

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS İZOLASYONUNDA MGİT ve LÖWENSTEIN JENSEN YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRMASI

Sibel ATIŞ*
Candan ÖZTÜRK**
Minür TÜMKAYA*

ÖZET

Akciğer tüberkülozunun bakteriyolojik tanısında Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGİT) yönteminin değerini araştırmak amacıyla yapılan bu çalışmada klinik ve radyolojik olarak akciğer tüberkülozu düşünülen 42 olgudan alınan 126 balgam örneğinin homojenizasyon ve konsantrasyon sonrası yayma mikroskopisi yapıldıktan sonra MGİT ve Löwenstein Jensen (LJ) kültür ortamlarına ayrı ayrı ekilerek sonuçlar karşılaştırıldı. MGİT yöntemi ile izolasyon oranı % 65, LJ yöntemiyle % 68.3 bulundu ($p<0.0001$). Ortalama üreme süresi LJ besiyerinde 29.6 ± 10.8 (min:13 - max: 60) gün, MGİT'te 15.5 ± 11.2 (min: 3-max: 44) gün idi ($p<0.0001$). LJ yöntemine göre MGİT yönteminin duyarlılığı % 88.3, özgüllüğü % 85, pozitif kestirim değeri % 92.6, negatif kestirim değeri % 77.2 bulundu. MGİT yönteminin Mycobacterium tuberculosis gösterilmesinde hızlı sonuç veren güvenilir bir yöntem olduğu ve rutin kullanıma girmesinin yararlı olacağı sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGİT), Löwenstein Jensen, Mycobacterium tuberculosis

SUMMARY

COMPARISON OF THE MGIT WITH LÖWENSTEIN-JENSEN MEDIUM FOR ISOLATION OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

We aimed to evaluate the value of Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) method for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in this study. 126 sputum samples of 42 cases considered as pulmonary tuberculosis clinically and radiologically have been cultured on MGIT and Lowenstein Jensen (LJ) culture media separately and the results have been compared. The isolation rates with MGIT and LJ method were 65 % and 68.3% respectively ($p<0.0001$). The mean proliferation times with MGIT and LJ method have been found 15.5 ± 11.2 (min: 3-max: 44) and 29.6 ± 10.8 (min:13 - max: 60) day, respectively ($p<0.0001$). The sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of MGIT were 88.3%, 85%, 92.6% and 77.2%, respectively.

The demonstration of Mycobacterium tuberculosis with MGIT method is a rapid and reliable method and we concluded that applying this method routinely will be useful.

Key words: Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT), Lowenstein Jensen, Mycobacterium tuberculosis

GİRİŞ

Tüberkülozun kesin tanısı, Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis) kültürde izolasyonunu gerektirmektedir (1,2). Ancak mikobakteriler genel olarak yavaş üreyen mikroorganizmalar olduğundan bu basilin teşhisi oldukça uzun zaman almaktadır. Katı besiyerlerinde gözle görülebilir koloniler oluşturabilmeleri için haftalar geçmesi gereklidir. Klinik tanı ve bakteriyolojik teyid arasında geçen sürenin uzun olması, mikobakteri enfeksiyonlarında görülen en önemli problemdir (1-3). Birçok ön tanıyı göz önünde bulundurması gereken klinisyen açısından varolan mikobakteriyel enfeksiyonun mümkün olan en kısa sürede gösterilmesi ve ilaç hassasiyet testleri eşliğinde en uygun tedavinin başlanması çok önemlidir. Ayrıca mikobakteri enfeksiyonlarının erken dönemde tanınması ve tedavi edilmesi toplumdaki enfeksiyonun kontrolü açısından da önemlidir (3). Bu durum ise duyarlık ve özgüllüğü yüksek, kolay uygulanabilir ve tanıyı hızlandıran yeni tanı yöntemlerine gereksinimi arttırmaktadır. Bu alanda son yıllarda önemli aşamalar elde edilmekle birlikte mikobakteri üremesini hızlandırdığı belirtilen bu sistemler

* Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anadalı, MERSİN.

** Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anadalı, MERSİN.

Yazışma Adresi:

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi,
Göğüs Hastalıkları Anadalı, 33070 MERSİN
Tel: 0 324 33743 28 Fax: 0 324 337 43 05
Email: satis@mersin.edu.tr

henüz günlük pratiğe tam olarak girmemişlerdir. Bu konudaki en önemli çalışmalar BACTEC, MGİT gibi sıvı besiyerlerinin kullanıma sokulması ile olmuştur (1).

Bu çalışmada mikobakteri izolasyonunda son yıllarda kullanıma giren ve nonradyometrik bir yöntem olan MGİT ile konvansiyonel Löwenstein Jensen kültür yöntemlerini M. tuberculosis izolasyonu ve üreme süreleri açısından karşılaştırmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Temmuz 1999 – Ekim 2000 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları polikliniğine başvuran ve klinik ve radyolojik olarak akciğer tüberkülozu düşünülen 42 (11 kadın, 31 erkek) hastada yapıldı. Çalışmaya alınan hastalardan ayrı günlerde olmak üzere üçer balgam örneği toplandı. Balgam örnekleri önce NALC (N-asetil-L-sistein), %4 NaOH ve trisodyum sitrat karışımı ile dekontaminasyon işleminden geçirildi. Toplam 126 balgam örneğinin homojenizasyon ve konsantrasyon işlemleri yapılarak yayma mikroskopileri hazırlandıktan sonra MGİT ve Löwenstein Jensen (LJ) kültür ortamlarına ayrı ayrı ekilerek sonuçlar karşılaştırıldı.

Yayma için bir miktar balgam öze ile alınıp lam üzerine yayılarak direkt preparat hazırlandı. Ziehl Neelsen boyama tekniği ile boyandı. Boyanan preparat immersiyon objektifi (100x) ile incelenerek direkt basil arandı.

Modifiye 7 H9 buyyon tabanlı, %10 CO₂ ve 4 ml sıvı besiyeri içeren, cam tüp dibinde 110 UL floresans indikatör silikon lastik bulunan MGİT (MGIT BBL, Becton Dickinson Microbiology Systems, Maryland, USA) tüpüne 0,5 cc OADC zenginleştirici (oleik asit, albümin, dextroz, ve katalaz) ve 0,1 ml PANTA (Polimiksin B, Amfoterisin B, Nalidiksik asit, Trimetoprim ve Azlosilin) ilave edildi. MGİT tüpüne en son olarak dekontaminasyon işlemi yapıldıktan sonra çöktürülen balgam örneğinden 0,5 ml kondu ve 37°C'de inkübe edildi. MGİT tüpleri ekim yapıldıktan sonra 2.günden itibaren 8 hafta süre boyunca günlük olarak 365 nm UV altında okundu. Ayrıca hazırlanan balgam numunesinden 1-2 damla, Löwenstein Jensen (LJ) besiyerine ekilerek, 37°C'de, %90 hava ve %10 CO₂ içeren ortamda 8 hafta bekletilerek, üreme süreleri kaydedildi.

İstatistiksel analizler bilgisayarda SPSS 9.0 ile yapıldı. İki grup arası ortalamaların farklılığı student t testi ile değerlendirildi. Gruplar arası kültür pozitiflik oranlarının karşılaştırılmasında Ki-kare testi kullanıldı. P<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Duyarlık, özgüllük, tanı değeri, pozitif ve negatif prediktif değerler standart metotlarla hesaplandı.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 42 hastanın, 11'i (%26.1) kadın, 31'i (%73.9) erkek idi. Ortalama yaş 43.84±19.24 idi. Balgam yayması örneklerinin 79'unda (%63) asido rezistan basil (ARB) pozitif bulundu. Kültür ortamlarından LJ' de 86 (%68.3), MGİT'de 82 (%65) balgam örneğinde mycobacterium tüberkülozis izole edildi. Hem MGİT besiyeri hem de LJ besiyerinde üreme saptanan balgam örnek sayısı 76 (%60) idi. İzolasyon oranları yönünden MGİT ve LJ kültür yöntemleri arasında anlamlı fark saptandı (p<0.0001). (Tablo I). Her iki yöntem kombine edildiğinde izolasyon oranı %73 (92/126) bulundu.

Tablo I: MGİT ve LJ yöntemleri ile kültürde üreme saptanan balgam örneği sayıları.

	LJ pozitif	LJ negatif	Total
MGİT Pozitif	76 (%60)	6 (%5)	82 (%65)
MGİT Negatif	10 (%8)	34 (%27)	44 (%35)
Total	86 (%68)	40 (%32)	126 (100)

Kikare, p<0.0001

MGİT yöntemi ile kültürde üreme saptanan 82 örneğin 68 (%82.9)'ünde ARB pozitif, 14 (%17)'ünde ARB negatif idi. LJ yöntemi ile kültürde üreme saptanan 86 örneğin 73 (%84.8)'ünde ARB pozitif, 13 (%15.2)'ünde ARB negatif idi.

Balgamda ARB pozitif olguların 68 (%86)'inde MGİT besiyerinde üreme saptanırken, 73 (%92.4)'ünde LJ besiyerinde üreme saptandı. Balgamda ARB negatif olguların 13 (%27.6)'ünde MGİT besiyerinde üreme saptanırken, 14 (%29.7)'ünde LJ besiyerinde üreme saptandı. (Tablo II ve III). Balgamda ARB müspet olması ile ARB menfi olması arasında hem MGİT yönteminde hem de LJ yönteminde üreme oranları açısından ARB müspet olgular lehine anlamlı bir fark saptandı (p<0.0001).

Tablo II: ARB direkt yayma pozitifliğine göre MGİT kültür yöntemi ile üreme oranları.

	MGİT pozitif	MGİT negatif	Total
ARB Pozitif	68 (%54)	11 (%9)	79 (%63)
ARB Negatif	14 (%11)	33 (%26)	47 (%37)
Total	82 (%65)	44 (%35)	126 (100)

Kikare, p<0.0001

Tablo III: ARB direkt yayma pozitifliğine göre LJ kültür yöntemi ile üreme oranları.

	LJ pozitif	LJ negatif	Total
ARB Pozitif	73 (%58)	6 (%5)	79 (%63)
ARB Negatif	13 (%10)	34 (%27)	47 (%37)
Total	86 (%68)	40 (%32)	126 (100)

Kikare, p<0.0001

LJ yöntemine göre MGİT yönteminin duyarlılığı % 88.3, özgülüğü % 85, pozitif kestirim değeri % 92.6, negatif kestirim değeri % 77.2 bulundu.

Ortalama izolasyon süreleri balgam yayma ARB pozitif ve negatif tüm olgular göz önüne alındığında LJ'de 29.6±10.81 (min:13 - max: 60) gün, MGİT'te 15.5±11.26 (min: 3-max: 44) gün olarak bulundu. Kültürde üreme süreleri açısından her iki yöntem karşılaştırıldığında, MGİT yönteminde üreme süresi LJ yöntemine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha kısa idi (p<0.0001). MGİT besiyerinde ortalama üreme süresi ARB pozitif olgularda 11.2±8.4 gün, ARB negatif olgularda 20±12.87 gün idi. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0.001). LJ besiyerinde ise ortalama üreme süresi ARB pozitif olgularda 25.4±9.8 gün, ARB negatif olgularda 32.5±12.6 gün idi. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0.0006). Balgam ARB yayma pozitif ve negatif olgular ayrı ayrı değerlendirildiğinde hem ARB pozitif hastalarda hem ARB negatif hastalarda MGİT yönteminde üreme süresi LJ'ne göre anlamlı derecede daha kısa idi (p<0.0001). (Tablo IV).

Tablo IV: Mycobacterium tuberculosis için MGİT ve LJ besiyerinde ortalama üreme süreleri (gün olarak) (ortalama ± standart sapma)

	MGİT	LJ	p
ARB Pozitif	11.2±8.4	25.4±9.8	<0.0001
ARB Negatif	20±12.87	32.5±12.6	<0.0001
Tüm olgular	15.5±11.26	29.6±10.81	<0.0001

TARTIŞMA

Mikobakteri izolasyonunda son yıllarda kullanıma girmiş olan MGİT yöntemi ile konvansiyonel Löwenstein Jensen kültür yöntemlerini karşılaştırdığımız çalışmamızda, MGİT'te %65, LJ'de %68.3 oranında M. tuberculosis

izolasyonu sağlanırken, MGİT yönteminde izolasyon süresi LJ'ne göre anlamlı derecede daha kısa bulundu. LJ yöntemine göre MGİT yönteminin duyarlılığı %88.3, özgülüğü %85, pozitif kestirim değeri %92.6, negatif kestirim değeri %77.2 olarak saptandı.

M. tuberculosis izolasyonunu artıracak ve kültürde gösterilme süresini kısaltacak tüm çalışmaların tanı ve tedavide kolaylık sağlayabileceği kesindir. Bu konudaki en önemli çalışmalar BACTEC, MGİT gibi sıvı besiyerlerinin kullanıma sokulması ile olmuştur. Mikobakteri üretimi için besiyeri seçilmesi önemlidir. Birçok laboratuvar, optimal mikobakteri üretimi için geleneksel yumurtalı (Löwenstein Jensen), agarlı (Middlebrook 7H10-12) ve /veya seçici ortamların kombinasyonunu kullanırlar (2). Son yıllarda mikobakteriyoloji laboratuvar teknolojilerinde yeni ve önemli gelişmeler kaydedilmiş olup, bunların başlıcaları, sıvı kültür ortamlarında hızlı bir şekilde mikobakteri üremesini ve izolasyonunu sağlayan otomatize sistemler olan BACTEC ve MGİT sistemleridir. Nonradyometrik bir sistem olan MGİT'te cam tüpün dibinde silikondan yapılmış, oksijen etiketli bir floresan indikatör bulunur. Büyüyen mikobakteri tarafından tüketilen oksijen, indikatörde ultraviyole ışığında saptanabilen floresansa yol açar (1).

Yapılan çalışmaların çoğunda MGİT yöntemi ile mikobakteri izolasyon oranlarının LJ'ne göre daha yüksek olduğunu gösterilmiştir (4-7). Bunların yanında Casal ve ark. LJ'de MGİT'e göre daha yüksek oranda izolasyon sağlamışlardır (8). Pfyffer ve arkadaşları (9) ile Levidiotou ve ark. nın (10) çalışmalarında ise M. tuberculosis izolasyon oranları açısından MGİT ve LJ yöntemleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Çalışmamızda MGİT yönteminde %65, LJ yönteminde ise %68.3 oranında M. tuberculosis izolasyonu sağlandı. İzolasyon oranlarımız birbirine yakın olmakla birlikte aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Bu sonucumuz, literatürdeki çalışmaların bazıları ile farklılık gösterirken, Casal ve arkadaşlarının sonuçlarıyla uyumlu idi. Mikobakteri yoğunluğunun kültürde izolasyon oranını etkileyen önemli bir faktör olduğu bildirilmiştir (7,11). Somoskövi ve arkadaşları, MGİT'te yayma pozitif olguların tümünde üreme saptamışlar, yayma negatif olgularda ise izolasyon oranını %76.6 olarak bulmuşlardır. LJ'de de yayma pozitif olgularda izolasyon oranını yayma negatiflere göre daha yüksek bulmuşlardır (7). Çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak hem MGİT hem LJ besiyerindeki izolasyon oranları ARB pozitif olgularda ARB negatif olgulara göre anlamlı derecede daha yüksek bulundu. Balgamda ARB pozitif olguların %86'sında MGİT besiyerinde üreme saptanırken, %92.4'ünde LJ besiyerinde üreme saptandı. Balgamda

ARB negatif olguların ise %27.6'ünde MGİT besiyerinde üreme saptanırken, %29.7'ünde LJ besiyerinde üreme saptandı.

Bazı laboratuvarlar solid besiyeri ile daha geç üreme ve daha düşük izolasyon oranlarından dolayı solid besiyerlerini kullanmama eğilimindedir. Ancak ARB içeren örneklerin kültürlerinde hiçbir zaman %100'lük bir izolasyon sağlanamamaktadır. Bu nedenle yeni sıvı besiyerleri ile birlikte ilave konvansiyonel solid besiyeri kullanıldığında izolasyon oranlarının arttığı bildirilmektedir (5,6,7,9,12). Rivera ve arkadaşları çalışmalarında MGİT yöntemini LJ ile kombine ettiklerinde M. tuberculosis izolasyon oranlarının %63.4'den %70.9'a çıktığını bildirmişlerdir (5). Çalışmamızda literatürdeki çalışmalarla uyumlu olarak, MGİT ile LJ yöntemini kombine kullandığımızda izolasyon oranının arttığı (%65'lerden %73'e çıktığı) izlendi. Bu bulgular, M. tuberculosis izolasyonunda optimum sonuçlara ulaşmak için solid bir besiyeri olan LJ besiyerinin tek başına kullanılmayıp, sıvı bir besiyeri ile kombine edilmesinin daha yararlı olacağı görüşünü desteklemektedir.

Mikobakteriler için MGİT yönteminin duyarlılığını Ardito ve arkadaşları, %100 (4), Badak ve arkadaşları, %85.4 (6), Casal ve arkadaşları, %95.4 (8) olarak bildirmişlerdir. MGİT özgülüğü ise %100 (8) ve %99 olarak (4) bildirilmiştir. Çalışmamızda MGİT yönteminin duyarlılığı %88.3 olarak bulundu. MGİT duyarlılık ve özgülük oranlarımız Ardito ve Casal'ın çalışmalarına göre daha düşük idi.

Mikobakteri izolasyonunda MGİT yöntemi ile yapılan çalışmalar bu kültür ortamında üreme sürelerinin klasik konvansiyonel yöntemlere göre belirgin derecede azaldığını göstermiştir (5-12). M. tuberculosis için ortalama üreme süresini Ardito ve arkadaşları, MGİT'te 10 gün, LJ'de 25 gün (4), Chew ve arkadaşları, MGİT'te 22 gün, LJ'de 27 gün (11), Rivera ve arkadaşları, MGİT'te 15.7 gün, LJ'de 29.9 gün (5), Phyffer ve arkadaşları, MGİT'te 9.9 gün, LJ'de 20.2 gün (9) olarak bildirmişlerdir. Somoskövi ve arkadaşları (7) ile Levidiotou ve arkadaşları (10), ARB yayma pozitif ve negatif olguları ayrı ayrı değerlendirdiklerinde hem ARB yayma pozitif hem de negatif örneklerde MGİT besiyerinde üreme süresinin LJ'ne göre anlamlı derecede kısa bulmuşlardır (10).

Çalışmamızda M. tuberculosis ortalama üreme süresi MGİT'te 15.5 (min: 3-max: 44) gün, LJ'de 29.6 (min: 13 - max: 60) gün bulundu. Önceki çalışmalarla uyumlu olarak, MGİT yönteminde M. tuberculosis üreme süresi hem ARB yayma pozitif hem de ARB negatif olgularda LJ'ne göre anlamlı derece daha kısa idi.

Alınan örneklerdeki mikobakterinin türü ve yoğunluğu

her iki yöntemde de üreme süresini etkileyen en önemli faktörlerdir. Chew ve arkadaşları, kültürlerde üreme süresinin ARB direkt yayma negatif olgularda yayma pozitif olgulara göre daha uzun olduğunu bildirmişlerdir (11).

Çalışmamızda da M. tuberculosis ortalama üreme süresi, hem MGİT hem LJ yöntemlerinde ARB yayma pozitif olgularda negatif olgulara göre daha kısa bulundu. Sonuç olarak, MGİT'in mikobakterilerin gösterilmesinde duyarlılığı yüksek ve hızlı sonuç veren bir yöntem olduğu ve de LJ ile birlikte kullanımında daha yüksek izolasyon oranları elde edilmesi nedenleriyle rutin kullanıma girmesinin yararlı olacağı düşünüldü.

KAYNAKLAR

1. Heifets L. Mycobacteriology Laboratory. In: Iseman MD, Huit GA. Clinics in Chest Medicine (Tuberculosis). W.B. Saunders Company, 1997,18:35-53.
2. Glenn DR, Thompson GP. Bakterioloji ve tüberkülozun bakteriyolojik tanısı. In: Schlossberg D (Ed). Tüberküloz. Çevirenler: Solakoğlu S, Solakoğlu FD. Çeviri editörü: Tetikkurt C. 3.baskı, İstanbul, Bilimsel ve Teknik Yayınları Çevirme Vakfı Basım ve Ciltevi, 1995,s:39-46.
3. Çelenk M. Tüberküloz Epidemiyolojisi. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi. (Tüberküloz Özel Sayısı), 1994;14:391-403.
4. Ardito F, Sanguinetti M, Sechi L, et al. Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube with radiometric and solid culture for isolation of mycobacteria from clinical specimens and susceptibility testing of M. tuberculosis. New Microbiol. 2000; 23:151-158.
5. Rivera AB, Tupasi TE, Grimaldo ER, et al. Rapid and improved recovery rate of Mycobacterium tuberculosis in Mycobacteria Growth Indicator Tube combined with solid Lowenstein Jensen medium. Int J Tuberc Lung Dis. 1997 ;1: 454-459.
6. Badak FZ, Kiska DL, Setterquist S, et al. Comparison of mycobacteria growth indicator tube with BACTEC 460 for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. J Clin Microbiol. 1996; 34: 2236-2239.
7. Somoskövi A and Magyar P. Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube with MB Redox, Löwenstein-Jensen, and Middlebrook 7H11 Media for Recovery of Mycobacteria in Clinical Specimens. J of Clin Microbiol, 1999; 37: 1366-1369.
8. Casal M, Gutierrez J, Vaquero M. Comparative

- evaluation of the Mycobacteria Growth Indicator Tube with the BACTEC 460 TB system and Lowenstein-Jensen medium for isolation of mycobacteria from clinical specimens. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1997;1:81-84.
9. Phyffer GE, Welscher HM, Kissling P, et al. Comparison of Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. *J Clin Microbiol* 1997; 35:364-368.
 10. Levidiotou S, Papamichael D, Gessouli E, et al. Detection of mycobacteria in clinical specimen using the mycobacteria growth indicator tube (MGIT) and the Lowenstein Jensen medium. *Microbiol Res.* 1999;154:151-155.
 11. Chew WK, Lasaitis RM, Schio FA, Gilbert GL. Clinical evaluation of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) compared with radiometric (Bactec) and solid media for isolation of Mycobacterium species. *J Med Microbiol.*1998;47:821-827.
 12. Heifets L, Linder T, Sanchez T, Spencer D, Brennan J. Two liquid medium systems, Mycobacteria Growth Indicator Tube and MB redox tube, for Mycobacterium tuberculosis isolation from sputum specimens. *J Clin Microbiol* 2000;38:1227-1230.