

KLİNİK ÖRNEKLERDEN MİKOBAKTERİ TÜRLERİNİN İZOLASYONUNDA KLASİK TANI YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI ve PRİMER ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ

Comparison of the Conventional Identification Methods in the Isolation of Mycobacteria Strains from the Clinical Samples and Determination of Susceptibilities to Primary Antituberculosis Agents

Olkar ABDULMAJED<sup>1</sup>, A. Nedret KOÇ<sup>2</sup>, Aşlıhan GÜLTEKİN<sup>1</sup>, M. Altay ATALAY<sup>3</sup>, Hüseyin KILIÇ<sup>2</sup>

**Özet:** Dünyanın pek çok yerinde *Mycobacterium tuberculosis*'in neden olduğu enfeksiyonların sıklığındaki artış, tüberkülozun tanısı ve ilaç direncinin kısa sürede gösterilmesini zorunlu hale getirmiştir. Bu amaçla çok sayıda yeni yöntem denenmektedir. Bu çalışmada, Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'na gelen klinik örneklerde *Mycobacterium tuberculosis*'in tanısında kullanılan klasik kültür yöntemleriyle tür tayin testlerinin ve duyarlılık testlerinin yapılması amaçlanmıştır. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'na tüberküloz tanısı amacıyla gönderilen toplam 50 klinik örnek işleme alındı. Bu örnekler; açlık mide suyu (AMS), bronkoalveolar lavaj (BAL), balgam, apse, idrar, steril vücut sıvıları, beyin omurilik sıvısı (BOS), doku, biyopsi örnekleridir. Klinik örneklerin Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyama ile mikroskopik incelenmesi, L-J (Löwenstein-Jensen) ve BACTEC MGIT 960 yöntemi ile kültürleri yapıldı. İzole edilen suşların tür düzeyinde tanımlanması BACTEC 460 NAP testi (Becton, Dickinson and Company Sparks, Ireland) ve MGIT 960 Tbc ID (Becton, Dickinson and Company Sparks, USA) testi ile çalışıldı. Duyarlılık testleri BACTEC MGIT 960 ile yapıldı. Çalışmaya alınan 50 tüberküloz şüpheli klinik örneğin EZN boyama yöntemiyle boyanması sonucunda % 34'ü ARB pozitif, L-J'de % 22 pozitif, BACTEC MGIT 960 kültür yöntemiyle % 26 pozitif, her ikisinde birlikte üreyen *Mycobacterium* suşlarının pozitiflik oranı ise % 16 olarak bulundu. Kültür pozitif olan klinik örneklerin % 50'si *M. tuberculosis* complex grubu, % 14'ü MOTT basili olarak bulundu. Kültür yönteminin altın standart kabul edildiği bu çalışmada; ARB mikroskopisinin duyarlılığı % 32, özgülüğü % 66 olarak bulundu. Kültür bulguları ile ARB bulguları karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan fark yoktu ve uyum düşük düzeyde bulundu ( $\kappa=0.04$ ;  $p>0.05$ ). Bu çalışmada; ilaç duyarlılık testinde, klinik suşların % 60'ı streptomycin, isoniazid, rifampin, etambutol (SIRE)'e duyarlı bulundu. *Mycobacterium tuberculosis*'in % 40'ı en az bir ya da daha fazla ilaca karşı dirençli bulundu. Sonuç olarak; bu çalışmada *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının en sıklıkla streptomycine direnç belirlenmesiyle birlikte en az bir ya da daha fazla ilaca karşı dirençli bulunmuştur. *M. tuberculosis*'in tanısında kullanılan klasik kültür yöntemlerinden ikisi olan; L-J katı kültür sistemi ve MGIT 960 sıvı kültür sistemlerinin birlikte kullanılması gerektiğini, kültür ve ilaç duyarlılık testinde de MGIT 960'ın kullanımı kolay ve güvenilir bir sistem olduğunu belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Mycobacterium tuberculosis*, Ziehl-Neelsen yöntemi, Löwenstein-Jensen, BACTEC MGIT 960, anti-tüberküloz duyarlılık testleri

**Abstract:** Early diagnosis and demonstration of drug resistance in patients with tuberculosis has become a necessity because of increasing prevalence of infections caused by *Mycobacterium tuberculosis*. Numerous new methods are being tested for this purpose. In this study it is aimed to compare conventional culture methods and molecular methods which are used for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples accepted by mycobacteriology laboratory. A total of 50 clinical specimens sent for diagnosis of tuberculosis to Erciyes University, Medical Microbiology Department, Mycobacteriology Laboratory were processed. These samples were gastric lavage fluid, bronchoalveolar lavage, sputum, abscess, urine, sterile body fluids, cerebrospinal fluid, tissue and biopsy samples. Microbiological examining was performed with Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) staining and cultured in L-J (Löwenstein-Jensen) medium by BACTEC MGIT 960 method. Determination of isolated subspecies at species level was studied with BACTEC 460 NAP test (Becton, Dickinson and Company Sparks, Ireland) MGIT 960 Tbc ID (Becton, Dickinson and Company Sparks, USA) test. Susceptibility tests were performed with BACTEC MGIT 960. Smear positive rate of studied 50 tuberculosis suspected clinical specimens were 34 %, with EZN dyeing. L-J and/or MGIT methods also resulted % 64 cultures positive. 50 % of culture positive samples were found *Mycobacterium* complex group and 14 % were MOTT bacilli. In this study where culture has been considered the gold standard; susceptibility and specificity of smear microscopy were found 32 % and 66 %, respectively. There was no significant statistical difference and low level of the compliance between culture and smear findings ( $\kappa=0.04$ ;  $p>0.05$ ). In this study; 60 % of clinical samples were found susceptible to SIRE (streptomycin, isoniazide, rifampin, ethambutol) in drug susceptibility test. 40 % of clinical samples were found resistant to at least one or more drug. In conclusion; in this study *Mycobacterium tuberculosis* strains were found resistant to streptomycin frequently and also resistant to at least one or more drug. These are determined that two traditional culture methods which are used for diagnosis of *M. tuberculosis*, L-J solid culture system and MGIT 960 liquid culture system must be used together; and MGIT 960 is an easy-to-use and a reliable system for culture and drug susceptibility tests.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, Ziehl-Neelsen Method, Löwenstein-Jensen, BACTEC MGIT 960, anti-tuberculosis susceptibility methods

<sup>1</sup> Bil.Uzm.Erc.Ün. Sağlık Bil.Ens.Mikrobiyoloji AD, Kayseri

<sup>2</sup> Prof.Dr.Erciyes Ün.Tıp Fak.Mikrobiyoloji AD, Kayseri

<sup>3</sup> Yrd.Doç.Dr.Erciyes Ün.Tıp Fak.Mikrobiyoloji AD, Kayseri

Geliş Tarihi : 29.11.2011 Kabul Tarihi : 21.08.2012

**\*Bu araştırma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSY-11-3433 nolu proje ile yüksek lisans tezi olarak desteklenmiştir .**

Tüberküloz halen her sene ortaya çıkan 9.4 milyon yeni olgu, 510.000 çoklu ilaç dirençli TB (MDR-TB) ve 1.8 milyon ölüm oranı ile önemli bir hastalık ve ölüm nedeni olmaya devam etmektedir (1,2). Ölüm oranının ve bulaşın azaltılması için erken tanı şarttır fakat duyarlı yöntemlerin gelişmiş laboratuvar altyapısına gereksinim duyulması uygulamayı sınırlamaktadır (3,4). Birçok ülkede asido-rezistan basil (ARB) mikroskopisi; *M. tuberculosis* (MTB)'i teşhis etmede ilk yöntem olarak kullanılmaya devam etmektedir (5). MTB için kültür sistemleri, şu an altın standart kabul edilmektedir. Çok yüksek duyarlılığı olan, ilaca duyarlı ve dirençli suşları ayırabilen bir yöntemdir. Sıvı besiyeri kültür yöntemleri (BACTEC MGIT 960 ve MGIT DST-BD teşhis sistemleri, NJ, ABD) geliştirilmiş ve orta-düşük kaynaklı ülkelerde kullanımı Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından onaylanmıştır. Sıvı kültür yöntemleri hızlı olmasına rağmen insan-kaynak ihtiyacı, maliyeti ve kontaminasyona meyilli olması gibi eksiklikler içermektedir (6).

Bu çalışmada, klinik örneklerde Mikobakteri türlerinin izolasyonunda klasik tanı yöntemlerinin karşılaştırılması ve primer anti-tüberküloz ilaçlara duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'na tüberküloz tanısı amacıyla gönderilen toplam 50 klinik örnek çalışmaya alındı. Bu örnekler; açlık mide suyu (AMS), bronkoalveolar lavaj (BAL), balgam, apse, idrar, steril vücut sıvıları, beyin omurilik sıvısı (BOS) ve doku biyopsisi-dir.

Klinik örnekler, Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyama yöntemiyle boyanarak mikroskopta X100 objektifte incelendi. Her bir klinik örnek 2 adet Löwenstein-Jensen (L-J) (Becton, Dickinson and Company Sparks, USA) besiyerine ve bir BACTEC MGIT 960 (Becton, Dickinson and Company Sparks, Ireland) besiyerine ekimleri yapıldı. İzole edilen suşların BACTEC MGIT 960 ile tiplendirme ve duyarlılık testleri çalışıldı. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTK) ve

tüberküloz basili dışındaki *Mycobacterium* (MOTT)'lerin ayırımı için BACTEC MGIT 960 TBc ID (Becton, Dickinson and Company Sparks, USA) identifikasyon test kiti ve BACTEC 460 NAP (Becton, Dickinson and Company Sparks, Ireland) kiti kullanıldı. Balgam, MAS, idrar, BAL, apse ve diğer mukopürülan materyallere; dekontaminasyon-homojenizasyon ve nötralizasyon prosedürü uygulandı. Bütün steril sıvı örnekler 10 ml'den fazla ise; 3500 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Daha sonra dekontaminasyon işlemi uygulandı ve 15 dk beklendi. EZN boyama yöntemi ile klinik örnekler boyandı ve X100 objektifte mikroskopta değerlendirildi. Mavi zeminde kırmızı basilin görülmesi ARB pozitif olarak değerlendirildi.

**Löwenstein-Jensen Kültür Besiyerine Ekim:** Her iki yöntemle işlenmiş örnekler, yatık olarak hazırlanmış ikişer adet L-J besiyerine, steril pipet ucu kullanılarak otomatik pipetle 300'er ml ekildi. Uygun biçimde kapağa temas etmeyecek şekilde besiyerinin içindeki sıvının, besiyerinin yüzeyine yayılması sağlandı. Ekim yapılan tüplerdeki besiyerleri 1 gün yatık halde 37 °C'deki etüvde inkübe edildi. 24 saat sonra dik olarak, sepetlere yerleştirilerek, 37 °C'de etüvde 60 gün süreyle izlendi. Diğer L-J besiyeri ise 25 °C'de etüvde 60 gün süreyle izlendi. Yapılan kültür kontrollerinde kültür kontaminasyonu olanlardan (kültür besiyeri bozulanlardan) ve üreme olan tüplerdeki kolonilerden sürme preparat hazırlanıp EZN boyama yöntemi ile boyandı. Mikroskopta immersiyon yağı ile X100 objektifinde incelendi sonuçlar not edildi. Üreme görülmeyen tüpler 60 gün sonunda üreme olmadı anlamında "negatif" olarak değerlendirildi.

**MGIT 960 (Florometrik) Ekim:** MGIT Growth Supplement'in tamamını (15 ml) steril enjektör ile çekerek MGIT PANTA (Becton, Dickinson and Company Sparks, Ireland) liyofilize şişesinin içerisine eklendi. İyiçe çözülmesi beklendi. Çalkalanmamasına özen gösterildi (Çözülmüş PANTA şişeleri 2-8°C'de 5 gün saklandı). Hasta kaydı tüp üzerine yapıldı. MGIT 7 ml tüpüne 0.8 ml Growth Supplement/MGIT PANTA antibiyotik karışımı ilave edildi. Dekontaminasyonu yapılmış materyalden, (0.8 ml Growth Supplement/MGIT PANTA antibiyotik karışımı eklenmiş) MGIT tüpüne 0.5

mL ilave edildi. Tüpün kapağı sıkıca kapatıldı ve tüp bir defa alt üst edildi. Barkodu okutarak cihaza yerleştirildi.

### **MGIT 960 ( FLOROMETRİK ) ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTİ**

**Antibiyotik solüsyonlarının hazırlanması:** Antibiyotikler MGIT SIRE kiti içinde liyofilize halde üretici firma tarafından sağlandı. Liyofilize halde bulunan bu ilaç şişeleri sulandırılarak stok solüsyonlar hazırlandı. Her liyofilize antibiyotik şişesine 4 ml steril distile su ekleyip tamamen çözünene kadar karıştırıldı. Liyofilize antibiyotiklerin dilüsyon şeması ve MGIT 7 ml besiyerindeki final konsantrasyonları hazırlandı.

**Antibiyotikli ve antibiyotiksiz MGIT tüplerinin hazırlanması:** Her test izolatu için 5 adet MGIT tüpü alınıp ve üzerleri yazıldı (Kontrol-K, diğerlerine S, I, R ve E olarak). Her tüpe aseptik şartlarda 800 µl MGIT SIRE zenginleştiricisi eklendi. Dört SIRE tüpünün her birine, daha önce hazırlanan antibiyotik solüsyonlarından bir mikropipet yardımı 100 µl pipetlendi. Kontrol tüpüne antimikrobiyal ajan eklenmedi.

**İnokulum hazırlanması:** Çalışmada pozitif MGIT tüpünden inokulum hazırlandı. Pozitif bir MGIT tüpü, MGIT 960 cihazında pozitif olduktan sonraki gün (1. gün) dahil 5. güne kadar kullanıldı. Tüpün 5 günden daha fazla bir pozitifliği varsa, 'Growth' zenginleştiricisi eklenmiş yeni bir MGIT tüpüne subkültürü yapıldı ve pozitif oluncaya kadar cihazda test edilip, pozitifliği takip eden 3-5. günlerde kullanıldı. Tüpler 1-3 gündür pozitif ise vortekslenildi ve inokulum olarak kullanıldı. Tüpler 3-5 gündür pozitif ise 1 ml pozitif tüpten örnek alındı ve 4 ml serum fizyolojikle (SF) dilüe edildi ve bu tüp pozitif MGIT tüpü olarak kabul edildi ve üremenin 1 ve 2. günündeki prosedür aynen takip edildi. serum fizyolojikle 1/100 oranında dilue edilip kontrol tüpüne inokulum olarak kullanıldı.

**İnokulasyon:** Dört adet ilaçlı MGIT tüpünün her birine streptomycin, izoniazid, rifampin, etambutol (SIRE) inokulum süspansiyonundan 0.5 ml pipetlendi. 1/100'lük kontrol süspansiyonu hazırlamak için 9.9 ml steril SF içine 0.1 ml mikroorganizma süspansiyonu pipetlenip iyice karıştırıldı.

dı. Kontrol süspansiyonundan kontrol olarak etiketlenmiş MGIT tüpüne 0.5 ml pipetlendi. MGIT 960 cihazına giriş kaydı yapıldı.

**Sonuçların yorumlanması ve rapor edilmesi:** MGIT 960 cihazına yüklenen antibiyogram testinin 4-8 gün içerisinde büyüme indeksinin (Growth unit)  $\geq 400$  olduğu durumda testin doğru çalıştığı kararına varıldı. Sonuçlar S,I,R,E ilaç tüpleri için (Growth unit)  $\geq 100$  dirençli (R) ya da (Growth unit)  $\leq 100$  duyarlı (S) olarak yorumlanıp rapor olarak verildi. 4 günden önce 8 günden sonra büyüme indeksinin (Growth unit)  $\geq 400$  olması durumunda fazla inokulum veya kontaminasyon kararı verildi ve test tekrar edildi. Tip tayini ve antibiyogram işlemi 8 güne kadar yapıldı. Üremenin 3-5. gün prosedürü uygulandı.

### **TÜR TAYİNİ**

BD MGIT TBc identifikasyon test (TBc ID) kiti kullanıldı. Pozitif kültür tüpünden 0.5 MF bulanıklığında SF ile dilüe edildi. Bu süspansiyondan 100 µl test kartuşu üzerindeki hasta örneği penceresine inokule edilip, 15 dk beklendi. Kit üzerinde ki kontrol (C) ve test (T) penceresinde pembe/kırmızı çizgilerin görülmesi beklendi.

### **Sonuçların yorumlanması**

**TBc için pozitif test (MPT64 antijenli):** Okuma penceresinde test 'T' konumunda ve kontrol 'C' konumunda pembe/kırmızı bir çizgi görünür. Bu, örnekte MPT64 antijeninin saptandığını gösterir. C ve T çizgilerinin yoğunluğu değişebilir. Arka plan alanı beyaz/açık pembe olmalıdır.

**TBc için negatif test (MPT64 antijeni saptanmadığında):** Okuma penceresinin Test 'T' konumunda pembe ile kırmızı çizgi görülmez. Bu örnekte MPT64 antijeninin saptanmadığını gösterir. Okuma penceresinde kontrol 'C' konumundaki bir çizgi test prosedürünün performansının uygun olduğunu gösterir. Arka plan alanı beyaz ile açık pembe olmalıdır.

**Geçersiz Test:** Okuma penceresinde kontrol 'C' konumunda pembe ile kırmızı çizgi görülme veya arka plan rengi test yorumunu engellerse test geçersizdir. Geçersizse, örnek yeni bir kitle tekrar test edilmelidir.

## İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Nitel veriler 'yüzde' olarak tanımlandı. Tanı kriteri olarak duyarlılık ve özgüllük hesaplamaları yapıldı. Testler arasındaki istatistiksel farklılığa McNemar testi kullanılarak bakıldı. Testler arasındaki uyuma ise kappa katsayısı hesaplanarak bakıldı. Anlamlılık seviyesi 0.05 olarak alındı.

## BULGULAR

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'na tüberküloz tanısı amacıyla gönderilen toplam 50 klinik örnek (13 BAL, 10 doku, 8 idrar, 5'er plevral mayi ve apse, 4 balgam, 2'şer BOS ve periton mayi, 1 MAS) çalışmaya alındı.

**Boyama yöntemi bulguları:** Çalışmaya alınan 50 tüberküloz şüpheli hasta örneği EZN boyama yöntemi ile boyandı. Örneklerin 33'ü ARB negatif (% 66), 17'si ve ARB pozitif (% 34) olarak bulundu (Tablo I).

**Kültür yöntemlerinin sonuçları:** Çalışmaya alınan 50 tüberküloz şüpheli klinik örneğin EZN boyama yöntemiyle boyanması sonucunda % 34'ü ARB pozitif bulundu, kültürde ise 32 (% 64) üreme belirlendi (Tablo 1). Kültürde üremeleri kültür yöntemlerine göre karşılaştırıldığında; L-J'de % 34.4 pozitif, BACTEC MGIT 960 kültür yöntemiyle % 40.6 pozitif, her ikisinde birlikte üreyen *Mycobacterium* suşlarının pozitiflik oranı ise % 25 olarak bulundu (Tablo II). Her iki yöntemden her hangi birinde veya ikisinde üreyen *Mycobacterium* suşları TBc ID Test (Becton, Dickinson and Company Sparks USA) ve NAP testi (BACTEC 460) ile 25'i (% 78.1) MTK grubu ve 7'si (% 21.8) MOTT basilleri

olarak tanımlandı. *M. tuberculosis* complex grubunun ürettiği klinik örnekler; 7 BAL, 4'er balgam, doku ve plevral mayi, 2'şer apse ve BOS, 1'er periton mayi ve idrar örnekleri olduğu görüldü. MOTT basilin ürettiği klinik örnekler; 4 BAL, 2 idrar ve 1 doku olarak belirlendi (Tablo I).

## ***M. tuberculosis* complex antitüberkülotik duyarlılık sonuçları:**

Toplam 25 MTK suşlarına duyarlılık testi BACTEC MGIT 960 ile çalışıldı. Bu çalışmada; toplam olarak 15'i (%60) SIRE'ye duyarlı, 10'u (%40) dirençli bulundu.

**Dirençli suşlar:** Kültürde MTK olarak izole edilen suşların 3'ü (% 12) sadece streptomisine (STR), 1'i (% 4) sadece izoniazide (INH), 1'i (% 4) de sadece ethambutole (ETM) dirençli olarak bulundu. Klinik suşların 3'ü (% 12) hem izoniazid hem de ethambutole dirençli olarak bulundu. Suşların 1'i (% 4) streptomycin, izoniazid ve ethambutolün üçüne dirençli olarak saptandı. Suşların 1'i (% 4) rifampin (RIF), izoniazid ve ethambutolün üçüne dirençli olarak bulundu (Tablo III).

Toplam 50 klinik örnekte kültür bulguları ile ARB bulguları karşılaştırıldı. Oniki örnekte hem kültür hem ARB pozitif bulundu. Onüç klinik örnekte ise hem ARB mikroskopisi hem de kültür üremesi negatif olarak bulundu. Beş örnekte ARB pozitif iken, kültürü negatif bulundu. Yirmi örnekte kültür pozitif iken ARB saptanmadı. Kültür bulguları ile ARB bulguları karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan fark yoktu ve uyum düşük düzeyde bulundu (Tablo IV).

**Tablo I.** Klinik örneklerin ARB mikroskopisi ve kültür sonuçları

Örnekler	Örnek sayısı	ARB				Kültür (-)
		(+)	(-)	MTK	MOTT	
Apse	5	-	5	2	-	3
BAL	13	6	7	7	4	2
Balgam	4	2	2	4	-	-
BOS	2	-	2	2	-	-
Biyopsi/Doku	10	1	9	4	1	5
Plevral Mayi	5	1	4	4	-	1
Periton Mayi	2	-	2	1	-	1
İdrar	8	7	1	1	2	5
MAS	1	-	1	-	-	1
<b>Toplam</b>	<b>50</b>	<b>17</b>	<b>33</b>	<b>25</b>	<b>7</b>	<b>18</b>

BAL: Bronko-Alveoler Lavaj, BOS: Beyin Omurilik Sıvısı, MAS: Mide Açlık Sıvısı, ARB: Aside Dirençli Basil, MTK: *Mycobacterium tuberculosis* kompleks, MOTT: Tüberküloz basili dışındaki *Mycobacterium*

**Tablo II.** *Mycobacterium* suşlarının kültür yöntemlerinde üreme oranı

Kültür yöntemleri	n (%)
L-J	11 (34.4)
MGIT	13 (40.6)
L-J+MGIT	8 (25)
<b>Toplam</b>	<b>32 (100)</b>

**Tablo III.** MTK suşlarının primer antitüberkülotik ilaçlara direnç profili

<b>Antitüberkülotik İlaç</b>	<b>Dirençli suş sayısı (n)/(%)</b>
Streptomycin	(3)/(12)
İsoniazid	(1)/(4)
Ethambutol	(1)/(4)
İsoniazid + Ethambutol	(3)/12
Streptomycin + İsoniazid + Ethambutol	(1)/4
Rifampin + İsoniazid + Ethambutol	(1)/4

**Tablo IV.** Kültüre göre ARB sonuçların istatistiksel değerleri.

<b>TESTLER</b>	<b>ARB</b>
Duyarlılık	% 32
Özgüllük	% 66
PPD	% 47
NPD	% 51
DSO	% 50
Kappa	0.04
p	>0.05

PPD: Pozitif prediktif değer, NPD: Negatif prediktif değer, DSO: Doğru saptama oranı

## TARTIŞMA

Tüberküloz, tanı ve tedavi yöntemlerindeki ilerlemelere rağmen sadece gelişmekte olan değil gelişmiş ülkelerde de çözülmesi gereken bir halk sağlığı sorunudur. İlk olarak öncelikle tanının hızlı ve doğru konması tedavinin ivedilikle başlanması gerekmektedir. Böylece en büyük bulaş kaynağı olan tanı almamış, çevreye basil saçan enfekte bireyler daha çabuk kontrol altına alınmış olur (7).

Tüberküloz tanısında mikroskop incelemesi uygulama kolaylığı, düşük maliyet, çabuk sonuç verme ve klinik örnekte bulunan mikobakterilerin inceleme alanındaki sıklığını belirleme gibi özellikleri

nedeniyle özellikle akciğer tüberkülozu tanısında kullanılmakla birlikte, enfeksiyona karar verme açısından mikroskop bulgusu kültür ile desteklenmelidir. Kullanılan boyama yönteminin kültür ile uyumlu sonuç vermesi, mikroskopik tanıdaki değeri hakkında bilgi vermektedir.

Tüberkülozun tanısında kullanılabilir hızlı ve duyarlı bir yöntem arayışları sürmekle birlikte direkt mikroskopi ve kültür önemi halen devam etmektedir (8).

Yapılan bir çalışmada; klinik örnekte  $10^6$  CFU/ml mikobakteri bulunması durumunda mikroskopik incelemede sonucun pozitif olacağı bildirilmekte-

dir. Ancak örnekte  $10^4$  CFU/ml mikobakteri bulunması durumunda pozitiflik oranının % 60 dolaylarında olacağı belirtilmektedir (9). Mikroskopik incelemenin duyarlılığı % 22-80 aralığında değişmektedir. Direkt mikroskopik incelemenin duyarlılığını etkileyen faktörler; örneğin tipi, mikobakterinin türü, dekontaminasyon işleminin etkisi, boyama yöntemi, yaymanın kalınlığı ve preparatı inceleyen kişinin deneyimidir. Akciğer tüberkülozunda duyarlılığı düşüren en önemli faktör hastanın yetersiz balgam çıkarmasıdır. Solunum yolu örneklerindeki mikroskobik pozitifliği diğer örneklerden daha fazladır. Fluorokrom boyama yönteminin karbol fuksin boyama yöntemine göre daha duyarlı olduğu bildirilmektedir. Ancak bu yöntemle pozitif bulunan preparatlar EZN yöntemiyle tekrar boyanarak sonuç doğrulanmıştır (10).

Kültürün altın standart yöntem olarak alındığı 383 klinik örnekle yapılan bir çalışmada; EZN boyama yönteminin duyarlılığı % 57.1; özgürlüğü % 99.6 olarak bulunmuştur (11).

Bu çalışmada; 50 tüberküloz şüpheli hasta örneğini EZN boyama yöntemi ile boyandı ve bu klinik örneklerin % 66'sı ARB negatif, % 34'ü ARB pozitif olarak bulundu. Boyama yönteminde; duyarlılık % 32, özgüllük % 66, pozitif prediktif değer (PPD) % 47; negatif prediktif değer (NPD) % 51 olarak bulundu.

Tüberkülozun tanısında günümüzde halen altın standart olarak kültür kabul edilmektedir. Kültür sonucunun mikroskopiye göre daha duyarlı olmasının nedeni ise balgamın mililitresinde sadece 10 tane tüberküloz basili olmasının, kültürden pozitif bir sonuç elde edilmesini sağlamasıdır. Ancak bu yöntemin doğru ve güvenilir bir sonuç vermesi için örneklerin zamanında ve uygun şartlarda alınması, laboratuvara uygun koşullarda ve en kısa zamanda ulaştırılması gerekmektedir. Kültürün direkt bakıya göre bir diğer üstünlüğü ise mikobakteri türlerinin tanımlanmasına ve antibiyotik duyarlılık testlerinin uygulanmasını sağlamasıdır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda kültür pozitiflik oranının % 4,8-18 arasında değiştiği saptanmıştır (12). Örneklerin cinsiyetlere göre dağılımına baktığımızda erkek olguların sayısının kadın olgulardan fazla olduğu bildirilmiştir (13).

Bu çalışmada; 50 klinik örneğin kültür bulguları ile ARB bulguları karşılaştırıldı. Oniki örnekte hem kültür hem ARB pozitif bulundu. Onüç klinik örnekte ise hem ARB mikroskobisi hem de kültür üremesi negatif olarak bulundu. Beş örnekte ARB pozitif iken, kültürü negatif bulundu. Yirmi örnekte kültür pozitif iken ARB saptanmadı. Kültür bulguları ile ARB bulguları karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan fark yoktu ve uyum düşük düzeyde bulundu ( $kappa:0.04$ ;  $p>0.05$ ).

Uzun süre depolanmış balgam örneklerinden *M. tuberculosis*'in izolasyonun da BACTEC MGIT 960 sisteminin kullanılabilirliğini araştırdığı bir çalışmada; aside dirençli basil için pozitif veya negatif olan klinik örnekler  $17\pm 7$  gün saklanmış ve daha sonra BACTEC 960 (MGIT) sisteminde inokülasyonu yapılmıştır. Balgam örneklerinde *M. tuberculosis*'in kültür pozitifliği L-J'ye inoküle edilenlerden daha yüksek olduğu bulunmuştur. MGIT sisteminin uzun süre depolanmış örneklerde *Mycobacterium tuberculosis* izolasyonu için kullanışlı olduğu bulunmuştur (14).

MGIT 960 sisteminin kültür üremelerinin değerlendirildiği ve ilaç duyarlılıklarının moleküler yöntemlerle geleneksel L-J kültür sistemi ile karşılaştırıldığı bir çalışmada; 698 hasta (2487 balgam örneği) MGIT sisteminde kültürlerde pozitiflik oranı % 31.6; L-J'de % 27.1, ARB pozitif örneklerde % 90.5 ve % 83.2 olarak bulunmuştur (15).

Bu çalışmada; 50 klinik örneğin L-J kültür sisteminde pozitiflik oranı % 22, BACTEC MGIT 960 kültür yöntemiyle pozitiflik oranı % 26, her ikisinde birlikte üreyen *Mycobacterium* suşlarının pozitiflik oranı ise % 16 olarak bulundu.

Yapılan bir çalışmada; 2624 klinik örnekte MGIT kültür sisteminin belirleme oranı; *M. tuberculosis* için % 94.7, ve MOTT basilleri için ise; % 91.4'e olarak bulunmuştur (16). Benzer bir çalışmada; 377 klinik örnek çalışmaya alınmış ve MGIT sisteminde *M. tuberculosis* suşların izolasyon oranı % 96.4 olarak saptanmıştır (17).

Bu çalışmada; 50 klinik örneğin % 50'si MTB ve % 14'ü MOTT basili olarak bulundu. Klinik örneklerden % 36'sında kültür üremesi negatif olarak

değerlendirildi. MGIT 960 sistemlerinde mikobakteriler için antitüberkülotik ilaç duyarlılık testi yapılmaktadır.

MGIT ve BACTEC duyarlılık testlerin birlikte yapıldığı bir çalışmada antitüberküloz ilaçlar için elde edilen uyumsuz sonuçlar agar orantılamaya yöntemiyle çözülmeye çalışılmış ve uyumsuz sonuçların yarısı BACTEC 460 lehine diğer yarısı MGIT 960 lehine sonuçlanmıştır. Bu çalışma antibiyotik duyarlılık testinin MGIT 960 cihazında rutin laboratuvarlarda kullanılabileceğini göstermiştir (18).

Benzer bir çalışmada; MGIT 960 ve BACTEC 460 arasında % 96.3 uyum bulunduğu belirlenmiştir (19-21).

Ülkemizde yapılan bir çalışmada; 505 *M. tuberculosis* kompleks suşunun ilaç duyarlılıkları araştırılmıştır. İlk sıra antitüberküloz ilaçlara sırasıyla STR, INH, RIF, ETM için % 9.1, % 13.2, % 13.2 ve % 3.3 direnç oranlarını bulunmuştur (22).

Ülkemizde direnç durumunu yansıtan en kapsamlı bildiri 1984-1989 ve 1990-1995 yılları arasında yapılmıştır. Bu bildiri 21 çalışma ve 21.959 suşun sonuçlarını kapsayan bir meta analiz çalışmasının verilerini içermektedir. Bu çalışmanın ilk aşamasında primer ilaç direnci STR, INH, RIF ve ETM için sırasıyla % 8.8, % 14.4, % 5.7 ve % 2.2 saptanmış, ikinci aşamada sırasıyla STR, INH, RIF ve ETM için %10.1, % 8.8, % 8.9 ve % 3.0 bulunmuştur. Toplam direnç ise STR için % 22.5, INH için % 27.8, RIF için %22.3, ETM için % 7.8 olarak bildirilmiştir (23).

Bu çalışmada; MGIT sisteminde antitüberkülotik duyarlılık testi kullanıldı. MTK suşlarının % 60'ı SIRE'ye duyarlı, % 40'ı dirençli bulundu. MTK suşların %12'si STR, % 4'ü INH'e, % 4'ü de ETM'e dirençli olarak belirlendi. MTB suşların % 12'si hem INH hem de ETM'e dirençli olarak bulundu. Dirençli suşların % 4'si STR, INH ve ETM'e her üçüne dirençli olarak bulundu. Dirençli suşların % 4'ünde STR, RIF ve ETM direnç belirlendi.

Sonuç olarak; *M. tuberculosis*'in tanısında; L-J katı kültür sistemi ve MGIT 960 sıvı kültür sistemlerinin birlikte kullanılması gerektiğini, kültür ve ilaç duyarlılık testinde de MGIT 960'ın kullanımını kolay ve güvenilir bir sistem olduğunu ortaya konulmuştur. *Mycobacterium tuberculosis* suşların en sıklıkla STR direnç belirlenmesiyle birlikte, % 40'ı en az bir ya da daha fazla ilaca karşı dirençli bulunması, sık sık bölgelerde suşların duyarlılık durumlarının değerlendirmesi yapılarak tedavi protokollerinin gözden geçirilmesi gereği belirlenmiştir.

#### KAYNAKLAR

1. WHO. *Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing: WHO Report 2009*. WHO, Geneva, Switzerland 2009.
2. WHO. *Global Tuberculosis Control. A Short Update to the 2009 Report*. WHO, Geneva, Switzerland 2009.
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; 19:169-172.
4. Nyendak, M R, Lewinsohn DA, Lewinsohn DM. *New diagnostic methods for tuberculosis*. *Curr Opin Infect Dis* 2009; 22:174-182.
5. Mathew P, Kuo YH, Vazirani B, Eng RH, Weinstein MP. *Are three sputum acid-fast bacillus smears necessary for discontinuing tuberculosis isolation?* *J Clin Microbiol* 2002;40:3482-3484.
6. Van Kampen SC, Anthony RM, Klatser PR. *The realistic performance achievable with mycobacterial automated culture systems in high and low prevalence settings*. *BMC Infect Dis* 2010;10:93.
7. Kim SJ. *Drug susceptibility testing in tuberculosis: methods and reliability of results*. *Eur Respir J* 2005;25: 564-569.



8. Arıkan S. Tüberküloz tanısında direkt mikroskopik inceleme ve kültür. *İnfeksiyon Bülteni* 1996; 1: 9-12.
9. Rutala WA, Weber DJ. New Disinfection and Sterilization Methods *Emerg Infect Dis* 2001;7:348-353.
10. Uzun M. Tüberküloz tanısında Erlich-Ziehl-Neelsen, fluorokrom boyama yöntemleri ile BACTEC ve Löwenstein-Jensen kültür yöntemlerinin sonuçlarının değerlendirilmesi. Doktora tezi, İstanbul Tıp Fakültesi 1994.
11. Durupınar B, Birinci A, Günaydın M, et al. Tüberküloz tanısında Auramine-Rhodamine boyama yönteminin güvenilirliği. *Mikrobiyol Bült* 1997;31:369-374.
12. Eriş FN, Biçmen C, Şenol G ve ark. İzmir Göğüs Hastanesi Mikobakteriyoloji Verilerinin Retrospektif Değerlendirilmesi, XXIX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı. 8-13, Antalya: 2000: 325.
13. Özkütük N, Sürücüoğlu S, Sezgin C, ve ark. Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikobakteriyoloji Verilerinin Değerlendirilmesi. X. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi (KLİMİK), Kongre Kitabı. Adana: 2001: 176-177.
14. Pardini M, Varaine F, Bonnet M, et al. Usefulness of the BACTEC MGIT 960 System for Isolation of Mycobacterium tuberculosis from Sputa Subjected to Long-Term Storage. *J Clin Microbiol*, 2007;45:575-576.
15. Balabanova Y, Drobniewski F, Nikolayevskyy V. et al. An Integrated Approach to Rapid Diagnosis of Tuberculosis and Multidrug Resistance Using Liquid Culture and Molecular Methods of Russia. *PLoSone*. 2009; 4: e7129.
16. Leitritz L, Schubert S, Bücherl B. et al. Evaluation of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB Systems for Recovery of Mycobacteria from Clinical Specimens of University Hospital With Low Incidence of Tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2001; 39:3764-3767.
17. Somoskövi A, Ködmön C, Lantos A. et al. Comparison of Recoveries of Mycobacterium tuberculosis Using the Automated BACTEC MGIT 960 System, the BACTEC 460 TB System, and Löwenstein-Jensen Medium. *J Clin Microbiol* 2000;38: 2395-2397.
18. Rüsç-Gerdes S, Domehl C, Nardi G et al. Multicenter evaluation of the Mycobacteria Growth Indicator Tube for testing susceptibility Mycobacterium tuberculosis to first line drugs. *J Clin Microbiol* 1999;37:45-48.
19. Palicova F, Jahn EIM, Pfyffer GE. Susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis to anti-tuberculosis drugs: BACTEC MGIT vs BACTEC 460TB System. 100th General Meeting Los Angeles, California May 2000; pp 21-25.
20. Scarparo C, Ricardi P, Piccoli P. Evaluation of the fully automated BACTEC MGIT 960 System for testing Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamid, streptomycin, izoniasid, rifampin, etambutol and comparison the radiometric BACTEC 460 TB method. *J Clin Microbiol* 2004;42:1109-1114.
21. Adjers Koskela K, Katila ML. Susceptibility testing with the manual MGIT and the MGIT 960 system provides rapid and reliable verification of multidrug resistant tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 2003;41:135-1239.
22. Saygan MB, Ocak F, Ceyhan, ve ark. Bölge tüberküloz laboratuvarlarından gönderilen Mycobacterium tuberculosis suslarının major antitüberküloz ilaçlara duyarlılıkları, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı, Sıhhiye, Ankara Mikrobiyoloji Bülteni 2007; 41:403-9.
23. Yolsal N, Malat G, Disçi R ve ark. Türkiye'de tüberküloz ilaçlarına direnç sorununun 1984-1989 ve 1990-1995 yılları için karşılaştırılması: Meta-analiz, *Klimik Dergisi* 1998; 11: 6-9.