

MİKROBİYOLOJİK TANIDA KLASİK YÖNTEMLERDE YENİ YAKLAŞIMLAR

Tanıl KOCAGÖZ

Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL
tanilkocagoz@gmail.com

ÖZET

Son yıllarda, moleküler yöntemlerdeki hızlı gelişmeler, moleküler tanı yöntemlerinin, kültür ve mikroskopi gibi klasik yöntemlerin yerini almaya başlamasına neden olmuştur. Bununla birlikte, klasik örnek işleme ve kültür yöntemlerinde de gelişmeler yaşanmıştır. Bu nedenle klasik tanı yöntemlerinin yeni şekilleri mikrobiyolojik tanıda önemini korumaya devam etmiştir. Bunlara örnek olarak, boğaz kültüründe A grubu beta hemolitik streptokok tanısını iki günden bir güne indiren Bacit-A, idrar ve dışkı kültürlerindeki patojenlerin kolayca tanınmasını sağlayan kromojenik agarlar, parazitolojik inceleme için dışkı örneklerinin, tüberküloz tanısı için balgam örneklerinin işlenerek mikroorganizmaların yoğunlaştırılmasında sant-rifüj gereksinimini ortadan kaldıran yöntemler, renk değiştirerek tüberküloz basilinin üremesini erken gösteren kullanıma hazır TK besiyeri ve antitüberküloz ilaçlara duyarlılık kitleri gösterilebilir. Yakın gelecekte moleküler yöntemlerin yanı sıra klasik tanı yöntemlerindeki gelişmelerin de devam etmesi beklenmektedir.

Anahtar sözcükler: Bacit-A, Decomics, mikrobiyoloji, Feconomics, kromojenik besiyeri, klasik yöntemler, tanı, TK Medium

SUMMARY

New Approaches to Classical Microbiology Diagnostics

In recent years, rapid developments in molecular diagnostics, led molecular tests to take the place of classical tests like culture and microscopy. However there have been developments also in sample processing and culture methods. Thus classical methods conserved their importance in microbiological diagnosis. Bacit-A which shortens detection of Group A beta hemolytic streptococci from 48 to 24 hours, chromogenic media which enable easy identification of pathogens in urine and fecal cultures, kits for processing fecal samples for parasitological examination and for processing sputum for identification of mycobacteria which eliminate the need for centrifugation, TK, ready to use rapid mycobacterial culture and susceptibility determination medium, which indicates mycobacterial growth by color change, can be shown as examples to these. In near future, along with molecular methods new developments in classical microbiological diagnostic methods, are expected.

Keywords: Bacit-A, chromogenic medium, classical methods, Decomics, diagnosis, Feconomics, microbiology, TK Medium

Son yıllarda yeni moleküler yöntemlerin kullanıma girmesi ile enfeksiyon etkenlerinin tanısı hızlanmıştır. Bununla birlikte moleküler yöntemler tanı için tüm gereksinimleri henüz karşılamamaktadır. Duyarlılığı ve zaman zaman özgüllüğü kısıtlı olsa da, mikroskopik inceleme birçok durumda en hızlı ve ucuz tanı yöntemi olmaya devam etmektedir. Enfeksiyon etkenlerini saptamada hala en duyarlı yöntem mikrobiyolojik kültürdür. Üretilmiş etkenin türünün hızlı saptanmasında MALDI TOF ("Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, Time of Flight") önemli bir alternatif haline gelmiş ancak antibiyotiklere hızlı duyarlılık belirleme gereksinimini ortadan kaldırmamıştır. Genetik değişik-

liklerin her zaman fenotipik olarak ilaç direncini tam olarak göstermemesi ilaçlara duyarlılık belirlemede her zaman kültür yöntemlerine gereksinim olacağını düşündürmektedir. Son yıllarda kültür besiyerlerinde yaşanan gelişmeler, klasik yöntemleri hala avantajlı kılmaya devam etmektedir.

Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarında yapılan incelemelerin başında, A-Grubu Beta hemolitik streptokok saptamaya yönelik, boğaz kültürü gelmektedir. Üst solunum yolu enfeksiyonları insanda en sık görülen enfeksiyon türüdür. Bu enfeksiyonların yaklaşık % 90'ında etken virüslerdir. Bu nedenle boğaz kültürü öncelikle gereksiz antibiyotik kullanımlarının önlenmesi

için yapılır. Bakteriyel infeksiyonların ise büyük bir çoğunluğu A grubu beta hemolitik streptokoklar (AGBHS) ile ortaya çıkar ve tedavi edilmesi çok önemlidir. AGBHS infeksiyonları erken tedavi edilmezse, kızıl, romatizmal ateş, nefrit ve belki de en önemlisi kalp kapaklarında deformasyonlara yol açabilir^(2,10). AGBHS infeksiyonlarının tanısı hızlı antijen testleri ile konabilse de bunların duyarlılığı kültür ile tanı kadar yüksek değildir. Alışılmış uygulamada boğaz kültürü için % 5 koyun kanı içeren kanlı agar kullanılır. Boğaz sürüntüsü ekilmiş bu besiyerinde bir gecelik inkübasyon sonrasında beta hemolitik koloniler görülürse bunların A grubu olup olmadığının anlaşılması için yeni bir koyun kanlı agara pasaj yapıp basitrasin diski konması gerekir. Ertesi gün disk çevresinde inhibisyon görülmesi, streptokokun A grubu olduğunu gösterir. Tanı için gereken toplam süre iki gündür. Bizim geliştirdiğimiz ve Bacit-A adını verdiğimiz besiyeri (Salubris A.Ş., İstanbul), AGBHS tanı süresini bir güne indirmektedir. İki bölmeli Petri kutusunun bir yanında koyun kanlı agar, diğer yanında basitrasinli koyun kanlı agar içerir. Boğaz sürüntüsü her iki bölme-ye de ekilen Bacit A'da bir gecelik inkübasyon sonucunda basitrasinsiz bölmede beta hemolitik kolonilerin görülmesi, basitrasinli bölmede bunların görülmemesi, üreyen streptokokların AGBHS olduğunu gösterir⁽³⁾.

İdrar yolu infeksiyonlarının önemli bir çoğunluğu (% 70 kadarı) *E.coli* ile ortaya çıkar. *Proteus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* ve stafilkok türleri diğer sık görülen etkenlerdir. Bağışıklık sistemi baskılanmış veya idrar sondası takılmış hastalarda zaman zaman mayalar da etken olabilir. İdrarın mikroskopik incelemesinde parçalı çekirdekli lökositlerin görülmesi infeksiyon varlığının en önemli belirtisidir. Alışılmış uygulamada kültür için idrar genelde kanlı agar ile birlikte EMB veya McConkey agara ekilir. Bu besiyerlerinde üreyen bakterilerin biyokimyasal testler ile türleri saptanır. Bu işlem bir günlük inkübasyon daha gerektirir. Bu alanda kullanılan otomatize test kitleri besiyerlerine kıyasla yaklaşık on kat daha pahalıdır. Bu işlemi hızlandırmak ve ekonomik hale getirmek için kromojenik besiyerleri kullanılmaya başlanmıştır. Kromojenik agarlar idrar kültüründe

üreyen bakterilerin kolonilerinin çeşitli renklerde olmasını sağlayarak, %90'dan fazlasının bir bakışta türünün saptanmasını sağlamakta böylece hem tür saptama için gerekli fazladan bir günü kazandırmakta hem de pahalı tür saptama kitlerinin kullanımını % 90 oranında azaltmaktadır^(1,12).

Dışkı kültürü dışkıda öncelikle *Salmonella* ve *Shigella* varlığını saptamak için yapılır. Klasik sistemde zenginleştirme amacı ile Selenit F ortamında bekletilen örnekler EMB ve SS besiyerlerine ekilir. Bu besiyerlerinde gözlenen laktoz negatif koloniler tiplendirmeye alınır. Böylece toplam en az üç gün içerisinde *Salmonella* veya *Shigella* tanısı konur. Kromojenik agarların kullanılması *Salmonella* tanısını kolaylaştırmış, hızlandırmış ve duyarlı hale getirmiştir. Kromojenik agarlarda *Salmonella*'lar tek koloni dahi oluştursa kırmızı rengi ile kolayca saptanabilmekte, zenginleştirme işlemine gerek kalmamaktadır⁽¹⁵⁾.

Klinik laboratuvarlarda en sıklıkla gerçekleştirilen işlemlerden birisi dışkının mikroskopla parazit varlığı yönünden incelenmesidir. Bu amaçla dışkı örneklerinin homojenize edildikten sonra kaba artıkların süzülmesi ve örneğin santrifüj edilerek parazit trofozoit, kist ve yumurtalarının konsantre edilmesi gerekmektedir⁽¹⁴⁾. Bu işlemler fazlaca emek ve zaman gerektirmektedir. Bu işlemlerin kolayca uygulanmasını sağlayan plastik filtreli santrifüj tüpleri geliştirilmiştir. Bunlar, işlemleri kolaylaştırmış ancak santrifüj gereksinimini ortadan kaldırmamıştır⁽¹³⁾. Son bir yıldır kullanıma giren, bizim geliştirdiğimiz, emici boncuklar ile çalışan bir yöntem (Feconomics, Salubris A.Ş., İstanbul) santrifüj gereksinimi de ortadan kaldırmıştır. Bu yöntemde dışkı, örnek kabındaki homojenizasyon ve fiksasyon sıvısı içerisine konarak çalkalanır. Sonra fazla sıvıyı ortadan kaldırarak örneği derişik hale getirecek olan emici boncuklar homojenize örneğe eklenir ve tekrar çalkalanarak homojenizasyon tamamlanır. Üç dakika içerisinde ortamdaki fazla sıvı boncuklar tarafından emilerek örnek yoğunlaşır. Emici boncukların gözenekleri parazit trofozoit, kist ve yumurtalarından çok daha küçük olduğu için, sıvı emilirken bu oluşumlar boncukların dışında kalan az miktardaki sıvıda derişik hale gelir.

Örnekten bir damla lama aktarılır, lugol ile karıştırılarak mikroskopla incelenir. Bu yöntemde santrifüj gereksinimi ortadan kalktığı için tüm işlem 20 dakikadan 5 dakikaya inmekte ve çok kolaylaşmaktadır⁽⁹⁾.

Emici boncuklar ile yoğunlaştırma işlemi tüberküloz tanısında klinik örneklerin dekontaminasyon ve yoğunlaştırma işleminde de kullanılmaya başlanmıştır. Bu amaçla geliştirilen kit (Decomics, Salubris A.Ş., İstanbul) ile yapılan işlemde, balgam ve diğer klinik örnekler, örnek kabındaki dekontaminasyon sıvısı içerisine konur ve çalkalanır; 10-15 dakika dekontaminasyon için beklenir. Sonra emici boncuklar eklenerek tüm dekontaminasyon sıvısının emilerek ortadan kaldırılması sağlanır. Bu sırada, örnekteki bakteriler, emici boncukların gözeneklerinden çok daha büyük oldukları için, boncukların dış yüzeyinde kalırlar. Sonra ortama nötralizasyon sıvısı eklenerek pH'nı nötralize edilmesi sağlanır. Dekontaminasyon sıvısında bulunan pH indikatörünün renk değiştirmesi ile pH'nı nötr hale geldiği izlenebilir. Tüm işlem aynı kap içerisinde tamamlanmış olur. Santrifüj işleminin ortadan kalkması ile işlem çok kolaylaşmış ve yaklaşık 45 dakikadan 20 dakikaya inmiştir^(4,5,8).

Tüberküloz tanısında kültür altın standart yöntem olmaya devam etmektedir. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının Löwenstein Jensen gibi klasik besiyerlerinde gözle görünür koloniler oluşturmaları 3 ila 6 hafta sürdüğü için üremeyi erken saptayan otomatize kültür sistemleri geliştirilmiştir. Halen dünyada en yaygın olarak kullanılan BACTEC MGIT (*Mycobacterium* Growth Indicator Tube, Becton Dickinson) ve diğer birçok sistem Middlebrook sıvı besiyeri kullanmaktadır. Bunların hepsinde besiyeri tüp veya şişeleri kullanıma hazır değildir ve kullanıma öncesi üreme eklentileri ve çeşitli antimikrobiyal maddelerin eklenmesini gerektirmektedir. Bu sistemlerde yüksek oranda kontaminasyon yaşanmasının bir nedeni bu ön hazırlık aşamalarının fazla olması olabilir. Bizim geliştirdiğimiz TK Kültür Sistemi'nde, hem izolasyon hem de antitüberküloz ilaçlara duyarlılık belirlemede kullanılan tüm besiyerleri, kullanıma hazırdır. Kullanıcı isteğe bağlı sıvı veya bifazik TK besiyeri kullanabilmektedir. Besiyerlerinin renk değiştirmesi gözle izlenebildiğinden oto-

matize kültür sistemi bulunmasa dahi üremeler erken saptanabilmektedir. TK besiyerlerinin laboratuvar olanakları kısıtlı ancak tüberkülozun yaygın olduğu ülkelerde de kullanılabileceği düşünülmektedir^(6,7,11).

Mikrobiyoloji laboratuvarında klasik testlerdeki gelişmeler, moleküler testlerdeki gelişmelere rağmen, klasik testlerin kullanılmaya devam etmesini sağlamaktadır. Mikroorganizmalardaki hızlı genetik değişikliklerin saptanmasına henüz moleküler testlerdeki hızlı değişim ayak uyduramamaktadır. Antibiyotik duyarlılığı gibi özellikler fenotipik klasik testlerle belirlenmeye devam edecek ya da moleküler testler ile birleştirilmiş melez yöntemler ortaya çıkacaktır.

KAYNAKLAR

1. Çıragil P, Gül M, Aral M, Ekerbiçer H. Evaluation of a new chromogenic medium for isolation and identification of common urinary tract pathogens, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006;25(2):108-11. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-006-0103-5> PMID:16496114
2. Gallis HA. Streptococcus, "Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilfert CM (eds). Zinsser Microbiology 19. baskı kitabında" s.357-67, East Norwalk, CT: Allpeton & Lange (1988).
3. Gür D, Kocagöz T, Akca Ö. Identification of group A beta-hemolytic streptococci within 24 hours, using a bacitracin containing media, American Society for Microbiology, 98th General Meeting, Atlanta (1998).
4. Kocagöz T, Akyar I, Altın S et al. Revolutionizing decontamination and concentration method for the diagnosis of tuberculosis, American Society for Microbiology General Meeting, San Francisco (2012).
5. Kocagöz T, Akyar I, Altın S ve ark. DECOMICS®, Tüberküloz tanısı için santrifüj gerektirmeyen yeni bir dekontaminasyon ve yoğunlaştırma yöntemi, I. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, PP.244, Antalya (2011).
6. Kocagöz T, Alp A, Albay A. A new rapid non-radioactive medium for culturing mycobacteria that also enables visually differentiation of mycobacterial growth from contamination. American Society for Microbiology, 100th General Meeting, Los Angeles (2000).

7. Kocagöz T, Altın S, Türkyılmaz Ö et al. The efficiency of TK culture system in the diagnosis of tuberculosis, *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;72(4): 350-7.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.12.004>
PMid:22277535
8. Kubica GP, Dye WE, Cohn ML, Middlebrook G. Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide for culture of mycobacteria, *Am Rev Respir Dis* 1963;87:775-9.
PMid:13927224
9. Kurt Ö, Akyar I, Görgün S, Kocagöz T, Özbilgin A. Feconomics®: A simple, novel and fast technique for stool concentration in parasitology laboratory, *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2012;18(Suppl-A):A161-5.
10. Lancefield RC. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci, *J Exp Med* 1933;57(4):571-95.
<http://dx.doi.org/10.1084/jem.57.4.571>
PMid:19870148 PMCID:2132252
11. Pai M, Kalantri S, Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: part II. active tuberculosis and drug resistance, *Expert Rev Mol Diagn* 2003;6(3):423-32.
<http://dx.doi.org/10.1586/14737159.6.3.423>
PMid:16706744
12. Perry JD, Freydière AM. The application of chromogenic media in clinical microbiology, *J Appl Microbiol* 2007;103(6):2046-55.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03442.x>
PMid:18045388
13. Perry JL, Matthews JS, Miller GR. Parasite detection efficiencies of five stool concentration systems, *J Clin Microbiol* 1990;28(6):1094-7.
PMid:2380347 PMCID:267882
14. Smith JW, Bartlett MS. Diagnostic parasitology: introduction and methods, "Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Shadomy Jr HJ (eds). Manual of clinical microbiology, 4. baskı" kitabında s.595-611, American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1985).
15. van Dijk S, Bruins MJ, Ruijs GJ. Evaluation and implementation of a chromogenic agar medium for Salmonella detection in stool in routine laboratory diagnostics, *J Clin Microbiol* 2009;47(2):456-8.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01643-08>
PMid:19091816 PMCID:2643670