

# MİKOBAKTERİYOLOJİ LABORATUVAR STANDARTLARI

Bilgöl METE\*, Recep ÖZTÜRK\*

## GİRİŞ:

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün son verilerine göre 2004 yılı içinde 9 milyon yeni tüberküloz olgusu saptanmış ve tüm bu olguların yaklaşık 2 milyonu kaybedilmiştir (1). Böylesine önem teşkil eden bir sorunla mücadelede, DSÖ 2005 yılı içinde yayma pozitif yeni olguların %70'ini saptamayı ve bu olguların %85'ini başarıyla tedavi etmeyi hedefleri arasına almıştır (1,2). Tüberküloz (TB)'un tanı ve tedavi takibi mikobakteriyoloji laboratuvarına bağımlı olsa da çoğu ülkede laboratuvarlar alt yapı, donanım ve tecrübeli personel açısından zayıf kalmaktadır. Oysa ulusal tüberküloz kontrol programının temel taşlarından biri ve doğrudan gözetimli tedavi stratejisinin en önemli ana unsuru TB bakteriyolojisidir (2). Bu denli önemli bir yere sahip olan mikobakteriyoloji laboratuvarı ise belli standartlar doğrultusunda yapılanmalı ve hizmet vermelidir.

Belirli amaç ve hedefleri gerçekleştirmek üzere kurulan mikobakteriyoloji laboratuvarları üstlendikleri fonksiyon ve kapasiteleri doğrultusunda 3 farklı düzeyde hizmet verirler. Bu laboratuvarların bir ülkede nerelere, nasıl kurulacağı ulusal kontrol otoritesi ve konunun uzmanlarından oluşan bir kurul tarafından tartışılıp değerlendirilerek karar verilmeli ve çalışmaları izlenmelidir (4).

## MİKOBAKTERİYOLOJİ LABORATUVARLARINDA BELİRLENEN DÜZEYLER

**Düzy 1 (perifer) laboratuvar:** 100.000 nüfusa hizmet veren laboratuvarlardır (dispanser ya da perifer laboratuvarları). Bu düzeyde bir laboratuvarın görevleri (5,6):

1. Mikobakteri analizi için uygun örnek toplanması
2. Doğrudan mikroskopik inceleme (yaymaların hazırlanıp, Ehrlich- Ziehl- Nielsen (EZN) yöntemiyle boyanması ve incelenmesi)
3. Sonuçların kaydedilmesi
4. Materyalin uygun biyogüvenlik önlemleri altında kültür ve ileri testler için bir üst laboratuvara gönderilmesi
5. Yeterlilik ve kalite kontrol programına katılım

**Düzy 2 (orta) laboratuvar:** 500.000- 1.000.000 nüfusa hizmet veren laboratuvarlardır. Bu düzeyde bir laboratuvarların görevleri (4,5,6):

1. Düzy 1 laboratuvar görevleri yanında
2. Yoğunlaştırma yöntemi ile mikroskopik inceleme yapma

3. Mikobakteri kültürü ve *Mycobacterium tuberculosis* kompleks identifikasyonu
4. Primer ilaçlara yönelik duyarlılık tayini
5. Yeterlilik düzeyi belirleme

**Düzy 2 laboratuvarların görevleri 2 alt grupta incelenebilir (5):** mikroskopik inceleme yaparak sağlık birimlerine teknik destek sağlama, düzy 1 laboratuvarlara yönetsel destek sağlama.

*Sağlık birimlerine yönelik teknik destek:* Düzy 2 laboratuvarlar, bölgesel sağlık birimleri tarafından talep edildiği oranda mikroskopik inceleme yapar; ancak günde 100 yaymadan daha fazla talep var ise EZN boyama yerine floresan boyama tercih edilebilir. Bu düzeyde bazen kültür hizmeti de verilebilir. Kültür yapmadaki öncelikler şöyle sıralanabilir:

- a. klinik ve radyolojik olarak pulmoner TB düşünülen ancak tekrarlanan yaymaları negatif olguların tanısı
- b. idrar, plevral sıvı, beyin omurilik sıvısı (BOS) ve pü gibi ekstrapulmoner örnekler
- c. bazı olguların tedavi izlemi (ekstrapulmoner TB, kronik pulmoner TB)

*Düzy 1 laboratuvarlara yönetsel destek sağlama:* Bu bağlamdaki belli başlı etkinlikler şunlardır:

- a. ayraçların hazırlanması ve perifer laboratuvarlara dağıtım
- b. mikroskopik inceleme alanında eğitim verme
- c. perifer laboratuvarlarda çalışan teknisyenlerin yayma inceleme ve mikroskopları koruma yönünden denetimi
- d. perifer laboratuvarlarda yapılan mikroskopik incelemelerin kalite kontrolü

**Düzy 3 (merkez) laboratuvar:** Düzy 3 laboratuvarlar, 10.000.000 nüfusa hizmet verir. Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı (UTBRL) da aslında bir merkez laboratuvardır. Birden fazla merkez laboratuvarı mevcut olduğu zaman içlerinden birisi UTBRL olarak belirlenir. Bu düzeyde bir laboratuvarın görevleri (5,6):

- a. Düzy 1 ve 2 laboratuvar görevleri yanında
- b. Mikobakteri tip tayini
- c. Sekonder ilaç duyarlılık testlerini yapmak

\* İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

- d. Diğer mikobakterilerde tüm ilaçların duyarlılık testlerini yapmak
- e. Gözetim, eğitim ve kalite kontrol programına katılım ve yönetim

**Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı:** Bir ülkede ideal olarak 1 adet UTBRL bulunmalıdır. Yöntem, test ve analiz standartlarını koyma, değerlendirme, izleme, koordinasyondan sorumludur (4).

#### Amaç ve hedefleri (4,5,6):

- a. Alt düzey laboratuvarlarda mikroskopi, kültür ve duyarlılık testlerinde yüksek düzeyde yeterlilik sağlamak
- b. Personel eğitimi ve kalite kontrol (ulusal laboratuvar açısından gelen yaymaların incelenmesi) sağlamak
- c. İlaç direnç sürveyansı
- d. Tüm ileri, hızlı, epidemiyolojik ve moleküler teknikleri referans düzeyde çalışmak

#### Faaliyetleri

- a. Amaca yönelik yöntem, teknik ve işlemleri standardize ederek alt seviye laboratuvarlara sertifika vermek
- b. Rehberler oluşturup, dağıtılmasını sağlamak (TB tanısı için bakteriyolojik yöntemler, mikroskop ve diğer cihazların bakım ve korunması, laboratuvar gözetim ve kalite kontrolü vb.)
- c. Yeni ve uygun yöntem önerilerinde bulunmak
- d. Alt düzey laboratuvarların gözetimi ve kalite kontrol programını yönetmek ve faaliyetlerine yardım etmek
- e. Teknisyenler ve diğer teknik elemanların eğitimini sağlamak
- f. Tanısı zor olguların tanısını doğrulamak, mikobakteri tip tayini, ilaç duyarlılık testleri yapmak
- g. Ülkede anti-TB ilaç direnç sürveyansı yapmak
- h. Laboratuvar ağındaki çalışmalara ait istatistiksel verileri toplamak
- i. Mikobakteri enfeksiyonları ile ilgili proje yürütmek ve dirençli kökenlerde ek anti-TB ilaç duyarlılık testleri yapmak

## MİKOBAKTERİYOLOJİ LABORATUVARLARINDA BİYOGÜVENLİK

Biyogüvenlik, başta çalışan kişiye ve çalışma arkadaşlarına olmak üzere diğer canlılara ve çevreye zarar vermeyen güvenli ortamlar planlamak, oluşturmak ve böyle ortamlarda çalışmaktır. Bu amaca yönelik olmak üzere DSÖ mikroorganizmaları 4 risk grubuna ayırmıştır (7):

**Risk grubu 1:** bireysel ve toplumsal hastalık riski yok ya da çok düşük

**Risk grubu 2:** bireysel risk orta derecede, toplumsal risk düşük

**Risk grubu 3:** bireysel risk yüksek derecede, toplumsal risk düşük

**Risk grubu 4:** bireysel ve toplumsal risk yüksek

Risk grupları ile paralel olarak aynı zamanda 4 tip laboratuvar vardır (tablo 1) (4):

Biyogüvenlik seviye 1 laboratuvar (BS1L)

Biyogüvenlik seviye 2 laboratuvar (BS2L)

Biyogüvenlik seviye 3 laboratuvar (BS3L)

Biyogüvenlik seviye 4 laboratuvar (BS4L)

Tüberküloz, damlacık çekirdeği yolu ile bulaşan bir enfeksiyon hastalığı olup, DSÖ tarafından risk grubu 3'te ele alınır. Hastalık özellikle laboratuvar çalışanlarında aynı kurumun sekreter ve diğer ofis çalışanlarına göre 3-5 kez daha fazla görülür. Bu nedenle alınması gerekli önlemler önem taşır (6,8). DSÖ, mikobakteriyoloji laboratuvarları için BS3L önermektedir. Ancak BS3L basilin doğrudan ve yoğun miktarda çalışıldığı araştırma, referans ya da ilaç duyarlılık testi yapıldığı laboratuvarlar için geçerlidir. Yayma yapılan mikobakteriyoloji laboratuvarları için BS2L özellikle yeterli olur, ancak bu koşullarda örnek, tüberkülozid bir dezenfektan ile muamele edilmelidir (7).

Mikobakteriyoloji laboratuvarına gelen her türlü örneğin *M. tuberculosis* kompleksi içerdiği kabul edilmeli ve önlemler buna göre alınmalıdır. Tüm laboratuvar personeli hem kendilerini, hem de diğer kişileri enfeksiyondan korumak amacıyla bu önlemlerin alınması ve uygulanması konusunda sorumludur. Yönetim de bu konuda alınması gerekli tüm önlemleri belirlemelidir. Yönetimin sorumlulukları personelin;

- rutin medikal taramalardan geçmesini
- biyogüvenlik hakkında eğitimli olmasını
- tehlikeli işlem, yöntem için gerekli ve yeterli bilgiye sahip olmasını
- acil durumlar ve kazalar için gerekli ve doğru önlemleri alacak düzeyde hazır olmasını
- yeterli biyogüvenlik ekipmanına sahip olmasını sağlamaktır (6).

Çalışanlar dikkatle seçilmeli; fiziksel ve mental olarak yeterli kapasitede olmalıdır. Mikobakteriyoloji laboratuvarlarında çalışmaya başlamadan önce tüberkülin testi yapılmalı, akciğer grafisi çekirilmeli, laboratuvar yöntem ve işleyişi için yeterli eğitim alınmış olmalıdır (6). Çalışılan laboratuvar koşullarına göre riskler ve bu risklere karşı alınması gerekli önlemler bilinmelidir.

Tüm mikobakteriyoloji laboratuvarlarında en önemli ekipman biyogüvenlik kabinleri (BGK) dir. Biyogüvenlik kabinleri, hem çalışan kişinin hem de çalışılacak işin zarar görmemesi için özel olarak hazırlanmış hava akışı kontrollü ve steril olan laboratuvar çalışma bankolarıdır. Hava çıkışı ve/veya girişi HEPA filtrelerinden olur. Giren ve çıkan havanın akış yönüne göre Sınıf I, Sınıf II, Sınıf III olmak üzere 3 tip BGK vardır.

**Sınıf I BGK,** yüksek ölçüde çalışan kişiyi ve çevreyi koruyacak özellik taşır. Ancak hava akımı doğrudan dışarıdan sağlandığı için yüksek ve orta derece steril çalışma gerektiren işler için uygun değildir.

Tablo 1. Risk grupları ve alınması gerekli önlemler

Patojenin risk derecesi	Örnek mikroorganizma	Ana kurallar
BS1L	Canlı virüs aşılıarı İnsan için patojen olmayan mikroorganizmalar	Çalışma sırasında kapılar kapalı tutulmalı Musluk ve lavabo olmalı Haşereler için önlem alınmalı Çalışma alanı her gün temizlenmeli Yiyecek yenmemeli ve sigara içilmemeli Pamukla tıkanmış pipet kullanılabilir Kontamine materyel hemen steril edilmeli
BS2L 2a	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Listeria S.aureus</i> , Mikoplazma	<b>BSL1'e ek olarak</b> Otoklav yerleştirilmeli Güvenlik kabini yerleştirilmeli ( Sınıf I veya II)
2b	E.coli  Bacillus anthracis Borrelia spp. Vibrio spp.	Aerosol oluşturan işlemler kabin içinde yapılmalı Sorumlu personel dışında giriş izne bağlı olmalı 12 yaş altı giriş kesin yasak olmalı Çalışan kişi çalışacağı mikroroganizma hakkında bilgi edinmeli Mekanik pipet kullanılmalı Bütün katı atıklar steril edilmeli Çalışma kıyafeti ile dışarı çıkılmamalı Kapıya tehlikeli ajan işareti konulmalı
BS3L 3a	<i>Brucella sp.</i> <i>M. tuberculosis</i> <i>Salmonella typhi</i>	<b>BSL2'ye ek olarak</b> Genel kullanım alanlarından çift kapı ve kontrollü geçiş bölümü ile ayrılmalı Oda içi kolaylıkla steril edilmeli Oda negatif basınçlı olmalı Oda içine giren ve çıkan hava steril olmalı Oda içinde hava akımı olmamalı Önden düğmeli çalışma kıyafetleri kullanılmamalı
3b	<i>Burkholderia mallei</i>	Eldiven giyilmeli Ayakkabılar değiştirilmeli Çalışma sonunda bütün aletler ve atıklar steril edilmeli Çalışma amacı dışında hiçbir canlı sokulmamalı
BS4L	Ebola virüs, Lassa virüs SARS, Coronavirüs Nairovirüs	<b>BSL3'e ek olarak</b> Çift kapılı otoklav yerleştirilmeli Dış ortama göre negatif basınçlı olmalı Sınıf III güvenlik kabinleri kullanılmalı Hava kilitli özel geçiş olmalı Giriş ve çıkışlarda duş alınmalı Kıyafetler değiştirilmeli ve özel koruyucu giysiler giyilmeli

**Sınıf II BGK**, yüksek ölçüde kişiyi, çevreyi ve ek olarak da ürünü korur; iç kısım sterildir. Bu nedenle birçok amaç için çok kullanışlıdır.

yüksek derecede koruyucu ve steril özelliktedir. Kullanımı zordur ve çok özel laboratuvarlarda kullanılır (7,9).

**Sınıf III BGK**, tamamen kapalı sistemden oluşur, çok

Mikobakteriyoloji laboratuvarları için *Sınıf I-II BGK* önerilmektedir (7).

Laboratuvar içindeki birçok işlem; preparat hazırlama, santrifüj etme, karıştırma, çalkalama, vorteks, pipetleme işlemleri, enjektörün boşaltılması, özenin yakılması, balgam ve materyal kabının kapağının açılması, liyofilize ampüllerin açılması ve kültür tüplerinden pasaj veya ilaç duyarlılık işlemleri aerosol oluşumuna yol açabilir (6). Aerosol oluşturan tüm işlemler kabin içinde yapılmalı ve tüpler açılmadan önce 5 dakika beklenmelidir (10). Kabin kullanımını kolay bir tasarıma sahip olmalı, içerisinde U.V. lamba ve normal aydınlatma lambaları bulunmalıdır. Ayrıca iç kısımda bek için hava gazı (doğal gaz veya LPG) bağlantısı olmalı ve ek elektrik tesisatı takılmış durumda olmalıdır. Amaca uygun boyutlarda olanlar tercih edilmelidir (7).

Biyogüvenlik kabinleri % 100 etkili ve koruyucu olmadıkları için özellikle iyi seçilmiş maske, önlük ve eldiven gibi diğer personel koruyucu giysiler ile birlikte kullanılmalıdır. Maskeler respiratuvar tipte, 0.5-1 $\mu$ m büyüklüğündeki partiküller için %90'dan fazla koruyucu özellikte N95 veya EN 149 P2 ya da P3 standartlarında olmalıdır. Maskeler 8 saatlik kullanımdan sonra değiştirilmelidir. Ayrıca tek kullanımlık plastik muayene eldiveni kullanılmalıdır. Her çalışmada mutlaka önlük giyilmeli, önlük arkadan düğmeli olmalıdır (ya da üst üste kapanan yandan düğmeli ve boyuna kadar kapanan tipte) (4,7,9).

Vazgeçilemeyecek bir diğer biyogüvenlik ekipmanı da U.V. lambalardır. Doğrudan ve üst hava ışıklı olarak kullanılabilirler. En etkili U.V lambaları dalga boyu 254 nm olan TUV- C tipleridir. Yararlı ömürleri teknik özelliklerinde belirtilmemiş ise yaklaşık 2500-3000 saat arasında değişir. Teknik olarak kontrol edilmeli ya da üretici firma güvencesi aranmalıdır. UV lambalarının penetrasyon özelliği olmadığı için diğer dezenfeksiyon işlemleri ile birlikte kullanılmalıdır. Lambalar reflektör içinde yerden 210 cm yükseklikte duvara monte edilmiş olmalıdır. Reflektör-lü/korunmuş UV lamba altında özel korunma sağlayan giysi, başlık ve gözlük olmaksızın çalışmak tehlikelidir. Üst hava ışıklı UV lambalar hava dezenfeksiyonu sağlarken, doğrudan ışıklı olanlar hem hava hem de yüzey dezenfeksiyonuna yardımcı olur.

Her laboratuvarında çalışma alanları ve bankoları üzerine U.V. lamba takılması yararlı olur. Çalışma öncesi ve sonrası U.V lamba yakılarak oda steril edilir. Oda hacmine bağlı olarak yakma süreleri değişir. Bir odaya yerleştirilecek UV lamba adedi odanın boyutlarına göre değişir. Lambalar kısa zamanda toz tuttuğu için en az 2 haftada bir alkollü bez ile silinmelidir. U.V lambalarının etkinlikleri 3 ayda bir kontrol edilmelidir (4).

Tüm çalışma alanları çalışma öncesi ve sonrası uygun bir dezenfektan madde ile silinmelidir. TB laboratuvarları için en uygun dezenfektanlar 1/10-1/50 oranında sulandırılmış

sodyum hipoklorit, % 5'lik fenoldür (7). Çalışma sırasında meydana gelebilecek aksilik ve kazalara karşı plan önceden belirlenmeli ve gerekli tüm gereçler, dezenfektanlar hazır tutulmalıdır (9).

Tüm bu genel bilgilerden sonra laboratuvar düzeylerine göre alt yapı/tasarım ve çalışma prensiplerindeki önemli noktaları gözden geçirelim.

## TASARIM

Doğrudan mikroskopi yapan laboratuvarlar: Mikroskopik inceleme için ayrı oda ya da laboratuvar içinde yeterli ayrı bir alan gereklidir. Mikroskopi laboratuvarında en az 1 lavabo ve 4 tezgah ya da masa bulunmalıdır:

- yayma hazırlanması
- boyama
- mikroskopik inceleme (elektrik yok ise pencerenin karşısında)
- materyal kabülü, kayıt ve lam saklanması için ayrı birer tezgah ayrılmalıdır. Laboratuvara giriş kontrol altında olmalı personel dışında sadece izinli kişiler girebilmelidir. Laboratuvarın sadece 1 giriş kapısı olmalı ve sürekli kapalı tutulmalıdır. Materyal kabülü, kabul masasının önündeki pencereden yapılmalıdır. Bu esnada materyal kapları sızdırma yönünden kontrol edilir ve gerekirse dekontaminasyon sağlanır. Laboratuvar istek formları kontrol edilir ve kayıt tutulur. Materyalin işlemleri tamamlandığında sonuçlar yine aynı pencereden verilir.

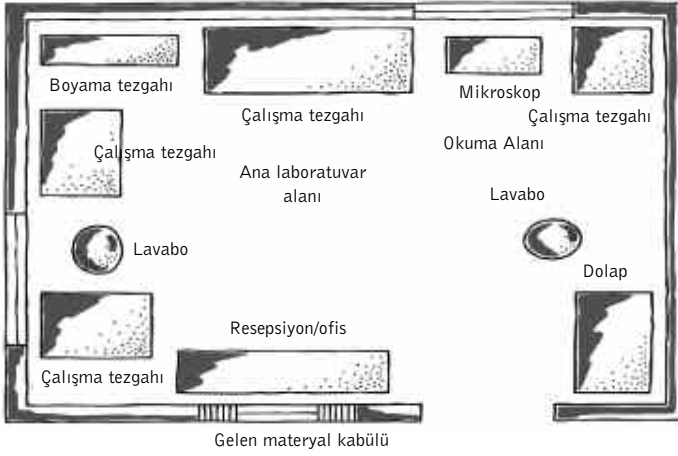
Duvar, tavan ve yerler pürüzsüz, kolay temizlenebilir, kullanılan kimyasal maddelere dayanıklı, aydınlatma yeterli olmalı ve yerler kaymamalıdır. (11).

Boyama malzemeleri tercihen düzey 2 laboratuvardan temin edilebilir ancak eğer eğitimli personel var ise boyalar burada da hazırlanabilir. Olanak var ise balgam biyogüvenlik kabininde çalışılmalıdır (5).

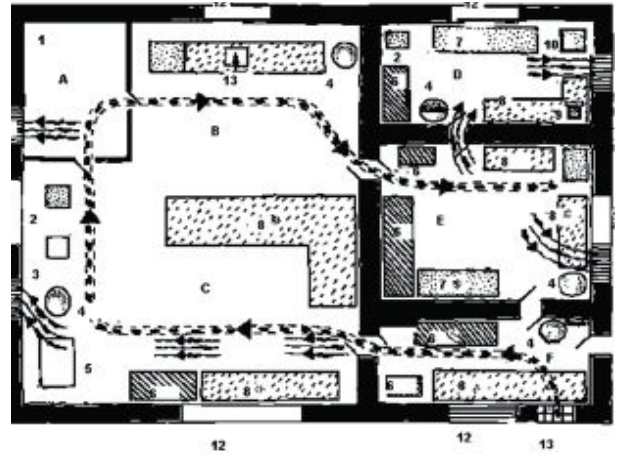
**Kültür yapan laboratuvarlar:** TB laboratuvarlarında en önemli nokta materyal akışının ve faaliyetlerin temiz bölümden daha kirli bölümlere doğru olmasıdır (12). Laboratuvar sıcak ve soğuk (temiz) alanlar olarak 2 ana bölüme ayrılmalıdır. Materyal akışı ve hava akımı soğuk alanlardan sıcak alanlara doğru yönlendirilerek kontrol edilebilir düzeyde tutulmalıdır. Sıcak alanlar soğuk alanlara oranla negatif basınçlı olmalıdır (4).

Sanıldığı gibi aksine pahalı havalandırma sistemleri kültür yapılan laboratuvarlarda temel bir gereksinim değildir. Temel ilke, çalışma saatleri içerisinde hava akımının BGK ya da duvara yerleştirilmiş havalandırma cihazları veya pencere yoluyla dışarı yönlendirilmesidir. Havalandırma standartları yılda incelenen materyal sayısı ve bu materyaller içerisinde tüberküloz prevalansına göre belirlenir. Saatte 6-12 kez oda havası değişimi, 30- 45 dakika

Şekil 1. Mikroskopi yapılan laboratuvar tasarımı



Şekil 2. Kültür yapılan laboratuvar tasarımı



içerisinde havadaki partiküllerin % 99'unu temizlemek için yeterlidir.

Odaya temiz hava sağlayan ve kirli havayı dışarı aktaran cihazlar karşılıklı duvarlara yerleştirilmelidir. Saniyede 23.6 litre temiz hava akımı yeterli basınç farkını sağlar. Kirli hava doğrudan dışarı aktarılır (yerden 3 metre yükseklikte).

Laboratuvara; kayıtların, sonuçların, kimyasal madde ve ayıraçların muhafaza edildiği ofisten geçilerek girilir. Sadece mikroskopi yapan laboratuvarlarda olduğu gibi materyal kabülü, ofisteki kabul masasının önündeki pencereden yapılmalıdır. Laboratuvar istek formları kontrol edilir ve kayıt tutulur. Tüm bu işler sonrasında materyaller ana laboratuvar bölümüne gönderilir. Bu bölümde yayma hazırlama ve boyama, dekontaminasyon ve sindirim, besiyerine ekim ve kültürlerin inkübasyonu için gerekli olan alanlar ve ekipmanlar bulunur: tezgahlar, 1 pH metre, 1 buzdolabı, musluğu dirsekle açılabilen lavabo ve saklama kabinleri. BGK ve santrifüj ise izolasyon alanı olarak ayrılan bölümde, ana laboratuvarın en arka bölümüne yerleştirilmelidir. BGK kapıya, havalandırma cihazına ya da personelin kalabalık olduğu yere yakın bulunmamalıdır.

Okuma odası ise mikroskopik incelemelerin ve kültürlerin değerlendirildiği bölümdür. Bu odada da mikroskop, çalışma tezgahı ve musluğu dirsekle açılabilen lavabo bulunur. Sonuçlar burada tamamlanıp ofise gönderilir.

Mutfak, kültürlerin atıldığı ve cam malzemelerin yıkandığı ve sterilize edildiği alandır. Çalışma tezgahları yanında, çift musluklu paslanmaz çelikten büyük bir lavabo ve otoklav bulunur. Birçok ülkede merkez laboratuvarlarda bulunmakla birlikte, eğer besiyeri hazırlanıyorsa besiyeri hazırlama odası da bulunmalıdır. Bu odada da çalışma tezgahları, koagülatör dirsekle açılabilen lavabo ve buzdolabı bulunur (12).

Mikroskopi ve kültür yapılan laboratuvar tasarımları şekil 1 ve 2'de gösterilmiştir (11,12).

- A: Oda etüv
- B: Okuma/Değerlendirme alanı
- C: Çalışma alanı
- D: Besiyeri odası
- E: Mutfak (Kirli odası)
- F: Örnek kabul odası
- 1. Oda etüv
- 2. Buzdolabı
- 3. Santrifüj
- 4. Lavabo
- 5. Biyogüvenlik kabini
- 6. Dolap
- 7. Lavabo/kurutma standı
- 8. Çalışma masası
- 9. Terazî
- 10. Koagülatör
- 11. Ekzost fanı
- 12. Kapatılmış pencere
- 13. Örnek/materyal kabul

Not: Oklar hava akım yönünü göstermektedir.

## ÇALIŞMA İLKELERİ

Yürüreceği laboratuvar işlemlerine göre yukarıda belirlenen standart düzeyler doğrultusunda yapılan bir mikrobakteriyoloji laboratuvarında çalışma prensipleri belirlenmelidir. Örnek alma-saklama ve nakilden, duyarlılık tayinine uzanan bir yelpazedeki tüm işlemler belirlenen standartlar doğrultusunda yürütülmeli ve her laboratuvarın bir işleyiş protokolü olmalıdır. Ayrıca her laboratuvarın, meydana gelecek kazalarda uygulanacak basamakları içeren hazır bir protokolü bulunmalıdır. Laboratuvar işlemlerindeki önem verilmesi gereken noktalara aşağıda kısaca değinilecektir:

**Örnek alma, saklama ve nakil**

Kesin tanı için uygun mikrobiyolojik yöntemlerle etkeni saptamak gerekir. Bu amaçla uygun örnek alınmalıdır. Enfeksiyon odağına göre farklı bölgelerden alınan örnekler mikobakteriyoloji laboratuvarında incelenir (13). Alınan örnekler en kısa zamanda istek formu ile birlikte laboratuvara ulaştırılmalıdır. Alınan materyale göre dikkat edilecek belli başlı noktalar bulunmaktadır:

**Balgam:** Basil saptama olasılığı en fazla olan örnek sabah aç karnına çıkarılan balgam olduğu için basil görme şansını arttırmak için hastadan üç ayrı sabah balgamı istenir. Örnek alınan kap steril, sert, tercihen vidalı kapaklı olmalı ve sızdırmaya izin vermemelidir (13).

Hasta öksürdüğü zaman enfeksiyon tehlikesi olduğu için örnek, üst oda havasına U.V uygulanan bir ortamda alınmalı eğer olanak yoksa kurum dışında, تنها bir yerde mümkünse bol güneşli bir alanda alınmalıdır. Eğer bu da mümkün değilse örneği alacak kişi uygun maske takmalı, hasta muayene odasının bir köşesinde (tercihen duvara doğru, bol güneşli ve havalandırılmalı bir yerde) örnek vermemelidir. Hastada TB enfeksiyonu olma olasılığı yüksek ise negatif basınçlı odalar tercih edilir (10,13).

**İdrar:** 3 gün sabah idrarının tamamı çalışmaya alınır. Kontamine, enfekte doku örnekleri: Tüm örnekler steril kaplarda gönderilir. Örnek kontamine ise dekontaminasyon gerekir.

**Steril vücut sıvıları:** En az 10 ml örnek alınır. İncelenmek üzere alınan örneklerin kayıt işlemleri büyük bir özenle yapılmalıdır (13).

Çoğu zaman toplanan örnekler bir üst laboratuvara gönderilir. Bir gün, en fazla 3 gün içinde örnek diğer laboratuvara ulaştırılmalıdır (5). Gönderilme zamanına kadar örnekler mümkünse buzdolabında (+4, -10°C) donmayacak ve kurumayacak şekilde saklanmalıdır. Işık görmeyecek şekilde sarılması önerilir.

DSÖ, bulaştırıcı örneklerin naklinin, iç içe girmiş 3 kap içinde yapılmasını önermektedir. Birinci kap doğrudan materyali ya da bakteriyi içerir, 2. kap 1. kabın kuvvetli emici bir madde ile iyice sarıldıktan sonra su geçirmez bir biçimde amabalajlanması sonucu oluşur. Üçüncü kap ise içi içe geçmiş diğer 2 tüpü dış etkilerden koruyan sert bir maddeden yapılmıştır. Bu kap üzerine DSÖ'nün önerdiği 'tehlikeli biyolojik etken' etiketi yapıştırılabilir.

DSÖ'nün önermiş olduğu bir üçlü kap sistemi yoksa farklı bir sistem kullanılabilir. Kültür, katı besiyerinde ise; kültür tüpü hava yastıklı özel ambalaj naylonları ile 1-2 kat sarılır. Bu özel ambalaj naylonu yerine 1-2 cm kalınlığında

pamuk veya sünger de kullanılabilir. Kültür sıvı besiyerinde ise 1. tüp çevresine mutlaka steril miktarda emici bez veya pamuk sarılmalıdır. Ambalaj bandı ile sıkıca sarılıp yapıştırılır ve 4-5x 18-20 cm boyutlarında PVC sert plastik su borunun açık kalan 2 ucuna (üst ve alt kısımlarına) köpük tıkaçlar tıkanarak bantlanır. Üzerine hasta protokol numarası veya ismi yazılır. Üçüncü kap olarak tahta kutu kullanılabilir. Tahta kutunun içine polistiren köpük tabakası ve pamuk yatak yerleştirilir. Kültür tüpü içeren PVC boruları birbirlerine temas etmeyecek şekilde kutunun içine yerleştirilir.

Hasta protokol kağıtlarını ve listesini tekrar kontrol edip kutunun içine ayrı olarak koyduktan sonra kutu kapatılır, üzerine 'tehlikeli biyolojik etken' etiketi yapıştırılır (13).

**Mikroskopik inceleme**

Mikroskopik inceleme ile TB basillerinin saptanması, tanı da en hızlı, en ucuz, en yararlı yöntemdir. Örneklerin santrifüjle bir tüpün dibine çöktürülerek toplanması, yani yoğunlaştırılması ve buradan yayma yapılması tanı koyma şansını arttırabilir.

Yayma hazırlandıktan sonra uygun bir yerde kurumaya bırakılır. Olanak varsa kurutma işlemi U.V ışığı olan kapalı bir kutuda veya kabinde yapılmalıdır. Kuruyan preparatlar zaman geçirilmeden tesbit edilmelidir. Tesbit edilmezse kurumuş balgamdaki basiller hava akımı ile havaya karışabilir (13,14).

Öze, iğne yakılmadan önce % 95 alkol veya % 5 fenollü kum içine birkaç kez daldırılıp çıkarıldıktan sonra steril edilebilir (7). Alevde tesbit edilen preparatlarda canlı basil kalabilir. Bu nedenle dezenfektan solüsyon içeren kaplarda bekletildikten sonra atılmalıdır.

ARB saptamaya yönelik 3 boyama yöntemi vardır: Karbol-fuksin temelli (EZN, Kinyoun) boyalar, florokrom boyalar. Boyama sırasındaki yıkama işlemleri çeşme suyu ile yapılmaz, distile su kullanılır (çeşme suyunda aside dirençli basiller olabilir). Mikroskopik inceleme sırasında immersiyon objektifi her incelemmeden önce ve sonra tek kullanımlık objektif silme kağıdı ile ya da tek kullanımlık hazırlanmış ince gazlı bez ile silinmelidir. Aksi halde bir önceki müspet preparattan objektife yapışan ARB'ler yanlış pozitifliğe neden olabilir. İmmersiyon yağı damlatılan damlalıklar kesinlikle lama değiştirilmemelidir. Basil nakli yanlış pozitifliklere yol açabilir. Bir yaymaya negatif demeden önce 300 alan (yaklaşık 15 dakika) taranmalı ve rapor edilmelidir (13,14) ( tablo 2).

Tablo 2. Aside dirençli basillerin raporlanması

Basıl Sayısı	Raporlama
300 alanda hiç basil yok	Negatif
300 alanda 1-2 basil	Şüphelidir, testi tekrarlayın
100 alanda 1-9 basil	+
10 alanda 1-9 basil	++
1 alanda 1+9 basil	+++
1 alanda 10 ya da daha fazla basil	++++

Mikroskopik inceleme yapılan laboratuvarlarda uyulması gereken standartlar (15):

- Her yeni kullanım için açılan boyama malzemesinde, florokrom boyalarda her kullanımda ve florokrom dışı boyalarda her gün pozitif ve negatif kontrol kullanılmalıdır.
- Örnekler arasında çapraz kontaminasyonu önlemek için lamalar ayrı ayrı boyanır.
- Her yeni ticari sistem ya da test ayıraçları negatif ve pozitif kontrol ile denenmelidir.
- Yayma sonuçları örnek kabulünden itibaren 24 saat içinde ilgili hekime bildirilmelidir.
- Florokrom pozitif boyamalar karbolfuksin temelli boyama ile doğrulanmalı ya da tecrübeli bir ikinci kişi tarafından pozitif olarak değerlendirilmelidir.
- Negatif EZN boyamaları kültür sonuçlanıncaya kadar, pozitif yaymalar ise 1 yıl boyunca saklanmalıdır.

### Kültür

İdeal olarak, her gün tüberküloz kültürü çalışılmalıdır. Ancak haftada 20- 50 örnek çalışan bir laboratuvar haftada 3-4 kez tüberküloz kültürü çalışabilir (10).

Tüm işlemler sınıf I-II BGGK içerisinde yapılmalıdır.

Kültür için en az bir katı (Löwenstein-Jensen) ve sıvı besiyeri (BACTEC 460, MGIT) kullanılmalıdır (10,15)

Steril vücut sıvıları ya da örneklerinde dekontaminasyon işlemine gerek yoktur; doğrudan besiyerine ekilir.

Santrifüj işlemleri için antiaerosol biyogüvenlik korumalı santrifüjler kullanılmalı, örnekler en az 15 dakika  $\geq 3000 \times g$ 'de çevrilmelidir (10,15).

Her yeni besiyeri kullanımında negatif ve pozitif kontrol kökenler de ekilir (10).

Kontaminasyon oranları belirlenmeli ve % 5'in altında tutulmalıdır (16).

Otomatize sistem temelli olmayan sıvı besiyerleri ilk 1-3 hafta içinde 2-3 günde bir okunmalı, sonraki 6-12 hafta süresince ise haftada bir okunmalıdır. Katı besiyerleri ise ilk 1- 4 hafta süresince haftada 2 kez sonrasında ise haftada 1 kez okunmalıdır.

Tüm pozitif sıvı besiyerlerinden pasaj alınır, EZN yöntemiyle boyanır, katı besiyerine (karışık mikobakteri üremeleri açısından) ve kanlı besiyerine (kontaminasyon açısından) ekilir. Üreyen mikobakteri ilk basamakta *M. tubercu-*

*losis* kompleks, *M. avium* kompleks ya da *M. tuberculosis* kompleks dışı mikobakteri olarak tanımlanır.

Sadece kültür yapan laboratuvarlar, duyarlılık testleri için kökeni referans laboratuvara 24- 48 saat içinde göndermelidir. Köken yanında hasta bilgilerini, örneğin tipini, EZN sonucunu içeren belgeler de olmalıdır (10,15).

Pozitif kültür sonucu hızla ilgili hekime bildirilir.

Kültür sonucu bildirilirken CDC (Centers for Disease Control) önerileri kullanılabilir (tablo 3) (14).

Tablo 3. Kültürde üreyen mikobakteri kolonilerin sonuç bildirimi

Koloni sayısı	Sonuç
< 50	Koloni sayısı
50-100	+1
100-200	+2
Yarı- yaygın	+3
Yaygın	+4

Örneğin kabulünden 14- 21 gün içinde *M. tuberculosis* kompleks üretilmesi amaçlanmalıdır (modern sıvı bazlı besiyerleri).

Üretilen *M. tuberculosis* kompleks en az 6 ay saklanmalıdır. Referans laboratuvarı için ise bu süre en az 3 yıldır.

Referans laboratuvarları salgın ya da laboratuvarında kontaminasyon durumunda epidemiyolojik analiz için moleküler yöntemleri ya doğrudan uygulamalı ya da ilgili laboratuvarlara yönlendirmelidir (10).

### Tip tayini

Konvansiyonel kültür ve biyokimyasal yöntemler (üreme özelliklerinin incelenmesi, niasin, nitrat redüksiyon, katalaz, pirazinamidaz, üreaz, NAP (p-nitro-a-acetylamino-beta-hydroxypropiofenone) testleri yanında günümüzde olanakları olan laboratuvarlarda yüksek performanslı sıvı kromatografi, DNA problemleri ile özgül genetik tanımlama ve BACTEC 460 NAP testi gibi yeni tanımlama yöntemleri de kullanılmaktadır (17,18).

### Duyarlılık testleri

Duyarlılık testleri belirtilen koşullarda yapılır (10,17):

- tüm ilk kez üreyen *M. tuberculosis* kompleks olguları
- 3 aylık tedaviye rağmen kültür pozitif hastalar
- kllinik olarak tedaviye yanıtız olgular
- daha öncesinde başarılı anti-TB tedaviye rağmen relaps gelişen olgular

Rifampisin, izoniazid, etambutol, streptomisin, pirazinamid duyarlılıkları bakılır(10).

Direnç- oran, mutlak konsantrasyon ve orantı yöntemleri uygulanır.

Hızlı duyarlılık testleri de kullanılabilir (17):

- Radyometrik Kültür Sistemi
- Floresan Kültür Sistemi
- Kolorimetrik Kültür Sistemi

- ESP II kültür sistemi
- E-test yöntemleri

Duyarlılık testleri hızla ilgili hekime bildirilir (10).

*M. tuberculosis* kompleks duyarlılık testleri yapan laboratuvarlar en az haftada 1 kez duyarlı bir kökeni test etmelidir (15). İlk kez izole edilen *M. tuberculosis* kompleksi bir (pirazinamid hariç) veya birden fazla ilaca dirençli ise sekonder ilaç duyarlılıkları belirlenmelidir (15).

Sonuç olarak; düzeylerine göre belirlenen standartlar doğrultusunda yapılan mikobakteriyoloji laboratuvarlarında biyogüvenlik önlemleri yanında ayrıca yapılacak çalışmalarda (mikroskopik inceleme, kültür, tip tayini, duyarlılık testleri, örnek saklama ve nakil koşulları) da uyulacak belli başlı standart kuralları belirlenir. Belirlenen bu standartlar doğrultusunda çalışıldığında ise bir mikobakteriyoloji laboratuvarından zamanında, güvenilir ve verimli sonuçlar elde edilir.

#### KAYNAKLAR

1. Drobniewski FA, Hoffner S, Rusch-Gerdes S et al. Recommended standards for modern tuberculosis laboratory services in Europe. *Eur Respir J* 2006; 28(5): 903-9.
2. WHO (World Health Organization): Strategic approach for the strengthening of laboratory services for tuberculosis control 2006-2009, WHO/ HTM/ TB/ 2006.364.
3. International Union against TB and Lung Disease (IUATLD)- WHO, International Course on the Management of TB Laboratory Networks in Low- Income Countries. Ottawa, Canada,2000.
4. Ceyhan İ. Ülkemize Uygun Tüberküloz Laboratuvar Yapılanması. 21 Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu Kitabı 11-12 Haziran 2003, Samsun; 428-42.
5. WHO (World Health Organization): Tuberculosis Handbook. Global Tuberculosis Programme. Geneva, Switzerland,1998.
6. WHO (World Health Organization). TB Manual National Tuberculosis Programme Guidelines, Warsaw.2001.
7. Gümüşlü F, Ceyhan İ, Kocagöz T, Sönmez N. Tüberküloz Laboratuvar Rehberi. T.C Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı Ankara;1998.
8. CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Goals for Working Safely with Mycobacterium Tuberculosis in Clinical, Public Health, and Research Laboratories. Department of Health and Human Services. Federal Register / Vol. 62, No. 81 /April 28, 1997 / Notices.
9. WHO ( World Health Organization), Laboratory services in tuberculosis control. Part I: Organization and Management, WHO/TB/98.258. Geneva.1998.
10. National Tuberculosis Advisory Committee. Guidelines for Australian mycobacteriology laboratories. *Commun Dis Intel* 2006; 30 (1):116-28
11. WHO ( World Health Organization), Laboratory services in Tuberculosis Control. Part II: Microscopy, WHO/TB/98.258. Geneva.1998.
12. WHO ( World Health Organization), Laboratory services in Tuberculosis Control. Part III: Culture, WHO/TB/98.258. Geneva.1998.
13. Özkara Ş, Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H. Türkiye’de Tüberkülozun kontrolü için Başvuru Kitabı. T.C Sağlık Bakanlığı, Verem Savaşı Daire Başkanlığı. Ankara, 2003.
14. Morris A. Chapter 12: Mycobacteriology. Laboratory Methods and Standards Guidelines for Tuberculosis Control in New Zealand 2003. (www.moh.govt.nz).
15. Mycobacteriology Laboratory Standards. New York State Department of Health Wadsworth Center Clinical Laboratory Evaluation Program (erişim tarihi 05/10/06). (www.wadsworth.org).
16. Vossler JL. Mycobacterium tuberculosis and other nontuberculous mycobacteria. In: Mahon CR, Manuseils G, eds. Textbook of diagnostic Microbiology. 2<sup>nd</sup> ed. U.S.A: W.B Saunders Company, 2000: 667-707.
17. Mycobacteria. In: Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G, eds. Koneman’s Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams& Wilkins, 2006: 1064-124.
18. Laszlo A. Tuberculosis: 7. Laboratory aspects of diagnosis. *Canadian Medical Association Journal* 1999 Jun 15;160 (12):1725-9.