

Tüberkülozun Tanısında %2 Ogawa Besiyerinin Löwenstein-Jensen Besiyeri ile Karşılaştırılması ve Değerlendirilmesi*

Comparison and Evaluation of Lowenstein-Jensen Medium and 2% Ogawa Medium for the Diagnosis of Tuberculosis

İsmail CEYHAN¹, Hülya ŞİMŞEK¹, Gülnur TARHAN²

¹ Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı, Ankara.

¹ Refik Saydam National Public Health Agency, National Tuberculosis Reference and Research Laboratory, Ankara, Turkey.

² Ahi Evran Üniversitesi, Sağlık Meslek Yüksekokulu, Kırşehir.

² Ahi Evran University, Vocational School of Health Services, Kirsehir, Turkey.

* Bu çalışma, 26. Ulusal Tüberküloz ve Göğüs Hastalıkları Kongresi (23-26 Mart 2011, Adana)'nde poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 10.08.2011 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 23.09.2011

ÖZET

Tüberkülozun kesin tanısı basilin gösterilmesiyle konulur. Bakteriyolojik tekniklerle bakterinin kültürde üretilmesi altın standart olarak kabul edilmekte ve kültürde iki adet besiyeri kullanılması ve besiyerlerinden birinin sıvı olması önerilmektedir. Bununla birlikte farklı besiyerlerinin kullanılmasının tanıya önemli katkılar sağladığı da rapor edilmiştir. Bu çalışmada, bugün hala dünyada yaygın olarak kullanılmakta olan yumurta bazlı Löwenstein-Jensen (LJ) besiyeri ile Ogawa (%2) besiyerinin tanı değerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarına 2.5 yıl boyunca (Ocak 2006-Haziran 2008) başvuran 3311 tüberküloz şüpheli hastaya ait 7912 adet örnek (akciğer ve akciğer dışı örnekleri) toplanmıştır. Toplanan her bir örnek modifiye Petroff yöntemine (%4 NaOH) göre aynı gün içerisinde homojenizasyon-dekontaminasyon-konsantrasyon işlemine alınmıştır. Her bir örnek için iki adet Ogawa ve iki adet LJ besiyeri kullanılmıştır. İşlenmiş örneklerden bu besiyerlerine 150-200 µl ekim yapılmış ve 35-37°C'de inkübe edilmiştir. Besiyerleri kontaminasyon yönünden inkübasyonun üçüncü gününde kontrol edilmiştir. Eğer kontaminasyon gözlenmemişse haftada bir kez olmak üzere üreme kontrolleri için sekiz hafta boyunca takip edilmiştir. Bu süre içerisinde üreme saptanan besiyerleri ayrılarak kültürlerin tanımlanması aşamasına geçilmiştir. Tür tayini için paranitrobenzoik asit (PNB), nitrat, niasin gibi biyokimyasal testler kullanılmıştır. *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi olarak

İletişim (Correspondence): Dr. Hülya Şimşek, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı, Sağlık Mahallesi Adnan Saygun Caddesi No: 55 Sıhhiye 06100, Ankara, Türkiye.
Tel (Phone): +90 312 458 2211, E-posta (E-mail): hsimsek_tr@yahoo.com

tanımlanan koloniler pozitif olarak rapor edilmiştir. Çalışma sonucunda toplam kontaminasyon oranı; Ogawa besiyeri için %3.1 ve LJ için %4 olarak bulunmuştur. Hastaların 248 (%7.5)'inde kültür pozitifliği (LJ + Ogawa ile) saptanmış; bunlardan 210'u her iki besiyeri ile de pozitif bulunurken, 20'si sadece LJ'de 18'i ise sadece Ogawa besiyerinde pozitif sonuç vermiştir. Her iki besiyerinin birlikte kullanılması dolayısıyla LJ ve Ogawa besiyerlerinin toplam pozitifliğe katkıları sırasıyla %8.1 (20/248) ve %7.3 (18/248); duyarlılıkları sırasıyla %92.7 (230/248) ve %91.9 (228/248) olarak bulunmuştur. LJ besiyeri referans yöntem olarak kabul edildiğinde, Ogawa besiyerinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla %91.3, %99.4, %92.1 ve %99.4 olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak ucuz ve kontaminasyon oranının düşük olması göz önünde bulundurularak özellikle laboratuvara gönderilen tek örnekler için (beyin omurilik sıvısı, biyopsi, püvy vb.) Ogawa besiyerinin, bir sıvı besiyerinin yanında, LJ ile birlikte ya da tek başına kullanılmasının mikobakterilerin üreme şansını artıracağı görüşüne varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Tüberküloz; Ogawa besiyeri; Löwenstein-Jensen besiyeri; kültür.*

ABSTRACT

Accurate diagnosis of tuberculosis is based on the detection of the bacilli in the clinical specimen. The growth of mycobacteria in laboratory media is regarded as the gold standard for diagnosis and use of two different cultivation media, one of them being a liquid one, is recommended. In this study, the diagnostic values of egg-based Lowenstein-Jensen (LJ) medium used extensively all over the world and Ogawa (2%) medium were compared. A total of 7912 pulmonary and extrapulmonary clinical samples which belonged to 3311 patients with suspected tuberculosis, were enrolled in the National Tuberculosis Reference Laboratory in Refik Saydam National Public Health Agency during 2.5 years (January 2006-June 2008). The samples were processed by modified Petroff method (4% NaOH) for homogenization-decontamination-concentration on the same day and inoculated on two Ogawa and two LJ media. The cultures were incubated at 35-37°C for eight weeks and were controlled on the third day of incubation in terms of contamination. If no contamination were detected, the cultures were incubated for a total of eight weeks with regular weekly controls. The colonies detected in culture media were identified by biochemical tests, including paranitrobenzoic acid (PNB), niacin accumulation and nitrate reduction tests. Those identified as *Mycobacterium tuberculosis* complex were reported as positive. The rates of contamination was 3.1% for Ogawa medium and 4% for LJ medium. Culture results were found positive for 248 patients (7.5%). While 210 of these were positive by both of the media, 20 (8.1%) patients were detected positive only by LJ and 18 (7.3%) only by Ogawa medium. The sensitivity of LJ medium was 92.7% (230/248) and of Ogawa medium was 91.9% (228/248). When LJ medium was taken as the reference method, the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of Ogawa medium were 91.3%, 99.4%, 92.1% and 99.4%, respectively. It was concluded that, when low price and low contamination rates were taken into consideration, Ogawa medium, used together with a liquid medium + LJ medium, would increase the yield of mycobacteria from single samples (cerebrospinal fluid, biopsy, pus, etc.) sent to the laboratories.

Key words: *Tuberculosis; Ogawa medium; Lowenstein-Jensen medium; culture.*

GİRİŞ

Tüberküloz (TB) tedavi edilebilir bir hastalık olmasına rağmen, günümüzde dünyada hala önemli bir halk sağlığı sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle laboratuvar tarafından doğru tanı konulması ve hastaların hemen tedavi edilmeleri gereklidir. TB'nin kesin tanısı basilin gösterilmesiyle konur. Bakterinin kültürde üretilmesi altın standart olarak kabul edilmekte ve kültürde en az iki besiyeri kullanılması ve bunlardan birinin sıvı ol-

ması önerilmektedir. Bununla birlikte farklı besiyerlerinin kullanılmasının tanıya önemli katkı sağladığı da rapor edilmiştir¹⁻³.

Mikobakteri izolasyonunda kullanılan ideal bir besiyeri, bakteriyi hızlı ve bol üretmenin yanında koloni morfolojisi, üreme oranı ve pigment oluşumu gibi karakteristik özelliklerini de saptamalıdır. TB'nin kültürü için yaygın olarak kullanılmakta olan yumurta bazlı Löwenstein-Jensen (LJ) besiyeri ve Ogawa besiyeri referans standart sayılmaktadır⁴⁻⁶. Her ikisinin büyük avantajı düşük maliyetli olmalarıdır. BACTEC/MGIT gibi radyometrik olan veya olmayan sıvı kültür sistemlerinin mikobakteri üretiminde daha verimli oldukları gösterilmiştir, ancak gelişmekte olan ülkeler için maliyeti oldukça yüksektir⁷. Gelişmekte olan ülkelerde yeterli kaynağı olmayan aşırı iş yüküne sahip TB laboratuvarları için Ogawa teknikleri idealdir; zira bu yöntem ekonomik, basit ve hızlıdır^{1,8}. 1940 yılında geliştirilen Ogawa besiyeri günümüzde pratikte Japonya başta olmak üzere Güneydoğu Asya ülkelerinde LJ'nin yerine kullanılmaktadır. LJ ve Ogawa besiyerleri kalitatif ve kantitatif olarak karşılaştırıldığında, *Mycobacterium tuberculosis* izolasyonu için Ogawa besiyerinin zaman açısından LJ'den daha iyi olduğu ve koloni sayısı bakımından aynı verimliliği gösterdiği düşünülmektedir⁹. Dolayısıyla, sıvı kültür sistemleri kullanarak TB'nin daha hızlı saptanmasına dayalı teknolojik gelişmelere rağmen, gelişmekte olan ülkelerde mikobakteri izolasyonu için kullanılan konvansiyonel katı besiyerleri hala en ucuz ve güvenilir yöntemlerdir. Bu çalışmada, yumurta bazlı LJ besiyeri ile %2 (asit tamponlu) Ogawa besiyerinin tanı değerlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Ocak 2006-Haziran 2008 tarihleri arasında Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı, Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarına başvuran hastalardan alınan akciğer (balgam ve açlık mide suyu) ve akciğer dışı örnekler (idrara, sentez sıvıları, biyopsi vb.) dahil edildi. Balgam, idrar ve açlık mide suyu örnekleri aynı kişiye ait 2-3 örnek, diğerleri ise genellikle bir örnek olarak laboratuvarımıza kabul edildi. İdrar örnekleri önce 3000 xg'de santrifüj edilerek yoğunlaştırıldı. Tüberküloz şüpheli 3311 kişiye ait 7912 adet örnek, aynı gün homojenizasyon-dekontaminasyon amacıyla modifiye Petroff yöntemine göre %4 NaOH ile 1/1 oranda karıştırıldı ve 20-30 saniye vortekslenip 15 dakika bekletildi¹⁰. Üzerine toplam hacim 45-50 ml olacak şekilde fosfat tamponu ilave edilerek nötralize edildi ve konsantrasyon amacıyla 3000 xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvı atıldıktan sonra dipteki çökeltiye 1-2 ml fosfat tamponu ilave edilerek karıştırıldı. Elde edilen çözeltilerden, iki adet Ogawa (%2) besiyerine ve iki adet LJ besiyerine 150-200 µl ekim yapıldı¹¹. Aynı çözeltilerden preparat hazırlanarak Ehrlich Ziehl Neelsen (EZN) boyama tekniğiyle mikroskopta aside dirençli basil (ARB) arandı.

Ekim yapılan besiyerleri 35-37°C'de inkübe edilerek, üçüncü ve yedinci günde, daha sonra ise haftada bir kez olmak üzere üreme kontrolleri yapılarak iki ay boyunca takip edildi. Bu süre içerisinde kontroller sırasında iyi üreme olan kültür tüpleri ileri testler yapılması için seçildi. Üreyen koloniler için tipik ve atipik mikobakteri tanımlamaları yapıldı ve *M.tuberculosis* kompleks türleri ilaç duyarlılık testlerine alındı.

BULGULAR

Bu çalışma için 2.5 yıllık süreçte laboratuvarımızda 3311 tüberküloz şüpheli hastaya ait 7912 adet örnek kullanılmıştır. Örneklerden yapılan kültürlerin incelenmesi sonunda, 7409 negatif (kontaminasyonlar dahil) ve 503 pozitif sonuç elde edilmiştir (Tablo I). Toplam kontaminasyon oranı Ogawa besiyeri için %3.1 ve LJ için %4 olarak belirlenmiştir.

Hasta bazında yapılan değerlendirmede, hastaların %7.5 (248/3311)'inde kültür pozitifliği (LJ + Ogawa ile) saptanmış; bunlardan 210'u her iki besiyeri ile de pozitif bulunurken, 20'si sadece LJ'de 18'i ise sadece Ogawa besiyerinde pozitif sonuç vermiştir. Her iki besiyerle saptanan toplam pozitiflik dikkate alındığında, LJ ve Ogawa besiyerlerinin toplam pozitifliğe katkıları sırasıyla %8.1 (20/248) ve %7.3 (18/248) olarak bulunmuştur.

LJ besiyeri esas alındığında Ogawa besiyerinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla %91.3, %99.4, %92.1 ve %99.4 olarak hesaplanmıştır.

TARTIŞMA

Son 10 yılda mikobakteri kültür yöntemleriyle ilgili pek çok ilerleme kaydedilmiştir. MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) 960, BacT/Alert, ESP, bifazik Septi-Check AFB ve Myco-Acid yöntemleriyle radyometrik BACTEC 460TB gibi sıvı besiyerine dayalı sistemler, klinik örneklerden mikobakteri izolasyonu için başarıyla kullanılmaktadır. Ancak gelişmiş sıvı besiyeri sistemlerine rağmen, agar (Middlebrook 7H10/7H11) ya da yumurta (Ogawa/LJ) bazlı besiyerlerinin mikobakterilerin primer izolasyonunda sıvı besiyerleriyle birlikte kullanılması sonuçların güvenilirliğini artırmaktadır¹². Bu nedenle standart olarak bir katı ve bir sıvı besiyerinin birlikte kullanılması önerilmektedir. Günümüzde halen klinik örneklerin kültürü için yumurta bazlı besiyerleri ilk seçimdir. Ancak her bir besiyerinin avantajları vardır ve her mikobakteri izolatu tek bir besiyerinde izole edilemez. Bu nedenle primer izolasyon için kullanılan her bir besiyeri tipinin bir temsilcisi önerilir. Örneğin; Japonya'da Middlebrook 7H11 ve MGIT ile kombinasyon halinde yumurta bazlı Ogawa besiyeri kullanılmaktadır⁶. MGIT, mikobakterilerin hızlı izolasyonunu ve yüksek duyarlılığı garanti etmektedir; ancak maliyeti yüksektir¹³. Ancak MGIT ve Ogawa besiyeri kombinasyonu, karışık kültür ya da kontaminasyon durumlarında mikobakteri izolasyonu için daha fazla tercih edilmektedir³.

Tablo I. Örnek ve Hasta Bazında Besiyerlerinde Saptanan Sonuçlar

	LJ			Ogawa			LJ + Ogawa		
	Pozitif	Negatif*	Pozitiflik oranı (%)	Pozitif	Negatif*	Pozitiflik oranı (%)	Pozitif	Negatif*	Pozitiflik oranı (%)
Hasta	230	3081	6.9	228	3083	6.9	248	3063	7.5
Örnek	481	7431	6.1	466	7446	5.9	503	7409	6.4

* Negatiflere kontaminasyon dahil edilmiştir.
LJ: Löwenstein-Jensen besiyeri.

Lubasi ve arkadaşlarının¹ 2004 yılındaki çalışmalarında, LJ sonuçları standart olarak kabul edilerek Ogawa ve modifiye Ogawa'nın duyarlılık ve özgüllükleri karşılaştırılmıştır. Toplamda 108 (%39.1) örnek kültür pozitif olarak saptanmış; her bir besiyeri için örnek pozitifliği; LJ için 93 (%33.7), modifiye Ogawa için 98 (%35.5) ve orijinal Ogawa için 82 (%29.7) olarak belirlenmiştir¹. Sonuçta araştırmacılar, Ogawa kültür metodunun ekonomik, basit ve çabuk olması sebebiyle gelişmekte olan ülkelerde iş yükü çok ancak kaynakları sınırlı olan laboratuvarlar için ideal olduğu görüşüne varmışlardır. Çalışmamızda, 2.5 yıl boyunca laboratuvarımızda mikobakteri kültürü için iki farklı yumurta bazlı katı besiyeri (LJ ve Ogawa) kullanılmış ve aynı kültür metoduyla her iki besiyeriyle elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Toplam 248 (%7.5) hastadan 210'u her iki besiyeri ile pozitif bulunurken, sadece LJ'de 20 ve sadece Ogawa besiyerinde 18 hasta pozitif olarak saptanmıştır. Her iki besiyerinin birlikte kullanılması dolayısıyla LJ ve Ogawa besiyerlerinin toplam pozitifliğe katkıları sırasıyla %8.1 ve %7.3; duyarlılıkları ise %92.7 ve %91.9 olarak bulunmuştur.

Pauwels ve arkadaşları¹⁴, bizim çalışmamızda olduğu gibi mikobakterilerin izolasyonu için iki farklı yumurta bazlı kültür ortamını (LJ ve %1'lik Ogawa) karşılaştırmışlar; *M.tuberculosis* izolasyon oranını Ogawa besiyeri için %95, LJ besiyeri için ise %88.4 olarak saptamışlardır. Bu nedenle araştırmacılar, Ogawa besiyerinin kullanımını önermektedirler. 1973 yılında Türkiye'den yapılan bir çalışmada, TB kültürü için kullanılan LJ ve Ogawa besiyerleri karşılaştırılmış; Ogawa besiyerindeki üremelerin LJ besiyerinden az bir farkla daha kısa sürede olduğu bildirilmiştir¹⁵. Bir başka çalışmada, akciğer TB'sinde *M.tuberculosis*'i üretmek için LJ ve Ogawa besiyerleri karşılaştırılmıştır⁹. 2007 yılında yapılan bu çalışmada, *M.tuberculosis* izolasyonunda her iki besiyerinin de, mikobakterilerin üreme zamanları ve koloni sayıları açısından aynı verimliliği gösterdiği sonucuna varılmıştır⁹. Bizim çalışmamızda %2'lik Ogawa besiyeri kullanılmış ve LJ besiyeri esas alındığında Ogawa'nın duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla %91.3, %99.4, %92.1 ve %99.4 olarak hesaplanmıştır. Çalışmamızda her ikisi de katı besiyeri olmasına rağmen farklı besiyerinin kullanılmasının toplam tanıya %7.5-%8.1 oranında katkısı olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca, toplam kontaminasyon oranı Ogawa besiyeri için %3.1, LJ için %4 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak ucuz ve kontaminasyon oranının düşük olması göz önünde bulundurularak özellikle laboratuvara gönderilen tek örnekler için (beyin omurilik sıvısı, biyopsi, püy vb.) Ogawa besiyerinin, bir sıvı besiyerinin yanında, LJ ile birlikte ya da tek başına kullanılmasının mikobakterilerin üreme şansını artıracağı görüşüne varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Lubasi D, Habeenzu C, Mitarai S. Evaluation of an Ogawa *Mycobacterium* culture method modified for higher sensitivity employing concentrated samples. *Tropical Medicine Health* 2004; 32 (1): 1-4.
2. Sato K. Comparison of BACTEC and Ogawa media for culture of mycobacteria from sputum specimens. *Kekkaku* 1993; 68(5): 345-9.
3. Bae E, Im JH, Kim SW, et al. Evaluation of combination of BACTEC mycobacteria growth indicator tube 960 system and Ogawa media for mycobacterial culture. *Korean J Lab Med* 2008; 28(4): 299-306.

4. American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. Am J Respir Crit Care Med 2000; 161(4 Pt 1): 1376-95.
5. Woods G. The mycobacteriology laboratory and new diagnostic techniques. Infect Dis Clin North Am 2002; 16(1): 127-38.
6. Saito H. Laboratory media for the cultivation of tubercle bacillus. Kekkaku 1998; 73(5): 329-37.
7. Zanetti S, Ardito F, Sechi L, et al. Evaluation of a nonradiometric system (BACTEC 9000 MB) for detection of mycobacteria in human clinical samples. J Clin Microbiol 1997; 35(8): 2072-5.
8. World Health Organization. Laboratory services in tuberculosis control. Part III: Culture, for the Global Tuberculosis Programme. 1998, Geneva, Switzerland (WHO/TB/98.258).
9. Parimango Rodriguez D, Chavez Castillo M, Lujan Velasquez M, et al. Comparison of Ogawa and Löwenstein-Jensen media for *Mycobacterium tuberculosis* isolation in pulmonar tuberculosis. Regional Hospital of Trujillo, Peru. Rev Med Vallejana (online) 2007; 4(1): 24-31.
10. Kent P, Kubica G. Public Health Mycobacteriology. A Guide for the Level III Laboratory. US Department of Health and Human Services. 1985, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta.
11. Ang CF, Mendoza MT, Santos HR, et al. Isolation rates of *Mycobacterium tuberculosis* from smear-negative and smear-positive sputum specimen using the Ogawa culture technique and the standard Lowenstein Jensen culture technique. Phil J Microbiol Infect Dis 2001; 30(2): 37-9.
12. Abe C. Standardization of laboratory tests for tuberculosis and their proficiency testing. Kekkaku 2003; 78(8): 541-51.
13. Chihota VN, Grant AD, Fielding K, et al. Liquid vs. solid culture for tuberculosis: performance and cost in a resource-constrained setting. Int J Tuberc Lung Dis 2010; 14(8): 1024-31.
14. Pauwels P, Kalonga MB, Sykalon SK, Willame JC, Carpels G. Comparison of 2 culture media for the isolation of *Mycobacterium tuberculosis*. Ann Soc Belg Med Trop 1990; 70(3): 237-41.
15. Gürdağ G, Gürsel A. Tüberküloz kültüründe Ogawa besiyeri ve kültür metoduyla standart Löwenstein-Jensen besiyeri ve kültür metodunun mukayesesi. Mikrobiyol Bul 1973; 7(4): 291-7.