

Mikobakterilerin Üretilmesinde Kanlı Agar Besiyerinin Değerlendirilmesi*

Evaluation of Blood Agar Medium for the Growth of Mycobacteria

Ahmet Yılmaz ÇOBAN¹, Alper AKGÜNEŞ², Belma DURUPINAR¹

¹ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun.

¹ Ondokuz Mayıs University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Samsun, Turkey.

² Samsun Göğüs Hastalıkları Hastanesi, Mikobakteriyoloji Laboratuvarı, Samsun.

² Samsun Chest Diseases and Chest Surgery Hospital, Mycobacteriology Laboratory, Samsun, Turkey.

* Bu çalışma, XV. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi (23-27 Mart 2011, Antalya)'nde poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 08.04.2011 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 02.06.2011

ÖZET

Bu çalışmada Samsun Göğüs Hastalıkları Hastanesi Mikobakteriyoloji Laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden mikobakterilerin üretilmesinde kanlı agarın değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, 123'ü balgam, 28'i bronkoalveoler lavaj (BAL) ve beşi plevral sıvı örneklerinden oluşan toplam 156 klinik örnek dahil edilmiştir. Örnekler dekontaminasyon işleminden sonra aside dirençli boyama (ARB) ile mikroskopik olarak incelenmiş ve eş zamanlı olarak Löwenstein-Jensen (LJ), BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, ABD) ve kanlı agar besiyerine ekim yapılarak elde edilen veriler değerlendirilmiştir. Çalışmamızda 35 mikobakteri (33 *Mycobacterium tuberculosis* ve iki atipik mikobakteri) suşu kanlı agarda, 38 mikobakteri (36 *M.tuberculosis* ve iki atipik mikobakteri) suşu LJ besiyerinde ve 46 mikobakteri (44 *M.tuberculosis* ve iki atipik mikobakteri) suşu BACTEC MGIT 960 sisteminde üremiştir. ARB sonucu negatif olan 29 örneğin 20'sinde kanlı agar ve LJ'de, 27'sinde ise MGIT sisteminde üreme saptanırken; ARB pozitif bulunan 20 örneğin 15'inde kanlı agar, 18'inde LJ besiyeri ve 19'unda MGIT sisteminde üreme olmuştur. Toplam 156 örneğin 15 (%9.6)'ı kanlı agarda, 16 (%10.2)'sı LJ besiyerinde ve 18 (%11.5)'i BACTEC MGIT 960 sisteminde kontaminasyonla sonuçlanmıştır. Üreme zamanları kanlı agar için 5-35 gün (ortalama 18 ± 7.4), LJ besiyeri için 11-35 gün (ortalama 19 ± 5.9) ve BACTEC MGIT 960 için 5-15 gün (ortalama 10 ± 2.4) olarak saptanmıştır. BACTEC MGIT 960 sisteminde kontamine olan üç örnekte, hem kanlı agar hem de LJ besiyerinde kontaminasyon olmadan üreme gözlenmiştir. Bir örnekte etken yalnızca LJ besiyerinde ürerken, kanlı agar ve BACTEC MGIT 960 sisteminde ürememiştir. Aynı şekilde bir diğer örnekte etken yalnızca kanlı agarda üremiş, LJ besiyeri ve BACTEC MGIT 960 sis-

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Ahmet Yılmaz Çoban, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 55139 Samsun, Türkiye. Tel (Phone): +90 362 3121919/3526, E-posta (E-mail): cobanay2003@gmail.com

teminde üreme olmamıştır. Altı klinik örnekte ise etken yalnızca BACTEC MGIT 960 sisteminde ürerken diğer iki besiyerinde üretilmemiştir. Sonuç olarak, mikobakterilerin izolasyonunda katı ve sıvı besiyerlerinin beraber kullanımının birbirini tamamladığı izlenmektedir. Ayrıca mikobakterilerin üretilmesinde kanlı agar, en az LJ besiyeri kadar etkili gibi görünmekle birlikte, bu konuda daha fazla sayıda örnek ile yapılacak çok merkezli çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar sözcükler: Mikobakteri; *Mycobacterium tuberculosis*; kültür; kanlı agar.

ABSTRACT

This study was aimed to evaluate the performance of blood agar for the growth of mycobacteria from clinical specimens sent to Mycobacteriology Laboratory of Samsun Chest Diseases Hospital. One hundred fifty six clinical specimens including 123 sputum, 28 bronchoalveolar lavage (BAL) and 5 pleural fluid specimens were inoculated in Löwenstein-Jensen (LJ), BACTEC MGIT 960 system (Becton Dickinson, USA) and blood agar following decontamination process. The specimens were also simultaneously examined for the presence of acid-fast bacilli (AFB). Thirty five mycobacteria strains (33 *Mycobacterium tuberculosis* and 2 atypical mycobacteria) grew in blood agar, 38 (36 *M. tuberculosis* and 2 atypical mycobacteria) in LJ media and 46 (44 *M. tuberculosis* and 2 atypical mycobacteria) in BACTEC MGIT 960 system. Among 29 AFB negative specimens, 20 revealed growth in both blood agar and LJ medium and 27 in MGIT system. AFB positive 20 samples yielded growth in 15 samples in blood agar, 18 in LJ medium and 19 in MGIT system. Among the total of 156 samples, contamination was observed in 15 (9.6%) samples in blood agar, 16 (10.2%) in LJ medium and 18 (11.5%) in MGIT system. Growth time was 5-35 days (mean 18 ± 7.4), 11-35 days (mean 19 ± 5.9) and 5-15 days (mean 10 ± 2.4) for blood agar, LJ medium and BACTEC MGIT 960 system, respectively. The three samples which revealed contamination in BACTEC MGIT 960 system, grew successfully in both blood agar and LJ medium without contamination. In one sample, growth was observed only in LJ medium but neither in blood agar nor BACTEC MGIT 960 system. However, in another sample, growth was observed only in blood agar while no growth was detected in LJ or BACTEC MGIT 960 system. Six samples yielded mycobacteria only in BACTEC MGIT 960 system. These results indicated that simultaneous use of one liquid and one solid medium to grow mycobacteria from the clinical samples seemed to be complementary. Blood agar was a promising choice since it was found to be as effective as LJ medium for the growth of mycobacteria, however, this issue needs to be further evaluated in a multicentre study with a larger specimen collection.

Key words: *Mycobacteria*; *Mycobacterium tuberculosis*; culture; blood agar.

GİRİŞ

Mikobakteri türleri özellikle de *Mycobacterium tuberculosis* yavaş üreyen mikroorganizmalardır. Mikobakterilerin üretilmesinde; yumurta bazlı katı besiyerleri [Löwenstein-Jensen (LJ), Ogawa ve Petragnani besiyerleri], agar bazlı katı besiyerleri (Middlebrook 7H10 ve 7H11 agar, TK-Medium Otomatize Sistem) ve sıvı besiyeri bazlı sistemler [BACTEC 460 TB Sistemi, BACTEC MGIT 960 Sistemi, VersaTREK (ESP Kültür Sistemi II), MB/BacT Mikobakteriyel Tespit Sistemi ve Septi-Chek AFB Bifazik Besiyeri] kullanılabilir. Mikobakterilerin üretilmesinde en az iki besiyerinin kullanılması alışlagelmiş bir durumdur. Daha hızlı ve iyi sonuç elde etmek için sıvı besiyerlerinin kullanılması önerilmektedir. Sıvı besiyerine ek olarak, örneklerin katı besiyerine de ekilmesi, üremeyi artırdığı gibi koloni morfolojisinin incelenmesine ve karışık mikobakteriyel enfeksiyonların tanımlanmasına olanak sağlamaktadır¹⁻³.

Son yıllarda yapılan az sayıdaki çalışmalarda, kanlı agarın, LJ besiyeri gibi mikobakteri türlerinin üretilmesinde rutin mikobakteriyoloji laboratuvarlarında kullanılabileceği gösterilmiştir⁴⁻⁹. Aynı zamanda kanlı agarın *M.tuberculosis* izolatlarının birinci ve ikinci kuşak antitüberküloz ajanlara duyarlılıklarının belirlenmesinde de kullanılabileceği bildirilmiştir¹⁰⁻¹⁵. Bu bilgiler ışığında çalışmanın amacı, rutin mikobakteriyoloji laboratuvarında LJ besiyeri ve otomatize sıvı kültür sistemiyle karşılaştırmalı olarak kanlı agar kullanımının değerlendirilmesidir.

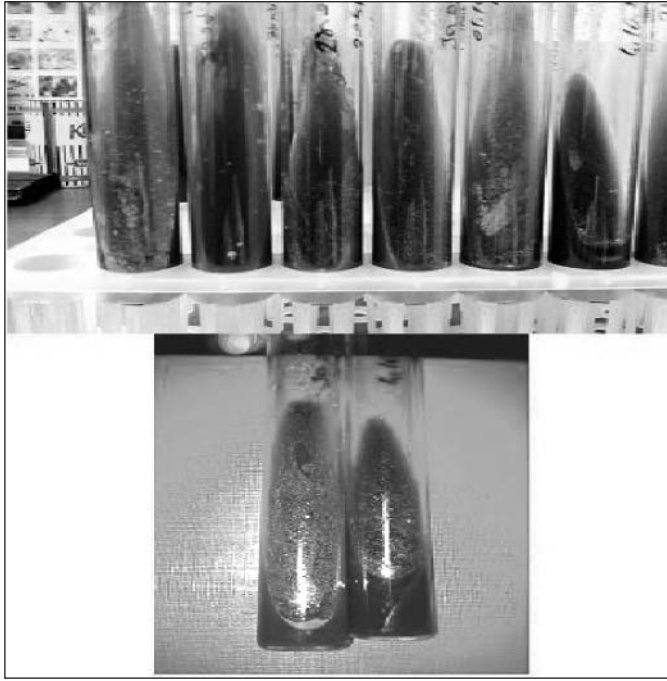
GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada, Samsun Göğüs Hastalıkları Hastanesi Mikobakteriyoloji Laboratuvarına Eylül 2010-Ekim 2010 tarihleri arasında gönderilen 123'ü balgam, 28'i bronkoalveoler lavaj (BAL) ve beşi plevral sıvı örneklerinden oluşan toplam 156 klinik örnek test edildi. Gelen örnekler %2'lik NaOH ile dekontaminasyon işleminden sonra aside dirençli boyama (ARB) için yayma preparat hazırlandı. Kalan sedimentten 100 µl LJ ve kanlı agar besiyerine ekilerek 37°C'de inkübe edildi. Aynı örnekten BACTEC MGIT 960 besiyerine (Becton Dickinson, ABD) firma önerilerine göre ekimler yapılarak cihazda inkübasyona bırakıldı. Kanlı agar ve LJ besiyerleri üreme açısından üç günde bir değerlendirildi. Üreme olmadığının rapor edilmesi için besiyerleri sekiz hafta inkübe edildi. BACTEC MGIT 960 sistemi (Becton Dickinson, ABD) ise üretici firma önerilerine göre değerlendirildi.

Kanlı agar besiyeri, üretici firmanın önerilerine göre kanlı agar toz besiyeri (BioMerieux, Fransa) kullanılarak hazırlandı ve 5 ml/L olacak şekilde gliserol eklendikten sonra 121°C'de 1 atm'de 15 dakika otoklavlandı. Daha sonra 45°C'ye kadar soğutulan besiyerine %5 olacak şekilde defibrine koyun kanı eklendi. Kontaminasyonu önlemek amacıyla besiyerine polimiksin, amfoterisin, nalidiksik asit, trimetoprim ve azlosilin (PANTA, Becton Dickinson, ABD) eklendi. Hazırlanan koyun kanlı besiyeri, ağız vidalı kapaklı tüplere dağıtılarak yatık bir şekilde donması sağlandı. Besiyerleri kullanılıncaya kadar 4°C'de saklandı.

BULGULAR

Çalışmamızda, örneklerin ARB sonuçları ile her üç besiyerinde elde edilen üreme sonuçları değerlendirilmiş ve bunlardan herhangi birinin pozitif olduğu 50 örneğe (50/156; %32) ait sonuçlar karşılaştırılmıştır. Sadece ARB pozitifliği saptanan ve hiçbir besiyerinde mikobakteri üremesi olmayan bir örnek değerlendirmeye alınmamış; kalan 49 örneğin besiyerlerinde üreme durumları, ARB sonuçlarına göre değerlendirilmiştir. Buna göre ARB negatif bulunan 29 örneğin altısında sadece BACTEC MGIT 960 sisteminde; ikisinde kanlı agar ve LJ besiyerinde; üçünde kanlı agar ve MGIT 960 sisteminde; üçünde LJ besiyeri ve MGIT 960 sisteminde; 15'inde ise her üç besiyerinde de üreme olmuştur. ARB pozitif bulunan 20 örnek değerlendirildiğinde, birinin sadece LJ besiyerinde; ikisinin kanlı agar ve MGIT 960 sisteminde; dördünün LJ besiyeri ve MGIT 960 sisteminde; 13'ünün ise her üç besiyerinde de ürediği belirlenmiştir (Resim 1). ARB sonuçlarına göre her bir besiyerinde saptanan üremeler Tablo I'de gösterilmiştir.



Resim 1. Kanlı agarda üreyen *Mycobacterium tuberculosis* kolonileri.

Tablo 1. ARB Sonuçlarına Göre Besiyerlerinde Gözlenen Üremeler

ARB sonucu (n)	KA			LJ			MGIT		
	Üreme Var	Kontamine Yok		Üreme Var	Kontamine Yok		Üreme Var	Kontamine Yok	
ARB negatif (29)	20	9	-	20	8	1	27	-	2
ARB pozitif (20)	15	5	-	18	2	-	19	-	1
Toplam (49)	35	14	-	38	10	1	46	-	3

ARB: Aside dirençli boyama, KA: Kanlı agar, LJ: Löwenstein-Jensen besiyeri, MGIT: BACTEC MGIT 960 sistemi.

Çalışma sonunda, 35 mikobakteri (33 *M.tuberculosis* ve iki atipik mikobakteri) suşu kanlı agarda, 38 mikobakteri (36 *M.tuberculosis* ve iki atipik mikobakteri) suşu LJ besiyerinde ve 46 mikobakteri (44 *M.tuberculosis* ve iki atipik mikobakteri) suşu BACTEC MGIT 860 sisteminde üremiştir.

Çalışılan toplam 156 örneğin 15 (%9.6)'i kanlı agarda, 16 (%10.2)'si LJ besiyerinde ve 18 (%11.5)'i BACTEC MGIT 960 sisteminde kontaminasyonla sonuçlanmıştır. Üreme zamanları kanlı agar için 5-35 gün (ortalama 18 ± 7.4), LJ besiyeri için 11-35 gün (ortalama 19 ± 5.9) ve BACTEC MGIT 960 için 5-15 gün (ortalama 10 ± 2.4) olarak saptanmıştır. Üç örnek BACTEC MGIT 960 sisteminde kontamine iken, hem kanlı agar hem de

LJ besiyerinde kontaminasyon olmadan üreme gözlenmiştir. Bir örnekte etken yalnızca LJ besiyerinde üerken, hem kanlı agarda hem de BACTEC MGIT 960 sisteminde üreme gözlenmemiştir. Aynı şekilde bir örnekte etken yalnızca kanlı agarda üemiş, hem LJ besiyerinde hem de BACTEC MGIT 960 sisteminde üreme olmamıştır. Altı klinik örnekte ise etken yalnızca BACTEC MGIT 960 sisteminde üretilmiş, diğer iki besiyerinde üreme olmamıştır.

TARTIŞMA

Çoğu mikobakteriyoloji laboratuvarı mikobakterilerin üretilmesinde katı besiyeri olarak yumurta bazlı LJ besiyerini kullanmaktadır. Buna ilave olarak imkanları olan laboratuvarlar tarafından sıvı bazlı otomatize sistemler de kullanılmaktadır. Katı besiyeri, sıvı kültürde kontaminasyon olması durumunda bakterinin üretilmesine destek olmaktadır. Sıvı besiyeri ile LJ besiyerinin birlikte kullanılması, izolasyonu %4-6 oranında artırmaktadır. Özellikle ekstrapulmoner örneklerde basil sayısı az olduğundan, bu örneklerin sıvı besiyerlerine ekilmesi izolasyon açısından önem taşır¹⁶.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, klinik mikobakteriyoloji laboratuvarlarının temel besiyeri olan kanlı agarın mikobakterilerin üretilmesinde de kullanılabileceğini göstermesi bu konuya ilgi duyulmasını sağlamıştır. Drancourt ve arkadaşları⁷, *M.tuberculosis* izolatlarının kanlı agarda 1-2 haftada kolayca ürediğini ve kanlı agarda klinik örneklerden izole edilen ortalama koloni sayısının, yumurtalı besiyerine göre anlamlı derece fazla olduğunu göstermişlerdir. Fransa'da yapılan bir çalışmada, mikobakterilerin izolasyonunda kanlı agar ile BACTEC 9000 MB sistemi zaman ve fiyat açısından karşılaştırılmıştır⁴. Fransa'da 1000 örnek analizi için kanlı agar kullanımının maliyeti 1913 Avro iken, BACTEC 9000 MB sistemi kullanılırsa bu miktar 8990 Avroya yükselmektedir. Kontaminasyon oranları her iki besiyerinde de eşit (%1.5) bulunmuştur⁴. Üreme zamanı kanlı agar için ortalama 19 ± 5 gün ve BACTEC 9000 MB sistemi için 22 ± 6 gün olarak saptanmıştır. Ayrıca çalışmada, tüberküloz dışı birçok mikobakteri türünün kanlı agarda üreyebildiği de gösterilmiştir⁴. Bizim çalışmamızda da kanlı agarda ortalama üreme zamanı 18 ± 7.4 gün olarak bulunmuş olup, kontaminasyon oranı kullandığımız her üç sistemde de bu çalışmaya göre yüksek saptanmıştır. Mathur ve arkadaşları⁵, kanlı agarda ortalama üreme zamanını 13.6 ± 5.2 gün, LJ besiyerinde ise 20.4 ± 5.1 gün olarak belirlemişler; ayrıca kanlı agarda LJ besiyerindekinden daha fazla koloni olduğunu rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda, üreme zamanları kanlı agar için 5-35 gün (ortalama 18 ± 7.4), LJ besiyeri için 11-35 gün (ortalama 19 ± 5.9) olarak saptanmış olup, üreyen koloni sayısı da LJ besiyerinde üreyenden daha fazladır (Resim 1).

Sonuç olarak kanlı agar, özellikle gelişmekte olan ülkelerde kısıtlı olanakları olan laboratuvarlarda mikobakterilerin üretilmesinde en az LJ besiyeri kadar etkili bir şekilde kullanılabilecek gibi görülmesine rağmen, bu konuda daha fazla sayıda örnek ile yapılacak çok merkezli çalışmalara gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. de Waard JH, Robledo J. Conventional diagnostic methods, pp: 401-24. In: Palomino JC, Leao SC, Ritacco V (eds), Tuberculosis 2007: From Basic Science to Patient Care. 2007, 1st ed. www.TuberculosisTextbook.com
2. Akyar I, Kocagoz T, Sinik G, Oktem S, Aytekin N, Kocagoz S. Lateral flow assay for rapid differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex and 97 species of mycobacteria other than tuberculosis grown in Löwenstein-Jensen and TK-SLC medium. Indian J Med Microbiol 2010; 28(4): 308-12.
3. Migliori GB, Matteelli A, Cirillo D, Pai M. Diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis and extensively drug-resistant tuberculosis: current standards and challenges. Can J Infect Dis Med Microbiol 2008; 19(2): 169-72.
4. Drancourt M, Raoult D. Cost-effectiveness of blood agar for isolation of mycobacteria. PLoS Negl Trop Dis 2007; 1(2): e83.
5. Mathur ML, Gaur J, Sharma R, Solanki A. Rapid culture of *Mycobacterium tuberculosis* on blood agar in resource limited setting. Dan Med Bull 2009; 56(4): 208-10.
6. Gil-Setas A, Mazon A, Alfaro J, Idigoras P. Blood agar, chocolate agar, and *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2003; 41(8): 4008.
7. Drancourt M, Carrieri P, Gévaudan MJ, Raoult D. Blood agar and *Mycobacterium tuberculosis*: the end of a dogma. J Clin Microbiol 2003; 41(4): 1710-1.
8. Mazón A, Gil-Setas A, Alfaro J, Idigoras P. Diagnosis of tuberculous arthritis from the isolation of *Mycobacterium tuberculosis* in blood agar and chocolate agar. Enferm Infecc Microbiol Clin 2000; 18(10): 527-8.
9. Kiliçturgay K, Gumrukcu E, Tubluk F, Saglam M. The results in our tuberculosis laboratory with penicillin blood agar medium. Mikrobiyol Bul 1977; 11(1): 29-33.
10. Coban AY, Bilgin K, Uzun M, et al. Susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin on blood agar. J Clin Microbiol 2005; 43(4): 1930-1.
11. Coban AY, Bilgin K, Uzun M, Akgunes A, Yusuf A, Durupinar B. Comparative study for determination of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibility to first- and second-line antituberculosis drugs by the Etest using 7H11, blood, and chocolate agar. J Clin Microbiol 2008; 46(12): 4095-8.
12. Coban AY, Cihan CC, Bilgin K, et al. Blood agar for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against first-line drugs. Int J Tuberc Lung Dis 2006; 10(4): 450-3.
13. Coban AY, Martin A, Uzun M, Bilgin K, Palomino JC, Durupinar B. Evaluation of blood agar for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against first-line antituberculous drugs: results from two centers. J Chemother 2008; 20(3): 388-90.
14. Satana D, Coban AY, Uzun M. Testing susceptibility of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* to second-line drugs by use of blood agar. J Clin Microbiol 2010; 48(11): 4291-3.
15. Yıldız C, Ulger M, Aslan G, Emekdas G. Isoniazid susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* on blood agar. Saudi Med J 2007; 28(6): 975-7.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute. Laboratory detection and identification of mycobacteria. Approved Guideline M48-A, 2008. CLSI, Wayne, PA.