

TÜBERKÜLOZ TANISI İÇİN KLİNİK ÖRNEK ALINMASI, LABORATUVARA GÖNDERİLMESİ VE KÜLTÜR YÖNTEMLERİ

Prof. Dr. Meltem Uzun

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

meltmuzuntr@yahoo.com

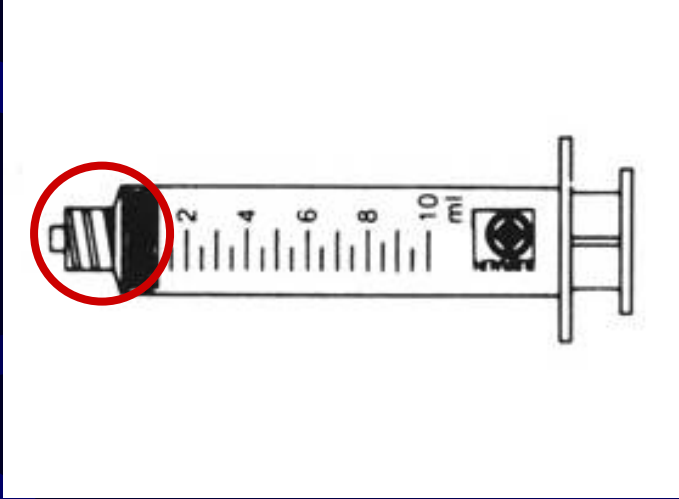
- * **Tüberküloz ve diğer mikobakteriyozların kesin tanısı, klinik örnekten mikobakterilerin izole edilmesi ile yapılır.**
- * **Kültür aşamasında uygulanan herhangi bir laboratuvar yönteminin etkinliği, büyük ölçüde klinik örneğin alınma ve laboratuvara gönderilme koşullarına bağlıdır.**
- * **Bu nedenle klinik örnek uygun zamanda, uygun yerden alınmalı ve bekletilmeden laboratuvara gönderilmelidir.**

GENEL KURALLAR

- * Klinik örnek steril, tek kullanımlık, sızdırmaz, burgulu kapaklı, fiksatif ve koruyucu içermeyen kaplara yeterli miktarda alınmalıdır.
- * Enjektörle örnek alınacaksa **luer tipi** kapaklı enjektörler tercih edilmelidir.
- * Kabın üzerindeki etikete hastanın adı-soyadı, örneğin ne zaman alındığı yazılmalı ve istek kağıdında hasta ile ilgili tüm bilgiler ve ilgili doktora ulaşılacak telefon numaraları yer almalıdır.



**Steril, tek kullanımlık, etiketli
örnek kapları**



Luer tipi kapaklı enjektör

GENEL KURALLAR

- * Antimikrobiyal tedavi öncesi alınmalıdır.
- * Kontaminasyonu en aza indirmek için klinik örnek aseptik şartlarda alınmalı ve musluk suyu ile kontaminasyondan kaçınılmalıdır.
- * Çevre koşullarına dayanıklı olmaları nedeniyle transport besiyeri çok gerekli değil → sürüntü, iğne aspirasyonu, biyopsi

KABUL EDİLMEMESİ GEREKEN ÖRNEKLER

- * Uygun olmayan kaplarda gönderilen örnekler
(Balmumu içeren, steril olmayan, kırık,
sızdıran)
- * Etiketlenmemiş örnekler
- * 24 saatlik biriktirilmiş idrar, balgam örnekleri
- * Sürüntü örnekleri
- * Örnek alımından, laboratuvarında işlenmesine
kadar > 7 gün geçen örnekler

SAKLAMA KOŞULLARI

- Bir saat içinde çalışılmayacak örnekler **-kan dışında-** 2-8 ° C'de bekletilmelidir.
- Dört saat içinde çalışılmayacaksa **mide lavajı** örneklerinin alındığı kaba nötralizasyon için **100 mg sodyum karbonat** ilave edilmelidir.
- Tekrar alınması zor olan örnekler kültür aşamasında oluşabilecek kontaminasyona karşın 2-8 ° C'de bekletilmelidir.

PULMONER ÖRNEKLER

- **Balgam**
 - * Birbirini takip eden üç gün üstüste en az 5-10 ml sabah balgamı
 - * Hasta yataktan kalkmadan ve ağzını çalkaladıktan sonra
 - * 24 saatlik balgam uygun değil !

- **İndüklenmiş balgam**

- * **Hipertonik tuzlu su (%10NaCl) inhalasyonu**
- * **En az 10 ml olmalı**
- * **Tükürüğe benzediği için istek kağıdında indüklenmiş balgam olduğu mutlaka belirtilmeli**
- * **Nebulizatör suyu ile balgamın kontaminasyonundan kaçınılmalıdır.**

- **Bronkoalveoler lavaj örneği**

Balgam çıkaramayan hastalara uygulanan invasiv bir teknikle alınır.En az 5 ml olmalıdır.

Musluk suyunda bulunabilecek saprofit mikobakteriler yalancı pozitifliğe neden olabileceğinden, bronkoskop musluk suyuyla kontamine edilmemelidir.

- **Bronşiyal fırçalama-iğne aspirasyonu**

Sığır serum albumin (son konsantrasyonu % 1-2) ve % 0.5 Tween 80 ile zenginleştirilmiş yaklaşık 10 ml Middlebrook 7H9 buyyonu içeren steril tüplere alınmalıdır.

- **Açlık mide suyu**

Yüksek asiditesi nedeniyle tüberküloz tanısı için uygun bir örnek değildir. Ancak;

- * **Balgam çıkaramayan veya balgamını yutan yenidoğanda ve küçük çocuklarda,**
- * **Koopere olmayan hastalarda tercih edilebilir.**
- * **Üç gün üst üste en az 5-10 ml örnek, sabah erken saatte hasta yataktan kalkmadan ve herhangi bir şey yemeden alınmalıdır.**
- * **Örnek alındıktan sonra 100 mg sodyum karbonat ile nötralize edilmeli, nötralize edilmemiş örnekler kabul edilmemelidir.**

EKSTRAPULMONER ÖRNEKLER

- **İDRAR**
 - * Ez az 40 ml sabah ilk idrar örneği
 - * Üç gün üst üste, orta akım idrar örneği, orta akım alınamıyorsa kateter ile
 - * Erkek hastalarda ilk idrarın tamamı da alınabilir
 - * Örnek vermeden önce dış üro-genital bölge temizlenmeli

RED

- 24 saatlik idrar
- 40 ml'den az

- **KAN**
- Asepsi uygulandıktan sonra alınarak hasta başında besiyerine ekim yapılır.
- Hasta başında ekim yapılamayacaksa 10 ml kan **SPS** veya **heparin** içeren tüplere alınarak laboratuvara gönderilmelidir.
- **PCR için kan → EDTA**

- **STERİL VÜCUT SIVILARI**

(BOS, plevral, peritoneal, perikardial, sinovial sıvılar)

- * Aspirasyon teknikleri veya cerrahi yöntemler kullanılarak alınmalıdır.
- * Az sayıda mikobakteri içerdiklerinden tanı için büyük hacimlere gereksinim vardır.
- * En az 10-15 ml, mümkünse **50 ml**.
- * Fibrinojen → SPS veya heparin
- * BOS en az 2 ml

- **ABSE İÇERİĞİ, ASPIRASYON SIVILARI, DERİ LEZYONU, YARA ÖRNEKLERİ**
- Asepsi uygulandıktan sonra mümkün olduğunca çok örnek **luer tipi kapaklı enjektör** ile aspire edilir.
- Küçük miktarda alınacaksa → Middlebrook 7H9
- Kutanöz lezyonlarda lezyonun kenarından aspirasyon
- Mutlak gerekiyorsa sürüntü örneği alınabilir

↓
Transport besiyerine

↓
Negatif sonuç güvenilir değil

DOKU ÖRNEKLERİ

(Lenf nodu, deri ve diğer biyopsi örnekleri)

- * Koruyucu veya fiksatif içermeyen kaplara en az **1 g** doku örneği
- * Kutanöz ülserlerde lezyonun periferinden örnek
- * Örnekler gazlı beze sarılmamalı ve formalin içinde gönderilmemelidir.
- * Doku parçalayıcı ile parçalanarak 1-2 ml Middlebrook 7H9 içinde homojen hale getirilebilir.

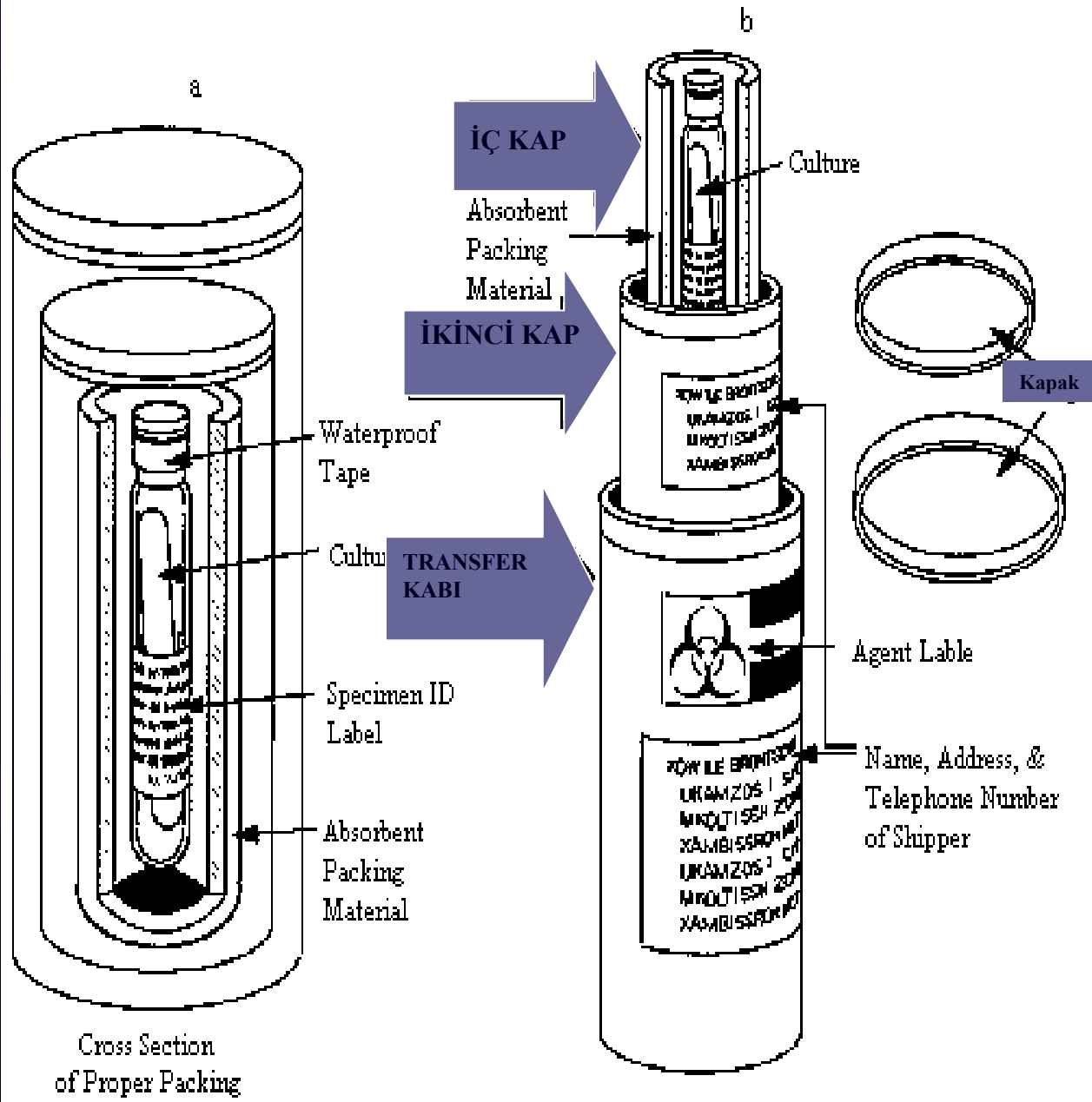
- **DIŐKI**
- **> 1 g** dıŐkı rneĐi steril, parafin içermeyen kaplara direkt olarak veya tuvalete serilmiŐ nylon üzerinden alınabilir.
- Sıklıkla AIDS hastalarının GİS'inde M.avium kompleksi'ni (**MAC**) araŐtırmak amacıyla kullanılır.
- Ancak dissemine MAC infeksiyonunun saptanmasında preparat ve kültür etkili bir yol değil
- Pozitif dıŐkı kültürü dissemine MAC infeksiyonunun göstergesi olabilir ancak; antibiyotik profilaksisinin etkinliği konusunda güvenilir veriler yok
- Bu nedenle MAC infeksiyonlarının saptanmasında **rutin dıŐkı kültürü önerilmez.**

ÖRNEKLERİN LABORATUVARA GÖNDERİLMESİ VE POSTALANMASI

- **% 50 infektif doz < 10 bakteri**
- **Bazı laboratuvarlarda aside dirençli bakteri izolasyon oranı > %10**



Bu nedenle balgam ve diğer klinik örnekler dikkatli taşınmalı → Sızmaya, sarsılmaya, basınç ve sıcaklık farklılıklarına dayanıklı üçlü kap sistemi



**“Etiyolojik ajan /
Biyolojik materyal”**
Kırılma veya
sızdırma
durumunda
aranacak kişinin ad-
soyad ve adresi

AMAÇ;

- Klinik örneklerde mikobakterilerin varlığını göstermek
- Hastalık etkeni mikobakteriyi izole etmektir.
- Preparat
- Kültür

Kültür yöntemleri, uzun yıllardır tüberküloz tanısında en güvenilir yöntem olarak varlığını korumaktadır !

ÖRNEKLERİN İŞLENMESİ

Mikobakterilerin araştırılması amacıyla laboratuvara gönderilen birçok klinik örnek; mikobakterilerle birlikte

- **Kontaminasyona neden olan bakteriler**
- **Mantarlar**
- **Lökosit**
- **Eritrosit**
- **Vücut sıvıları**
- **Doku gibi organik kalıntılar da içerir.**

Bu nedenle;

- Normal flora içeren klinik örnekler
- Alınmaları ve transport işlemleri sırasında sterilizasyon kurallarına uyulmadığı düşünülen klinik örnekler;
organik kalıntıları **sindirmek (digestion)**
kontaminasyona neden olan **bakteri ve mantarları elemine etmek** amacıyla **dekontaminasyon** işlemi uygulanır.

**Bazı yöntemlerde her iki işlem için tek bir madde →
%4 NaOH**

**Bazı yöntemlerde her iki işlem için ayrı ayrı
maddeler →**

N-Asetil-L-Cystein (NALC) + %4 NaOH

NALC → Mukolitik

%4 NaOH → Dekontaminan

**%2.9 sodyum sitrat → Klinik örneklerde
bulunabilecek ağır metal iyonlarını bağlayarak
NALC'ın inaktive olmasını önlemek amacıyla
kullanılır.**

**50 ml %4 NaOH+50 ml %2.9 NaSitrat+0.5 g NALC
18-24 saat !**

Normalde steril olduğu düşünölen BOS, vücut sıvıları, kan → **Dekontaminasyon işlemi uygulanmaz.**

Ancak steril boşluklardan örnek alımı ve transportu sırasında sterilizasyon kurallarına uyulmadığı kuşkusunu varsa, **bu örneklere de dekontaminasyon işlemi uygulanır.**

Kültür

Konvansiyonel besiyerleri

- Katı
- Sıvı

Katı besiyerleri

- * **Yumurta temelli** (Primer izolasyonda önerilir)

Löwenstein-Jensen (L-J) Tam yumurta veya yumurta sarısı

Petragnani

American Trudeau Society

- * **Agar temelli** (10-12 günde koloni oluşumu)

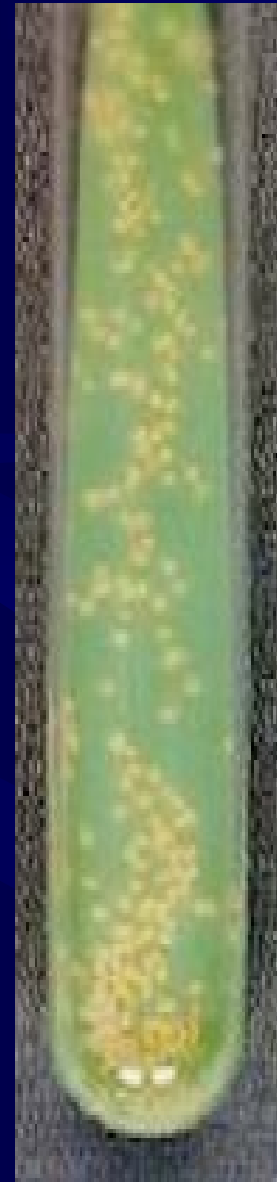
Middlebrook 7H10

Middlebrook 7H11

Sıvı besiyerleri

Middlebrook 7H9

Dubos tween albumin





Kontaminasyona neden olan mikroorganizmaların üremesini etkin bir şekilde inhibe etmek amacıyla **selektif besiyeri olan;**

L-J Gruft

Mycobactosel L-J

Mitchison's selektif 7H11



Primer izolasyonda besiyerlerinden en az biri selektif olmalı !

Hızlı kültür sistemleri

- İzolasyon süresi kısa
- İzolasyon oranı yüksek

Sıvı, katı, bifazik besiyerleri

- Gaz basıncındaki değişiklikler
- CO₂ oluşumu
- O₂ kullanımı

Fluorometrik veya kolorimetrik olarak ölçülür.

CDC → **Sıvı + katı besiyeri kombinasyonu**

Mikobakterilerin izolasyon şansı artıyor.

Bactec 460 TB (Becton Dickinson Diagnostic Instruments, Sparks, MD)

- Yarı otomatize
 - İzolasyon, identifikasyon, duyarlık deneyi
 - Bactec 12B (Middlebrook 7H12)
 - Besiyerinde ^{14}C işaretli palmitik asit
↓ kullanımı
 $^{14}\text{CO}_2 \rightarrow$ 0-999 sayısal değerleri arasında
üreme indeksi olarak ölçülmesi
 - Ekimden önce besiyerlerine polimiksin B, azlosilin, nalidiksik asit, trimetoprim, amfoterisin B (PANTA)
 - Radyoaktif madde
 - Çapraz kontaminasyon
- Dezavantaj



Tam otomatize sistemler

- **Versa TREK (Myco-ESP II)** (Trek Diagnostics, Inc., Westlake, Ohio)
- **MB/Bac T** (BioMerieux, France)
- **Bactec 9000 MB** (BD Biosciences, Sparks, MD)
- **Bactec Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) 960** (BD Biosciences, Sparks, MD)

Versa TREK (Myco-ESP II)



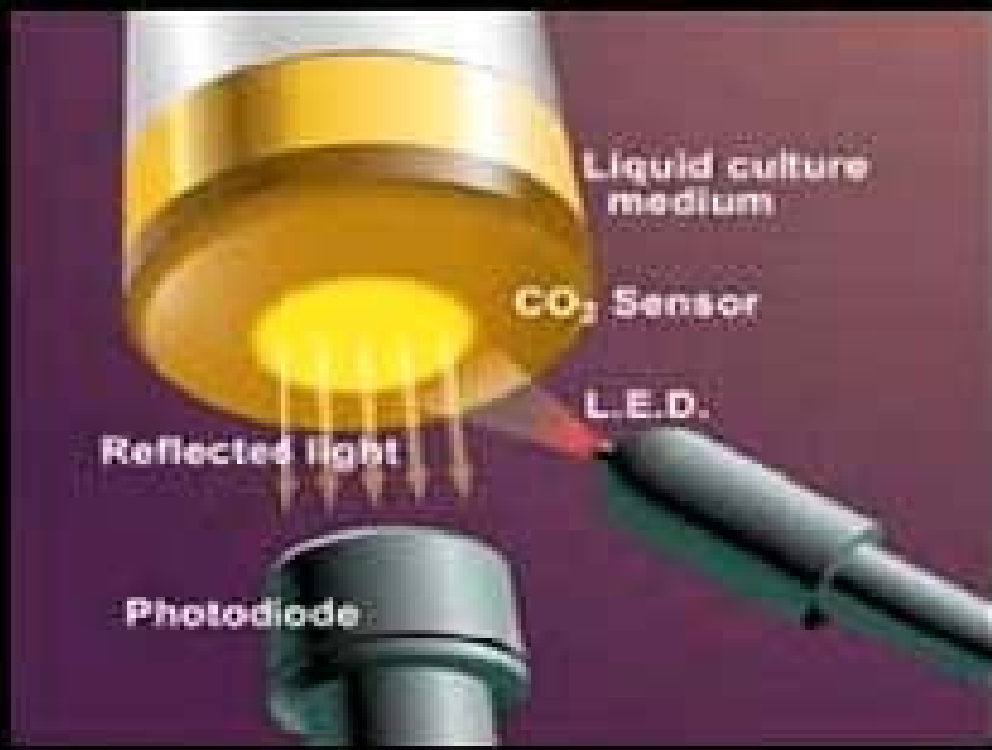
- Selüloz sünger
- Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri
- Kan ve kemik iliği dahil tüm örnekler için uygun
(EDTA veya SPS'li tüpe alındıktan sonra ekimi uygun)
- Ekimden önce oleik asit-albumin-dekstroz-katalaz (OADC)
- Antibiyotik karışımı
- Mikobakterilerin üremesi sonucu oluşan gaz basıncındaki değişiklikler ölçülerek (her 24 saatte) değerlendirme yapılır.
- Gaz basıncındaki değişiklik grafiksel olarak bilgisayarda görüntülenir.

MB/Bac T (Bac T/ALERT MB)

- Besiyerinin dip kısmında kolorimetrik bir sensor içerir.
- Oluşan CO₂ düzeyini ölçerek üremeyi değerlendirir.
- 120-240 kapasiteli bir sistem
- Steril olmayan örnekler ekilmeden önce antibiyotik karışımı (amfoterisin B, azlosilin, nalidiksik asit, polimiksin B, trimetoprim)

Steril örnekler ekilmeden önce reconstitution sıvısı (tween, gliserol, amarant) ilave edilir.

- Kan dışındaki tüm örnekler için uygun



Bactec 9000 MB



- Oksijen kullanımı fluoresans ile belirlenir.
- Modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri
- Ekimden önce besiyerine PANTA
- Balgam + diğer solunum yolu örnekleri için **Myco F/sputa**, kan ve diğer steril örnekler için **Myco F/lytic**

Bactec MGIT 960

- Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri
- Besiyerinin dip kısmında oksijene duyarlı rutenyum metal kompleksi içeren silikon bulunur.

Üreme yoksa oksijen varlığına bağlı olarak → silikon tabakaya gönderilen UV ışınına karşı floresans oluşmaz.

Üreme varsa oksijen kullanılması sonucu → UV ışınına karşı floresans oluşur.

- Oluşan floresans miktarı üreme indeksi olarak değerlendirilir.
- Ekimden önce besiyerlerine OADC ve PANTA ilave edilir.
- Manuel olarak kullanılmaya da uygun.
- Kan dışındaki tüm örnekler



Manuel sistemler

- **Septi-Check AFB** (BD Biosciences, Sparks, MD)
- **MGIT** (BD, Biosciences, Sparks, MD)
- **MB Redox** (Biotest Diagnostics Corp., Danville, NJ)
- Düşük kapasite ile çalışan laboratuvarlarda tercih edilir.

Septi-Check AFB

- Bifazik bir kültür sistemi
- Sıvı besiyeri (Middlebrook 7H9)
- Üç tip katı besiyeri (L-J, Middlebrook 7H11, çukulatamsı agar)
- Çukulatamsı agar kontaminasyonu belirlemek amacıyla kullanılır.
- Ekimden sonra besiyerleri ilk 24 saat ters olarak bekletilir → sonra dik konuma getirilir.
- Kültür süresince besiyerleri hafifçe çalkalanarak katı-sıvı besiyerleri temas ettirilmelidir.
- Kan dışındaki tüm klinik örnekler için uygun

MB Redox

- Cihaz gerektirmeyen bir sistem
- Antibiyotik karışımı ve renksiz tetrazolyum tuzu içeren modifiye Kirchner besiyeri kullanılır.
- **Tetrazolyum tuzu** (Mikobakterilerin redox sistemi ile indirgenir) → **Formazon** (pembe, kırmızı, menekşe rengi)
→ Hücre yüzeyinde granüler formda birikir → Renkli mikrokoloniler → Makroskopik olarak gözlenir.