

## MİKOBAKTERİYOLOJİK ÖRNEKLERİN DİREKT PREPARAT VE KÜLTÜR SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

### THE EVALUATION OF THE SMEAR AND CULTURE RESULTS OF MYCOBACTERIOLOGICAL SPECIMENS

Nuran DELİALIOĞLU Gönül ASLAN Candan ÖZTÜRK Feza OTAĞ

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin

**Anahtar Sözcükler:** Aside-dirençli basil, direkt mikroskopik inceleme, kültür, tanı

**Key Words:** Acid-fast bacilli, direct microscopical examination, culture, identification

## ÖZET

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 24.4.1999 ile 15.4.2002 tarihleri arası üç yıllık sürede gönderilen çeşitli klinik örneğin direkt preparat ve kültür sonuçlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu örneklerin 969 (%71.7)'u solunum yollarına aitti. Bu sürede değerlendirilen 1351 örneğin 99 (%7.3)'unda asido-rezistan basil üremiş ve 61 (%4.51) örneğin direkt preparat sonucu pozitif bulunmuştur. Direkt preparat sonucu pozitif olan sekiz örnekte kültürde üreme saptanmamıştır. Direkt preparat; duyarlılığı %53 ve özgüllüğü %99, pozitif prediktif değeri %86 ve negatif prediktif değeri %96 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, direkt mikroskopik incelemenin duyarlılığı düşük olmasına karşın tüberkülozun erken tanısında ucuz, hızlı ve kolay uygulanabilmesi önemli rol oynamaktadır.

## SUMMARY

The purpose of this paper was to evaluate the mycobacteriological results of smears and cultures of various clinical specimens which were submitted to the Microbiology Laboratory, Faculty of Medicine, Mersin University, in the last three years between 24.4.1999 and 15.4.2002. The 969 (71.7%) of the all specimens were from respiratory tract. In the evaluation of 1351 specimens, 99 (7.3%) grew acid-fast bacilli (ATB) and 61 (%4.51) were smear-positive for AFB. The overall sensitivity, specificity, positive predictive values and negative values were found as 53%, 99%, 86% and 96%, respectively. Although the sensitivity of direct microscopical examination is low, it is important in the early diagnosis tuberculosis since it is an easy, cheap and rapid procedure.

## GİRİŞ

Tüberküloz halen insanoğlunun savaştığı önde gelen belalardan biridir. Dünya Sağlık Örgütü 1990 yılında 7.5 milyon kişinin tüberküloz olduğunu ve 2.5 milyon kişinde öldüğünü tahmin etmektedir. Gelişmekte olan ülkelerin çoğunda sıklıkla genç yetişkinler arasında görülmesi ve özellikle ev halkı arasında kişiden kişiye hava yolu ile yayılması dünyadaki önemini vurgulamaktadır (1). Dünya popülasyonunun 1/3'i *Mycobacterium tuberculosis* ile infektidir ve 1996'da dünyada altı milyondan fazla tüber-

küloz olgusu bildirilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 1984'de tüberküloz en düşük morbitideye ulaşmış, ancak 1985-1992 arasında 64.000 (10.5/100.000 olgu) aktif tüberküloz rapor edilmiştir. Artışın nedenleri; İV ilaç alışkanlığı olanlar, tüberküloz kontrol programında aksaklıklar ve AIDS epidemidir. 1992'den sonra olgu sayısı azalmış ve 1997'de 7.4/100.000 olgu bildirilmiştir (2). Gelişmekte olan ülkelerde önemi hiç azalmayan tüberküloz AIDS gibi nedenlerle gelişmiş olan ülkeler içinde çok önemli bir sorun haline gelmiştir (3).

Tüberküloz tanısı klinik belirtiler ve bulgular, radyolojik görünüm, tüberkülin deri testi sonucunun değerlendirilmesi, klinik örneklerden hazırlanan preparatlarda mikobakteri görülmesi ve besiyerinde üretilmesiyle mümkün olmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün kararına göre, bir hastaya kesin tüberküloz tanısı konulabilmesi için uygun şekilde alınan klinik örneğin laboratuvara gönderilmesi, hazırlanan preparatlarda mikobakterilerin görülmesi ve ekim yapılan besiyerlerinde üretilmesi ile mümkün olur. Mikobakteriler ekim yapılan besiyerlerinde iki-sekiz hafta gibi çok uzun bir sürede ürerler. 1970'li yılların başlarında radyometrik yöntemler kullanılarak hızlı üreme sağlayan yeni besiyerleri geliştirilmiştir. BACTEC TB 460 sistemi ile ortalama tüberküloz izolasyon süresi yedi-onbeş gün en fazla beş haftadır. Bu süre klasik (Löwenstein-Jensen) besiyerinde ekim yöntemine göre iki-üç hafta zaman kazancı sağlamaktadır. Mikobakterilerin klinik örnekte varlığının gösterilmesinde duyarlı ve çabuk tanı yöntemlerinden biri, mikobakteri DNA ve RNA baz sıralarının araştırılması temeline dayanan tekniklerdir (4).

Bu çalışmada laboratuvara gönderilen mikobakteriyolojik örneklerin direkt preparat ve kültür sonuçları retrospektif olarak değerlendirilmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Laboratuvara 24.4.1999-15.4.2002 tarihleri arasında mikobakteriyolojik inceleme için gönderilen toplam 1351 örnekten direkt preparat ve kültürler yapıldı. Balgamdan direkt, balgam dışındaki örneklerden santrifüj sonucu dipteki çökeltiden preparat hazırlandı. Direkt preparatlar Ehrlich-Ziehl-Neelsen yöntemi ile boyandı. Steril vücut sıvıları dışında kontamine örneklerle dekontaminasyon işlemi uygulandı. Örneklerin dekontaminasyonunda ilk iki ay %4 sodyum hidroksit kullanılmıştır. Daha sonra dekontaminasyon solüsyonu olarak N-asetil-L-sistein (NALS)+ trisodyum sitrat+sodyum hidroksit karışımı kullanılmıştır. Dekontaminasyon solüsyonu 14.5 trisodyum sitrat, 40 gram sodyum hidroksit bir litre suda eritilip otoklavlandıktan sonra kullanılacağı zaman üzerine 0.375 gram NALS ilave edilmiştir. Örnek üzerine eşit miktarda ilave edilip 15 dakika oda ısısında bekletildikten sonra üzerine eşit miktarda fosfat tampon eklenip 15-20 dakika 3000 g'de santrifüj edilmiştir. Üstteki sıvı dökülüp üzerine 0.5-2 ml kadar fosfat tampon ilave edilip Löwenstein-Jensen besiyerlerine ekim yapılmış ve ekimler 37° C'de haftada bir kontrol edilerek sekiz hafta bekletilmiştir.

## BULGULAR

Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na üç yıllık sürede 1351 örnek tüberküloz aranması ve kültür için gönderilmiştir. Bu örneklerin 969 (%71.7)'u çeşitli solunum yolu örneği,

243 (%17.9)'ü idrar, 60 (%4.4)'ı plöra sıvısı, 53 (%3.9)'ü diğer steril vücut sıvıları idi (Tablo 1). Toplam 1351 örneğin direkt preparat pozitiflik oranı %4.5 (61) ve kültür pozitiflik oranı %7.3 (99) olarak bulunmuştur. Bu kültür pozitif örneğin 53 (%53)'ünün aynı zamanda direkt preparat taramasında pozitif olarak bulunmuştur. Kültür pozitif olan örneklerin 90 (%90.9)'ı solunum yoluna aitti. Direkt preparatta aside dirençli basil pozitif olarak saptanan sekiz (%13) örnekte kültürde üreme kaydedilmemiştir. Aside dirençli basil direkt preparat ve kültür sonuçları Tablo 2'de verilmiştir. Direkt preparat; duyarlılığı %53, özgüllüğü %99, pozitif prediktif değeri %86 ve negatif prediktif değeri %96 olarak bulunmuştur.

**Tablo 1.** Aside dirençli bakteri aranan örnek tipi ve kültür sonuçları

Örnek tipi	Örnek sayısı (%)	Pozitif kültür sayısı (%)
Balgam	870 (64.3)	88 (10.1)
Bronko-alveoler lavaj	29 (2.1)	0
Gastrik aspirat	70 (5.1)	2 (2.8)
İdrar	243 (17.9)	4 (1.64)
Vücut sıvıları	39 (2.8)	1 (2.56)
Plöra sıvısı	60 (4.4)	1 (1.66)
BOS	14 (1)	1 (7.14)
Diğerleri	26 (1.9)	2 (7.69)
Toplam	1351	99 (% 7.32)

**Tablo 2.** Aside dirençli bakteri aranan örneklerin direkt preparat ve kültür sonuçları

	Direkt preparat pozitif	Direkt preparat negatif	Toplam
Kültür pozitif	53	46	99
Kültür negatif	8	1244	1252
Toplam	61	1290	1351

## TARTIŞMA

Üç yıllık süre içinde laboratuvarında mikobakteriyolojik incelemelerde klasik yöntem kullanılmıştır. Tüm direkt preparatlar Ehrlich-Ziehl-Nielsen ile boyanıp incelenmiş ve kültür için Löwenstein-Jensen besiyerine ekilmiştir.

Aside dirençli basil aranmasında aside dirençli basil boyaması hala en sık kullanılan yöntemdir. Direkt preparat pozitifliği için 10.000 basil/ml olması gerekir. Günümüzde çoğu laboratuvarlar fenolik auramin veya auramin-rodamin gibi florokrom boyama yöntemleri kullanılmaktadır. Kültür yöntemleri katı veya sıvı besiyerleri kullanılmaktadır. Dekontaminasyon için sıklıkla NALS ve %1 sodyum hidroksit solüsyonu kullanılmaktadır. Steril vücut sıvıları ve steril dokular dekontaminasyon işlemi yapılmadan ekilmektedir (2).

BACTEC radyometrik sistemi mikobakteri kültürü için geniş ölçüde kullanılmaktadır. Bu sistem ile 9 ile 16 günde üretilmekte ve mikobakteri diğer mikobakterilerden ayırt edilebilmektedir. Alternatif yöntemler olarak nükleik asit hibridizasyonu ve polimeraz zincir reaksiyonu gibi nükleik asit amplifikasyon yöntemleri *M. tuberculosis*'in direkt tanısında kullanılmaktadır (2).

Direkt aside dirençli boyama kültür ile birlikte kullanılmalıdır. Direkt preparat ile mikobakteri görülebilmesi için balgamın millilitresinde en az  $5 \times 10^3$  ile  $5 \times 10^4$  basil bulunmalı, kültür ile tanıda ise 10 ile 100 kadar canlı organizma yeterlidir. Mikobakteri infeksiyonu tanısında direkt incelemenin duyarlılığı kültür yöntemlerinden daha düşük olmasına karşın kültür ile tanı göreceli olarak uzun süre gerektirildiğinden dolayı direkt preparat mikobakteri infeksiyonunun erken tanısında önemlidir (5). Konsantre balgamın direkt mikroskopik incelemesi tüberküloz tanısında; duyarlılığının düşük olmasına karşın ucuz, hızlı ve kolay uygulanabilmesi nedeniyle önemli rol oynamaktadır. Kültür altın standart olarak kullanılmaktadır (6).

Direkt preparat duyarlılığı %22 ile %78 arasında bildirilmektedir. Bu sayılar farklı anatomik bölgelerden ve hastalığın değişik evrelerindeki hastalardan alınan örnekleri içermektedir (6). Çalışmada direkt preparat duyarlılığı %53 olarak bulunmuştur. Duyarlılığı etkileyen faktörler örneğin tipi, santrifüj aşaması, boyama yöntemi, kullanılan kültür yöntemi ve değerlendirilen hasta grubudur. Solunum yoluna ait örneklerde direkt preparat pozitiflik oranı yüksektir (5). Akciğer tüberkülozunun ilk tanısında direkt preparat duyarlılığı kültür ile karşılaştırıldığında %50 civarındadır. Çoklu örnekler ile direkt preparat duyarlılığı artmaktadır. Tek balgam örneğinde direkt preparat duyarlılığı %30-40'tır, ancak çoklu örneklerde bu %65-75'e çıkmaktadır. Direkt mikroskopi ile tanıda etkili olan diğer bir faktör hastanın hastalığının ve mikro-organizmanın boyutudur. Laboratuvar çalışanları arasındaki deneyim ve beceri düzeyi farklılıkları ve örneğin hazırlanmasında kullanılan spesifik yöntemle bağlı olarak testte değişkenlikler oluşabilir (6). Uzamış ve yoğun yapılan örnek dekontaminasyonu ve kültürlerde inkübasyon süresinin kısılması direkt preparat pozitif ve kültür negatif sonuçlara neden olabilir. Uygun tedavi gören akciğer hastalığı olan hastalarda iki ile on hafta süresince direkt preparat pozitif, kültür negatif sonuçlar alınabilir. Direkt preparat incelemenin özgüllüğü çok yüksektir (5). Bu çalışmada da direkt preparat özgüllüğü %99 olarak bulunmuştur. Tüberküloz tanısında kültür direkt preparattan daha duyarlı ve özgüldür. Yapılan çalışmalarda, akciğer tüberkülozunda balgam kültür duyarlılığı %81 olarak bildirilmektedir (6). Direkt preparat

ile inceleme tedaviye yanıtın takibinde önemlidir. Anti-tüberküloz ilaç başlandıktan sonra organizma replike olma yeteneğini kaybeder, kültürler negatif olabilir. Tedavi süresince organizmaların çoğu ölür ve dökülür, tedavi sırasında balgamda organizmanın sayısını değerlendirme tedavisi erken objektif değerlendirmeyi sağlar (7). Boyama işlemi sırasında lamların kontamine olması veya boyama işlemi sırasında saprofitik mikobakterilerle kontamine suyun kullanılması yanlış pozitif sonuçlara neden olabilir (5). Yaygın hastalığı olan ve çok sayıda basil çıkaran hastalarda pozitif direkt preparat ve pozitif kültür arasında iyi korelasyon bulunmaktadır. Minimal veya daha az ilerlemiş hastalığı olanlarda pozitif direkt preparat ile pozitif kültür arasındaki korelasyon %25 ile %40 arasındadır (7).

Çalışmada kontaminasyon oranı %3.4 (46) olarak bulunmuştur. Laboratuvarlarda kültür kontaminasyon oranları çıkarılmalı ve takip edilmelidir. Genellikle kabul edilen kontaminasyon oranı %3 ile %5 arasındadır; %3'ün altında olması dekontaminasyon işleminin yoğun olduğunu gösterir ve işlem mikobakteriye en az letal etki edecek şekilde modifiye edilmelidir. Kontaminasyon oranının %5'in üstünde olması ise yetersiz dekontaminasyon işlemini gösterir (5).

Yıldıran ve ark. (8) Gülhane Askeri Tıp Akademisi Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'na ait 27.519 örneğin direkt preparat ve kültür sonuçlarını değerlendirdikleri çalışmalarında; %6.2 örnekte asido-rezistan basil ürettiği, kültür pozitif olan örneklerin %71.8'inin aynı zamanda direkt preparat sonuçları da pozitif bulunmuştur. Direkt preparat sonucu pozitif olan örneklerin %1.1'inde kültürde üreme saptanmamıştır. Direkt preparat duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %71.8 ve %98.8 olarak bulunmuştur. Orhan ve ark. (9) Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'nın 2710 hastaya ait sonuçlarını değerlendirmişler; direkt preparat pozitiflik oranını %4.76 olarak bulmuşlar ve BACTEC 460 sisteminde yapılan kültürde %8.45'inde *M. tuberculosis* kompleks ürettiğini saptamışlardır. Özkütük ve ark. (10) Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'na gönderilen 3133 örneğin %12 direkt preparat pozitif ve Löwenstein-Jensen besiyerinde %10 oranında üreme saptamışlardır.

Direkt preparat duyarlılık oranını yükseltmek için; direkt preparatların deneyimli kişiler tarafından ve dikkatli bir şekilde taranması gerekmektedir. Kültür için de Löwenstein-Jensen besiyerine ekim yanında otomatize bir sistemin de kullanılması ve böylece laboratuvar da atipik ve tipik mikobakteri identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması yazarlar tarafından planlanmaktadır.

## KAYNAKLAR

1. **Comstock GW.** Epidemiology of tuberculosis. *In: Reichman LB, Hershfield ES, eds. Tuberculosis, A Comprehensive International Approach.* 2nd ed. New York: Marcel Dekker, **2000**: 129-56.
2. **Haas DW.** *Mycobacterium tuberculosis.* *In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases.* 5th ed. Pennsylvania: Churchill Livingstone, **2000**: 2576-607.
3. **Anđ Ö, Erturan Z.** Tüberkülozun dönüşü ve direnç sorunu. Anđ Ö, Uzun A, ed. *Tüberküloz Tanı, Direnç, Tedavi*'de. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, **1996**: 17-25.
4. **Kasımoğlu Ö.** Tüberküloz tanısında yeni gelişmeler. Anđ Ö, Uzun A, eds. *Tüberküloz Tanı, Direnç, Tedavi*'de. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, **1996**: 11-16.
5. **Noite FS, Metchock B .** *Mycobacterium.* *In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, eds. Manual of Clinical Microbiology.* 6th ed. Washington DC: ASM Press, **1995**: 400-37.
6. **Lobue PA, Perry S, Catanzaro A.** Diagnosis of tuberculosis. *In: Reichman LB, Hershfield ES, eds. Tuberculosis, A Comprehensive International Approach.* 2nd ed. New York: Marcel Dekker, **2000**: 341-75.
7. **Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC.** *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.* 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, **1997**: 893-952.
8. **Yıldırım ŞT, Özyurt M, Saraçlı MA, Gün H.** Yedi yıllık bir dönemde mikobakteriyolojik örneklerle ait smear ve kültür sonuçlarının değerlendirilmesi. *İnfek Derg* **1998**; 12: 151-5.
9. **Orhan G, Zer Y, Balcı İ, Bayram A, Korkmaz G.** Hastanemiz Mikobakteriyoloji Laboratuvarına gelen materyallerin retrospektif olarak değerlendirilmesi. *X. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi (15-19 Ekim 2001, Adana)* kitabında. İstanbul: KLİMİK Derneđ **2001**: 240.
10. **Özkütük N, Sürücüođlu S, Sezgin C, Özbakkalođlu B.** Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikobakteriyoloji Laboratuvarı verilerinin değerlendirilmesi. *X. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi (15-19 Ekim 2001, Adana)* kitabında. İstanbul: KLİMİK Derneđ **2001**: 240.