

# *Mycobacterium tuberculosis* Kompleksi Suşlarının Erken Tanısında Kord Oluşumunun Değeri

Meltem Uzun, Zayre Erturan, Özdem Anğ

**Özet:** Çalışmada, BACTEC 12B ve 13A besiyerlerinde kord oluşumunun *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi suşlarının erken tanısındaki değeri araştırılmıştır. BACTEC besiyeri pozitif olarak belirlenen 92 örnekten hazırlanan ve Ziehl-Neelsen yöntemiyle boyanan preparatların sırasıyla %91.3 ve %90'unun kord-pozitif; *M. tuberculosis* dışı mikobakterilerin ürediği besiyerlerine ait preparatların ise % 100 ve % 100'ünün kord-negatif olduğunu belirlemiştir. Sonuçta kord oluşumunun farklı kişiler tarafından değerlendirilmesinin anlamlı olmadığı ( $t=0.03$ ); her iki araştırmacıya ait duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değerlerin sırasıyla, %91.3, %100, %100, %61 ve %90, %100, %100, %57.8 olduğu saptanmış ve BACTEC besiyerinde kord oluşumunun *M. tuberculosis* kompleksi suşlarının erken tanısında güvenilir bir parametre olabileceği düşünülmüştür.

**Anahtar Sözcükler:** BACTEC 12B ve 13A besiyeri, *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi, kord oluşumu.

**Summary:** Value of cord formation for presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. In this paper cord formation in BACTEC 12B and 13A media was evaluated for presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. Ziehl-Neelsen stained smears, prepared from 92 radiometrically positive BACTEC media, were examined independently by two researchers. Smears prepared from 91.3% and 90% of *M.tuberculosis* complex strains were determined as cord-positive and smears prepared from 100% and 100% of the mycobacteria other than *M.tuberculosis* cultures were determined as cord-negative by the two researchers, respectively. At the end of the study it was proved that examination of the smears by different researchers was not significant ( $t=0.03$ ), and sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of the cord formation for the presumptive identification of *M.tuberculosis* complex were determined as 91.3%, 100%, 100%, 61% and 90%, 100%, 100%, 57.8% by both of the researchers, respectively. Therefore we concluded that the presence of cords in BACTEC media can be a reliable parameter for presumptive identification of *M.tuberculosis* complex strains.

**Key Words:** BACTEC 12 B and 13A media, *Mycobacterium tuberculosis* complex, cord formation.

## Giriş

*Mycobacterium tuberculosis* kompleksinde yer alan virülen suşlar sıvı besiyerinde karakteristik olarak ip veya demet şeklinde yılankavi kord (serpentine cord) oluşturarak ürerler. Kord faktörü (6-6'-dimikolat-a-D-trehaloz) bir glikolipiddir ve mikolik asidler trehaloz gibi şekerlere bağlanarak kord faktörü oluştururlar. *M. tuberculosis*'in virülen olmayan varyantları ve *M.tuberculosis* dışı mikobakteriler (MOTT) ise yine sıvı besiyerlerinde merkezi olmayan, dağınık bir üreme gösterirler. Ancak, in vitro olarak üretilen *M. tuberculosis* suşlarının yılankavi kord oluşturma, kültürlerinin yapıldığı besiyerinin içeriğine ve kültür koşullarına göre değişiklik gösterir (1-3). Lorian ve arkadaşları (3) *M. tuberculosis* kompleksi suşlarının Triton WR-1339 katkılı Middlebrook 7H10 agarda tipik kord oluşturduğunu göstermiş ve bu özelliklerinin Runyon grup 1'de yer alan mikobakteriler hariç diğer MOTT suşlarından ayrımlarında kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Bu nedenle çalışmamızda BACTEC besiyerlerinde kord oluşturmalarının *M.tuberculosis* kompleksi suşlarının erken tanısında güvenilir bir parametre olup olmayacağı araştırılmıştır.

## Yöntemler

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Tüberküloz Laboratuvarı'na Temmuz 1997-Mart 1998 tarihleri arasında gönderilen 60 balgam, 20 açlık mide suyu (AMS), 3'er idrar ve plevra sıvısı, 2'şer bronkoalveolar lavaj (BAL) ve cerahat, 1'er beyin-omurilik sıvısı (BOS) ve periton sıvısında üreyen 92 mikobakteri suşu çalışma kapsamına alınmış ve bu suşların BACTEC besiyerinde kord oluşturma özellikleri prospektif olarak incelenmiştir (2,4). Steril olarak kabul edilen örneklerin direkt olarak BACTEC 13A besiyerinde kültürleri yapılmış, diğer tüm örnekler ilk aşamada %4 NaOH+NALC yöntemi kullanılarak homojenizasyon işlemi uygulanmış ve bu işlemden sonra örnekler santrifüjde çevrilmiştir. Her örnek için bir adet BACTEC besiyeri, bir adet Löwenstein-Jensen besiyeri kullanılmış ve besiyerleri 37°C'de altı hafta süreyle inkübe edilmiştir. BACTEC besiyerleri ilk iki hafta haftada iki kez; son dört hafta haftada bir kez BACTEC TB 460 sisteminde kontrol edilmiş ve üreme indeksi (GI)  $\geq 100$  değerine ulaşan besiyerlerinden hazırlanan preparatlar Ziehl-Neelsen yöntemiyle boyanarak aside dirençli bakterilerin varlığı araştırılmıştır. Saf halde aside dirençli bakteri görülen besiyerlerinden NAP ayırma deneyi yapılmış ve mikobakteri-

ler *M. tuberculosis* kompleksi ya da MOTT olarak tanımlanmıştır (5,6). İzole edilen tüm mikobakterilerin son tanımlanmasında konvansiyonel biyokimyasal yöntemler (üreme hızı, koloni morfolojisi, pigment oluşumu, niasin birikimi, nitrat indirgemesi, üç günde arilsülfataz, üreaz enzim aktivitesi) kullanılmış ve çalışmanın tüm aşamaları sınıf II güvenlik kabininde gerçekleştirilmiştir (7,8)

NAP ayırma deneyi yapılan besiyerlerinin GI değeri  $\geq 800-99$ 'a ulaştığında, bu besiyerlerinden tekrar preparat hazırlanarak Ziehl-Neelsen yöntemiyle boyanmış ve bu preparatlar NAP ayırma deneyi sonuçları bilinmeden, birbirlerinden bağımsız olarak iki araştırmacı tarafından incelenmiş ve kord varlığı kaydedilmiştir. Aside dirençli bakterilerin uzun eksenleri, kordun uzun eksenine paralel olarak yerleştiğinde ve bunun sonucunda yılankavi bir görünüm oluştuğunda, bu preparatlar kord-pozitif olarak değerlendirilmiştir. Mikobakterilerin biyokimyasal yöntemlerle identifikasyonları tamamlandığında BACTEC besiyerlerinde kord oluşumu ile identifikasyon sonuçları yine araştırmacılar tarafından birbirlerinden bağımsız olarak karşılaştırılmış; duyarlık, özgüllük, pozitif (PPV) ve negatif prediktif değerler (NPV) hesaplanmıştır.

### Sonuçlar

Temmuz 1997-Mart 1998 tarihleri arasında BACTEC 12B ve 13A besiyerlerinden izole edilen 92 mikobakteri suşunun NAP ayırma deneyi ile 81'i *M. tuberculosis* kompleksi, 11'i MOTT olarak tanımlanmış; suşların son tanımlamalarında biyokimyasal yöntemler kullanılmış ve 81 suşun tamamının *M. tuberculosis*, 11 MOTT suşundan 8'inin *M. fortuitum*, 3'ünün *M. scrofloceum* olduğu belirlenmiştir. Bu suşların izole edildiği klinik örnekler Tablo 1'de gösterilmiştir.

Birinci araştırmacı *M. tuberculosis* izole edilen 81 BACTEC

besiyerine ait preparatın 74'ünü (%91.3); ikinci araştırmacı 73'ünü (%90) kord-pozitif olarak değerlendirirken; MOTT üreyen 11 besiyerinden hazırlanan preparatların tümü her iki araştırmacı tarafından da kord-negatif olarak belirlenmiştir. Her iki araştırmacının kord varlığı açısından incelediği preparatların sonuçları Tablo 2'de gösterilmiştir.

*M. tuberculosis* kompleksi suşlarının ürettiği BACTEC besiyerlerinden hazırlanan preparatlarda, bu bakterilerin büyük çoğunluğunun birleşme eğiliminde olduğu ve yılankavi kord oluşturdukları (Resim 1); tek tek dağılım gösteren bakteri sayısının az olduğu, MOTT üreyen besiyerlerinden hazırlanan preparatlarda ise bu bakterilerin çok merkezli küçük kümeler oluşturdukları, paralel yerleşim yerine tek tek dağılım gösterdikleri gözlenmiştir (Resim 2). Her iki araştırmacı tarafından da kord-negatif olarak değerlendirilen, ancak *M. tuberculosis* olarak tanımlanan suşların ürettiği besiyerlerinden hazırlanan preparatlarda ise; GI  $\geq 999$  olduğu halde çok az paralel yerleşim gösteren bakteri olduğu ve bu preparatların az sayıda bakteri içerdiği belirlenmiştir. Bu preparatlar her iki araştırmacı tarafından da şüpheli olarak kaydedilmiş, ancak sonuçta kord-negatif olarak değerlendirilmiştir.

### İrdeleme

Tüberküloz insidansının giderek artış göstermesi ve çoğul ilaca dirençli tüberküloz suşları ile oluşan salgınlar, bu hastalığı tekrar önemli bir sağlık sorunu haline getirmiştir. Klinik ve radyolojik bulgular ve preparasyonda aside dirençli bakterilerin görülmesi tüberküloz tanısına yardımcı olmakla birlikte, kesin tanı için klinik örnekten *M. tuberculosis*'in üretilmesi koşuldur.

Ancak *M. tuberculosis*'in kültürde üretilmesi için 2-8 haftalık bir süre gerekmektedir. Bu nedenle son yıllarda tüberkülozun

tanısı ve mikobakteri suşlarının tür düzeyinde tanımlanmasında kısa sürede sonuç veren teknikler geliştirilmiştir ve bu yöndeki çalışmalar devam etmektedir (9,10).

*M. tuberculosis* kompleksi grubunda yer alan virülan suşların sıvı besiyerlerinde karakteristik olarak kord oluşturmalarının, bu suşların erken tanısında bir parametre olarak kullanılabilceğini gösteren yayınlar bulunmaktadır (2,4). BACTEC TB 46 sistemi kullanım kılavuzunda radyometrik olarak pozitif bulunan BACTEC besiyerlerinden hazırlanan preparatlarda aside dirençli olarak boyanan bakterilerin morfolojileri dikkatli olarak incelenirse, bu gözlemin *M. tuberculosis* kompleksi-MOTT suşlarının ayırımında yardımcı olabileceği belirtilmektedir (5).

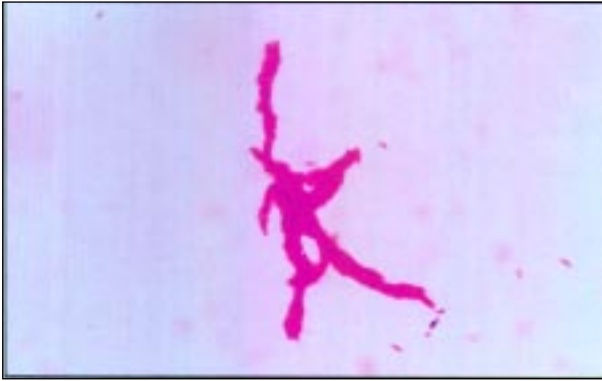
Yagupsky ve arkadaşları (2)'nin çalışmasında BAC-

**Tablo 1. *M. tuberculosis*, *M. fortuitum* ve *M. scrofloceum*'un İzole Edildikleri Klinik Örnekler**

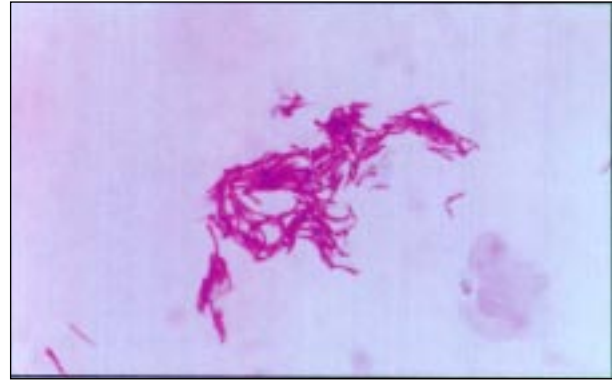
Klinik Örnek	Örnek Sayısı	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. scrofloceum</i>
Balgam	60	60	-	-
AMS	20	9	8	3
İdrar	3	3	-	-
Plevra sıvısı	3	3	-	-
BAL	2	2	-	-
Cerahat	2	2	-	-
BOS	1	1	-	-
Periton sıvısı	1	1	-	-
<b>Toplam</b>	<b>92</b>	<b>81</b>	<b>8</b>	<b>3</b>

**Tablo 2. *M. tuberculosis* Kompleksi ve MOTT Suşlarının Kord Sonuçları**

Kord oluşumu	<i>M. tuberculosis</i> Kompleksi (n=81)		MOTT (n=11)	
	1. Araştırmacı	2. Araştırmacı	1. Araştırmacı	2. Araştırmacı
Pozitif	74	73	-	-
Negatif	7	8	11	11
	<b>1. Araştırmacı</b>		<b>2. Araştırmacı</b>	
	Duyarlık: % 91.3		Duyarlık: % 90	
	Özgüllük: % 100		Özgüllük: % 100	
	PPV: %100		PPV: %100	
	NPV: %61		NPV: % 57.8	



**Resim 1.** *M. tuberculosis* kompleksi suşlarının BACTEC 12B besiyerinde oluşturduğu kord (100x).



**Resim 2.** MOTT basillerinin BACTEC 12B besiyerindeki görünümü (100x).

TEC 12B besiyeri pozitif olarak belirlenen 270 örnekten hazırlanan preparatlar üç ayrı araştırmacı tarafından incelenmiş ve araştırmacılar *M.tuberculosis* kompleksi üreyen 88 besiyerine ait preparatın sırasıyla %93.2, %88.6 ve %83'nü kord-pozitif, MOTT üreyen 182 besiyerinden hazırlanan preparatın ise %97.3, %97.8 ve %99.5'ini kord-negatif olarak bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, ortalama olarak duyarlılık %88.3, özgüllük %99.6, PPV %97.6 ve NPV %94.6 olarak belirlenmiştir.

Morris ve arkadaşları (4) ise *M.tuberculosis* kompleksi üreyen 170 BACTEC besiyerlerinden hazırlanan preparatın %22.9'unun kord-pozitif; MOTT üreyen 543 besiyerlerinden hazırlanan preparatın ise % 98.5'ini kord-negatif olarak değerlendirmiştir. Yine aynı çalışmada duyarlılık, özgüllük, PPV ve NPV sırasıyla %22.9, %98.5, %82.9 ve %80.3 olarak bildirilmiştir.

Çalışmamızda *M.tuberculosis* kompleksi üreyen 81 BACTEC besiyerinden hazırlanan ve her iki araştırmacı tarafından da ayrı ayrı incelenen preparatların %91.3 ve %90'ı kord-pozitif olarak değerlendirilirken; MOTT üreyen 11 besiyerinden hazırlanan preparatların tümü (%100) kord-negatif olarak değerlendirilmiştir; sırasıyla her iki araştırmacı tarafından duyarlılık % 91.3 ve % 90, özgüllük % 100 ve %100, PPV %100 ve %100 ve NPV %61 ve %57.8 olarak belirlenmiştir. BACTEC besiyerinde *M.tuberculosis* üreyen ancak araştırmacılar tarafından kord-negatif olarak değerlendirilmiştir; Sonuçlarımız Yagupsky ve arkadaşları (2)'nin sonuçları ile uyumlu bulunurken, Morris ve arkadaşları (4)'na göre daha yüksek değerler elde edildiği görülmektedir. Ancak bu araştırmacılar çalışmalarının sonucunda elde edildiği görülmektedir. Ancak bu araştırmacılar çalışmalarının sonucunda elde ettikleri değerlerin daha düşük bulunmasını, kord oluşumunu incelemek için 32-100 arasında GI değeri veren besiyerlerini kullanmalarına bağlamışlar ve kord oluşumunun incelenmesinde GI değerinin önemli bir faktör olduğunu belirlemişlerdir.

Yagupsky ve arkadaşları (2), inceledikleri 182 MOTT şuşunun 6'sını; Morris ve arkadaşları (4) ise 543 MOTT şuşunun 8'ini kord-pozitif olarak değerlendirmişler ve bu şuşların *M. fortuitum* ve 3 *M. avium* kompleksinden olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda incelenen 8 *M. fortuitum* ve 3 *M. scrofloceum* şuşunun hiçbirisinde kord görülmemiştir; ancak gerek bu şuşların sayısının az oluşu, gerekse MOTT grubuna dahil diğer mikobakteri şuşları ile hiçbir tecrübemizin bulunmayışı, labora-

tuarımızda bu şuşların erken tanısı için kord varlığı araştırılmasını sınırlamaktadır. Bu nedenle kord-negatif örnekler hemen MOTT olarak tanımlanmamalı, bu örneklerden de *M.tuberculosis* kompleksi izole edilebileceği unutulmamalıdır. Ancak yüksek duyarlılık, özgüllük ve PPV elde edildiğinden, kord varlığı araştırılmasının *M.tuberculosis* kompleksi şuşlarının erken tanısında güvenilir bir parametre olabileceği düşünülmektedir. Sonuçta böyle bir yöntemi *M.tuberculosis* kompleksi şuşlarının erken tanısında kullanılacak bir parametre olarak seçmeden önce, her laboratuvarın kendi oranlarını belirlenmesi, kendi tecrübelerini edinmelerini önermekteyiz.

#### Kaynaklar

1. Minnikin D E. Lipids: complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles. In: Ratledge C, Stanford J, eds. *The Biology of Mycobacteria*. Vol 1. London: Academic Press, 1982:95-184
2. Yagupsky PV, Kaminsky DA, Palmer KM, Nolte FS. Cord formation in BACTEC 71112 medium for rapid, presumptive identification of Mycobacterium tuberculosis complex. *J Clin Microbiol* 1990;28:1451-3
3. Lorian V. Direct cord reading medium for isolation of mycobacteria. *Appl Microbiol* 1966; 14:603-7
4. Morris AJ, Reller LB. Reliability of cord formation in Bactec media for presumptive identification of Mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1993; 31:2533-4
5. Siddiqi SH. *BACTEC TB system: Product and Procedure Manual*. Sparks, MD: Becton Dickinson Diagnostic Instruments System, 1995
6. Morgan MA, Hortsimeier CD, De Young DR, Roberts GD. Evaluation of the p-nitro- $\alpha$ -acetyl-amino- $\beta$ -hydroxypropiophenone differential test for identification of Mycobacterium tuberculosis complex. *J Clin Microbiol* 1983; 21:634-5
7. Master RN. Mycobacteriology. In: Isenberg HD, ed. *Clinical Mycobacteriology Procedures Handbook*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1993:3.12.1-3.12.27
8. Vestal AL. *Procedures for the Isolation and Identification of Mycobacteria*. HHS Publication No. (CDC) 81-8310. Atlanta, GA: Centers for Disease Control, 1981:1-13
9. Viaspolder F, Singer P, Rpggeveen C. Diagnostic value of an amplification method (Gen-Probe) compared with that of culture for diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2699-703
10. Roneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Win WC Jr. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th