

TÜBERKÜLOZ BASİLİNİN İDENTİFİKASYONU

Doç. Dr. Süheyla SÜRÜCÜOĞLU

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa

İzole edilen mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanmaları gereklidir. Her mikobakteriyoloji laboratuvarının tüm izolatları tanımlayabilecek düzeyde olması gerekli değildir. Ancak tüberküloz basillerinin etken olma sıklığı ve infektivitesi göz önüne alındığında, en azından *M. tuberculosis* kompleksinin identifikasyonunda kullanılan anahtar testlerin uygulanması gerektiği düşünülmektedir.

Tüberküloz basillerinin tanımlanmasında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Konvansiyonel 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 ve tüberküloz basillerinin identifikasyonunda geçerliliklerini halen korumaktadırlar. Ancak tüberküloz dışı mikobakterilerin bazı türlerinin ayrımında yanlış sonuç verebilmektedir. Yeni identifikasyon yöntemleri ise bakterilerin hücre duvarında bulunan mikolik asit analizine dayalı kromatografik yöntemler, DNA prob yöntemi ile özgül genetik tanımlama ve BACTEC sistemi ile kullanılan NAP testidir. Bu yöntemler hızlı ve güvenilir olmakla birlikte, özellikle genetik incelemeler

konvansiyonel yöntemlere göre oldukça pahalıdırlar ve bu nedenle her laboratuvarında uygulanmaları güçtür.

Tüberküloz Basillerinin İdentifikasyonunda Kullanılan Konvansiyonel Yöntemler

Bütün testler biyolojik güvenlik kabininde uygulanmalıdır.

1. Üreme Özelliklerinin İncelenmesi

1. 1. KOLONİ VE MİKROKOLONİ GÖRÜNÜMÜ

1. *M. tuberculosis* Lowenstein Jensen (LJ) besiyerinde veya Middlebrook agarda 37°C'de 14-28 günlük inkübasyondan sonra pigmentsiz, düzensiz, kuru, krem rengi koloniler oluşturur.

2. Middlebrook 7H10 veya 7H11 agarda 5-10 günlük inkübasyondan sonra oluşan mikrokoloniler mikroskop altında incelendiğinde “yılanvari kordon” görünümü izlenir. Mikrokolonileri incelemek için petrilere ince dökülmüş agarlı besiyeri kullanılmalı ve 10X büyütmeli objektif kullanılmalıdır.

Mikrokoloni incelemesi özellikle *M. tuberculosis* kompleksin hızlı identifikasyonuna olanak sağlayan kolay ve güvenilir bir yöntemdir. Aynı zamanda

mikrokoloni incelemesi prob seçimine de rehberlik edebilir.

M. bovis

Çok yavaş ürer (disgonik). LJ'de görünür kolonilerin oluşması için sıklıkla 6-8 haftalık inkübasyon gereklidir. LJ'de agarlı besiyerlerine oranla daha iyi üreme gösterir. Gliserol üremesini güçleştirir. En iyi üreyebildiği ortam gliserolsüz %0.4 pirüvatlı LJ'dir. Yumurtalı besiyerinde tipik kolonileri düzgün veya bazen düzensiz kenarlı, krem rengi, küçük koloniler şeklindedir. Middlebrook 7H11 agarda çok küçük, su damlasına benzer koloniler oluşturur.

1. 2. ÜREME HIZININ VE PİGMENT ÜRETİMİNİN SAPTANMASI

Mikobakteriler üreme hızları, tercih ettikleri üreme ısıları ve ışıktaki veya ışık olmadan pigment üretme özelliklerine göre sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırma (Runyon) 1950'li yıllardan beri geçerliliğini korumaktadır. Ancak son yıllarda özellikle AIDS'li hastalardan izole edilen *M. avium intracellulare* kompleksi'nin ışıktaki pigment oluşturabildiği gözlenmiştir. Bazı mikobakteri türlerinin ise pigmentasyon özelliklerinin üreme ısısına göre değiştiği bilinmektedir. Örneğin *M. szulgai* 25°C'de fotokromojen, 37°C'de ise skotokromojendir. Bu nedenle tüm pigmentli kültürlerin pigmentasyon için iki farklı ısı derecesinde test edilmesi önerilmektedir. Üreme hızı ise katı besiyerinde gözle görünür koloni oluşuncaya kadar geçen süreyi ifade etmektedir.

Mikobakterilerin bu özellikleri LJ besiyerine yapılan taze pasajlarda incelenebilir. LJ, sahip olduğu renk kontrastı nedeni ile üreyen

kolonilerin pigment özelliğini daha kolay yansıttığından tercih edilmektedir. LJ'de üremeyen bakteriler için Middlebrook 7H10 kullanılabilir. Ancak bu besiyeri kullanıldığında testi değerlendirmek daha güçtür.

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) alüminyum folyo parçaları
5. 60-W aydınlatma gücünde lamba

Kalite Kontrol

Aşağıda verilen kontrol suşları ile test ayda bir kez kontrol edilmelidir.

A. *M. terrae* ATCC 15755: Yavaş ürer, oda ısısında $\pm$ ürer, ışıktaki veya karanlıkta pigment yapmaz (nonkromojen).

B. *M. fortuitum* ATCC 6841: Hızlı ürer, oda ısısında iyi ürer, ışıktaki veya karanlıkta pigment yapmaz (nonkromojen).

C. *M. gordonae* ATCC 14470: Yavaş ürer, oda ısısında zayıf ürer, ışıktaki ve karanlıkta turuncu pigment yapar (skotokromojen).

D. *M. kansasii* ATCC 12478: Yavaş ürer, oda ısısında çok zayıf ürer, ışıktaki turuncu pigment yapar, karanlıkta pigment yapmaz, ışık testinden sonra pigment oluşumu gözlenir (fotokromojen).

Yöntem

Test edilecek koloniler Middlebrook 7H9 broth besiyerine ekilir. Bir çubuk ile tüpün kenarında iyice ezilerek kolonilerin sıvı besiyeri içinde dağılması sağlanır.

Tüpler vorteks aracılığı ile 10 saniye karıştırıldıktan sonra bir pastör pipeti aracılığı ile altışar damla kültür süspansiyonu alınarak üç ayrı LJ besiyerine ekim yapılır.

LJ besiyerlerinden iki tanesi besiyerinin tamamını örtecek şekilde hemen alüminyum folyo ile kapatılır. Tüplerin kapakları gevşek bırakılmalıdır.

Kapalı tüplerden biri oda derecesinde (22⁰-25⁰C), diğer kapalı tüp ve açık bırakılan tüp 37⁰C'de %10 CO₂'li ortamda inkübe edilir.

Açık tüp haftada bir kez olmak üzere üç hafta süre ile üreme miktarı ve pigment üretimi yönünden incelenir. Üçüncü haftanın sonuna kadar alimünyum folyo açılmaz.

Koloni rengi kaydedilir. Üreme miktarı ise 0-2+ olarak belirlenir (Tablo 1)

Tablo 1. Besiyerinde üreme hızı*

37⁰'de Üreme hızı

	1. Hafta
Hızlı	1+ - 2+
Orta	± - 1+
Yavaş	0 - ±

* 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.

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.

Değerlendirme

1. Açık ve kapalı tüplerde üreyen

kolonilerde pigment yok (krem rengi);

Nonkromojenik

2. 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.

Üreme Miktarı

2. Hafta **3. Hafta**
Besiyeri 25 cm uzaklıkta bulunan 60 W gücündeki lambanın altında bir saat tutulur. Daha sonra başlangıçta tüpün bekletildiği ısıda inkübe edilir. Kapağı gevşek bırakılmalıdır.

1. 24 saatlik inkübasyonun sonunda koloniler pigment oluşumu yönünden yeniden incelenmelidir. Sarı veya turuncu pigment varlığı kaydedilir. Pigmentin koyuluğu değil, varlığı aranmalıdır. Kapalı tüpte bulunan

pigmentsiz kolonilerde, ışıkla karşılaştıktan sonra pigment üretimi var; **Fotokromojenik**

1. 3. NAP (p-nitro- α -acetylamino- β -hydroxypropio-phenone) TESTİ (BACTEC)

NAP (p-nitro- α -acetylamino- β -hydroxypropio-phenone) kloramfenikol sentezinde ara bileşik olan bir antimikobakteriyel ajandır. *M. tuberculosis* kompleks'in üremesini selektif olarak inhibe eder. Diğer mikobakteri türleri NAP ile inhibe olmaz veya kısmen inhibe olabilir. BACTEC 12B besiyerinde aktif olarak üreyen kültürün 1 ml'si NAP flakonuna eklendiğinde *M. tuberculosis* komplekse ait olan bakteriler inhibe olurken tüberküloz dışı mikobakteriler belirgin ölçüde inhibe olmazlar. Üremenin varlığı, cihazın radyoaktif detektörü tarafından $^{14}\text{CO}_2$ üretiminin izlenmesi ile belirlenir. Üreme yoksa bakterinin *M. tuberculosis* komplekse ait olduğu düşünülür. NAP testi mikobakterilerin ayırımında kullanılan yeni yöntemler arasında sayılmakla birlikte hızlı ve güvenilir olması nedeni ile BACTEC kültür yöntemi uygulayan merkezlerde yaygın kullanım alanı bulmuştur. Ancak NAP testinin nükleik asit prob, kromotografik yöntemler veya konvansiyonel yöntemler ile doğrulanması önerilmektedir.

İnceleme Örneği

BACTEC 12B besiyeri (Growth index > 50)

Gereçler

1. BACTEC 460 cihazı (Becton Dickinson)
2. Middlebrook 7H12 (BACTEC 12B) besiyeri (7H9 broth, sıgır serum albümini, kazein hidrolizat, katalaz ve ^{14}C işaretli substrat içerir.)
3. BACTEC NAP flakonları (5 μg NAP diski taşır).

4. Steril tüberkülin enjektörleri
5. Pamuk veya gazlı bezli petler, antimikobakteriyel dezenfektan ve %70 etil alkol

Kalite Kontrol

M. tuberculosis ATCC 27294 ve *M. kansasii* ATCC 35775

M. tuberculosis'in growth index'i (GI) düz bir çizgi çizerken, *M. kansasii*'nin GI inkübasyon sürdükçe yükselen bir eğri çizer.

Yöntem

1. BACTEC 12B şişesinde GI 10'un üzerinde olduğunda, GI yaklaşık 50-100'e ulaşıncaya kadar besiyerleri günlük olarak okunur.
2. 12B şişesinin GI'i 50-100'e ulaştığında, besiyeri iyice karıştırılır. Aseptik koşullarda 1 ml besiyeri NAP flakonuna aktarılır (Gram boyama veya subkültür ile kontaminasyon olamadığından emin olunmalıdır). Kalan 3 ml besiyeri kontrol olarak kullanılır.
3. Flakonun ağzı uygun bir antimikobakteriyel dezenfektanla (Cidex, Glutarex gibi) ve ardından etil alkolle temizlenir. Flakon iyice karıştırılır.
4. Hem inokülasyon yapılan primer izolasyon şişesi (kontrol), hem de NAP flakonları günlük olarak 2-6 gün süre ile okunur, GI kaydedilir.
5. 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

Dilüsyon yapıldıktan sonra besiyerinin 1 ml'si NAP flakonuna aktarılır. Artan besiyeri kontrol olarak kullanılmak üzere inkübe edilir.

Değerlendirme

1. Sonuçlar 2-7 gün, ortalama dört 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 olarak değerlendirilir.

2. Test sonucu dört günden daha kısa sürede değerlendirilmemelidir.

3. *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.

4. 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.

5. NAP sonuçlarının değerlendirilmesi: Kontrol şişesindeki (orijinal kültür şişesi) günlük GI artmaya devam etmelidir, artış göstermiyorsa NAP sonucu değerlendirmeye alınmamalıdır. NAP flakonundaki GI artışı veya azalışı ise mikobakteri türüne bağlıdır;

a. *M. tuberculosis* kompleks: İnokülasyondan sonra ardışık iki GI'de önemli bir azalma ($\geq 20\%$); ilk iki gün hafif, fakat önemli olmayan bir artış ve ardından artışın olmaması veya azalma olması = TB kompleks

b. Tüberküloz dışı mikobakteri: Günlük GI'in dört gün içinde 400'ün üzerine çıkması; inokülasyondan sonra ilk 1-2 gün içinde artış olmaması veya hafif bir azalma, iki günün ardından önemli bir artış ($\geq 20\%$) olması = Tüberküloz dışı mikobakteri

6. 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.

2. Biyokimyasal Özelliklerin İncelenmesi

2.1. NİASİN TESTİ

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. Ticari olarak hazırlanmış kağıt stripler (Difco) ile yapılan niasin test yöntemi de bulunmaktadır.

İnceleme Örneği

Niasin testi aktif olarak üremekte olan genç kültür kullanımını gerektirmez. Test için LJ besiyerinde yoğun olarak üremiş üç haftadan eski 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 karsinogeniktir. 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 besiyerleri

Yöntem

1. En az üç haftalık ve yoğun üremesi olan LJ kültürleri kullanılmalıdır. Koloni sayısı az olduğunda yanlış negatif sonuçlar alınabilir.

2. 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.

3. Tüpler horizontal olarak oda ısısında bir saat bekletilir. Bir pastör pipeti dolusu geri alınan sıvı temiz bir tüpe aktarılır.

4. Tüpe birer pastör pipeti dolusu %4 anilin ve siyanojen bromid eklenir.

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

Testin yapılması yukarıdaki gibidir. Ancak ayıraçlar yerine tüp içine strip konur ve hemen tüpün ağzı kapatılır. Tüp ara sıra çalkalanarak oda ısısında 15 dakika bekletilir. Beyaz zeminde incelendiğinde 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.

2. 2. NİTRAT REDÜKSİYONU TESTİ

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

1. Bir öze dolusu koloni 2 ml nitrat substratı içinde ezilir ve elle karıştırıldıktan sonra 35⁰-37⁰C'de iki saat inkübe edilir.

2. Sırası ile aşağıdaki ayraçlar eklenerek karıştırılır.

- 1 damla konsantre HCl
- 2 damla %0.2 sulfanilamid
- 2 damla *N*-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride'in sudaki %0.1'lik eriyiği

3. Karışım oda ısısında 5 dakika bekletilir ve pembe-kırmızı renk değişimi araştırılır.

Değerlendirme

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

2. 3. KATALAZ TESTİ

Katalaz hidrojen peroksidi su ve oksijene ayırtan 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 hidrojen peroksit, diğer bakterilerde bulunan enzimin araştırılmasında kullanılan ayraçtan 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, 22-25°C'de hava kabarcıkları oluşur, 68°C'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

1. İki ayrı tüpte test edilecek birkaç mikobakteri kolonisi (2-4 haftalık) 0.5 ml fosfat tampon içine inoküle edilir. Tüplerden biri 68°C'lik su banyosunda 20 dakika bekletilir. Diğer tüp kontrol için kullanılır.
2. 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

1. Middlebrook 7H9'a bir öze dolusu koloni inoküle edildikten sonra tüp 37°C'de yedi gün bekletilir.

2. İnkübasyonun sonunda vorteks ile 5-10 saniye karıştırılır ve altı damla dik LJ besiyerine aktarılır. Besiyerleri 14 gün 37°C'de inkübe edilir. Kapak gevşek bırakılmalıdır.

3. 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.

4. Oluşan hava kabarcıklarının yüksekliği ölçülür.

Değerlendirme

1. Isıya stabil katalaz testi:

Çok az miktarda gaz kabarcığının oluşması bile pozitif olarak değerlendirilir. *M. tuberculosis* ve diğer bazı mikobakteriler 68°C'de ısıtıldıklarında katalaz aktivitelerini kaybederler.

2. Semikantitatif katalaz testi:

Yüksek katalaz reaksiyonu: Hava kabarcıklarının yüksekliğinin >45 mm oluşması

Düşük katalaz reaksiyonu: Hava kabarcıklarının yüksekliğinin <45 mm olması

M. tuberculosis ve MAC düşük katalaz reaksiyonu verir.

M. kansasii, hızlı üreyen mikobakteriler ve sıklıkla izole edilen skotokromojenler yüksek katalaz reaksiyonu verir.

3. Çok eski kültürlerden veya yetersiz üreyen kolonilerden yapılan deneylerden yanlış düşük sonuçlar alınabilir. Diğer bakteriler ile kontamine kültürler ise yanlış yüksek sonuç verebilir.

2. 4. THİOPHENE-2- CARBOXYLIC ACID HYDRAZİDE (TCH) İLE ÜREMENİN İNHİBE EDİLMESİ

M. tuberculosis ve diğer yavaş üreyen mikobakterilerin çoğu TCH'ye dirençlidirler. *M. bovis* ise (Bazı INH dirençli suşlar hariç) düşük konsantrasyonda TCH'a duyarlıdır ve TCH'li besiyerinde üreyemez. Bu test özellikle *M. bovis* ve *M. tuberculosis*'in ayırımında yardımcıdır.

İnceleme Örneği

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

Gereçler

1. Dört kadranlı steril petri plakları
2. TCH duyarlılık besiyeri (10 µg/ml)
 - a. İki adet 200 ml.lik Middlebrook 7H10 besiyeri hazırlanır. Besiyerleri otoklavda sterilize edilir. Su banyosunda 50°C'ye kadar soğutulur.
 - b. Soğumuş besiyerlerinden birinden 5.0'er ml pipet aracılığı ile petri plakların I. ve III. kadrana dökülür.
 - c. Diğer besiyerine 1000 µg/ml TCH stok solüsyonundan 2.0 ml eklenir ve iyice karıştırılır. Bu besiyerinden 5.0 ml, II. ve IV. kadrana dökülür.

d. Besiyerleri karanlıkta (koyu renk kağıda sarılı olarak), 2-8°C'de bir ay süre ile saklanabilir.

Kalite Kontrol

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

Negatif kontrol: *M. tuberculosis* ATCC 25177 (dirençli)

Yöntem

1. 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.

2. Besiyerleri ışıktan korunması için kağıtla kapatıldıktan sonra, inokülumun absorbe olması için oda ısısında yaklaşık bir saat bekletilir. Besiyerleri ters çevrilerek 37°C'de %10 CO₂'li ortamda üç hafta inkübe edilir.

3. 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.

2. 5. PİRAZİNAMİDAZ TESTİ

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

1. Bir öze dolusu genç koloni iki adet pirazinamidaz agarın yüzeyine inoküle edilir. Tüplerin kapakları gevşek bırakılarak inkübe edilir.

2. 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.

3. 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, laboratuvarlarda 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. Tüberküloz dışı mikobakterilerin identifikasyonunda biyokimyasal testler uygulanabilirse de her zaman doğru sonuç vermezler.

Tüberkülozun doğru tanısı güvenilir ve standardize edilmiş mikrobiyolojik yöntemlerin kullanılması ile mümkündür. Bu nedenle örneklerin toplanmasından, mikroskopik inceleme, kültür ve identifikasyona kadar her aşamada belirlenen standart yöntemlere uyulması, test kontrollerinin kullanılması ve laboratuvarda periyodik olarak kalite kontrolün yapılması zorunludur.

