*) kontrol için de yapılır.
 6. Daha önceden hasta ve kontroller için işaretlenmiş kuyucuklara 2'şer µl DNA (*örnek/pozitif kontrol/negatif kontrol*) pipetlenir. Bu amaçla önceden iCycler IQ multicolor Real-Time PZR Detection System (BioRad) cihazında pipetlemelerin daha önceden tanımlanmış olan kuyucuklara yapılmasına dikkat edilmelidir.
 7. Kuyucuklardaki toplam hacim 25 µl olmalıdır.
 8. Pleyt üzerine dikkatlice yapıştırılan yapışkanlı filmin (optik bantın), kuyucuklar üzerinde hiçbir boşluk bırakmaksızın pleyte sıkıca yapıştığından ve her kuyucuktaki solusyonun kuyucuğun dibinde olduğundan ve kuyucukta hava kabarcığı olmadığından emin olunmalıdır.
 8. Pleyt, cihazın klitli raylı bölümünde (Real-Time Modülünde) yer alan blok üzerine örneklerin tanımlandığı yerlere dikkatli bir şekilde yerleştirilir ve kapak kapatılır.
- b) iCycler IQ cihazının Programlanması :
- Daha önceden belirlenen ve cihaza yüklenen Fluorion MTBC QLP 2.1 Real-Time

PZR kiti termal protokolü çalışma için seçilir. Aşağıdaki tabloda ısı ve süreleri ile döngü sayıları verilmiş olan bu protokol, HotStar Taq DNA Polimerazın aktivasyonu için; bir ilk denatürasyon, iki aşamalı amplifikasyon döngüleri ve son bir inkübasyon aşamalarından oluşur. Real-Time PZR verileri, amplifikasyon döngüsünün ikinci aşamasında toplanır.

İlk denatürasyon	95°C	13:30 dakika	50 döngü
Amplifikasyon	95°C	00:30 dakika	
Veri Toplama	58°C	01:30 dakika	
Sonsuz inkübasyon	22°C	∞	

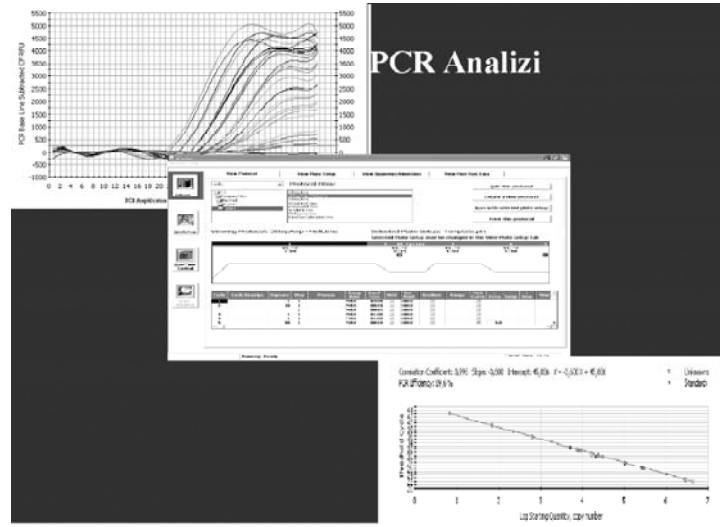
1. Daha önceden hazırlanmış olan çalışma protokolünü seçmek için , cihazın "Library" modülündeki "View Protocol" sayfasındaki "Protocol files" penceresinden "MtbQLP.tmo" Termal protokolü seçilir.
2. Örnek, standart, pozitif kontrol ve negatif kontrol içeren kuyucukları tanımlamak için ; "View plate setup" sayfasının "Pleyt setup files" penceresinde yer alan önceki bir çalışma seçilir ve "Edit Plate Setup" tıklanarak çalışma peyt görüntüsü ve çalışma ile ilgili şablon semboller ekrana getirilir. Görüntüdeki eski çalışmaya ait tanımlanmış semboller silinerek yeni çalışma için uygun semboller seçilir. Ardından çalışma pleyti üzerindeki uygun kuyucuk tıklanıp " sample identifier" bölümüne kuyucuk kodlaması yapılarak tanımlamalar gerçekleştirilir.
3. Daha sonra floresan boyaları seçmek için, "Select and Load Fluorophores" ekranında her kuyucuk için hem FAM-490 (örnek DNA'sı için) hemde Cy5-635 (internal kontrol için) boyaları işaretlenir.
4. Pleyt yerleşimi tamamlandıktan sonra "Plate setup filename" penceresinden çalışmaya bir dosya adı (tercihan çalışma tarihi ve test adı) verilir ve " save this setup" tıklanarak dosya kaydedilir.
5. Takiben ilgili protokolü çalıştırmak için "Run with selected protokol" düğmesi tıklanarak " Run Prep" ekranına geçiş sağlanır.
6. Bu ekranda örnek hacmi bölümüne total volüm 25 µl olarak tanımlanır.
7. Seçilen protokol ve dosya adının doğruluğu teyid edilerek "Begin Run" düğmesine tıklanarak çalışma başlatılır.

Çalışma sonrası veri analizi :

Termal protokol sona erdiğinde iCycler IQ yazılımı, baseline döngülerini ve eşik otomatik olarak hesaplar. Baseline döngüleri her bir örnek için ayrı ayrı belirlenir. Eşik, tüm örneklerin baseline döngülerinin 10 katı olarak hesaplanır ve standart eğri mümkün olan en yüksek korelasyon katsayısına sahip olacak şekilde ayarlanır. Standart eğri (Eşik döngüsü–Log Başlangıç miktarı) tanımlanmış standartlardan elde edilen veriler kullanılarak oluşturulur.

Veri analizi için cihaz üzerinde “View Post-Run Data” sayfası tıklanarak daha önceki çalışma dosyalarının da içeren “Data files” dosyasından değerlendirilecek yeni çalışma dosyası açılarak incelemeye başlanır. Bu amaçla ekrandaki “Analyze Data” kısmı tıklanarak çalışmanın anlık amplifikasyon verileri gözlenir (Şekil-2). Öncelikle Pozitif kontrol ve internal kontrole ait beklenen eşik döngüleri (C_T) (32±3) kontrol edilir. Çalışma sonuçları bu verilere uymadığı durumda test sonuçları rapor edilmemelidir. Sorun yoksa FAM 490 ve Cy5-635 ile ilgili amplifikasyon verileri birarada değerlendirilir. Analiz sonucunda **eşik çizgisini kesen örneklerin** eşik döngüleri FAM veri penceresindeki grafiğin yanında görüntülenir. Bu örnekler **pozitif** kabul edilir. **Eşik çizgisini kesmeyenler** ise “N/A” olarak gösterilir ve bu örneklerin testin saptama sınırı olan **8,08X10² kopya/ml altında** bakteriyel yüke sahip oldukları kabul edilir. Yanlış negatif sonuçları önlemek için, bu “saptanamayan “ örnekler Cy5 internal kontrol verileri de kontrol edilmelidir. Aşağıdaki tablo olası sonuçları ve anlamlarını göstermektedir.

Sinyal durumu	Yorum	Değerlendirme
FAM Filtre çiftiyle sinyal varsa	Örnek MTBC DNA içeriyor, sonuç pozitifdir	Örnek pozitif olduğundan internal kontrolü kontrol etmeye gerek yok (yüksek pozitif örnekler internal kontrol sinyalini baskılayabilirler)
FAM’da sinyal yok, Cy5’te sinyal var	Örnek MTBC DNA saptanamamış, sonuç negatiftir.	Cy5 filtre çiftiyle alınan sinyal, PZR inhibisyonu olasılığını ortadan kaldırıyor.
FAM’da ve Cy5’te sinyal yok	Sonuç belirsiz	Cy5’te sinyal olmaması PZR inhibisyonu yada DNA izolasyonunda problem olduğunu gösteriyor.



Şekil-2 : Real Time PZR testi kayıt ekranı, anlık izlenen amplifikasyon eğrileri ve korelasyon eğrisi

5. Sorun Giderme

Sorun	Nedeni	Çözümü
FAM Filtresinden sinyal alınmamış yada geç alınmış	Yanlış termal protokol seçilmiş	Doğru protokol seçildiğinden emin olun
Pozitif kontrolün sinyali geç veya zayıf	Pozitif kontrol yada diğer kit bileşenleri bozulmuş	Kullanım süresi dolmuş kit bileşenleri kullanmayın. Kit bileşenlerinin saklanmasıyla ilgili talimatlara uyun.
Internal kontrolün sinyali alınmamış	Internal kontrol veya detection mix 2 bozulmuş	Kit bileşenlerinin saklanmasıyla ilgili talimatlara uyun
	PZR inhibisyonu	Önerilen DNA izolasyon metodunu izlediğinizden emin olun.
	İzolasyon sırasında DNA kaybedilmiş	Önerilen DNA izolasyon metodunu izlediğinizden emin olun.
Negatif kontrolde FAM filtresinden sinyal alınmış	Kontaminasyon	Filtreli uç kullanın. Yeni kit bileşenleriyle PZR'ı tekrarlayın.
Eşik çizgisi düşük sinyallerin üzerinde	Eşiğin pozisyonu elle ayarlanmalı	Mause'u kullanarak eşiği düşük sinyalleri kesene dek aşağı çekin. Background'un üzerinde kalmaya ve negatif kontrolün eşiği kesmemesine dikkat edin.
Kırık/Düzensiz olmayan çizgiler	Baseline döngüleri yeniden ayarlanmalı.	Yeni baseline döngülerini manuel olarak ayarlayın ve eşik döngülerini yeniden hesaplatın.

KULLANICIYA ÖNERİLER

- Ürün kuru buzda teslim edilmelidir. Kuru buzda teslim edilmeyen ürün kabul edilmemelidir.
- Son kullanma tarihi geçmiş ürün veya bileşenleri kullanmayınız.
- Çalışma boyunca, steril, filtrelı pipet uçları ve mikrosantrifüj tüpleri kullanılmalıdır.
- Çalışma öncesi tüm bileşenler oda ısısına getirilmeli, kullanım öncesi içeriklerinin homojen hale gelmesini sağlamak için tüm bileşenler çözüldükten sonra karıştırılmalı ve kısaca santrifüjlenmelidir.
- Kit bileşenleri reaksiyon hazırlanana kadar buz veya soğutucu blok üzerinde tutulmalı ve kısa sürede -20°C'ye kaldırılmalıdır.
- Klinik örnekle çalışırken kişisel biyogüvenlik kurallarına azami dikkat gösterilmelidir. İşlemler sırasında aerolizasyonu engellemek için aerosol bariyerli pipetör kullanımı gereklidir. Kesinlikle ağızla pipetleme yapılmamalı, selektif amplikasyon için azami dikkat gösterilmelidir. Tüm çalışma yüzeylerinin temizliği ve uygun bir dezenfektan ile dezenfeksiyonu yapılmalıdır.
- Nükleik asit izolasyon aşamasında oluşan patojenik atıklar, tıbbi atık torbasına atılmalıdır.
- Reaktif şişelerinden örnekleme yapılacağı zaman reaktiflerin mikrobiyal kontaminasyonuna dikkat edilmesi gereklidir. Ayrıca, kit prospektüsünde kullanım sırasında dikkat edilmesi gerekli uyarısı yapılmış reaktif ve substratların cilt ve mukoz membranlarla temasının önlenmesi gereklidir. Temas durumunda seri olarak su ve sabunla yıkamayı takiben tıbbi destek alınmalıdır.
- Laboratuvar çalışma alanında yeme, içme ve sigara kullanımına izin verilmemelidir. Örneklerin ve kit reaktiflerinin hazırlanması sırasında koruyucu giysiler, disposable eldiven ve göz koruyucularının kullanımı önemlidir.
- Cihazın verimli çalışması için düzenli olarak firma önerileri doğrultusunda bakımlarının yapılması gereklidir.
- MTBC testi ile, anti-tüberküloz tedavisi almayan hasta örnekleri ile en fazla 7 gün önce tedaviye başlanmış ya da ideal olarak en az 1 yıldır tedavi görmeyen hasta örnekleri değerlendirilebilir
- MTBC test sonuçları tüm klinik ve laboratuvar verileriyle birlikte yorumlanmalıdır.
- Bir kutu MTBC test kiti 96 testliktir.
- DNA ekstraksiyon işlemi sonrası test süresi yaklaşık 3 saattir.

KAYNAKLAR

1. Kim MH., Yang HY., Suh JT., Lee HJ.: Comparison of in-house PZR with conventional techniques and Cobas Amplicor *M.tuberculosis* Kit for Detection of *Mycobacterium tuberculosis*. Yonsei Med J 49(4):537-544, 2008
2. Roche Diagnostics : Cobas Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* Test ,P/N: 03032129018; Revision 4.0; 1-18; 6/2007
3. Kubar A : Laboratuvarıda tasarlanan nükleik asit testleri ve uygun primer/prob dizaynları. Durmaz R. (edt): IV. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu. Sayfa : 99-105, Malatya, 3-7 Eylül 2007
4. Aktaş E: Multipleks, Broad-Range ve Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemlerinin Mikrobiyolojide Kullanımı. Durmaz R. (edt): IV. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu. Sayfa : 106-124, Malatya, 3-7 Eylül 2007
5. Durmaz R., Günal S., Çavuşoğlu C.: *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının moleküler epidemiyolojisinde kullanılan yöntemler: IS 6110 Fingerprinting, spoligotyping ve MIRU-VNTR Durmaz R. (edt): IV. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu. Sayfa : 214-233, Malatya, 3-7 Eylül 2007
6. Tortoli E., Palomino J.C.: New Diagnostic Methods. Palomino J.C., Leão S.C., Ritacco V. (Editors):Tuberculosis 2007, From basic science to patient care, chapter 14, 448-494,Brasil, 2007
7. Martin A., Portaels F.: Drug Resistance and Drug Resistance Detection. Palomino J.C., Leão S.C., Ritacco V. (Editors): Tuberculosis 2007, From basic science to patient care, chapter 19, 648-474, Brasil, 2007
8. Alp A : Tüberküloz Tanısı . Katkı Pediatri Dergisi, Cilt: 28, Sayı 4, sayfa 436-48, 2006
9. Bayram A., Çeliksöz C., Karlıgil T., Balcı İ.: Klinik örneklerden kültür ile saptanan *Mycobacterium tuberculosis* kompleks kökenlerinin otomatize PZR yöntemiyle araştırılması. İnfeksiyon dergisi (Turkish Journal of Infection) , 20 (1):1-6;2006
10. Ozkutuk A., Kirdar A., Ozden S., Esen N.: Evaluation of Cobas Amplicor MTB Test to detect *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and extrapulmonary specimens.New Microbiologica, 29, 269-273, 2006
11. Bodil J., Malin R.: The Cobas Amplicor MTB test for detection of *mycobacterium tuberculosis* complex from respiratory and non-respiratory clinical specimens. New Microbiologica, Oct; vol 29 (issue 4) : pp 269-73 ; 2006

12. Çavuşoğlu C.: Moleküler tanı yöntemlerinde yaşanan sorunlar. IV.Tüberküloz Sempozyumu, 8 ARALIK 2005, Malatya, Sempozyum ve Kurs Kitabı, sayfa 81-90 , 2005
13. Tarhan G., Ceyhan İ., Cesur S.: National Tuberculosis Reference Laboratory Experience in Multi Center Quality Control Programs for Molecular Diagnostics of Tuberculosis. Turk J Med Sci , 35 : 282-288: 2005
14. Goessens WHF., Man P., Koeleman JGM., Luijendijk A., Witt R., Endtz HP., Belkum A.: Comparison of the COBAS AMPLICOR MTB and BDProbe Tec ET Assays for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Respiratory Specimens. Journal of Clinical Microbiology, Vol.43, No.6, p.2463-2566, June 2005.
15. Alp A.: Mikobakterilerin tanı ve identifikasyonunda moleküler yöntemler. 3.Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Program ve Bildiri Özet Kitabı, Ankara, Sayfa: 95-99, 2004
16. Katoch VM. Newer diagnostic techniques for tuberculosis. Indian J Med Res. 2004; 120: 418-428.
17. Abu-Amero KK, Halablab MA.: *Evaluation of the COBAS AMPLICOR MTB test for the detection of Mycobacterium tuberculosis complex*. East Mediterr Health J. May;10(3):329-35; 2004
18. Noordhoek GT., Mulder S., Wallace P. et al.: Multicentre quality control study for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by nucleic acid amplification methods. Clin Microbiol Infect 10: 295-301, 2004
19. Wang S.X, Sng LH., 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
20. Levidiotou S., Vrioni G., Galanakis E., Gesouli E., Pappa C., Stefanou D.: Four-Year Experience of Use of the Cobas Amplicor System for Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Respiratory and Non respiratory Specimens in Greece. Eur J.Clin Microbiol Infect Dis , 22: 349-356: 2003
21. Piersimoni C, Scarparo C. Relevance of Commercial Amplification Methods for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Clinical Samples. J Clin Microbiol 2003; 41: 5355- 5365.
22. Özyurt M.: Tüberkülozun Laboratuvar Tanısında kullanılan Moleküler Ticari Tanı Sistemleri. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu, Samsun. Sempozyum Kitabı sayfa: 325-337, 2003

23. Woods GL. The mycobacteriology laboratory and new diagnostic techniques. *Infect Dis Clin North Am.* 2002 Mar;16(1):127-44
24. Çavuşoğlu C, Güneri S, Suntutur M, Bilgiç A. Clinical Evaluation of the FASTPlaqueTB for the rapid diagnosis of Pulmonary Tuberculosis. *Turk J Med Sci.* 2002; 32: 487- 492
25. 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*
26. Piersimoni C, Scarparo C, Piccoli P, et al. Performance assessment of two commercial amplification assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex from respiratory and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 4138–4142.
27. 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*
28. Woods GL.: Molecular Techniques in Mycobacterial Detection. *Arch Pathol Lab Med.*2001;125:122-126
29. Çavuşoğlu C, Çiçek-Saydam C, Tuncel M, Bilgiç A. Solunum örneklerinden *Mycobacterium tuberculosis* kompleks'in saptanmasında TMA (Gen-Probe MTD) ile Roche Amplicor PZR'ın etkinliğinin karşılaştırılması. *İnfek Derg.* 2001; 15: 21-24.
30. Durmaz R.:Nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinde sorunlar ve standardizasyon. *Uygulamalı moleküler mikrobiyoloji.* Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Sti., İstanbul, sayfa:45-56 ; 2001
31. Kaul K.L.: Molecular Detection of *Mycobacterium tuberculosis* : Impact on Patient Care. *Clinical Chemistry (2001) 47:8: 1553-1558*
32. Durmaz R , Günal S.: Tüberkülozun tanısında polimeraz zincir reaksiyonunun kullanılması. Durmaz R. (Edt), *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*, 2.baskı, Kozan Ofset, Ankara, Sayfa ; 173-179, 2001
33. Kocagöz T.: Tüberküloz 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

34. Scarparo C., Piccoli P., Rigon G.: Comparison of enhanced *Mycobacterium tuberculosis* Amplified Direct Test with COBAS AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory and extrapulmonary specimens. J.Clin. Microbiol. 38:1559-1562, 2000
35. Centers for Disease Control and Prevention. Update: Nucleic acid amplification tests for tuberculosis. Morb Mortal Wkly Rep 49:593-594, 2000
36. Woods G.L.: Molecular Methods in the detection and identification of Mycobacterial Infections. Arch Pathol Lab Med , Vol 123 ;1002-1006; 1999
37. Tortoli E, Tronci M, Passerini Tosi C, et al. Multicenter evaluation of two commercial amplification kits (Amplicor, Roche and LCx, Abbott) for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and extrapulmonary specimens. Diagn Microbiol Infect Dis. 1999; 33: 173–179.
38. Bonington A, Strang JIG, Klapper PE, et al. Use of Roche Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* PZR in early diagnosis of tuberculous meningitis. J Clin Microbiol. 1998; 36: 1251–1254.
39. Reischl U, Lehn N, Wolf H, Naumann L. Clinical evaluation of the automated Cobas Amplicor MTB assay for testing respiratory and non-respiratory specimens. J Clin Microbiol. 1998; 36: 2853–2860.
40. Donald Jungkind D., Drenzo S., Beavis K.G., Silverman N.S.: Evaluation of Automated COBAS AMPLICOR PZR System for Detection of Several Infectious Agents and Its Impact on Laboratory Management. Journal of Cl. Microbiology, Vol.34, No.11, p 2778-2783; 1996

