

Mikobakteriyel İnfeksiyonların Laboratuvar Tanısı

LABORATORY DIAGNOSIS OF MYCOBACTERIAL INFECTIONS

Nuran ESEN, Nuran YULUĞ

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Tüberküloz, bilinen en eski infeksiyon hastalığı olmakla beraber, hala insanları etkileyen ve yılda yaklaşık olarak üç milyon kişinin ölümüne yol açmaktadır. Son yıllarda özellikle AIDS olgularına bağlı mikobakteriyel infeksiyonlarda artış gözlemlenmektedir ve antitüberküloz ilaçlara dirençli suşların yaygınlaşması nedeni ile günümüzde önemini korumaktadır. Bu duruma paralel olarak tüberkülozu hızla tanı, tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıklar konusunda önemli gelişmeler izlenmektedir. Bu derleme mikobakteriyoloji laboratuvarında örneklerin işlenmesi, mikroskopik inceleme, izolasyon, identifikasiyon ve duyarlılık testleri ile moleküler yöntemleri literatür işliğinde hatırlatmayı amaçlamaktadır.

Anahtar sözcükler: Mikobakteriler, izolasyon, identifikasiyon, duyarlılık testleri, moleküler yöntemler

SUMMARY

Although tuberculosis has been a well-known infectious agent for ages, incidence is still increasing and causes 3 million deaths every year. In the last decade a significant increase in the number of mycobacterial infected patients, related to AIDS and multi-drug resistant strains has been observed. For this reason mycobacterial infections are still considered to be important diseases. In parallel to this situation recent technological advances in the clinical mycobacteriology laboratory have led to faster detection, identification and drug susceptibilities of tuberculosis. In this review several aspects of the specimen processing, identification, isolation, susceptibility testing and molecular methods of mycobacterium are discussed in the light of recent literature.

Key words: Mycobacteria, isolation, identification, susceptibility testing, molecular methods

Nuran ESEN
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik
Mikrobiyoloji AD.
35340 İzmir
Tel: 0232 412 4508
Fax: 0232 259 0541
e-mail: nuran.esen@deu.edu.tr

Mikobakteriyel infeksiyonlar dünyada her yıl yaklaşık olarak sekiz milyon yeni olgunun ortaya çıkmasına ve üç milyon kişinin ölümüne neden olmaktadır. 1980'li yıllarda itibaren olgu sayısında her yıl ortalama %3-6 oranında artış gözlemlenmektedir. Tüberküloz, özellikle gelişmekte olan ülkelerin önemli sağlık sorunuştur. İleri ülkelerde ise göğler, immun sistemi baskılanan hastalıklar, özellikle AIDS nedeniyle *Mycobacterium tuberculosis* ve fırsatçı mikobakterilere bağlı infeksiyonlar giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Artan direnç ve yeni mikobakteriyel infeksiyonlar, tanı, tedavi ve korunumda yeni gelişmeler gerekliliğini gündeme getirmektedir (1,2).

Mikobakteriler karakteristik olarak aside dirençli, zorunlu aerop, hareketsiz, kapsülsüz, spor oluşturma yeteneği 0,2-0,6 x 1-10 μ m boyutlarında, geç ve güç üreyen basillerdir. Hücre duvarının en önemli kısmını mikolik asit olan kompleks lipitler, ayrıca türde özgü mikozidler, wax D, kord faktörü (trehaloz 6,6'-dimikolat) ve sulfolipitler oluşturur. Kuru ağırlığının %30-60'ını oluşturan lipitler, mikobakterilere hidrofobik özellik kazandırırlar ve bu nedenle birçok dezenfektan direnç gösterirler. Gram ve Giemsa gibi sık kullanılan anilin boyalarla da boyanmazlar. Karbolfüksin ile boyandıktan sonra asit alkol uygulanmasında diğer bakteriler

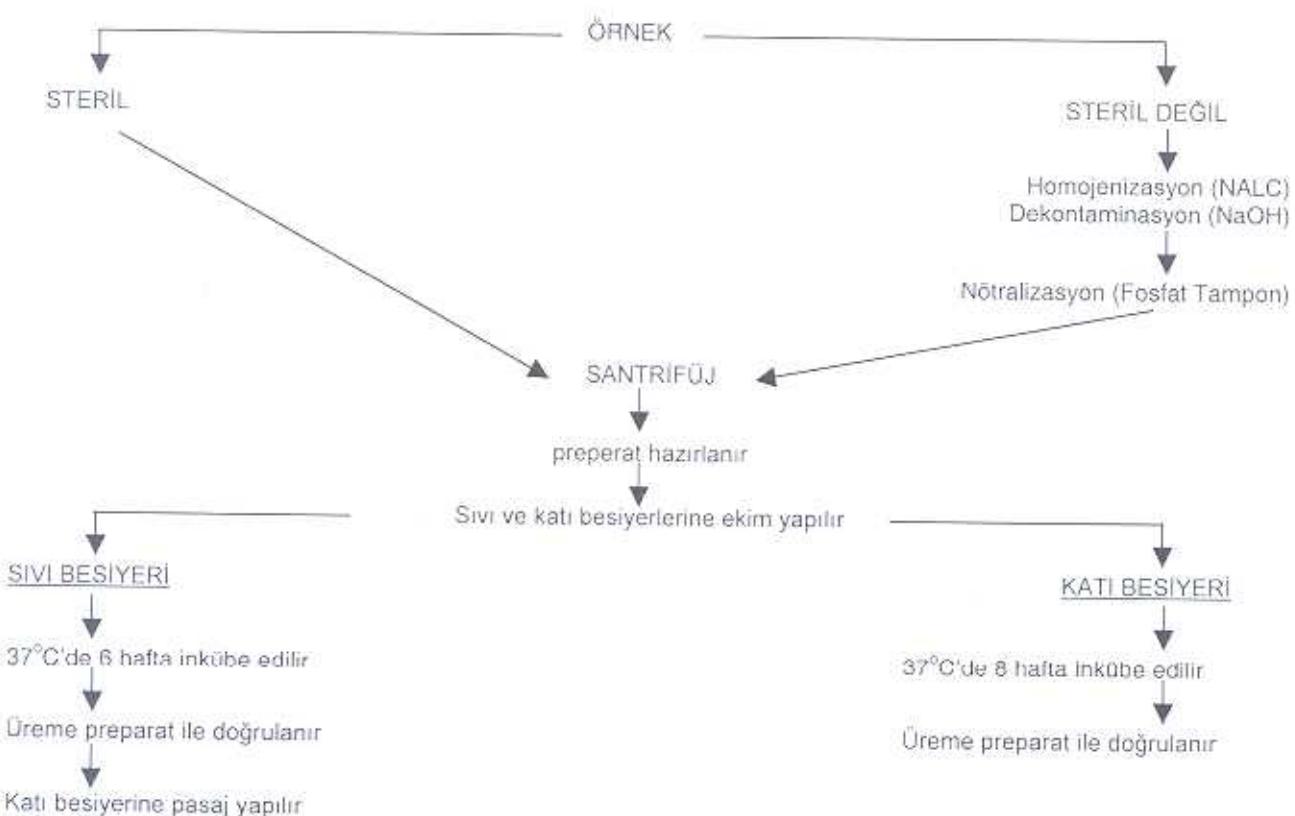
boyayı bırakırken mikobakteriler bırakmazlar (2-4). Mikobakteriyel infeksiyonlar ileri derecede bulaşıcı infeksiyonlar grubunda olduklarından, bu etkenle ilgili tüm çalışmalar güvenlik kabininde yapılmalıdır.

Örneklerin İşlenmesi

Kan, BOS (beyn omurilik sıvısı), plevra sıvısı gibi steril bölgelerden alınan örnekler genellikle az sayıda basit içerdiklerinden santrifüj ile konsantr edilirler. Normal flora içeren bölgelerden alınanlar ise laboratuvara ulaşığında önce diğer mikroorganizmaların üremelerini engellemek amacıyla dekontaminasyon edilirler. Gelen örnekler sıkılıkla balgam, idrar, bronkoalveolar lavaj, tride açık sıvısı, doku örnekleri, kan ve diğer vücut sıvılarıdır. Dekontaminasyon ve hemojenizasyonda en sık N-acetil-L-sistein (NALC) - NaOH (Sodyum hidroksit) kullanılır (Şekil 1). NALC, muhafizik bir ajan olup mikobakteriler için yüksek konsantrasyonlarda toksik etkiye sahip olan NaOH'ın

son konsantrasyonunu da %1'e indirebilmektedir. Asetil sistein solüsyon içinde aktivitesini hızla kaybettiği için bu solüsyon günlük hazırlanmalıdır. Ayrıca dekontaminasyon işlemlerinde zefiran trisodium fosfat, NaOH, oksalik asit, sülfürük asit, setilpridinyum klorit - sodyum klorit solüsyonları da kullanılabilir. NaOH mikobakteriler üzerine toksik etkiye sahip olduğundan çalışmalardaki 15-20 dakikalık zaman limiti kesinlikle aşılınamalı ve daha kuvvetli dekontaminasyon gerektiği durumlarda süre değil NaOH konsantrasyonu artırılmalıdır. Daha sonra 0,067M fosfat tamponu eklenerek NALC-NaOH'in mikobakterilere zarar vermesi engellenmelidir (2,5,6).

İşlemden kullanılan santrifüj mutlaka soğutmalı olmalıdır. Santrifüjin 8-10°C'de yapılması ile mikobakteriler üzerine öldürücü etki azalmakta, standart santrifüjler ise ısının artmasına ve bu nedenle mikobakterilerin ölmesine neden olmaktadır (5).



Şekil 1. Mikobakterlerin izolasyonu için işlemenmesinde izlenecek akış şeması

Direkt Bakı

Mikobakterilerin laboratuvar tanısında ilk olarak örnekte direkt mikroskop ile asidorezistan basil (ARB) aranır. Günümüzde CDC (Centers for disease control) ömek alındıktan sonra, 24 saat içinde ARB için direkt mikroskopik baktı sonucunun rapor edilmesi gerektiğini bildirmektedir (7,8). Çökeltiden hazırlanan preparatlar alevde tespit edildikten sonra Ziehl-Neelsen, Kinyoun veya Auromin-Rhodamin ile boyanır. Ziehl-Neelsen boyasında karbol fuksin ısıtularak uygulanır ve ardından, preparat asit alkoller dekolorize edilerek metilen mavisiyle boyanır. Kinyoun boyasında karbol fuksin içeriğindeki bazik fuksin ve fenol daha konstantredir, ısıtulmadan uygulanır, diğer aşamalar ise Ziehl-Neelsen boyası ile aynıdır. Her iki boyamada preparatlar ışık mikroskopunda, Auromin-Rhodamin ile boyama ise floresan mikroskopta değerlendirilir. Präparata ARB görüldüğünde kantitasyon yapılmalı ve boyama yöntemi belirtilmelidir. Hızlı bir teknik olmasına rağmen miliyirde bakteri sayısı 10.000'in üzerindeki örneklerde pozitif sonuç verdiğiinden duyarlılığı düşüktür (2,3,6).

Besieverleri ve İnkübasyon

Mikobakterilerin optimal üreme isıları genellikle

35-37°C'dir. *M.marinum*, *M.ulcerans*, *M.chelonae* ve *M.huemophilum* gibi, deri ve yumuşak dokuda infeksiyonlara neden olan etkenlerin optimal üreme isıları daha düşük olduğundan ekim yapılan ikinci besieverleri 25-33°C'de inkübe edilmelidir. Mikobakterilerin jenerasyon süresi 18-20 saat olduğundan, kültürler 6-8 hafta süreyle inkübe edilmelidir. Üremelerinin logaritmik fazında ortamda %5-10 CO₂ bulunması zorunlu aerop olan mikobakterilerin üremelerini hızlandırır. Direkt bakıda ARB olumlu bulunan ve deri lezyonlarından hazırlanan kültürlerin inkübasyon süreleri 12 haftaya uzatılmalıdır (2,3,5).

Mikobakterilerin üretilmesinde sıvı (Middlebrook 7H9, Dubos Tween-albumin) veya katı besieverleri kullanılmaktadır. Katı besieverleri, yumurta ve agar bazlı olmak üzere ikiye ayrılr. Yumurta bazlı besieverlerinden en sık Löwenstein Jensen (LJ) olmak üzere, Petriagnau ve American Thoracic Society besieverleri de kullanılmaktadır. Middlebrook 7H10 ve 7H11 ise agar bazlı besieverlerindendir. Yumurta ve agar bazlı besieverlerinin de avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır (Tablo 1). İzolasyonda en az bir katı ve bir sıvı besieverinin birlikte kullanılması önerilmektedir (5,6).

Tablo 1. Yumurta ve agar bazlı besieverlerinin avantaj ve dezavantajları

	Avantajlar	Dezavantajlar
Yumurta bazlı besieverleri	<ul style="list-style-type: none"> Buzdolabında bozulmadan önce saklanabilir Hazırlama sırasında kontaminasyon şansı düşüktür Birçok mikobakterinin üremesine uygun dur 	<ul style="list-style-type: none"> Kontaminasyon olduğunda tüm yüzeye yayılır Ilaç duyarlılıklar için uygun değildir. İlaçların konsantrasyonları istenilen değere göre düşer, bazı ilaçlar ise fosfolipit gibi yumurta komponentleri ile etkileşime girebilir
Agar bazlı besieverleri	<ul style="list-style-type: none"> Besiyeri şeffaf olduğundan mikroskopta 30-60x erken gözlemeyle olanağ sağlar %10 CO₂ içeren ortamda inkübasyon, izolasyon süresini kısaltır Ilaç duyarlılıklarında tercih edilir Kimyasal formül basit olduğundan kontaminasyon olma olasılığı düşüktür 	<ul style="list-style-type: none"> Plaklar döküldüğünde, uzun süreli inkübasyon sırasında nem kaybı önlenmezse kurur Güneş ışığına maruz kaldığında formaldehit gaz salımı artar ve mikobakterilerin üremeleri engellenir Zenginleştirici aseptik şartlarda eklenmelidir

Septi-Chek MB (Becton Dickinson) ticari olarak satılan besiyerlerindendir. Bu sisteme Middlebrook 7H19 sıvı besiyeri ve Middlebrook 7H11, modifiye LJ ile kontaminant kontrolü için çukulata ağardan oluşan üç çeşit katı besiyeri bulunmaktadır (2).

Mikobakterilerin üretilmesinde hızlı yöntemler geliştirilmektedir. BACTEC 460 TB (Becton Dickinson) sisteminde kullanılan BACTEC 12 B şişeleri, Middlebrook 7H19, kazein hidrolizat, karalaz ve ^{14}C işaretli substrat (palmitik asit) içermektedir. Ayrıca ekim yapılmadan önce kontaminasyonun önlenmesi amacıyla PANTA (polimiksin B, amfoterisin B, nalidiksik asit, trimetoprim, azlosilin) eklenmektedir. Mikobakterilerin substrati metabolize etme yeteneğine bağlı olarak oluşan $^{14}\text{CO}_2$, BACTEC 460 cihazı tarafından kuantitatif olarak ölçülebilmekte ve ortalama 9-14 günde sonuç vermektedir. Çok düşük düzeyde de olsa radyoaktif madde içeren bu sistemin değerlendirilmesi için cihaza gereksinim vardır. Ayrıca altı haftalık inkuşasyon süresince en az sekiz kez ölçüm yapılarak izlendiğinden,igne ile çapraz kontaminasyonu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (9-13).

MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) 960 (Becton Dickinson), radyometrik olmayan yöntemlerindendir. Middlebrook 7H9 besiyeri içinde, sili-kona bağlı ve oksijene duyarlı floresan indikator bulunmaktadır. Oksijenin metabolik olarak tüketilmesi ile tüpler, 365nm UV ışığında floresan yerirler. Kontaminasyon riski düşük olan bu sistem kısa sürede somuç vermekte ve ilaç duyarlılığında kullanılabileceği söylemektedir. Sonuç wood lambasında da değerlendirilebliği için cihaz şart değildir. Otomatize edilmesi kullanım kolaylığı sağlamıştır (11).

MB/BacT Alert (Organon-Teknika) sisteminde üremenin varlığı kolorimetrik olarak saptanmaktadır. Her şişenin tabanında bulunan katı fazdaki sensör, üreven mikobakterilerin oluşturduğu CO_2 ile yesilden sarıya dönünen kolorimetrik indikator içermektedir. Şişelerin inkuş'e edildiği aletin her bölümünü reflektometre ve ölçüm üniteleri içermekte ve değerler 10 dakikada bir bilgisayara iletilmektedir (12).

ESP Culture System II'de (Accumed) modifiye Middlebrook 7H9 besiyeri kullanılmaktır, mikobakterilerin üremesi ile sıvı besiyeri üzerindeki boşlukta oluşan gaz ve basınç değişiklikleri ölçülerek değerlendirme yapılmaktadır (6).

BACTEC 9000 MB (Becton Dickinson) radyoaktif madde içermeyen, floresan temelne dayanan ve sürekli monitörize edilerek ölçülen bir sistemdir. Middlebrook 7H9 besiyerinde, kontamine mikroorganizmaların üremelerini baskılamak için anübiyotikler ve diğer ek maddeleri içermektedir. Bu sisteme oksijene duyarlı sensor kullanılmaktır ve mikobakterilere özgü çevresel parametreler hesaplanmaktadır (13).

Dio-TK kültür sistemi (Diomed), çoklu renk avıracı kimyasından yararlanarak hazırlanmış kırmızı renkli bir besiyeridir. Ekilen örnekte mikobakterilerin varlığında oluşan metabolik ürünlerle besiyerinin rengi sarıya, diğer mikroorganizmalarla yeşile dönüşür. Bu besiyerinde kontaminasyon varlığı henüz mikroskopi yapılmadan saptanabilemektedir (14).

Identifikasiyon

Kültürde üreme saptanan ARB kolonilerin üreme hızları, koloni şekilleri ve oluşturdukları pigment dikkate alınmalıdır (6). Tanımlamada öncelikle *M.tuberculosis* kompleks ve TDM (tüberküloz dışı mikobakteri) ayrimının yapılması gerekmektedir. *M. tuberculosis* kompleksini *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. ulcerans*, *M. microti* ve *M. canetti* oluşturmaktadır (6,15). BACTEC 460 sisteminin geliştirdiği, *M. tuberculosis*'in diğer mikobakterlerden ayrimında kullanılan NAP (p -nitro - alfa - acetyl-amino-beta-hydroxypropionate) testi yaygın olarak kullanılmaktadır. *M. tuberculosis* izolatları NAP ile inhibe olurken tüberküloz dışı mikobakterilerin üremesi devam etmektedir. Ayrıca mikroorganizmaların katı besiyerinde üreme özellikleri veya sıvı besiyerinden hazırlanan preparatlardaki görünümleri de tanımlamada yol göstericidir. Örneğin sıvı besiyerlerinde ürediğinde hücre duvarında bulunan kord faktörünün nedeniyle düzenli dizilim gösterenler *M. tuberculosis*, kısa pleomorfik olanlarını *M. avium-intracellularare* kompleksi, daha aralıklı dizilim gösteren veya

büyük kümeler oluşturanların ise *M. kansasi* olabileceği düşünülmelidir (2,5,6).

Mikobakteriler türlerde göre değişen miktar ve çeşitlerde karetonoid pigment sentez ederler. *M. tuberculosis*, deveniyü renkli koloniler oluştururlar. TDM'ler oluşturdukları pigment ve üreme sürelerine göre dört gruba ayrırlar (Tablo II). Fotokromojenler, karanlıkta beyaz, krem veya boz renkte iken, aydınlatıkta limon sarısı pigment oluştururlar. Fotokromojenite testi genç, metabolik olarak aktif kültürlerde yapılmalıdır. *M. kansasi* gibi türler ışıkta hızla renk değiştirirken, *M. simiae* gibi bazı türler ise uzun süre ışıkla temasdan sonra uzun süre geçmedikçe renk değişikliği olmaz. Skotokromojenler hem karanlık hem de aydınlatıkta pigment oluştururlarsa da sürekli ışığa maruz kalınca pigment oluşumu artabilir. Fotokromojen olmayanlar ise genellikle pigment oluşturmasalar da ara sıra soluk pastel renklerden koyu portakal rengine kadar değişen aralıklar pigment oluşturabilirler (2,4-6).

Mikobakterilerin tanımlanmasında üreme hızları da önemlidir. İlk izolasyonda kullanılan dekontaminantlar bazı hızlı üreyenlerin bile üç haftada üremesine neden olmaktadır. Bu yüzden üreme süreleri, yapılan pasajlar ile saptanmalıdır. Hızlı üreyenler genellikle yedi günden kısa sürede ırterken, diğerlerinin üremesi için en az yedi günde gereklilikleri vardır (Tablo II) (2,5).

Nasın, tüm mikobakterilerin metabolik sentezindeki oksidasyon redüksiyon sırasında yer alır. Hemen tüm mikobakteriler niasinden nikotinik asit mononükleotid üretirken, *M. tuberculosis*'te metabolik yolun kapali olması en fazla miktrada masının birikmesine ve besiyerine salınmasına neden olmaktadır. *M. simiae*, *M. chelonae* chemovar *niacinogenes* ve BCG'nin bazı suşları da pozitif reaksiyon verdiginden, *M. tuberculosis* tanısında masın testi ile beraber, 68°C katalaz testi veya nitrat redüksiyon testi de uygulanmalıdır (Tablo III) (2,5).

Nitrat indirgeme testi; *M. tuberculosis*, *M. kansasi*, *M. szulgai*, *M. fortuitum* türlerinin tanımlanmasında çok değerlidir. Kültürün tazelığı, ısı, enzim inhibitörleri ve hidrojen iyon konsantrasyonu nitrat indirgemesini etkilemektedir. Coğu mikobakteriler pasajdan dört, hızlı üreyenler ise iki hafta sonra test edilirler (2,5,6).

Hücre içi çözülebilir enzim olan katalaz, hidrojen peroksidi su ve oksijene dönüştürmektedir. Oksijen kabarcıkları tepkimenin pozitif olduğunu gösterir. Özellikle tercih edilen ışıya dirençli katalaz testidir. *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. gastric*, *M. haemophilum*'un katalaz aktiviteleri, 68°C'de 20 dakikada inaktiv olur. Yarı kantitatif katalaz testinde, mikobakterilerin üretiltiği tüplere hidrojen peroksit eklenerek oluşan kabarcıklar ölçülür. Kabarcıklar 45mm'den az ise düşük katalaz, fazla ise yüksek katalaz olarak değerlendirilir (2,5).

Tablo II. Tüberküloz dışı mikobakterilerin sınıflandırılması

Runyon Grup No	Grup Adı	Organizmalar
I	Fotokromojenler	<i>M. kansasi</i> , <i>M. avium</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. intermedium</i> , <i>M. simiae</i>
II	Skotokromojenler	<i>M. gordoni</i> , <i>M. szulgai</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. interjectum</i> , <i>M. canetti</i> , <i>M. hiberniae</i> , <i>M. kubicae</i>
III	Fotokromojen olmayanlar	<i>M. avium-intracellulare kompleks</i> (MAC), <i>M. terrae kompleks</i> , <i>M. malmense</i> , <i>M. haemophilum</i> , <i>M. simiae</i> , <i>M. ulcerans</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M. gastric</i> , <i>M. genavense</i> , <i>M. flavigens</i>
IV	Hızlı üreyenler	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. fallax</i> , <i>M. phlei</i> , <i>M. thermoresistibile</i> , <i>M. vaccae</i> , <i>M. ulcerans</i> , <i>M. peregrinum</i> , <i>M. mucogenicum</i>

Tablo III. Aynı grupta yer alan mikobakterilerin ayrimında kullanılan biyokimyasal testler

Mikobakteri Grubu	Biyokimyasal Testler
<i>M. tuberculosis</i> kompleks	Niasin, nitrat reduksiyonu, ısıya dirençli katalaz, <i>M. bovis</i> düşünüldüğünde TCH'ye duyarlılık
Fotokromojenler	Tween 80 hidrolizi, nitrat reduksiyonu, pirazinamidaz, 14 günlük arılsulfataz, üreaz, niasin
Skotokromojenler	Tween 80 hidrolizi, nitrat reduksiyonu, yarı kantitanif katalaz, üreaz, 14 günlük arılsulfataz
Fotokromojen olmayanlar	İsya dirençli ve yarı kantitanif katalaz, nitrat reduksiyonu, Tween 80 hidrolizi, üreaz, 14 günlük arılsulfataz, tellürit reduksiyonu
Hızlı üreyenler	MacConkey agar'da üreme, nitrat reduksiyonu, Tween 80 hidrolizi, 3 günlük arılsulfataz, demir alımı

M. bovis - *M. tuberculosis* ayrimi TCH (nöfen 2 karboksilik asit hidrazi) ilave edilen Middlebrook besiyerinde yapılmaktadır. Üç hafta inkübe edildikten sonra değerlendirilir. *M. bovis*, TCH'nin 1-5 µg/ml. gibi çok düşük konsantrasyonlarına hassastır. *M. tuberculosis*, izoniazide dirençli bazı *M. bovis* suşları ve diğer mikobakteriler genellikle TCH'ye dirençli olduklarıdan üremeye devam ederler (Tablo III) (2,5).

Pirazinamidin pirazinoik asit ve amonya deamidasyon tepkimesi bazı mikobakterilerin ayriçi tanısında kullanılmaktadır. İçinde pirazinamid ve piruvik asit gibi maddeler bulunan pirazinamidaz besiyerinde mikobakteriler üretildikten sonra ferrozamonyum sulfat damlauldığında gözlenen pembe renk oluşumu ile test pozitif kabul edilir. Bu test kullanılarak *M. marinum*, *M. kansasi* den, *M. tuberculosis*, *M. avium* kompleks ise *M. bovis*'den ayırt edilebilir (2,5).

Bazı mikobakteriler tarafından üretilen lipaz enzimi sayesinde Tween 80 (polioksietilen sorbitan monooleat), oleik asit ve polioksietilen sorbitol'e hidroliz olur. Besiyerine eklenen nötral kırmızı, Tween 80 hidroliz olmamış ise bağlanarak sarı renge dönüşürken, hidroliz olmuş ise renk kırmızı kalır. Bu test ile genellikle saprofitler pozitif, patojenler ise negatif sonuç verirler (2,5,6).

Mikobakterilerin demir alımı testinde, ferrik-amonyum sitratı demir okside dönüştürme yeteneğine bakılır. Koloniler ve besiyeri, kırmızımsı kahverengi paslı bir renge dönüşür. Bu test ile *M. avium* ve *M. abscessus* genellikle negatif, *M. fortuitum* ve hızlı üreyenlerin çoğu pozitif sonuç verir. Yavaş üreyenlerin demir

oksit biriktirebilmeye yeteneği yoktur (2,5).

Kristal violet içermeyen MacConkey agar hızlı üreyen mikobakterilerin ayrimında kullanılır. Potansiyel patojen olarak kabul edilen *M. fortuitum* kompleksi bu besiyerinde genellikle ürerken, saprofit olarak kabul edilenler inhibe olurlar. Ancak bu besiyerinde *M. smegmatis* suşlarının %23'ü üreyebildiğinden, *M. smegmatis* ile *M. fortuitum*'u birbirinden ayırmak için 3 günlük arılsulfataz testi de yapılmalıdır (Tablo III) (2,5).

Arılsulfataz enzimi serbest fenolftalein oluşturmak için besiyerine eklenen tripotasyum fenolftalein disulfatta bulunan sulfat grubu ile aromatik zincir arasındaki bağın hidrolyzlenmesinden sorumludur. Ortamda alkali ilave edildiğinde kırmızı renk oluşumu serbest fenolftalein varlığının gösterir. Bu enzim birçok mikobakteride bulunmakta, belirlenme süreçlerindeki farklılık ayırt sağlamaktadır (2,5,6).

Sodyum klorur (NaCl) varlığında üreyebilmeleri de mikobakteri türlerinin tanımlanmasında kullanılmaktadır. Üreyen kolonilerden LJ ve %5 NaCl eklenecek hazırlanan LJ besiyerlerine yapılan pasajlar dört hafta sonra değerlendirilir. *M. triviale* NaCl varlığında ürerken *M. chelonae* subsp. *chelonae* üreyemez (2,5).

Bazı mikobakterilerde bulunan tellürit reduktaz enzimi, renksiz olan potasyum tellüriti metalik siyah telluryum çökeltlerine indirger. *M. avium-intracellulare* kompleksi 3-4 günde pozitif sonuç vererek diğer fotokromojen olmayanlardan ayrılır (2,5).

Skotokromojenler ve fotokromojen olmayan mikobakteriler üreyi hidrolize edebilmeye özelliklerine göre

ayırı edilirler. *M. avium*, *M. szulgai*, *M. flaveescens*, *M. bovis*, *M. gasterium* ve *M. tuberculosis* pozitif sonuç verirken, *M. avium* kompleks, *M. scrofulaceum*, *M. terrae* kompleks ve *M. gordonae* negatif sonuç verir (Tablo III) (2,5).

Sodyum sitrat, manitol veya inositolun tek karbon kaynağı olarak kullanıldığı testler ile bazı hızlı üreyen mikobakterilerin ayrimı yapılabilmektedir (5).

Duyarlılık Testleri

Dünya Sağlık Örgütü izole edilen her *M. tuberculosis* suşuna duyarlılık testinin yapılması önermektedir. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (16) birinci basamak antituberkuloz ajanlarına duyarlılıkların belirlenmesinde referans olarak agar proporsiyon ve BACTEC 460 TB yöntemlerini önermektedir. İlaç duyarlılıkları; E-test, kolorimetrik yöntemlerden Alamar mavisi ve MTT, MGIT 960, MB/BacT, ESP Culture System II ve Dia-TC gibi hızlı izolasyon sistemleriyle de belirlenebilmektedir (6,13,17-20).

Rutin laboratuvarlarda en sık test edilen antimikobakteriyel ajanlar; streptomisin, izoniazid, rifampisin ve etambutoldur. Bu ajanların Middlebrook 7H11 besiyerinde yapılan agar proporsiyon yönteminde kritik konsantrasyonları sırasıyla; 2,0, 0,2, 1,0, 5,0 µg/ml. olarak önerilmektedir. Sonuçlar üç hafta inkübe edilip, kontrol besiyerinde yeterli üremenin değerlendirilmesiyle verilir. Duyarlılık testleri mutlaka ilaçlara duyarlı H37Rv ATCC 27294 suşu ile beraber uygulanmalı ve ilaç içeren besiyerlerindeki üreme, kontrol besiyerindeki üremenin %1inden fazla ise direnç kabul edilmelidir (5).

Moleküler Yöntemler

Mikrobiyolojik tanı geleneksel yöntemlerle zahmetli ve zaman alıcı olan mikobakteriler moleküler yöntemlerle çok kısa sürede saptanabilmektedir. Moleküler yöntemler tanrı ve duyarlılıkların belirlenmesinde geleneksel yöntemlere alternatif olarak değil, bu testlerle birlikte uygulanmaları önerilmektedir (21,22). PCR yöntemiyle, direkt örnekten *M. tuberculosis* varlığını saptayan birçok çalışma bulunmaktadır. Klinik örneğe sonuç verilmesinde standartizasyon sorunları yaşadığı için günümüzde daha çok FIA (food and

drug administration) tarafından onaylı MTD (*Mycobacterium tuberculosis* Direct Test) ve Amplicor gibi standartize ticari sistemler kullanılmaktadır. Bu testlerde; direkt bakti ve kültürün yapılabildiği merkezlerde, bir yıldır ilaç kullanmayan hastaların ARB pozitif solunum yolu örneklerinde kullanılması koşulu ile onay verilmiştir. MTD yöntemi ek olarak ARB negatif örnekler için de onay almıştır (22).

Moleküler yöntemler mikobakterilerin sadece klinik örnekten tamında değil, tür düzeyinde tanımlanması, ilaç direncinin belirlenmesi ve epidemiyolojik araştırmalarda da kullanılmaktadır. Hızlı testler takiben kullanılması çok yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu gibi çok kısa sürede sonuçlanmaktadır (23,24). Tür düzeyinde tanımlamalarda altın standart olan otomatik DNA dizi analizinde özellikle *hp65* geninin kullanılması ile tür özgül alelik varyasyonlar 48 saat içinde belirlenebilmektedir (23). Bu yöntem çok yüksek maliyet gerektirdiğinden alternatif testler uygulanmakta ve arayışlar sürdürmektedir. *hp65* gen bölgesinin kullanıldığı PRA (PCR - REA - Restriksiyon enzim analizi) yöntemiyle tür tanımı kısa sürede ve hibridizasyon gibi zahmetli işlemleri içermeden yapılabilmektedir (25). Özgül hibridizasyon problemleri ile de tür tamı yapılmamaktadır. Inno-LiPA yönteminde, nitrosellüloz membran üzerinde bulunan probalar ile hibridizasyon gerçekleşmektedir. Accu-Probe ise kısıtlı sayıda probun ayrı ayrı uygulanması ile tanımlama yapmaktadır (22,26).

Moleküler yöntemlerle saptanan ilaç direncine neden olan mutasyonlar, direnci belirlemekle birlikte fenotipik dirence neden olmayan sessiz mutasyonları da saptanmaktadır. Mutasyonun saptanamaması durumunda ise izolat duyarlı olabileceği gibi başka bölge mutasyonları veya diğer mekanizmalar nedeniyle dirençli olabilmektedir. Yalancı negatiflik ve pozitiflik olasılığına rağmen ilaç direncinin moleküler yöntemlerle kısa sürede saptanması tedavi protokollerini etkileyebilmektedir. Rifampine dirençli mutasyonlar; genellikle, *rpoB*'nın 81 bazçiftlik gen bölgesinde gözlenmiş ve bu bölge RRDTR (rifampisin direncini belirleyen bölge - rifampin resistance determining region) olarak adlandırılmıştır. İlaç direncini belirlemeye; DNA dizi

analizi referans yöntemdir. Ayrıca SSCP (Single strand conformation polymorphism), heterodupleks analiz, ters hibridizasyon yöntemi ve FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) ile de moleküller olarak ilaç direnci moleküller olarak belirlenebilmiştir (27,28).

Salgınlarda kaynağın, iyatrojenik olguların, çapraz kontaminasyonların belirlenmesi ve reinfeksiyon reaktivasyon ayrimı için moleküller epidemiyolojik çalışmalar yapılmaktadır. Bu amaçla IS6110 REA ile birlikte, PGRS (polymorphic GC rich sequence), spoligotyping (spacer oligotyping) ve MIRU-VNTR (variable number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units) yöntemlerinden en az ikisinin birlikte uygulanması önerilmektedir (29,30).

Uzun ve komplikasyonlara yol açabilen protokoller ile sağlanabilen tüberkülozu laboratuvar bulguları gerek tanıda gerekse duyarlılık testleri nedeniyle takipte çok değerlidir. Geç ve güç üreyen bu mikroorganizma ile oluşan infeksiyonları kısa sürede tanımlayan ve ilaç duyarlılıklarını belirleyen güvenilir yöntemlerin geliştirilmesine gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. Kapur V, Whittam TS, Musser JM. Is *Mycobacterium tuberculosis* 15,000 years old? *J Infect Dis* 1994; 170:1348-1349.
2. Metchock BG, Nolte PS, Wallace Jr RJ, *Mycobacterium*, In: *Manual of Clinical Microbiology*, In: Murray PR, Baron EJ, Pfaffer MA, Tenover FC, Yolken RH eds, 7th Edition, Washington DC: ASM Press, 1999; 399-437.
3. Willett HP, *Mycobacterium*, In: Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wulfert CM, eds. *Zinsser Microbiology*, 19th Edition. Connecticut: Prentice-Hall International Inc, Appleton & Lange, 1988; 423-448.
4. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS et al. *Medical Microbiology*, 3rd Edition. Missouri: Mosby, Inc, 1998; 319-330.
5. Kent PT, Kubica GP, Division of laboratory training and consultation laboratory program office. Public health mycobacteriology, a guide for the level III laboratory, US department of health and human services, Public health service, Centers for disease control, Atlanta, Georgia, 1985.
6. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Mycobacteria*, In: Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, 11th Edition. Missouri: Mosby, Inc. 2002; 538-571.
7. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE et al. The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J Clin Microbiol* 1993; 31:767-770.
8. Salfinger M, Pfiffer GE. The new diagnostic Mycobacteriology laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13: 961-979.
9. McCarter YS, Ratkiewicz IN, Robinson A. Cord formation in Bactec medium is a reliable, rapid, method for presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2769-2771.
10. Siddiqi SH. Bactec® TB system, product and procedure manual. Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, Md. 1989.
11. Comfield DB, Beavis KG, Greene JA et al. Mycobacterial growth and bacterial contamination in the *Mycobacteria* growth indicator tube and Bactec 460 culture systems. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2068-2071.
12. Rohner P, Ninet B, Metral C et al. Evaluation of the MB-BacT system and comparison to the Bactec 460 system and solid media for isolation of mycobacteria from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1997; 35:3127-3131.
13. Pfiffer GE, Cieslak C, Welscher HM et al. Rapid detection of *Mycobacteria* in Clinical specimens by using the automated Bactec 9000 MB system and comparison with radiometric and solid culture systems. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2229-2234.
14. Dio-TK kültür sistemi (ITGV ve Tübítak destekli ARGE Projesi) Araştırma önergesi, Diomed AS, İstanbul, 2001.
15. Goh SK, Legrand E, Sola C et al. Rapid differentiation of "*Mycobacterium canetti*" from other *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms by PCR restriction analysis of the *hp65* gene. *J Clin Microbiol* 2001; 39:3705-3708.
16. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia, and other aerobic Actinomycetes; Tentative Standard, Second Edition NCCLS document M24T2, Pennsylvania

- USA 2002.
17. Joloba MI, Bajaksouzian S, Jacobs MR. Evaluation of E-test for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2000; 38:3834-3836.
 18. Alp A, Gunalp A. Mycobacterium tuberculosis'in anti-tüberküloz ilaçlara karşı duyarlılığının saptanmasında kullanılan üç yöntemin karşılaştırılması. *Mikrobiyoloji Bülten* 2000; 34:267-278.
 19. Poongladda S, Roengsanthia D, Arjratthanakool W et al. Rapid and simple MTB method for rifampicin and isoniazid susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002; 6:1118-1122.
 20. Walters SB, Hanna BA. Testing of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin by *Mycobacterium* Growth Indicator Tube method. *J Clin Microbiol* 1996; 34:1565-1567.
 21. Noordhoek GT, Kolk AH, Bjune G et al. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. *J Clin Microbiol* 1994; 32:277-284.
 22. Woods G. Molecular Methods in the detection and identification of Mycobacterial Infections. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123:1002-1005.
 23. Pai S, Esen N, Pan X et al. Routine rapid *Mycobacterium* species assignment based on species-specific allelic variation in the 65-kilodalton heat shock protein gene (*hsp* 65). *Arch Pathol Lab Med* 1997; 121:859-864.
 24. Scarpa C, Piccoli P, Rigon A et al. Direct identifi-
cation of mycobacteria from mb/bact alert 3d bottles: comparative evaluation of two commercial probe assays. *J Clin Microbiol* 2001; 39:3222-3227.
 25. Telenti A, Marchesi F, Balz M et al. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1993; 31:175-178.
 26. Miller N, Infante S, Cleary T. Evaluation of the LiPA Mycobacteria Assay for identification of Mycobacterial species from BACTEC 12B bottles. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1915-1919.
 27. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis* 1998; 79:3-29.
 28. Drobniewski FA, Watterson SA, Wilson SM et al. A clinical, microbiological and economic analysis of a national service for the rapid molecular diagnosis of tuberculosis and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Microbiol* 2000; 49:271-278.
 29. Cowan LS, Mosher L, Diem L et al. Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1592-1602.
 30. Dale JW, Al-Ghusein H, Al-Hashmi S et al. Evolutionary relationship among strains of *Mycobacterium tuberculosis* with few copies of IS6110. *J Bacteriol* 2003; 185:2555-2562.