

# Comparison of PCR and MGIT 960 fluorometric methods in the detection of *Mycobacterium tuberculosis*

## *Mycobacterium tuberculosis* saptanmasında PCR ile MGIT 960 fluorometrik yöntemlerinin karşılaştırılması

Tekin Karşılıgil, S. Gökçe Alagöz, Yasemin Zer, Mustafa Sağlam, Mustafa Çay, Şükran Buğur

Department of Clinical Microbiology, Faculty of Medicine, Gaziantep University, Gaziantep, Turkey

### Abstract

Tuberculosis infection is one of the most important lung diseases in both the world and Turkey. It is very important to have an accurate and reliable diagnosis of *M. tuberculosis*, which is a tuberculosis agent. Although culture is the golden standard method in the diagnosis, patients receive results earlier with molecular diagnostic methods, since they are faster. The aim of the present study was to compare molecular and culture diagnostic methods used in the diagnosis of *M. tuberculosis* and to investigate at what rate molecular methods help the diagnosis. The study included 152 patients (61 females, 91 males) who were admitted to the Microbiology Laboratory of the Medical School of Gaziantep University Şahinbey Research and Practice Hospital. After applying the decontamination and homogenization process to patient samples, culture and PCR were performed. When the results were evaluated by comparing 12 patients in culture, 11 patients in PCR were confirmed positive. Among the samples, one surgical material and a sputum sample came up with results positive in culture and negative in PCR. The differences in the results of our study in two procedures may be associated with sample type, the presence of dead bacillary, and DNA loss that may occur in the decontamination homogenization process. It is important to diagnose tuberculosis accurately and fast. However, it should be noted that the molecular systems are more costly.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, culture, PCR

### Öz

Tüberküloz enfeksiyonu hem dünyada hem de Türkiye’de en önemli akciğer hastalıklarından biridir. Tüberküloz etkeni olan *Mycobacterium tuberculosis* tanısının doğru ve güvenilir olması çok önemlidir. Tanıda kültür altın standart olmasına rağmen moleküler tanı yöntemlerinin daha hızlı olması hastaların daha erken sonuç almasını sağlamaktadır. Çalışmamızın amacı *M. tuberculosis* tanısında kullanılan moleküler ve kültür tanı yöntemlerini karşılaştırmak, moleküler yöntemlerin tanıya ne oranda yardımcı olacağını araştırmaktır. Çalışmamıza Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Araştırma Uygulama Hastanesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına başvuran 152 hasta (61 kadın, 91 erkek) dahil edilmiştir. Hasta örneklerine uygulanan dekontaminasyon homojenizasyon işlemi takiben kültür ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yapılmıştır. Çıkan sonuçlar karşılaştırılarak değerlendirildiğinde kültürde 12 hasta, PCR’de ise 11 hasta pozitif saptanmıştır. Örneklerden bir ameliyat materyali ve bir balgam örneği, kültürde pozitif PCR’de negatif sonuç vermiştir. Bir idrar örneği ise PCR’de pozitif, kültürde negatif sonuç vermiştir. Çalışmamızda iki yöntemde sonuçlardaki farklılıklar örnek türüyle, ölü basillerin varlığıyla, dekontaminasyon-homojenizasyon işleminde meydana gelebilecek DNA kaybıyla ilişkili olabilir. Tüberküloz tanısının doğru ve hızlı şekilde konması önemlidir. Fakat moleküler sistemlerin daha yüksek maliyetli olduğu da unutulmamalıdır.

**Anahtar kelimeler:** *Mycobacterium tuberculosis*, kültür, PCR

### Giriş

Tüberküloz tedavi edilebilir ve önlenebilir bir hastalık olmasına rağmen günümüzde hala en çok ölümlere neden olan hastalık olarak yerini korumaya devam etmektedir (1). Hastalık, *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi (*M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*) basiller tarafından oluşturulmakta ve seyirinde basiller ile konağın inflamatuvar hücrelerinin ilişkilerine bağlı olarak kronik granülomatöz bir enfeksiyon gelişmektedir (2). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) “Küresel Tüberküloz 2014 Raporu”na göre dünya genelinde tüberküloz

insidans, prevalans ve mortalite hızları düşmektedir. Buna rağmen küresel tüberküloz yükü halen çok yüksektir. 2013 yılında dünya genelinde dokuz milyon yeni olgu ve 1.5 milyon tüberkülozdan ölüm olduğu belirtilmektedir. Türkiye genelinde 2005-2006 yıllarında yaklaşık 21.000 tüberküloz olgusu varken, 2013 yılında verem savaşı dispanserlerine kayıtlı toplam tüberküloz olgu sayısı 13.409’a düşmüştür. Ülkemizde yeni tespit edilen tüberküloz hasta sayısı her yıl yaklaşık %6-7 oranında azalmaktadır (3). Türkiye 53 ülkeden oluşan DSÖ Avrupa Bölgesinde yer almaktadır. Avrupa Bölgesi’nde insidans hızı ortalaması yüz binde 42’dir (4). Enfeksiyon veya hastalığın oluşup oluşmaması, konağın direnci ile basilin virulansı arasındaki dengeye bağlıdır. Tüberküloz tanısındaki yetersizlikler hastalı-

**Correspondence:** Tekin Karşılıgil, Department of Clinical Microbiology, Faculty of Medicine, Gaziantep University, Gaziantep, Turkey  
Tel: +90 532 7446939 [karshiligil@gantep.edu.tr](mailto:karshiligil@gantep.edu.tr)

Received: 01.07.2015 Accepted: 16.10.2015  
www.gaziantepmedicaljournal.com  
DOI: 10.5578/GMJ.10819



ğın tanısının yapılamamasına, bulaşın devam etmesine; yanlış tanı ile hastaların yanlış ve gereksiz tedavi alınmasına, ilaç direncinin geç tanısı ile yeni mutasyonlar ortaya çıkmasına ve bulaştırıcılığın devam etmesine yol açmaktadır (5). Mikobakteri kültürü mikobakterilerin saptanmasında altın standart olarak yerini korumaktadır. Kültür yöntemlerinin en önemli avantajları mikobakteri canlılığını doğrudan gösterebilme, mikroskopik inceleme ile ayrımı yapılamayan *Mycobacterium tuberculosis* Complex/atipik mikobakteri ayrımını yapabilmesidir. Kültür ile sonucun 2-6 haftada alınması, mikroskopla incelemenin duyarlılığının düşük olması nedeniyle araştırmacılar yıllardır tüberküloz tanısı için hızlı ve duyarlı yeni inceleme yöntemleri geliştirmeye çalışmışlardır. Center for Disease Control (CDC), tüberküloz olgularının %75'inin 48 saat içerisinde saptanabilmesi amacıyla standart tanısal testlere ilaveten mevcut en hızlı yöntemlerin kullanılmasını önermiştir. Bu amaçla hasta örneklerinden ve kültür ortamlarından tanıya yönelik hızlı sonuç verebilen ve kolay uygulanabilir özelliğe sahip birçok tanı sistemleri geliştirilmiş ve kullanıma sunulmuştur. Moleküler yöntemler hedeflenen ihtiyaçları karşılamak için ümit verici en iyi adaylar olarak değerlendirilmektedir. Bu amaçla en sık nükleik asit amplifikasyon temelli moleküler tanı yöntemleri uygulanmaktadır. Ancak rutinde klinik örnek türü, içerdiği basil sayısı gibi faktörler testlerin performansını etkilemektedir.

Çalışmamızın amacı, polimeraz zincir reaksiyon (PCR) ve Kültür yöntemlerini karşılaştırmak ve PCR yönteminin tanıya ne oranda katkı sağlayabileceğini araştırmaktır.

### Gereç ve Yöntemler

#### Hasta Grubu

Çalışmamızda Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına *M. tubercu-*

*losis* şüphesi ile gönderilen toplam 152 hasta (61 kadın, 91 erkek) MGIT 960 yöntemi ve PCR ile araştırılmıştır.

#### Metod

Çalışmamızda N-Asetil-L-Sistein (NALC) ve sodyum hidroksit (NaOH) yöntemi ile homojenizasyon ve dekontaminasyon işlemi takiben COBAS TaqMan MTB Test (Roche Diagnostics, Germany) ile PCR ve MGIT 960 (Becton Dickinson, USA) florometrik tanı yöntemiyle *M. tuberculosis* kültürü üretici firmaların önerileri doğrultusunda yapılmıştır.

DNA izolasyonu için "MagNA Pure LC" otomatize izolasyon sistemi (MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit, Roche Diagnostics, Germany), kit kullanılmıştır. Elde edilen DNA çalışılana kadar -20°C'de saklanmış, yeterli sayıya ulaşıldığında COBAS Taqman MTB Test (Roche Diagnostics, Germany) kiti ile *M. tuberculosis* DNA'sının varlığı araştırılmıştır.

#### Sonuçlar

MGIT 960 florometrik yöntemle 12 hasta örneğinde, PCR yöntemi ile de 11 hasta örneğinde, *M. tuberculosis* varlığı saptanmıştır. 140 hasta örneği MGIT ile, 141 hasta örneği ise PCR ile negatif sonuç vermiştir (Tablo 1).

MGIT 960 florometrik yöntemiyle tapılan çalışmada iki hastanın sonucu pozitif iken PCR ile negatif bulunmuştur. PCR ile pozitif saptanan bir hasta MGIT ile negatif bulunmuştur (Tablo 2). MGIT ile pozitif saptanan örneklerin birisi ameliyat materyali diğeri balgam iken PCR ile pozitif saptanan örnek idrar örneğidir.

#### Tartışma

Tüberküloz tanısında birçok moleküler tanı yöntemi denenmiş olmasına rağmen bu yöntemler kültür ve mikroskopinin yerini henüz alamamıştır. Balgam, idrar ve beyin omurilik sıvısı (BOS) gibi örneklerde bulunan inhibitörlerin varlığı veya uygun olmayan örnek

Tablo 1. PCR ve MGIT 960 yöntemleriyle elde edilen sonuçların değerlendirilmesi

Örnek türü	Kültür (MGIT 960)				PCR				Toplam
	Pozitif	%	Negatif	%	Pozitif	%	Negatif	%	
Balgam	3	5.9	48	94.1	2	3.92	49	96	51
Bronko alveolar lavaj	3	7.1	39	92.8	3	7.14	39	92.8	42
BOS	2	10	18	90	2	10	18	90	20
Plevral mayi	1	6.25	15	93.7	1	6.25	15	93.75	16
İdrar	1	10	9	90	2	20	8	80	10
Ameliyat materyali	1	25	3	75	-	-	4	100	4
Mide suyu	1	33.3	2	66.6	1	33.3	2	66.6	3
Diğer	-	-	6	100	-	-	6	100	6
<b>Toplam</b>	<b>12</b>		<b>140</b>		<b>11</b>		<b>141</b>		<b>152</b>

**Tablo 2.** MGIT 960 ve PCR yöntemleriyle elde edilen sonuçların değerlendirilmesi.

		Kültür	
		(+)	(-)
PCR	(+)	10	1
	(-)	2	139

alma ve işleme koşullarının kullanılması amplifikasyona dayalı yöntemlerin genel pozitiflik oranlarını ve duyarlılığını düşürmektedir. Bununla birlikte moleküler yöntemler, mikobakteri infeksiyonları için büyük önem taşıyan hızlı tanı yöntemleri olma özelliğini sürdürmektedir. Rutin uygulama amacıyla seçilecek bir yöntemde aranılan en önemli özellik, testin özgüllük ve duyarlılığının yüksek olmasıdır. Farklı duyarlılık sonuçları elde edilmesinde, kullanılan PCR yönteminin yanı sıra, örnek türü ve örnek içindeki basil miktarını da önemli rol oynadığı bildirilmektedir. Araştırmalar, örneğin hazırlanmasında uygulanan homojenizasyon ve dekontaminasyon işlemi sırasında örnekteki canlı basillerin %80'inin kaybolabileceğini göstermektedir (6). Bu nedenle örnek içindeki basil miktarında kayba neden olmadan DNA izolasyonunun sağlanması büyük önem taşımaktadır. Ancak moleküler yöntemlerin bir avantajı olarak örnek içinde birkaç basilin bulunması durumunda bile PCR sonucunun pozitif bulunabileceği belirtilmektedir (7).

Bu çalışmada; PCR ve MGIT sonuçları birbirine çok yakın bulunmuştur. Bir örnekte PCR (+) fakat MGIT (-) bulunmuştur. Bunun nedeni, örnekte bulunan az sayıdaki tüberküloz basilinin kültürde üreyemeyeceği ancak PCR ile çoğaltılabileceği olabilir. Ayrıca PCR'de ölü basillerde pozitif olarak tespit edilebileceğinden kültürde negatif çıkan örnekler PCR'de pozitif saptanabilir. Çalışmada, kültür (+) fakat PCR (-) iki örnek bulunmaktadır. Bu örneklerin birisi balgam, diğeri ameliyat materyali olup her ikisinde de inhibitör madde varlığından söz edilebilir. Ayrıca, ameliyat materyali, uygun bölgeden alınmamış olabilir. Yine, doku çalışmalarında kullanılan lizis buffer da inhibisyon etkisi yapabilir.

Tüberküloz tanısında kültür yöntemi uygun laboratuvar koşullarında çalışıldığı sürece oldukça değerli bir yöntemdir. Ancak kültür yöntemleri zaman alıcı (3-6 hafta gibi uzun sürelerde sonuçlanan) yöntemlerdir.

Marja-Leena Katila ve arkadaşları, L-J, MGIT 960 ve COBAS Amplicor sistemlerini karşılaştıran çalışmalarında 2015 örnekten pozitif bulunan 152 tanesi değerlendirmeye alınmış, bu örneklerin 139'u (%91) MGIT sisteminde 127'si (%84) L-J besiyerinde pozitif saptanmıştır. Çalışmada MGIT'te üremenin en er-

ken 12 günde L-J'de üremenin ise en erken 20 günde gerçekleştiğini bildirmişlerdir. MGIT'te tanımlanan 363 örneğin doğrulanması COBAS Amplicor sistemi ile yapılmış ve örneklerin %96'sı moleküler yöntemle pozitif bulunmuştur. Araştırmacılar, hızlı ve doğru tanı için MGIT 960 ile Amplicor PCR yöntemlerinin birlikte kullanımını uygun bulmuşlardır (8).

Bayram ve arkadaşları yaptığı çalışmada 2920 solunum yolu ve solunum yolu dışı örneklerden Löwenstein-Jensen katı besiyeri ve BACTEC B12 sıvı besiyerlerinde kültür yapılmış ve pozitif saptanan COBAS AMPLICOR MTB PCR testi ile incelemişlerdir. Löwenstein-Jensen katı besiyerinde üreme gösteren 41 örnekten 32'si PCR yöntemiyle de pozitif, 9 örnek negatif bulunmuştur. BACTEC sisteminde üreme görülen 127 örneğin 86'sı PCR ile pozitif, 41'i negatif bulunmuştur. Bu çalışmanın sonucuna göre Löwenstein-Jensen katı besiyeri ve PCR arasında ki uyum %89,6, BACTEC ile PCR arasındaki uyum %76,3 olarak saptanmıştır. Bu sonuçlara göre kültür ve PCR yöntemleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (9). Gürsoy N. ve arkadaşları, 199 solunum yolu, 78 BOS, 178 idrar ve 266 diğer klinik örnekler olmak üzere 721 örneği kültür ve COBAS Amplicor sistemleriyle incelemişler, örneklerin %4,2'sini kültürle, %9,7'si ise PCR'yle pozitif bulunmuştur (10).

Brisson N. ve arkadaşları, balgam, gastrik aspirasyon, plevral sıvı kullanarak 514 klinik örnekte yaptıkları çalışmada PCR pozitif olup kültür negatiflik oranını %12,3 olarak bulmuşlardır (11).

PCR yöntemlerinin hızlı tanı amacıyla kullanılabilmesi önemli bir yardımcı metod olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak, PCR yöntemleri yüksek oranda hassasiyet gerektirir. Kontaminasyona dikkat edilmelidir. Yayımda ve kültürde olumsuz sonuç alınan örneklerde PCR yöntemi tanıya yardımcı olabilecek önemli bir seçenektir. Klinik olarak şiddetle muhtemel görülen tüberkülozda ise PCR pozitifliği oldukça değerlidir (12).

Hastadan elde edilen örneğin izolasyonu sırasında oluşabilecek kontaminasyon ya da yapılabilecek hatalar, sonucu etkilemektedir. Teknolojideki ilerlemeye paralel olarak geliştirilen otomatize nükleik asit izolasyon sistemleri, bu sorunları minimize etmektedir. Böylece rutin laboratuvar hizmetlerinde, işgücü ve zaman tasarrufunun yanı sıra, kontaminasyon ve teknik hataların önlenmesi de mümkün olabilmektedir. Bu yöntemlerin hem daha duyarlı ve hızlı olmaları hem de standarde yöntemler oluşu, rutin PCR uygulanan laboratuvarlarda tüberküloz tanısı amacıyla kullanılabilirliğini gündeme getirmiştir. Ancak bu sistemlerin ekonomik maliyetlerinin yüksek olduğu da unutulmamalıdır.

**Kaynaklar**

1. Soini H, Musser JM. Molecular diagnosis of mycobacteria. Clin Chemistry 2001;47:809-14.
2. Afghani B, Lieberman JM, Duke MB, Stutman HR. Comparison of quantitative polymerase chain reaction, acid-fast bacilli smear and culture results in patients receiving therapy for pulmonary tuberculosis. Diagn Microbiol Infect Dis 1998;29:73-9.
3. 68. Verem Eğitim ve Propaganda Haftası Basın Bilgi Notu.
4. World Health Organization. Global tuberculosis control: a short update to the 2012 report. WHO report 2012. WHO/HTM/TB/2012.6, France.
5. Dorman SE. New diagnostic tests for tuberculosis: bench, bedside, and beyond. Clin Infect Dis 2010;3:173-7.
6. Yajko DM, Wagner C, Tevere VJ, Kocagöz T, Hadley WK, Chambers HF. Quantitative culture of *Mycobacterium tuberculosis* from clinical sputum specimens and dilution end points of its detection by the Amplicor PCR assay. J Clin Microbiol 1995; 33:1944-7.
7. Hellyer TJ, Fletcher TW, Bates JH, Stead WW, Templeton GL, Cave MD, et al. Strand displacement amplification and the polymerase chain reaction for monitoring response to treatment in patients with pulmonary tuberculosis. J Infect Dis 1996;173(4):934-41.
8. Marja-Leena Katila, Palvi Katila, Riita Erkinjuntti-Pekkanen. Accelerated detection and identification of mycobacteria with MGIT 960 and COBAS AMPLICOR systems. Journal of Clinical Microbiology 2000;38(3):960-4
9. Bayram A, Çeliksöz C, Karlıgil T, Balcı İ. Klinik örneklerden kültür ile saptanan *Mycobacterium tuberculosis* kompleks kökenlerinin otomatize PCR yöntemiyle araştırılması. Turkish Journal of Infection 2006;20(1):1-6
10. Gürsoy N, Durmaz R, Günel S, Otlı B, Çalışkan A. Tüberkülozun tanısında Cobas Amplicor ve iki Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyon sistemlerinin değerlendirilmesi. 6. Ulusal Mikobakteri Sempozyum Kitabı, 2006:223.
11. Brisson-Noel A, Aznar C, Chureau C, Nguyen S, Pierre C, Bartoli M, et al. G. Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. Lancet 1991;338(8763):364-6.
12. Abe C, Hirano K, Wada M, Kazumi Y, Takahashi M, Fukasawa Y, et al. Detection of *M. tuberculosis* in clinical specimens by polymerase chain reaction and Gen-Probe amplified *M. tuberculosis* direct test. J Clin Microbiol 1993;31:3270-4.

**How to cite:**

Karlıgil T, Alagöz SG, Zer Y, Sağlam M, Çay M, Buğur Ş. Comparison of PCR and MGIT 960 fluorometric methods in the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. Gaziantep Med J 2015;21(4):248-251.