

Mycobacterium Türlerinin Alt Solunum Yolu Örneklerinden Basit Besiyerleri ile İzolasyonu ve Maliyet/Etkinlik Analizi

Özgür Yanılmaz ©
Güner Söyletir ©

Isolation of Mycobacterium Species Using Simple Media Prepared From Lower Respiratory Tract Samples and Analysis of Cost/Effectiveness

Öz

Amaç: Tüberkülozun laboratuvar tanısında altın standart etkenin izolasyonudur. İzolasyon için en sık kullanılan besiyerleri, Lowenstein-Jensen (L-J) ve otomatize sıvı besiyerleridir (OSB). Ancak bu besiyerleri maliyet ve üretme zamanı açısından sorun olmaya devam etmektedir. Çalışmamızda alternatif olarak %5 koyun kanlı ağarın (KKA) etkinliği araştırılmıştır.

Yöntem: Marmara Üniversitesi Hastanesi ve T.C. Sağlık Bakanlığı Süreyyapaşa Göğüs Hastalıkları Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarlarına mikobakteri kültürü için gelen 617 alt solunum yolu örneği OSB, L-J ve KKA'ya ekildi.

Bulgular: Örneklerin 38'inde (%6.2) üreme saptanmış, bunların 36'sı OSB (%5.8), 31'i L-J (%5), sadece 5'i KKA (%0.8) ile izole edilmiştir. İzolasyon süreleri sırasıyla 14.53, 29.09 ve 19.2 gün olarak saptanmıştır. Çalışmanın ikinci aşamasında, aside dirençli basil saptanan alt solunum yolu örnekleri (n=108) işleme alınmış; standart besiyerlerinin yanı sıra örnekler, KKA'nın yarısına doğrudan diğer yarısına ise Middlebrook 7H9 sıvı besiyerinde 48 saat inkübe edildikten (M-7H9+KKA) sonra ekilmiştir. Örneklerin 75'i OSB (%69.4), 73'ü L-J (%67.6), 72'si ise M-7H9+KKA'da (%66.7) üretilmiştir. Doğrudan KKA'ya ekilen sadece bir örnekte (%1) üreme saptanmıştır. İzolasyon süresi OSB'de 14.57 gün iken, L-J'de 26.10 ve M-7H9+KKA'da 18.74 gün olarak saptanmış olup, izolasyon süreleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır (p<0.001).

Sonuç: Mikobakteri izolasyonunda OSB etkin ve hızlı sonuç veren ama maliyeti en yüksek seçenektir. Düşük maliyetli L-J ise geç izolasyon dezavantajına sahiptir. KKA, bakterinin ilk izolasyonunda en düşük etkinliği sergilemekle birlikte, M-7H9 ile zenginleştirme, besiyerini OSB ve L-J ile kıyaslanabilir düzeye çekmiştir. M-7H9+KKA yöntemi maliyet ve etkinlik açısından L-J'ye benzerlik gösterirken süre açısından üstünlük sağlamıştır. Çalışmamızın sonuçlarına göre otomatize sistemlere sahip olmayan laboratuvarlar için M-7H9+KKA yöntemi uygun bir alternatif olabilir.

Anahtar kelimeler: mikobakteri, izolasyon, koyun kanlı agar

ABSTRACT

Objective: Isolation of the causative agent is the gold standard for the diagnosis of tuberculosis. Most commonly used culture media for isolation are Lowenstein-Jensen (L-J) and automatic liquid medium (ALM). However, the cost and bacterial growth time still poses challenging concerns. In this study, as an alternative, effectiveness of 5% sheep blood agar (SBA) was investigated.

Method: Samples from lower respiratory tract (n=617) which were sent to laboratories of Marmara University Hospital and Süreyyapaşa Chest Diseases Hospital for mycobacterial culture were inoculated on ALM, L-J and SBA.

Results: Mycobacterial growth was observed in 38 samples. Thirty-six strains were grown on ALM (5.8%), 31 on L-J (5%) and only 5 on SBA (0.8%). Times to their isolation were calculated as 14.53, 29.09 and 19.2 days respectively. In the study period, we also inoculated 108 lower respiratory tract samples which were positive for acid-fast bacteria, on ALM, L-J and SBA. For inoculation on SBA, samples were seeded after enrichment by incubation in Middlebrook-7H9 broth for 48 hours. Totally, 75 of the samples (69.4%) exhibited growth in ALM, 73 (67.6%) on L-J and, 72 (66.7%) on M-7H9+SBA, requiring isolation times of 14.57 days for ALM, 26.10 days for L-J and, 18.74 days for M-7H9+SBA. Statistically significant differences were detected between isolation times of these media (p<0.001).

Conclusion: SBA showed comparable growth rates with that of ALM and L-J media and was superior than L-J in respect to mycobacterial isolation time while their costs were similar. Low-cost L-J has an disadvantage of having longer isolation times. Although SBA displayed the lowest effectiveness at first bacterial isolation, thanks to enrichment with M-7H9 its performance reached comparable levels with ALM and L-J. M-7H9+KKA method resembles L-J in terms of cost-effectiveness, but it is superior to L-J in terms of isolation times. According to the results of our study, M-7H9+SBA method might be an alternative for laboratories where automated systems are not available.

Keywords: mycobacterium, isolation, sheep blood agar

Received: 29 January 2019
Accepted: 12 June 2019
Publication date: 31 January 2020

Cite as: Yanılmaz Ö, Söyletir G. Mycobacterium türlerinin alt solunum yolu örneklerinden basit besiyerleri ile izolasyonu ve maliyet/etkinlik analizi. İKSSTD 2020;12(1):77-81.

Özgür Yanılmaz
Marmara Üniversitesi
İstanbul Pendik EAH
Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı
İstanbul - Türkiye
✉ dryanilmaz@gmail.com
ORCID: 0000-0003-3847-7288

G. Söyletir 0000-0001-5695-731X
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
İstanbul - Türkiye

GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre; dünya nüfusunun yaklaşık 1/3'ü *Mycobacterium tuberculosis* ile enfektedir. Hastanın kesin tanısı için etkenin laboratuvarında izolasyonu ve tanımlanması gereklidir. Tüberkülozun laboratuvar tanısı için uygulanan geleneksel yaklaşımlar; klinik örneklerden aside dirençli boyama yapılarak mikroskopik inceleme ile basil (ARB) aranması ve örneğin katı ve/veya sıvı besiyerine ekiminin yapılarak kültürde izolasyonudur. Mikroskopik incelemede basil saptanabilmesi için, örneğin mililitresinde 5.000-10.000 basil bulunmalı, kültürde pozitifliğin saptanabilmesi için ise mililitrede 10-1.000 canlı basil bulunması yeterlidir ⁽¹⁾. Bu nedenle ARB sonucu negatif bulunan örneklerin de kültürlerinin yapılması önerilmektedir.

Katı besiyeri olarak kullanılan Lowenstein-Jensen (L-J) besiyeri maliyet olarak ucuz olmasına rağmen izolasyon için genellikle 4-8 hafta gibi bir süreye ihtiyaç duymaktadır. Sıvı besiyeri olarak kullanılan otomatize sıvı besiyeri (OSB) ise katı besiyerine göre daha hızlı izolasyon yeteneğine sahiptir. Fakat bu sistemin pahalı olması özellikle ülkemiz gibi gelişmekte olan ülkeler için dezavantaj oluşturmaktadır. Biz de çalışmamızda L-J ve OSB sistemine alternatif olarak düşük maliyetli %5 Koyun Kanlı Agar'ın (KKA) etkinliğini diğer iki besiyeri ile karşılaştırmayı planladık. Bu amaçla alt solunum yolu örneklerinin [balgam ve bronkoalveolar lavaj (BAL)] L-J, OSB ve KKA'ya ekimini yaparak üreme sayı ve sürelerini kıyasladık.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamız için Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden 27.02.2009 tarih ve B.30.2.MAR.0.01.02/AEK/126 sayı ile ve Sağlık Bakanlığı Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesinden 21.10.2010 tarih ve 6/E karar no ile etik kurul onayı alınmıştır.

Marmara Üniversitesi Hastanesi Mikobakteriyoloji Laboratuvarı ve T.C. Sağlık Bakanlığı Süreyyapaşa Göğüs Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'na Ağustos 2009-Nisan 2011 tarihleri arasında gelen alt solunum yolu örnekleri ile ARB pozitif olduğu saptanan yaklaşık 100 alt solunum yolu örneği çalışmaya dahil edildi.

Toplanan örneklerin preparatları; balgam örneklerinden direkt yayma preparatı olarak, BAL örneklerinin

miktarı 10 ml.'den fazla ise santrifüj sonrası sedimentten hazırlandı. Laboratuvara gelen BAL örnekleri KKA'ya ekildi. 24 saatlik inkübasyondan sonra üreme olmayanlar doğrudan, üreme olanlar ve balgam örnekleri dekontaminasyon işleminden sonra L-J, OSB ve KKA besiyerlerine ekildi. Dekontaminasyon işlemi gereken örnekler NALC-NaOH (N-asetil-L-sistein-sodyum hidroksit) metoduyla dekontamine edildi. Homojenize edilmiş örneklerden 0.5 ml OSB'ye, 0.2 ml. L-J besiyerine ve KKA'ya ekim yapıldı. Örnek ekilmeden önce kontaminasyonu engellemek amacıyla OSB'ye 0.1 ml PANTA (polimiksin B, amfoterisin B, nalidiksik asit, trimetoprim, azlosillin) eklendi. Örneklerin OSB, L-J ve KKA besiyerlerine ekimleri yapıldıktan sonra 8 hafta süreyle 35-37°C'lik etüvde inkübe edildi. Uzun süreli inkübasyon nedeniyle kurumayı önlemek amacıyla KKA parafilm ile sarıldı ve içi su dolu kaplar ile inkübatörün neminin artırılması sağlandı. Üreme saptanan besiyerlerinden EZN boyama yapılarak kontaminasyon açısından değerlendirildi.

Çalışmanın ikinci aşamasında, Süreyyapaşa Göğüs Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikobakteriyoloji Laboratuvarında EZN pozitif olarak saptanan alt solunum yolu örnekleri, homojenizasyon ve dekontaminasyon işlemi takiben OSB ve L-J besiyerlerine ek olarak KKA'nın bir yarısına doğrudan, diğer yarısına ise 0,5 ml. örnek Middlebrook-7H9 (M-7H9) sıvı besiyerinde 48 saat inkübe edildikten sonra ekildi. Tüm besiyerlerine ekilen örnek hacimleri ve üreme takipleri birinci aşamadakine benzer şekilde gerçekleştirildi.

OSB, L-J, KKA ve M-7H9+KKA besiyerlerindeki aside dirençli basil üremesi ve üreme süreleri karşılaştırıldı. Verilerin istatistiksel değerlendirmesinde Mann-Whitney U Test ve One Way ANOVA yöntemleri kullanılmıştır.

BULGULAR

İlk aşamada toplam 540 alt solunum yolu örneği incelenmiş ve 34'ü (%6,3) EZN pozitif olarak saptanmıştır. Üreme ve EZN sonuçlarının dağılımı Tablo 1'de verilmiştir.

Çalışmamızın ilk aşamasında; 38 *Mycobacterium tuberculosis* izolasyonunun, 36'sı (%95) OSB'de gerçekleşirken 31'i (%82) Lowenstein-Jensen besiyerinde ve sadece 5'i koyun kanlı agarda gerçekleşmiştir.

Tablo 1. Birinci aşamada çalışılan örneklerin (n=540) direkt inceleme ve kültür sonuçları.

	EZN pozitif n (%)	Üreme pozitif n (%)	Toplam n
Balgam	28 (10.1)	30 (10.8)	278
BAL	6 (2.3)	7 (2.7)	262
Toplam	34 (6.3)	37 (6.9)	540

Etkinlik açısından OSB ve L-J besiyerleri benzer değerleri göstermekle birlikte OSB, kullanılan besiyerleri içinde en kısa sürede üreten ama en pahalı besiyeri olarak karşımıza çıkmaktadır (Tablo 2).

Tablo 2. Çalışmanın birinci aşamasında besiyerlerinde mikobakterilerin ortalama izolasyon süreleri ve test maliyetleri.

	OSB	LJ	KKA
Üreme süresi (Gün±SD)	14.53±2.97	29.09±7.61	19.2±3.35
Maliyet (TL)	48,16	4.13	2.06

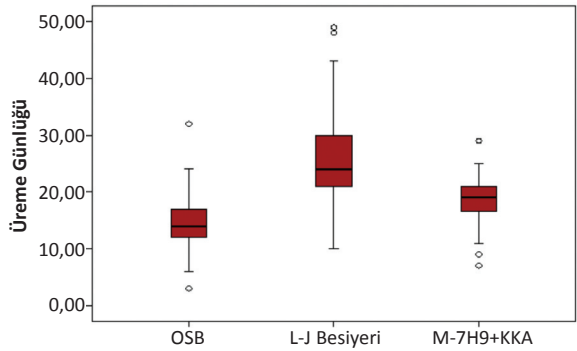
Üreme süreleri açısından besiyerleri arasında gözlenen fark, EZN pozitif ve negatif örnekler kıyaslandığında daha belirgin olarak karşımıza çıkmaktadır. OSB’de, EZN pozitif örneklerin ortalama izolasyon süresi 12,69±3,4 gün iken EZN negatif örnekler için bu süre 14.5±.88 gün tespit edilmiş ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p≤0.05). Ancak L-J besiyerinde; EZN pozitif örnekler (ortalama süre 28.6±7.17 gün) ile EZN negatif örnekler (ortalama süre =29.1±13.07 gün) arasında fark saptanmamıştır (p>0.05).

Çalışmanın ikinci aşamasında toplam 108 EZN pozitif örneğin 80’inde (%74.1) kullanılan besiyerlerinden herhangi biri ile *Mycobacterium tuberculosis* izole edilmiştir (Tablo 3).

Mycobacterium tuberculosis üreyen örneklerin 75’i (%94) OSB’de ortalama 14,91 günde, L-J besiyerinde

Tablo 4. Çalışmanın ikinci aşamasında EZN pozitif örneklerden *Mycobacterium tuberculosis* izole edilen kültürlerde besiyeri verimliliği ve test maliyeti.

	OSB	LJ	M-7H9+KKA
Pozitif kültür (n=80)	75 (%94)	73 (%91)	72 (%90)
Üreme günü	14.91±3.93	26.52±8.28	19.14±3.5
Maliyet (TL)	48.16	4.13	4.13



Şekil 1. Besiyerlerinde üreme günü dağılımı.

73’ü (%91) ortalama 26.52 günde, M-7H9+KKA besiyerinde ise 72’si (%90) ortalama 19.14 günde üretilmiştir. Bu örneklerin besiyerlerinde üreme oranları, süreleri ve test maliyetleri Tablo 4’de verilmiştir.

Maliyeti L-J kadar olan M-7H9+KKA besiyeri, ortalama izolasyon günü açısından daha üstün görünmektedir. OSB, L-J ve M-7H9+KKA besiyerlerinin ortalama izolasyon süreleri One Way ANOVA yöntemiyle istatistiksel yönden değerlendirildiğinde besiyerlerinin ikiyeşerli kıyaslamalarında aralarında anlamlı farklar bulunmuştur (p<0.001) (Şekil 1).

TARTIŞMA

Tüberküloz tanısı için altın standart etkenin izolasyonudur. Bu amaçla sıklıkla kullanılan katı besiyeri (L-J)

Tablo 3. Çalışmanın ikinci aşamasında EZN pozitif örneklerin besiyerlerinde izolasyon oranları.

	OSB+LJ + M-7H9 n (%)	OSB + LJ n (%)	OSB + M-7H9 n (%)	Sadece OSB n (%)	Sadece LJ n (%)	Toplam üreme n (%)
Balgam (n=98)	62 (63.3)	1 (1)	4 (4.1)	2 (2)	4 (4.1)	73 (74.5)
BAL (n=10)	5 (50)	0 (0)	1 (10)	0 (0)	1 (10)	7 (70)
Toplam (n=108)	67 (62)	1 (0.9)	5 (4.6)	2 (1.9)	5 (4.6)	80 (%74.1)

*Sadece M-7H9’da ve sadece KKA’da üreyen olmadığı için tabloda yer verilmemiştir.

izolasyon için ortalama 4-8 haftaya ihtiyaç duymaktadır. İzolasyon süresini azaltmak üzere Tarshis ve ark.'nın ⁽²⁾ 1955 yılında yapmış olduğu çalışma kanlı agarın bu amaçla kullanıldığı ilk çalışmalardan biri olma özelliğini taşımaktadır. Bu araştırmacılar, KKA ve L-J besiyerlerini karşılaştırdıkları çalışmalarında tüberküloz tanısı almış toplam 1515 hasta örneğinin 1427'sini kanlı agarda, 1365'ini ise L-J besiyerinde ürettiklerini bildirmişlerdir. Sonraki yıllarda izolasyon süresini azaltabilmek için geliştirilmiş otomatize sıvı besiyeri bu süreyi ortalama 2 haftaya indirmiştir. Fakat bu sistemin pahalı olması, ülkemiz gibi gelişmekte olan ülkeler için önemli dezavantajlar oluşturmaktadır. Drancourt ve ark.'nın ⁽³⁾ 2007 yılında yapmış olduğu çalışmada KKA kullanımı yeniden gündeme gelmiştir. Araştırmacılar, mikobakteri izolasyonunda KKA ile BACTEC 9000MB sıvı besiyerini karşılaştırmış ve 95 pozitif örneğin 94'ünü KKA'da üreten BACTEC 9000MB ile 88 adedini izole edebilmişlerdir ($p=0.03$). Ortalama izolasyon sürelerini KKA'da 19 ± 5 gün iken, BACTEC'te 22 ± 6 gün olarak tespit etmişlerdir ($p=0.1$). Benzer şekilde, Mathur ve ark.'nın ⁽⁴⁾ 2009 yılında yapmış olduğu çalışmada EZN pozitif 70 balgam örneğinden KKA ve L-J'ye ekim sonrası izolasyon sayıları sırası ile 66 ve 68 olarak belirtmişler, ortalama izolasyon sürelerini ise KKA için 13.6 ± 5.2 gün, L-J için ise $20,4\pm 5,1$ gün olarak saptamışlardır ($p=0.0001$).

Bizim çalışmamızda topladığımız 617 örneğin 38'inde üreme saptanmıştır. Ortalama 14.53 ± 2.97 günde 36 adet *Mycobacterium tuberculosis* izole edebilen OSB %95 izolasyon oranı ile çalışmamızdaki en etkin besiyeri olarak belirlenmiştir. Fakat bu sistem etkin olmasına karşın, 48,16TL/test maliyeti ile diğer besiyerlerine göre oldukça pahalıdır (10.05.2019 1€=6,88TL). Aynı örneklerden ortalama 29.09 ± 7.61 günde 31 adet *Mycobacterium tuberculosis* izole edebilen L-J besiyeri etkinlik açısından %82.1 oranında izolasyon sağlamıştır. Fakat bu besiyerinin izolasyon için çok uzun bir süreye ihtiyaç duyuyor olması tüberkülozun erken tanısının sağlanması amacı ile tezat oluşturmaktadır. Koyun kanlı agarın 2,06TL/test fiyatı ile maliyet açısından çok uygun olmasına, ortalama izolasyon süresi açısından da 19.2 ± 3.35 gün ile OSB'ye kıyasla uzun fakat L-J besiyerine kıyasla daha kısa bir süreye gereksinim duymasına rağmen, % 13 izolasyon oranı ile yalnızca 5 adet örnekten izolasyon sağlayabilmiş olması bu besiyerinin rutin mikobakteriyoloji laboratuvarında primer izolasyon amacıyla kullanılabilmesinin önündeki en büyük engel gibi görün-

mektedir. 2007 ve 2009 yıllarında yapılan çalışmalar otomatize sistemden dahi daha iyi performans elde etmeleri bizim sonuçlarımızla tezat oluşturmaktadır ^(3,4). Bizim çalışmamızla diğer iki çalışma arasındaki temel fark araştırmacıların ifadesi ile kurumayı önlemek için kanlı agar besiyerlerinin tüpte hazırlanmış olmasıdır. Ancak bu kadar düşük düzeyde izolasyon elde etmemiz araştırmacıların kullandığı kanlı agar tüplerle açıklanamaz. Bunun yanısıra Drancourt ve ark.'nın ⁽³⁾ kanlı agarda saptadıkları üreme süresi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sıvı besiyerine kıyasla daha kısa olması literatür bilgilerimizle de bağdaşmamaktadır.

Çalışmanın bir sonraki aşamasında EZN pozitif 108 örnekten, OSB ortalama 14.91 ± 3.93 gün ile 75 örnekten izolasyon sağlamayı başarmış iken L-J besiyerinde ortalama 26.52 ± 8.28 gün ile 73 izolasyonda kalmıştır. Bu aşamada en dikkat çekici nokta 7H9 Middlebrook sıvı besiyerinde zenginleştirme yapıldıktan sonra pasaj yapılan KKA'nın ortalama 19.14 ± 3.50 günde 72 tane izolasyon sağlayabilmiş olmasıdır. Bu verilerle M-7H9+KKA yöntemi, L-J besiyeri ile benzer performansı gösterirken, mikobakteri izolasyonunu L-J besiyerine kıyasla yaklaşık bir hafta daha erken sonuç üretmiştir. Ayrıca test maliyeti açısından M-7H9+KKA yöntemi L-J ile aynı, OSB'den yaklaşık 12 kat daha ucuz olması bu yöntemin önemli avantajlarından biridir (Tablo 4).

Çoban ve ark.'nın ⁽⁵⁾ 2004 yılında yaptığı çalışmada, koyun kanlı agarı *Mycobacterium tuberculosis*'in İNH ve RİF direncini araştırmak üzere kullanmışlardır. Bu amaçla önce BACTEC 460TB sisteminde ürettikleri kökenleri ilaç eklenmiş KKA'da test etmişler ve kanlı agardaki performansın BACTEC 460TB ilaç duyarlılığı sonuçları ile benzer bulmuşlardır. Bu sonuçlar, primer izolasyondan çok M-7H9 sıvı besiyerinden KKA'ya yapılan pasaj sonrasında mikobakteri izolasyonunun halen kullanılmakta olan yöntemlere benzer etkinlik saptadığımız çalışmamızı destekler niteliktedir.

Sonuç olarak, *Mycobacterium* türlerinin izolasyonu için alternatif olarak düşündüğümüz KKA etkinlik açısından diğer besiyerlerinin oldukça gerisinde kalmıştır. Ancak 7H9 Middlebrook sıvı besiyerinde zenginleştirdikten sonra kullanılacak KKA besiyeri, standart yöntemlere benzer etkinlik göstermiştir. Dolayısıyla M-7H9+KKA yöntemi sıvı bazlı otomatize sistemlere maliyeti nedeniyle sahip olamayan laboratuvarlar için alternatif olarak önerilebilir.

Teşekkür

Çalışmamızda bizden desteğini esirgemeyen Uz. Dr. Mualla PARTAL'a teşekkür ederiz.

Etik Kurul Onayı: Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden 27.02.2009 tarih ve B.30.2.MAR.0.01.02/AEK/126 sayı ile ve Sağlık Bakanlığı Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesinden 21.10.2010 tarih ve 6/E karar no ile etik kurul onayı alınmıştır.

Çıkar Çatışması: Çıkar çatışması yoktur.

Finansal Destek: Marmara Üniversitesi bilimsel araştırmalar proje desteği BAPKO alınmıştır.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received from Marmara University Faculty of Medicine on 27.02.2009 and numbered B.30.2.MAR.0.01.02 / AEK / 126 and Ministry of Health Göztepe Training and Research Hospital dated 21.10.2010 and numbered 6 / E.

Conflict of Interest: There is no conflict of interest.

Funding: Marmara University scientific research project support was received.

KAYNAKLAR

1. Heifets L. Gen-Probe test should not be considered final in *Mycobacterium tuberculosis* identification. J Clin Microbiol 1989 Jan;27(1):229. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC267276/>
2. Tarshis MS, Weed WA, Kinsella PC, Parker MV and Dunham WB. Further Experience with a New Blood Medium for the Cultivation of *Mycobacterium tuberculosis*. Am J Public Health 1955 Sep;45(9):1157-61. <https://doi.org/10.7759/cureus.757>
3. Drancourt M, Raoult D. Cost-Effectiveness of Blood Agar for Isolation of *Mycobacteria*. PLoS Negl Trop Dis. 2007 Nov 28;1(2):e83. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000083>
4. Mathur ML, Gaur J, Sharma R, Solanki A. Rapid culture of *Mycobacterium tuberculosis* on Blood Agar in Resource Limited Setting. Dan Med Bull 2009 Nov;56(4):208-10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19939338>
5. Coban AY, Bilgin K, Uzun M, Fisgin NT, Akgunes A, et al. Susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin on blood agar. J Clin Microbiol. 2005 Apr;43(4):1930-1. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.4.1930-1931.2005>