

Tüberküloz Bakteriyojisi

Uzm.Dr.Sefa

L.ÖZŞAHİN*

TÜBERKÜLOZ BASİLİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Işık Mikroskopisi

Mikobakterium tüberkülozis, 2-5 µm boyunda, 0.2-0.3 µm kalınlığında İnce bir çomaktır. Hareketsiz, kapsülsüz, bazıları sporludur. Alışılmış boyalarla güçlükle boyanırlar, fakat klasik karboi fuksin ya da Ziehl-Nielsen (Z-N) metodu ile boyandıklarında alkolle ya da kuvvetli mineral asitlerle boyalarını vermezler; bu nedenle asido-alkalo rezistans (AAR) diye tanımlanırlar. Işık mikroskopunda düz ya da hafif eğri kırmızı-pembe çomakçıklar şeklinde bazen tek bazen de birkaçı bir arada görülürler. Florokrom yöntemi ile incelendiklerinde mavi ışıkta floresan gösterirler. Patolojik numunelerde, Z-N yöntemi ile boyandıklarında kültürde bulunandan daha uzun, daha eğridirler, bazen tek, bazen kümeler halinde ya da cord şeklinde görülebilirler. "Cord factor" birçok mikobakterilerin yüzeyinde bulunan bir lipid materyeldir (trehalose 6.6-dimicolate); bu madde M.tüberkülozis basilinin cord şeklinde üremeleri ve bir arada durmalarını sağlar (1). Yine kemoterapi altındaki hastalardan alınan numunelerde M.tüberkülozis muhtemelen canlılığını yitirmesine bağlı olarak homojen boyanmazlar. İNH, tiamid ve hatta yüksek doz penisilin tüberküloz basiline AAR özelliğini kaybettirebilir (2).

Elektron Mikroskopi

Tüberküloz basilinin hücre duvarı 20 nm kalınlığında olup elektron-dense iç tabaka ve elektron-geçirgen dış tabakadan oluşur (3). Gram negatif bakterilerin tersine hücre duvarı etrafında membran yoktur.

Sitoplazmayı sınırlayan plazma membranı klasik üç tabakalı yapıdadır. Mikobakterinin sitoplazmasında fibriler bir kitle şeklinde DNA, çok sayıda ribozom, polifosfat granülleri, lipid damlacıkları ve vakuoller bulunur (2).

Hücre Duvarının Kimyasal Yapısı ve Bileşenleri

Mikobakterilerin duvar yapısı da temelde diğer bakteriler gibidir. N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asitin polimeri olan peptidoglikan iskeleti oluşturur. Mikobakterilerde daha spesifik olan, lipopolisakkarid yan zincirlerdir. Lipopolisakkaridler, arabinose ve galaktozdan oluşan dallı bir polisakkarid olan arabinogalaktan'dan yapılmıştır. Arabinogalaktan, mikobakterilerin yanı sıra Cornebakteriler'de ve Nokardialar'da da bulunur. Arabinogalaktan, peptidoglikan'a fosfodiester köprüleri ile bağlıdır. Arabinogalaktanların yan zincirlerindeki uç arabinase birimlerine mikolik asid diye adlandırılan bir grup uzun zincirli yağ asitleri kovalant bağlarla bağlanırlar. Yaklaşık 70 karbon atomu içeren bu yağ asitleri hücre duvarının kalınlığından ve bir ölçüde de hücrenin aside dirençli olmasından sorumludurlar (4).

Hücre duvarının dış tabakasından yukarıda sözedilenlerin dışında daha bir çok kompleks moleküller bulunmaktadır. Bunların arasında M.tüberkülozis ile enfekte edilmiş makrofaj kültürlerinde fagolizozom füzyonunu engellediği için virulansda rol oynadığı düşünülen sülfatidler ve sulfated acyl trehalose'lar vardır (2). Eskiden sadece virulan suşlara özgü olduğu düşünülen, bir trehalose dimycolate olan "cord factor"ün bütün mikobakteri türlerinde olduğu gösterilmiştir. En dış tabaka, peptidoglikolipidlerden ya da phenol-phthiocerol glycoside'lerden oluşan ve "mycoside"ler olarak adlandırılan bir yapıdır. Mycosideier ağ şeklinde lifset yapı gösterirler ve M.avium ve M.tuberculosis gibi hücre içi basillerde, basilin çevresini kapsül gibi saran saydam bir bölgenin görülmesine neden olur (4). Mycosideierin seroaglutinasyon tekniği ile mikobakterilerin tiplendirilmesi ve sınıflandırılmasında kullanılacak faj bağlayan birimler (phage-binding properties) içerdikleri gösterilmiştir (2).

Ayrıca mikobakteri suşlarında phthiocerol dimycoserosateier, triaçilgliserol'ler ve trigliserid'ler gibi balmumu

* SSK Ballıdağ Sanatoryumu, KASTAMONU

gösterilmiştir; bunlar hücre duvarının impermeabilitesini arttırmaktadır (2).

Hücre duvarı, kuvvetli tüberkülin benzeri reaksiyon veren proteinler ve peptidler de içerir,

Hücre duvarının kalınlığından ve çok miktarda lipid içermesinden (hücre duvarının %60'ını lipidler oluşturur) dolayı hidrofilik moleküllere karşı impermeabilitesi E.coli'den hatta P.aeruginosa'dan çok daha fazladır (5).

Gliserol ya da INH gibi küçük hidrofilik moleküller, Gram-negatif bakterilerdeki porlar gibi görev yapan duvar proteinlerine bağlanarak penetre olurlar. Buna karşın makrolidler ve Rifampin gibi hidrofobik moleküller ise hücre duvarı lipidlerinde çözünerek hücre içine girerler (2).

Mikobakteriyel Antijenler

Tüberküloz basilinin bulunmasından hemen sonra, R.Koch ısı ile öldürülmüş sıvı kültürden steril filtrat elde etmiş, adına da "old tüberkülin" (OT) demiştir. OT ile, enfekte bireylerde tüberküloz enfeksiyonu almamış olanlara oranla daha çabuk ve daha belirgin reaksiyon olduğu görülmüş ve intradermal cilt testi olarak tüberküloz enfeksiyonunun tanısında kullanılmaya başlanmıştır. Tüberküloz basilinin kaba bir ekstraktı olan OT bir çok antijen içermektedir ve daha sonraki araştırmacılar bu antijenleri purifiye etmeye çalışmışlardır.

OT'den ilk olarak purified protein derivatves (PPD) elde edilmiştir. Bu preparat da immünolojide, epidemiyolojide ve klinikte yaygın olarak kullanılmasına karşın kompleks karışımlar içermektedir ve PPD'nin de purifiye edilmesine çalışılmıştır. M.tüberküloz ve M.bovis'in majör antijenleri olan polisakkarid antijenler (arabinogalaktan, arabinomannan, D-glucan) muhtemelen bütün mikobakterilerde benzer şekilde vardır. Protein antijenlerden, sitoplazmik orijinli olduğu düşünülen antijen 5 ve kültür nitratının majör ekstraktlarından antijen 6 PPD'den daha spesifiktirler. Mikobakterin avlum intraselülare (IVİAİS) kompleksinin peptidoliplidleri ya da C mikozidleri tipe özgüdür. Bu antijenlere karşı elde edilen antikolar MAİS-kompleks suşlarında serolojik tiplendirmede kullanılmaktadır. Tüberküloz basilinin peptidoglikollidleri spesifik antijen olarak kullanılamazlar.

Son yıllarda dominant antijenlerin E.coli'de genetik klonlanması ile rekombinant proteinler elde etmek mümkün olmuştur. Bunlar arasında, çeşitli prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde bulunan ancak M.tüberküloz'e spesifik epitopu bulunan 65-kDa proteini de vardır (6).

Beslenme ve Gelişme

Tüberküloz basilinin iki temel büyüme özelliği vardır: Alışılmış besiyerlerinde üremez, ancak yumurtalıpatatesli ya da serum albüminli besiyerlerinde ürer. İkincisi, yavaş üremektedir; jenerasyon süresi iyi besiyeri koşullarında 17-18 saattir, kültürde gözle görülebilir koloniler 2-4 haftada oluşur. Her ne kadar tüberküloz ba-

sili üremek için özet büyüme faktörlerine ya da vitaminlere gereksinim duymuyorsa da çeşitli maddeler büyümesini potansiyallze eder. Bunlar arasında siğir serum albümini, yumurta sarısı ve hatta katalaz sayılabilir. Bunların olumlu etkileri, kültür ortamındaki toksik parçacıkları absorbe etmelerine bağlı olabilir.

Tüberküloz basili aerobdur; katalaz, peroksidaz ve süperoksit dismutaz içerir; büyüme hızı büyük ölçüde oksijen basıncına bağlıdır. Örneğin oksijen basıncının yüksek olduğu kavitelere hızla ürer, buna karşın oksijenin az olduğu kazeöz ortamda ya da çok az ürer ya da hiç üremez. Ortamda ister NaHCO₃/Na₂CO₃ şeklinde ister %8 oranında gaz fazda karbondioksit bulunması basilin üremesini kolaylaştırmaktadır (2).

Tüberküloz basili çok çeşitli maddeleri okside edebilir. Laboratuvar koşullarında üremesi için karbon kaynağı olarak gliserol, pürivat ve glukozu kullanır. Diğer yandan tüberküloz basiline çok yakın olan M.bovis, karbon kaynağı olarak pürivatı kullanır, ancak fazla miktarda gliserol üremesini inhibe eder. Ferrik amonyum sitrat şeklinde kültür ortamında bulunan sitrat organizma için gerekli olan demin sağlar.

Tüberküloz basili azot kaynağı olarak genellikle asparagin'i kullanır. Bunun yerine glutamin, aspartik asit, glutamat ya da amonyum tuzları da kullanılabilir. Alanin'in en iyi azot kaynağı olduğu bildirilmiştir. Karbon ve azot kaynaklarına ek olarak tüberküloz basili majör elementlerden potasyum (K), magnezyum (Mg), kükürt (S) ve fosfor (P)'a yanısıra demir, çinko ve belki de mangan gibi eser elementlere gereksinim duymaktadır ki bunlar hem insan vücudunda hem de semi-sentetik kültür ortamlarında bulunmaktadır.

Mutasyon, İlaç Rezistansı

Bütün bakteriyel genomlar gibi, mikobakteriyel genom da sayısız mutasyonlara uğrayabilir. Mutant'lar koloni oluşum süresini ve morfolojisini değiştirir; biyokimyasal ve virülansla ilgili özellikleri, ilaç duyarlılığını etkiler. Özellikle ilaçlara duyarlılığın değişmesi, tüberkülozun tanısı, tedavisi ve epidemiyolojisinde büyük önem taşır. Spontan mutasyonlar ile M.tüberküloz'ın kültür ortamlarındaki üremesinde farklılıklar oluşmaktadır; örneğin Avrupa ve Amerika'da tüberküloz basili kültürlerde yavaş ürer, soluk sarı pürüklü koloniler yapar. Afrika'da ise daha yavaş ürer, daha küçük düz ve pürüklü, mat koloniler yapar (M.africana), Güney-doğu Asya'da M.bovis, kültürde pürüksüz-küçük ancak M.tüberküloz gibi soluk sarı koloniler (normalde M.bovis kolonisi renksizdir) yapar.

Tıbbi açıdan mutasyonların en önemli sonucu anti-tb ilaçlara duyarlılığın değişmesidir. Test tüplerinde SM, INH, RIF, PZA ve EMB'e karşı rezistant mutantlar tespit edilebilir, ilk olarak rezistan basillerin duyarlı basillere oranı tespit edilmeye çalışılır ki bu oran 1/10⁵ ile 1/10⁸ arasında değişir. Daha sonra mutant basilin dahil olduğu basil topluluğunun büyüklüğü araştırılır; basil popülasyonu ne kadar büyükse rezistant mutantların olma

olasılığı o kadar (azladır. Daha soru a anti-fb tedavi gözden geçirilir. Bir ilaç ne kadar bakterisid ise (tek başına kullanıldığında) mutantın tespiti o kadar kolay olur.

Tüberküloz basılının ilaç rezistansından sorumlu olan genleri henüz tespit edilememiştir. Ancak bir ilaca rezistan olduğu tespit edilen basiller diğer ilaçlara duyarlı olabilmektedirler. Kiinsyen bunu gözönüne almalı ve dirençli mutanla etkin anti-tb ilaçlarla kombine tedavi yapılmalıdır.

Mikobakteriyofajlar ve Faj Tiplendirmesi

İlk kez 1947 yılında mikobakterileri enfekte eden ve iizise uğratan bir bakteriofaj izole edilmiştir. Ancak M.tüberkülozis'i enfekte eden fajlar ilk kez 1954'te rapor edilmiştir. Bazı suşian bakteriofajlarla lizise uğraması, diğer bazılarının ise lizise karşı dirençli olması 80'li yıllarda tüberküloz basılının tıptendirilmesinde kullanılabilceği düşüncesini uyandırmıştır. Bugün M.tüberkülozis suçlarını enfekte eden 15 çeşit bakteriyofaj bilinmektedir. Tam olarak bilinen bakteriyofajlar dört tanedir: Ao, Aox, B ve C, Amerika ve Avrupa'da tıp B yaygın iken, Japonya ve Hong Kong'da tıp A yaygındır. Faj tipleri ile ilaç rezistansı arasında ilişki tespit edilememiştir (2).

Tüberküloz Tanısında ve Taktikte Bakterioloji

Semptomlar, hastalık öyküsü ve radyolojik inceleme tüberkülozu düşündürülebilir. Ancak kesin tanı klinik numunelerde basilin gösterilmesi ile konur. Balgamın direkt mikroskopik incelenmesi çabuk yapılabilen bir tetkiktir, ancak basilin görülebilmesi için mililitrede en az 1(T organizma olması gerektiğinden ve diğer bütün mikobakteriler de AAR olduğundan duyarlılığı azdır. Diğer mikroorganizmalar için olduğu gibi tüberküloz basili içinde en iyi tanısal yöntem kültürde üretilmesidir. Ancak diğer mikroorganizmaların tersine üremesi çok uzun sürdüğünden kültürde üremesini çabuklaştıracak teknikler yanısıra immünolojik, biyokimyasal ve genetik mühendislik teknikleri de erken tanı amacıyla geliştirilmektedir.

MİKOBAKTERİYOLOJİDE KONVANSİYONEL UYGULAMALAR

Numune Eldesi ve Transportu

Laboratuvarlara mikobakteriyolojik inceleme için çok sayıda ve değişik numuneler gelmektedir. Bu incelemelerin başarısı da numunenin alınış, saklanış ve transport biçimine bağlıdır. Tüberküloz tanısı için numune, kemoterapiye başlanmadan önce alınmalıdır. Numune kapları temiz olmalı, kapalı ortamlardan alınanlar için (örn.spinal sıvı, plevra sıvısı, abse vb.) steril kaplar kullanılmalıdır. Laboratuvara mümkün olduğu kadar çabuk ulaştırılmalıdır. Eğer gecikme kaçınılmaz ise hem tb basılının canlılığını korumak hem de diğer mikro-

organizmaların kontamasyonunu engellemek için +4°C'de bekletilmelidir.

Balgam ve Balgam İçeren Numuneler

Spontan tükürülmüş üç balgam numunesi temiz ama çoğunlukla steril olmayan kaplara alınır. Eğer spontan olarak balgam elde edilemiyor ise nebülizasyon, gastrik lavaj, bronkoskopik materyal elde edilmese çalışılır.

Ekstrapulmorte Numuneler

Akciğer dışı klinik numunelerdeki AAR basil miktarı çok azdır. Bu kapalı ortamlardan (plevra, perikard, periton, BOS, sinovyal sıvı, kemik iliği, kan, cerrahi biyopsiler vb.) elde edilen numunelerde mikobakteri dışında mikroorganizma içermez. Dolayısı ile steril koşullarda ve steril kaplara alınmalıdır. Böylece tüberküloz basılının de canlılığını etkileyebilecek dekontaminasyon işlemlerine gerek kalmaz, HIV ile enfekte bireylerde tüberküloz için kan kültürü almanın büyük önemi vardır. Kültür için 10 ml Kan izolator ya da lizis-santrifüj sistemi kullanılarak alınmalıdır; böylece laboratuvar çalışanı kültüre ekim yapmadan önce aynı kapta mononükleer hücrelerin lizisini ve kanın santrifüjünü güvenli bir şekilde yapabilir.

İdrar gibi koniamine numuneler balgamda olduğu gibi toplama. Numune alınmadan önce dış genital organlar yıkanır ve sabah iki idrardan üç gün üst üste orta-idrar alınır.

Mikroskop!

Boyanmış smear'ın mikroskopta incelenmesi AAR tanısında ilk basamaktır. En çok kullanılan boyama yöntemleri karbol fuksin ve Ziehl-Neelsen'dir. Boyamadan sonra lam ışık mikroskopunda İmmersiyon objektifi (100x) altında incelenir, AAR basil, eğer karşı boyama için metilen mavisi kullanılmışsa mavi zeminde kırmızı-penibe çomakçıklar şeklinde görülür. Yoğun çalışan laboratuvarlarda floresan boyama tercih edilir, boyama ve inceleme daha hızlı yapılabilmektedir. Primer florokrom boyası için Auramine O kullanılır. Asit ve alkolle dekolorizasyondan sonra karşı boyama potasyum permanganat, aoiridine orange ya da thlazine red ile yapılır ve floresan mikroskop altında küçük büyütme ile (25 ya da 40x) immersiyon yağı kullanılmadan incelenir. AAR basil yeşil floresan veren ince çomaklar şeklinde görülür.

Hangi yöntemle incelenirse incelensin AAR basil varlığı sayısal olarak belirlir; bu hem tanı sırasındaki hastalığın ağırlığını göstermede hem de tedaviye yanıtı takip etmede önemlidir. Z-N yöntemi ile boyanmış yaymanın tümünde 1-2 basil görülürse saptanan basil sayısı raporlanır. Yaymanın tümünde 3-9 basit görülmüş ise (+), yaymanın tümünde 10'dan fazla basil varsa (++) , her İmmersiyon alanında bir ya da daha fazla basil varsa (+++) olarak raporlanır (7),

Kültür

Dekontaminasyon

Kapalı, aseptik lezyonlardan elde edilen numuneler hariç bir çok klinik numune hızlı üreyen bakterilerle kontamine edilmiştir ve kültüre ekim yapılmadan önce dekontaminasyon yapılması gerekir. Dekontaminasyon yöntemlerinden bin numunenin kimyasallarla karıştırılmasıdır (örn. asit, alkali, guarterner amonyum); bu kimyasallar kontamine bakteriyi tüberküloz basiliinden daha çabuk öldürmektedir. Tüberküloz basili daha çok katı materyalde olduğundan (örn. balgamda mukus globüllerinde) öncelikle bu materyalin sıvılaştırılması gerekir. Bu sıvılaştırma ve dekontaminasyon işlemi tek bir madde ile (örn. sodyum hidroksit) yapılabileceği gibi iki kimyasalın karışımı ile (örn. sodyum hidroksit+trisodyum sülfat) de bir seterde yapılabilir. Bu işlemden sonra dekontamine numune genellikle santrifüje edilir ve sediment, dilüe asit solüsyonu ile nötralize edilir. Bütün bu uygulamalar, tüberküloz basilinin dekontamine edici madde tarafından öldürülmemesi için belirlenmiş süreyi aşmamalıdır.

Numunelerin dekontaminasyon işleminin kalite kontrolü yapılmalıdır. Amaç dekontaminasyonun tam olduğunun ve fazla miktarda tüberküloz basilinin bu işlem sırasında öldürülmemiş olduğunun tespitidir. Kalite kontrolü için basit bir yöntem kontamine kültürlerin oranını tespit etmektir. Yüzde 5'in üzerinde kontamine kültür, dekontaminasyonun başarısız olduğunu, %2'nin altında kontamine kültür ise çok fazla miktarda tüberküloz basilinin ölümüne neden olduğunu gösterir.

Kültür Vasatı

Çok çeşitli kültür vasatları kullanılır, ancak bunlar arasında en yaygın olanları yumurtalı vasatlar, modifiye Löwenstein-Jensen (L-J) ve Ogawa, Middlebrook 7H10, 7H11 ve 7H12'dir. Yumurtalı vasatın hazırlanması agarlı vasatın hazırlanmasından daha zahmetlidir ancak daha ucuza mal olur; kolonilerin morfolojisi de daha tipiktir. Ayrıca basilin başlangıç üremesini kolaylaştırmak için Cöz'e gereksinim yoktur ve vidalı tüplerde hazırlanabilir. Agar vasatı ile hazırlanması daha kolaydır, ancak basilin başlangıç üremesini hızlandırmak için CO₂'den zengin ortama gereksinim vardır ve bu nedenle de Petri kutusunda hazırlanmalıdır. Bütün bu nedenlerle tüberküloz prevalansının yüksek olduğu ülkelerde yumurtalı vasatlar tercih edilmektedir. Diğer yandan agar vasatı, daha iyi standardize edildiğinden bilimsel araştırmalarda kullanılmaktadır. Selektif ilaç içeren vasatları da primer izolasyonda kontaminasyonu kontrol etmek için bazen kullanılmaktadır.

Dekontamine numuneden 0,1-0,5 ml, 1-2 tüp ekim yapılır. M. africanum ya da M. bovis'in yaygın olduğu ülkelerde ekim yapılan tüplerden bir iki tanesi pürüvat içermelidir; çünkü bu mikobakteriler sodyum pürüvat içeren ortamda daha iyi ürerler. M. tüberkülozis'in de sodyum pürüvat eklenmiş L-J besiyerlerinde daha iyi ve çabuk ürediğini de bildirilmiştir (8,9). Ekim yapılacak tüp miktarı, inkübatörün kapasitesine ve ekilecek nu-

munenin önemine (örn: BÖS) bağlıdır. Vasatlar 37°C'de inkübe edilmelidir.

Hangi kültür vasatına ekim yapılmış olunursa olsun, kültürler ekimden birkaç gün sonra kontrol edilmeye başlanmalıdır. Erken kontrol hızlı üreyen atipik mikobakterilerin ve kontamine kültürlerin farkedilmesini sağlar. Eğer kontaminasyon söz konusu ise yeniden numune alınıp ekim yapılmalıdır. Kültürler en az altı hafta, daha iyisi üç ay kontrol edilmelidir, haftada bir kontrol yeterlidir. Kültür nüspetliği koloni sayısına göre yarı-kantitatif olarak ifade edilir. Elli koloniden az üreme, koloni sayısı belirtilir; 50-100 koloni (+), 100-200 koloni (++) , 200-500 koloni (+++), 500 koloniden fazla üreme olarak raporlanır.

Tüberküloz Basilinin İdentifikasyonu

izole edilen mikobakterinin koloni morfolojisi ve pigment üretiminin dikkatle gözlenmesi M. tüberkülozis'in ayırıcı tanısında çok önemlidir. M. tüberkülozis 3.-4. haftada tipik olarak pürüklü, soluk sarı koloniler yapar. M. bovis ise her aydan önce üremez ve beyaz, pürüksüz, küçük koloniler yapar. Bununla beraber M. bovis BGG kolonileri büyüme hızı ve koloni morfolojisi olarak M. tüberkülozis'e benzer. M. africanum'da geç üremesine rağmen soluk sarı, pürüklü, yayvan koloniler yapar. Atipik mikobakterilerden bir kısmı ışıkta (fotokromojenler; M. kansasii, M. marinum) bir kısmı da karanlıkta (çabuk üreyenler ve nonfotokromojenler) M. tüberkülozis ile çok kolay karışır. Bu nedenle M. tüberkülozis'i diğerlerinden ayırmada kullanılan üç standard biyokimyasal test geliştirilmiştir. Bunlar niacin testi, nitrat redüksiyon testi ve katalaz aktivitesidir, M. tüberkülozis ve M. bovis'i ayırmada 2 mg/L thiofen-2-carboxylic acid hidrazid (TCH) eklenmiş vasat kullanılır. Bu vasatta M. tüberkülozis ürerken M. bovis üremez. M. tüberkülozis niacin üretir, nitrat redükte eder, buna karşın atipik mikobakteriler ısıya dayanıklı katalaz üretirler.

İlaç Duyarlılığı

ilaç duyarlılık testi (rezistans testi) olanak varsa mutlaka yapılmalıdır. Genellikle rezistans testi sonuçları alınmadan anti-tb tedaviye başlanılmaktadır. Daha önce tedavi görmemiş taze olgularda tespit edilen ilaç rezistansı "primer", tedavi altında ya da daha önce tedavi görmüş olgulardaki rezistans ise "sekonder" rezistans olarak adlandırılır.

Rezistans Testi Yapılışı

Basilin ilaçlara duyarlılığını tespit etmede belirti (kritik) konsantrasyonda ilaç eklenmiş L-J ya da agarlı vasatlar kullanılır ve makroskopik olarak değerlendirilir. Kritik konsantrasyon, duyarlı basilin ölçeği, rezistan basilin ise ölmeyeceği konsantrasyondur. Rezistans testi için L-J'de INH 0.2 mg/L, RIF 40 mg/L, PZA 200 mg/L, EMB 2 mg/L, SM 4 mg/L eklenerek ilaçlı vasatlar hazırlanır; 7H10 ve 7H11 için ilaç oranları farklıdır. Hazırlanmış test tüplerine alınan klinik numune direkt eklenileceği gibi (direkt test), kültürde üretilmiş basil de eki-

lebillir (indirekt test). Primer kültürdeki üreme $1Q^{10}$ ve 10^{10} mg/ml oranında sulandırılır ve her ikisinden 0.1 ya da 0.2 ml hem kontrol tüpüne hem de ilaçlı tüplere ekim yapılır. PZA hariç, kontrol tüpünün (koloni sayısı olarak) % Tinden fazla üreme varsa o ilaca karşı rezistans var kabul edilir. PZA için bu oran %10'dur.

PZA sadece asit ortamda etkili olduğundan bu ilacın konulacağı vasat pH'sı 5.5 olmalıdır. Ancak bu pH'da hazırlanmış kontrol tüpüne ekilecek basilin sadece %1-10'u ürer. Bu nedenle üreme azlığının nedeninin PZA'ya mı asiditeye mi bağlı olduğu anlaşılabilir. PZA'nın karşılaştırılacağı kontrol tüpleri pH'sı 6.6 ve 5.5 olan iki tüp olmalıdır ve pH 5.5 olan kontrol tüpündeki üreme pH 6.6 olanın %1-10'u kadar olmalıdır (2). Bütün bu nedenlerle genellikle PZA için rezistans testi yapılmamaktadır.

BACTEC TB SİSTEMİ

Mikobakteriyel üremenin erken tespitinde kullanılan radyometrik bir yöntemdir. Bu yöntemle ilk önce-leri karbon 14'le işaretlenmiş glikoz kullanılarak nontüberküloz bakterilerde çalışılmış, 1980'lere doğru da tü-

berkülozis tanısında kullanılmaya başlanmıştır (10). Bu yöntemin esası karbon kaynağı olarak sadece karbon 14'le işaretlenmiş palmitik asit konulmuş sıvı besiye-rinde tüberküloz basilinin ürettiği ^{14}C 'in gösterilmesi-dir (2). Direkt boyama pozitif balgamın ekildiği konvan-siyonel kültürlerde ortalama 18 günde gösterilebilen üreme BACTEC TB sistemi ile ortalama 8 günde gös-terilebilmektedir. Direkt boyama negatif balgamın ekil-diği konvansiyonel kültürlerde ortalama üreme 26 günde İken BACTEC TB sistemi ile ortalama 14 günde üreme tespit edilebilmektedir (11). Pratikte dekonta-mine edilmiş 0.5 ml numune, polimiksin B, trimetoprin, naidik asit ve azosillin eklenmiş 4 ml Middlebrook 7H12 İçeren besiyerine ekilmektedir. Aynı anda kon-vansiyonel vasata da ekim yapılmalıdır, çünkü bazı ba-sıl suşları sadece birisinde üreyebilmektedirler.

BACTEC TB sisteminin basil ürediğini çabuk gös-termesi yanı sıra başka avantajları da vardır. Örneğin bu yöntemle kan kültürü yapmak da mümkün olmakta-dır. Aynı şekilde bu yöntemle rezistans testi de yapıla-bilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Saygun N. Mikobakteriler. İn: Kocabaş A, ed. Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü. Adana: Emel Matbaası, 1991 ;41 -5,
2. Grosset JH. Bacteriology of Tuberculosis. İn: Reichman LB, Hershfield ES, eds. Tuberculosis. A Comprehensive International Approach. New York: Marcel Dekker Inc, 49-73.
3. Drapper P. The anatomy of mycobacteria. İn: Ratledge C, Stanford J, eds. Biology of the Mycobacteria. 2nd ed. Lon-don: Academic Press, 1982:9-52.
4. Kocabaş A, Mikobakterilerin Yapısal ve Antijenik özellikleri. İn: Kocabaş A, ed. Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü. Adana: Emel Matbaası, 1991:47-55.
5. Jarlier V, Nikaido H. Permeability barrier to hydrophilic so-lutes in Mycobacterium chelonae. J Bacteriol 1990; 172:1418-23.
6. Shinnick TM. The 65 kilodalton antigen of Mycobacterium tuberculosis. J Bacteriol 1987; 169:1080-8.
7. Akkaynak S. Tüberküloz. Ankara: Ayyıldız Matbaası, 1986:105-13.
8. Zäher F, Marks J. Methods and medium for the culture of tubercule bacilli. Tubercle 1977; 58:143-5.
9. Aysev D. Mycobacterium tuberculosis'in kültüründe sodyum pıruvatin değeri. Solunum Hastalıkları 1992; 3(1):49-52.
10. Middlebrook G, Reggiardo Z, Tigertt WD. Automatable radiometric detection of growth of mycobacterium tuberculosis in selective media. Am Rev Respir Dis 1977; 115:1066-9.
11. Morgan mA, Borstmeter CD, De Young DR, Koberts CD. Comparison of a radiometric method (BACTEC) and conventional culture media for recovery of mycobacteria from smear-negative specimens. J Clin Microbiol 1983; 18:384-8.