

Tüberküloz tanısında LED floresan mikroskopi performansının değerlendirilmesi

Evaluation of the performance of LED fluorescent microscopy in diagnosis of tuberculosis

Gizem ERDAL¹ (ID), Süheyla SÜRÜCÜOĞLU² (ID), Nuri ÖZKÜTÜK² (ID)

ÖZET

Amaç: Bu araştırmanın amacı akciğer tüberkülozu kuşkusu olan hastaların solunum yolu örneklerinin mikroskopik incelemesinde LED floresan mikroskopi (LED FM) ile Ehrlich Ziehl Neelsen (EZN) boyama yöntemini karşılaştırmak ve LED FM'nin performansını araştırmaktır.

Yöntem: Araştırmada Şubat 2018-Aralık 2019 döneminde akciğer tüberkülozu ön tanıılı hastalardan alınan solunum yolu örnekleri incelenmiştir. NALC-NaOH yöntemi ile işlenen örneklerden iki adet yayma preparat hazırlanmış ve preparatlar iki okuyucu tarafından kör olarak hem EZN hem de LED FM ile incelenmiştir. Performans değerlendirmesinde kültür sonuçları referans alınmıştır.

Bulgular: Araştırmada 1499 solunum yolu örneği değerlendirilmiştir. Örneklerin 134'ünün (%8.9) kültüründe mikobakteri üremiştir. LED FM'nin duyarlılığı %64.2 (%95 güven aralığında %61.8-%64.4), özgüllüğü %96 (%95 güven aralığında %95.7-%96.3), pozitif prediktif değeri %61.4 ve negatif prediktif değeri %96.5 bulunmuştur. EZN yönteminin

ABSTRACT

Objective: The aim of the study is to compare of the results of LED fluorescent microscopy (LED FM) and Ehrlich Ziehl Neelsen (EZN) staining in the examination of the respiratory specimens and to evaluate the performance of LED fluorescent microscopy with culture.

Methods: In the study, the respiratory specimens obtained from patients prediagnosed with pulmonary tuberculosis were examined in the Tuberculosis Laboratory of Manisa Celal Bayar University Hafsa Sultan Hospital between February 2018 and November 2019. Two smears from each specimen processed with NALC-NaOH method were prepared and they were evaluated both EZN and LED FM by blind readers. The results of culture were used as reference for determination of the performance of LED FM.

Results: In the study 1499 respiratory specimens were evaluated with LED FM. Mycobacteria were grown in the culture of 134 specimens (8.9%). The sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of LED FM were found as 64.2% (95% GI, 61.8%-64.4%), 96% (95%GI, 95.7%-96.3%), 61.4% and

¹Manisa Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Manisa
²Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD., Manisa



İletişim / Corresponding Author : Gizem ERDAL
Manisa Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Hastanesi, Manisa - Türkiye
E-posta / E-mail : gizemadisanli11@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 18.05.2021
Kabul Tarihi / Accepted : 19.08.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.46244

Erdal G, Sürücüoğlu S, Özkütük N. Tüberküloz tanısında LED floresan mikroskopin performansının değerlendirilmesi. Türk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(4): 622 - 631

duyarlılığı ise %51.5 (%95 güven aralığında %49-%54), özgüllüğü %99.9 (%95 güven aralığında %99.7-%99.9), pozitif prediktif değeri %97.2 ve negatif prediktif değeri %95.4'tür. Ancak LED FM'de yayma şüpheli, kültür negatif (54/1365) sonuçlar EZN'den (0/1365) anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.00$). Bunun nedeninin okuyucuların deneyim eksikliğine bağlı olduğu düşünülmüştür. LED FM inceleme süresi %69 zaman tasarrufu sağlanmıştır. Okuyucular arasındaki uyum iyi derecede bulunmuş (Kappa değeri 0.71) ve okuyuculara uygulanan değerlendirme formu sonucu rutin incelemede LED FM tercih edilebileceği belirlenmiştir.

Sonuç: LED FM'nin duyarlılığı EZN'den %12.7 daha yüksek bulunmuştur. Ancak yanlış pozitif sonuç oranının yüksek olması nedeni ile LED FM'nin okuyuculara gerekli eğitim verildikten sonra kullanıma girmesi gereklidir. LED FM'nin ülkemizde büyük ölçekli laboratuvarlarda kullanılmasının maliyet etkin olacağı düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Tüberküloz, tanı, LED floresan mikroskopi, florokrom boyama, karbol fuksin boyama, kültür

96.5%, respectively. The sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of EZN were also found as 51.5% (95% CI, 49%-54%), 99.9% (95% CI, 99.7%-99.9%), 97.2% and 95.4%, respectively. However, smear scarce-culture negative results (54/1365) with LED FM were obtained significantly higher than the results with EZN (0/1365, $p=0.000$). The reason of this was thought to be due to the lack of the experience of the readers. The reading time of LED FM was 69% time saving. The consistency between the readers was found to be good (Kappa value=0.71) and it was determined that LED FM could be preferred in routine examination as a result of the survey conducted to the readers.

Conclusion: The sensitivity of LED FM was found 12.7% higher than the sensitivity of EZN. However, because of the high rate of false positive results, the introduction of LED-FM should be accompanied by appropriate training of the readers. It is also thought that the use of LED FM will be cost-effective in large-scale laboratories in our country.

Key Words: Tuberculosis, diagnosis, LED fluorescence microscopy, fluorochrome staining, carbol fuchsin staining, culture

GİRİŞ

Tüberküloz (TB), yeni tanı yöntemleri ve antitüberküloz ilaçlara rağmen günümüzde ilk 10 ölümlü nedeninden biridir (1). Önlenabilir ve tedavi edilebilir bir hastalık olmakla birlikte, her yıl milyonlarca insan tüberkülozdan hayatını kaybetmektedir. Hastalığın yayılımının önlenmesi ve tedavi başarısı için hastalık etkeni olan *Mycobacterium tuberculosis*'in kısa sürede tanımlanması gereklidir. Tüberküloz tanısında altın standart yöntem kültürdür. Fakat kültür zaman alıcı bir yöntemdir. Bu nedenle akciğer tüberkülozu tanısında balgamın mikroskopik incelemesi hızlı, kolay ve ucuz bir yöntem olarak tüm dünyada geçerliliğini

korumaktadır. Mikroskopik inceleme tüberkülozun laboratuvar tanısının yanı sıra bulaştırıcı hastaların saptanmasında ve tedavinin etkinliğinin izlenmesinde de önemli bir yol göstericidir (2). Mikroskopik incelemede yüz yılı aşkın süredir kullanılmakta olan karbol fuksin boyama yönteminin özgüllüğü yüksek (%95) olmakla birlikte duyarlılığı %22-78 arasında değişmektedir (3). Mikroskopinin duyarlılığı çeşitli faktörlerden etkilenir. Hastalığın şiddeti, örnek tipi, örnek toplama kalitesi, örnekteki basil sayısı, örnek işleme yöntemi, boyama yöntemi ve incelemenin kalitesi bu faktörler arasındadır. Negatif sonuç vermek için ışık mikroskopunda en az 300 alan incelenmelidir. Bu nedenle doğru yapıldığında

karbol fuksin boyama yöntemi zaman alıcı ve iş yükünü artırıcıdır. Diğer bir boyama yöntemi ise floresan mikroskopların kullanıldığı florokrom boyama yöntemidir (3). Bu yöntemde koyu zeminde floresans veren basillerin saptanması daha kolay olduğundan daha düşük büyütmede tarama yapılabilir. Böylelikle karbol fuksin boyama yöntemine göre daha az sayıda alan daha kısa sürede taranabilir. Yapılan çalışmalarda florokrom boyama yönteminin karbol fuksin boyama yönteminden %10 daha duyarlı olduğu, özgülüklerinin ise benzer olduğu bildirilmiştir (4). Bu nedenle özellikle yüksek insidanslı ülkelerde ve iş yükü yüksek olan laboratuvarlarda florokrom boyama yönteminin kullanılması önerilmektedir. Ancak bu yöntemin bazı dezavantajları vardır; floresan mikroskoplar pahalıdır, bakımları zordur, karanlık oda gerektirir, aydınlatmada kullanılan civa buharlı lambalar kısa ömürlü ve toksiktir. Floresan mikroskoba alternatif olarak geliştirilen Light emitting diodes (LED) mikroskoplar ise floresan mikroskoplara oranla daha ekonomik, daha düşük bakım gereksinimi olan, daha az elektrik harcayan ve pille çalışabilen cihazlardır. LED ampullerin yarı ömrü uzundur ve ultraviyole ışık üretmez. Aynı zamanda inceleme için karanlık oda gerekmez (4). Ancak inorganik materyallerin florokrom boya ile boyanma olasılığı nedeni ile yalancı pozitiflikler görülebilir.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2011 yılında floresan mikroskop kullanan laboratuvarlarda LED mikroskopların kullanımına geçilmesini öneren bir politika yayınlamıştır (4). Bu politikada ışık mikroskobu kullanan laboratuvarlar için de aşamalı olarak LED mikroskoplara geçilmesi önerilmiştir. Bu önerilere rağmen LED mikroskopların kullanımı ışık mikroskopları veya konvansiyonel floresan mikroskoplar kadar yaygın değildir. Dünyada LED mikroskopların rutin kullanımına dair veriler sınırlıdır. Ülkemizde Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı Daire Başkanlığı tarafından uygulanan bir ankete göre ise 2013 yılında mikroskopik inceleme yapan 385 laboratuvardan sadece ikisinde LED floresan mikroskop kullanıldığı bildirilmiştir (5).

Bu araştırmanın amacı akciğer tüberkülozu kuşkusu olan hastaların solunum yolu örneklerinin mikroskopik incelemesinde LED floresan mikroskopi ile EZN boyama yöntemini karşılaştırmak ve LED floresan mikroskopinin performansını araştırmaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu araştırma Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hafsa Sultan Hastanesi Tüberküloz Laboratuvarı'nda Şubat 2018-Aralık 2019 tarihleri arasında yürütülmüştür.

Araştırmada TB ön tanısı ile mikobakteriyolojik inceleme istenen hastaların balgam ve bronkoalveolar lavaj sıvısı (BAL) gibi solunum yolu örnekleri incelenmiştir. Solunum yolu dışı örnekler, açlık mide sıvısı örnekleri, kültürü yapılmamış örnekler, kültürü kontamine olan örnekler veya tedavi altındaki hastaların örnekleri araştırmaya dahil edilmemiştir. Örneklerin işlenmesinde NALC-NaOH yöntemi kullanılmıştır. İşlenmiş örneklerin süspansiyonlarından biri rutin EZN boyama, diğeri florokrom boyama (Auramine-O) yöntemi ile incelenmek üzere ikişer tane yayma preparat hazırlanmıştır. EZN boya, karbol fuksin çözeltisi, asit alkol ve metilen mavisi çözeltisi ile, florokrom boya ise auramine O, asit alkol ve potasyum permanganat ile Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi'nde tanımlandığı şekilde hazırlanmış ve uygulanmıştır (6). Laboratuvarımızda iç ve dış kalite kontrol uygulamaları sürdürülmektedir.

Araştırma başlamadan önce laboratuvarında rutin hizmet vermekte olan iki teknisyen ve çalışma ekibinde yer alan araştırma görevlisi, iki hafta süre ile LED-FM kullanımı ve florokrom boyalı preparatların değerlendirilmesi konusunda eğitim almıştır. Bir teknisyen preparatları hazırlamış ve boyamış, ikinci teknisyen ve araştırma görevlisi boyalı preparatları değerlendirmiştir. Preparatlara hasta ismi yazılmamış, numaralandırılmıştır. Boyalı preparatlar OLYMPUS CX43RF (SN MA1657, Japonya) LED floresan ataçmanlı mikroskopta x40 objektif ile çift kör olarak okunmuştur.

Preparatlar negatif olarak raporlanmadan önce $\times 400$ büyütmede en az 70 mikroskobik alan taranmıştır. Aydınlık bir odada yapılan değerlendirmede yeşil-sarı, düz veya hafif kıvrık, tek tek veya kümeler halinde basiller aranmıştır. Preparatların değerlendirilmesi yarı kantitatif olarak yapılmıştır (6). Çalışmada LED FM yönteminde iki ayrı okuyucu olduğu için, bakıda pozitif ve/veya yüksek olan değer LED FM sonucu olarak kabul edilmiştir. Ayrıca her lam için okumanın başlangıcı ve bitişi arasındaki süre araştırma ekibi dışındaki bir teknisyen tarafından kronometre ile kaydedilmiştir. İşlenmiş örnekler hem katı hem sıvı besiyerine ekilmiştir. Katı kültür için Löwenstein-Jensen besiyeri (BD, BBL) sıvı kültür için otomatize sistemlerden BD BACTEC MGIT 960 sistemi kullanılmıştır. Tüberküloz basillerinin tanımlanması için BD MGIT TBc Tanımlama Testi (TBc ID, BD) kullanılmıştır. Araştırma sonunda teknisyenlerin LED floresan mikroskobik incelemeye uyumlarının sorgulanması için bir anket uygulanmıştır.

İstatistiksel değerlendirme

İstatistiksel değerlendirme için SPSS 21.0 paket programı (SPSS Inc, Chicago, USA) kullanılmıştır. Kategorik değişkenler sayı ve yüzde ile, sürekli değişkenler ortalama ve standart sapma ile sunulmuştur. Kategorik değişkenlerdeki farklılıklar Pierson ki-kare testi ile, sayısal değişkenlerdeki farklılıklar Mann-Whitney U testi ile belirlenmiştir.

İki mikroskobik inceleme yöntemi arasındaki uyum kappa değerleri belirlenerek incelenmiştir. Kappa değeri >0.75 mükemmel uyum, $0.40-0.75$ orta-iyi uyum ve <0.40 düşük uyum olarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel değerlendirmede $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Sağlık Bilimleri Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirildi (Tarih:26.10.2017 ve Karar No: 20.478.486).

BULGULAR

Araştırmaya Şubat 2018-Aralık 2019 döneminde akciğer tüberkülozu ön tanısı ile mikobakteriyolojik inceleme için gönderilen 1101'i (%73.4) balgam, 392'si BAL (%26.2), altısı (%0.4) endotrakeal aspirat (ETA) olmak üzere toplam 1499 hasta örneği değerlendirilmiştir.

İncelenen 1499 örneğin 71 (%4.7)'i EZN boyama yöntemi ile, 140 (%9.3)'ü LEDFM ile pozitif saptanmıştır. Örneklerin 134 (%8.9)'ünde sıvı veya katı kültürden en az birinde kültürde üreme saptanmıştır. Kültürde üreyen 134 mikobakterinin 36 (%26.9)'ü tüberküloz dışı mikobakteri olarak tanımlanmıştır. Tüberküloz dışı mikobakteri üreyen örneklerin 21'i balgam, 15'i BAL'dır (Tablo 1).

Tablo 1. Klinik örneklerin mikroskobik inceleme ve kültür sonuçları*

| Örnek (n) | EZN | | | | LED FM | | | | Kültür | | | |
|-----------------------------------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| | Negatif | | Pozitif | | Negatif | | Pozitif | | Negatif | | Pozitif | |
| | Sayı | % | Sayı | % | Sayı | % | Sayı | % | Sayı | % | Sayı | % |
| Balgam (1101) | 1055 | 95.8 | 46 | 4.2 | 1021 | 92.7 | 80 | 7.3 | 1021 | 92.7 | 80 | 7.3 |
| Bronkoalveolar lavaj sıvısı (392) | 368 | 93.9 | 24 | 6.1 | 333 | 84.9 | 59 | 15.1 | 339 | 86.5 | 53 | 13.5 |
| Endotrakeal aspirat (6) | 5 | 83.3 | 1 | 16.7 | 5 | 83.3 | 1 | 16.7 | 5 | 83.3 | 1 | 16.7 |
| Toplam (1499) | 1428 | 95.3 | 71 | 4.7 | 1359 | 90.7 | 140 | 9.3 | 1365 | 91.1 | 134 | 8.9 |

*Satır yüzdeleri alınmıştır.

Kültürde üreme olan 134 örneğin EZN boyama yöntemiyle bakısında; 69 (%51.5)'u pozitif, 65 (%48.5)'i negatif saptanmıştır. Kültür sonuçları referans olarak alındığında EZN boyama yönteminin

duyarlılığı %51.5 (%95 güven aralığında %49-%54), özgüllüğü %99.9 (%95 güven aralığında %99.7-%99.9), pozitif prediktif değeri (PPD) %97.2, negatif prediktif değeri (NPD) %95.4 olarak hesaplanmıştır (Tablo 2).

Tablo 2. EZN boyama ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması

| EZN | Kültür negatif | | Kültür pozitif | | Toplam | |
|-----------------|----------------|-------|----------------|-------|--------|-------|
| | Sayı | % | Sayı | % | Sayı | % |
| Negatif | 1363 | %99.9 | 65 | %48.5 | 1428 | %95.3 |
| Pozitif | 2 | %0.1 | 69 | %51.5 | 71 | %4.7 |
| Şüpheli pozitif | 0 | | 2 | | 2 | |
| 1+ | 0 | | 28 | | 28 | |
| 2+ | 2 | | 18 | | 20 | |
| 3+ | 0 | | 10 | | 10 | |
| 4+ | 0 | | 11 | | 11 | |
| Toplam | 1365 | %100 | 134 | %100 | 1499 | %100 |

Kültürde üreme olan 134 örneğin LED FM ile 86 (%64.2)'sı pozitif, 48 (%35.8)'i negatif saptanmıştır. LED FM sonucu şüpheli pozitif olan 52 örneğin ve 2+ olan iki örneğin kültüründe ise üreme olmamıştır. Kültür sonuçlarına göre LED FM'nin duyarlılığı %64.2

(%95 güven aralığında %61.8-%64.4), özgüllüğü %96 (%95 güven aralığında %95.7-%96.3), PPD %61.4, NPD %96.5 olarak hesaplanmıştır (Tablo 3). Tablo 4'te her iki mikroskopik inceleme yönteminin performans değerleri gösterilmiştir.

Tablo 3. LED FM ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması

| LED FM | Kültür negatif | | Kültür pozitif | | Toplam | |
|-----------------|----------------|------|----------------|-------|--------|-------|
| | Sayı | % | Sayı | % | Sayı | % |
| Negatif | 1311 | %96 | 48 | %35.8 | 1359 | %90.7 |
| Pozitif | 54 | %4 | 86 | %64.2 | 140 | %9.3 |
| Şüpheli pozitif | 52 | | 16 | | 68 | |
| 1+ | 0 | | 25 | | 25 | |
| 2+ | 2 | | 19 | | 21 | |
| 3+ | 0 | | 9 | | 9 | |
| 4+ | 0 | | 17 | | 17 | |
| Toplam | 1365 | %100 | 134 | %100 | 1499 | %100 |

Tablo 4. EZN boyama ve LED FM'nin performans değerlerinin karşılaştırılması

| | EZN | LED FM |
|------------|-------|--------|
| Duyarlılık | %51.5 | %64.2 |
| Özgüllük | %99.9 | %96.0 |
| PPD | %97.2 | %61.4 |
| NPD | %95.4 | %96.5 |

LED FM ile EZN sonuçları arasında uyum iyi düzeyde (Kappa değeri 0.63, $p=0.000$) bulunmuştur. İki LED FM okuyucusunun sonuçları arasında da iyi düzeyde uyum (Kappa değeri 0.71, $p=0.000$) gözlenmekle birlikte okuyuculardan birincisinin ortalama okuma süresi 104.5 ± 35.6 saniye, ikincisinin ortalama okuma süresi ise 83.0 ± 25.7 saniye olarak hesaplanmıştır. İki okuma süresi arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.01$). Ortalama okuma süreleri EZN için 300 saniye, LED FM için 94 saniye olarak hesaplanmıştır. LED FM, ışık mikroskobu ile okuma süresine oranla %69 zaman tasarrufu sağlanmıştır.

Araştırmanın sonunda her iki okuyucu da floresan boyama yönteminin EZN boyama yöntemine göre daha kolay olduğunu, LED FM ile incelemede alan bulmanın ve okumanın daha kolay ve hızlı olduğunu ve mikroskopi yöntemlerinden birini tercih edecek olsalar LED FM'yi tercih edeceklerini belirtmişlerdir.

TARTIŞMA

Dünya Sağlık Örgütü tarafından 2009 yılında LED FM'nin tüberküloz tanısında güvenilirliği araştırılmış ve kültür referans yöntem olarak alındığında LED FM'nin duyarlılığı %84, özgüllüğü %98 olarak belirlenmiştir (4). LED FM, EZN mikroskopi ile kıyaslandığında özgüllükte herhangi bir azalma olmadan duyarlılıkta ortalama %6'lık bir artış görülmüştür. Ayrıca LED FM ile yapılan incelemenin EZN'ye göre %50 daha kısa sürede tamamlandığı belirtilmiştir. Bu sonuçların ardından DSÖ 2011 yılında LED FM kullanımına ilişkin bir politika yayınlamıştır (4). Bu politikada LED FM'nin konvansiyonel floresan mikroskopinin yerini alması

önerilmiş ve LED FM'nin EZN boyalı mikroskobik incelemeye alternatif olabileceği bildirilmiştir.

Araştırmamızda LED FM, EZN boyama yöntemine oranla %12.7 daha duyarlı bulunmuştur. Özgüllüğü ise %3.9 daha düşüktür. Yapılan çalışmalarda da LED FM'nin duyarlılığı EZN'ye göre daha yüksek bulunmuştur. Bu konuda yapılan bir meta-analizde 2000-2014 yılları arasında yayınlanan 12 çalışma değerlendirmeye alınmış ve LED FM'nin havuzlanmış duyarlılık değeri %66.9, özgüllük değeri %96.1 olarak bulunmuştur (7). Floresan mikroskopi yöntemlerinde duyarlılığın daha yüksek olmasının bir nedeni mikobakterilerin hücre duvarında yer alan mikolik asitin karbol fuksine oranla florokrom boyaları daha iyi absorbe etmesi, bu nedenle hasar görmüş basiller dahil daha fazla sayıda basilin boyanabilmesidir. Duyarlılığı artıran bir başka neden ise, LED FM'de basillerin parlak görünümünden dolayı teknisyenlerin daha çok basili görüp tanıyabilmeleridir (8). Konvansiyonel floresan mikroskopi, LED FM, ve EZN boyama yöntemlerini karşılaştıran ilk çalışma ise 2008 yılında yayınlanmıştır (9). Bu çalışmada toplam 221 balgam örneği değerlendirilmiştir. Örneklerin %16'sında kültürde üreme olmuştur. LED FM'nin duyarlılığı %84.7, özgüllüğü %98.9, konvansiyonel floresan mikroskopinin duyarlılığı %73.6, özgüllüğü %99.8, EZN boyamanın duyarlılığı %61.1 ve özgüllüğü %98.9 olarak bulunmuştur. Ayrıca LED FM ile %61 zaman tasarrufu sağlandığı bildirilmiştir. Bu çalışmanın ardından özellikle olgu yükü yüksek olan, direnç sorunu yaşanan ve HIV ile komorbid olguların fazla olduğu Afrika ülkeleri, Hindistan, Çin, Etiyopya gibi Asya ülkelerinden araştırmalar bildirilmiştir. Olgu

yükü en yüksek ülkeler arasında olan Hindistan'da 2012 yılında Ulusal Tüberküloz Kontrol Programı gereği 200 mikroskopi laboratuvarında LED FM'ye geçilmiştir. Bir yıl içinde TB ön tanılı hastalarda EZN pozitifliği

oranında değişiklik olmazken LED FM pozitifliğinde %30 artış gözlenmiştir (10). Bu araştırmalardan bazılarının sonuçları Tablo 5'te özetlenmiştir.

Tablo 5. LED FM ve EZN boyama yöntemlerinin bazı çalışmalardan elde edilen performans değerleri

| Araştırma (referans) | Örnek | LED FM | | EZN | |
|------------------------|---------------------|------------|------------|------------|----------|
| | | Duyarlılık | Özgüllük | Duyarlılık | Özgüllük |
| Uganda (11) | 1394 balgam | %67.9-71.7 | %95.3-99.2 | %62.3 | %98.4 |
| Bangladeş (12) | 150 balgam | %95.3 | %94.1 | %56.1 | %97.6 |
| Uganda (13) | 233 balgam | %64.0 | %97.0 | %56.0 | %97.0 |
| Güney Afrika (14) | 354 balgam | %46.0 | | %39.0 | |
| Hindistan (15) | 200 balgam | %83.1 | %82.4 | %81.6 | %83.5 |
| Endonezya (16) | 660 balgam | %75.5 | %90 | %54.9 | %96.6 |
| Arjantin (17) | 6968 solunum örneği | %87.7 | %99.9 | %76.3 | %99.9 |
| Etiyopya (18) | 346 balgam | %71.8 | | %44.5 | |
| Manisa (2020), Türkiye | 1499 solunum örneği | %64.2 | %96.0 | %51.5 | %99.9 |

Buna karşın LED FM'nin EZN ile incelemeye göre tanıya katkısının olmadığını bildiren çalışmalar da vardır (19). Ruanda'da yapılan bir çalışmada dört orta düzey ve dört periferik laboratuvarında toplam 648 örnek her iki yöntemle ve Xpert ile değerlendirilmiştir (19). EZN'nin duyarlılığı periferik laboratuvarlarda %55.1 iken, LED FM'nin %37 olarak bulunmuştur. Orta düzey laboratuvarlarda ise bu oranlar sırası ile %58.3 ve %62.5'tir. Xpert'in tanıya katkısı ise %32 olarak belirlenmiştir. Bu nedenle LED FM'nin EZN incelemeye üstünlüğünün olmadığını bildirilmiştir.

Araştırmamızda LED FM yönteminin duyarlılığı yukarıda verilmiş olan çalışmalardan elde edilen sonuçlara benzer veya daha düşüktür. Diyarbakır'da yapılan bir çalışmada da kültür altın standart alınarak 758 klinik örnek LED FM ve EZN ile değerlendirilmiş, EZN boyama yöntemi ve LED FM için duyarlılık ve özgüllükler sırasıyla %49.02, %99.85 ve

%64.7, %96.3 olarak saptanmıştır (20). Bu değerler bizim sonuçlarımıza benzerlik göstermektedir. Mikroskobik incelemenin pozitif prediktif değerini ve duyarlılığını etkileyen birçok faktör vardır. Çalışılan popülasyondaki hastalık prevalansı, çalışma yöntemi, hastaların klinik tablosu ve değerlendiren kişinin deneyimi bu faktörler arasındadır. Çalışmaların çoğu yüksek olgu yükü olan ülkelerde yapılmıştır. Ülkemizde TB insidansı DSÖ 2019 raporuna göre yüz binde 16'dır (1). Bu oran Hindistan'da yüz binde 199, Uganda'da yüz binde 200, Bangladeş'te yüz binde 221'dir. Araştırmamızda her iki yöntemin özgüllük değerleri benzer (%99.9 ve %96.0) ve literatür sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Çalıştığımız örnek sayısı bildirilen çalışmaların çoğundan fazladır. Bu nedenle elde ettiğimiz performans değerlerinin ülkemiz verisi olarak önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Araştırmamızda mikroskopik inceleme sonuçları yarı kantitatif olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar her iki yöntem arasında uyumlu bulunmuştur. Ancak şüpheli pozitif sonuçlar açısından iki yöntem arasında belirgin bir fark vardır. DSÖ Stop TB Partnership tarafından 2013 yılında yayınlanan Tüberküloz Tanısında Balgam Mikroskopisi El Kitabında floresan mikroskopi ile şüpheli pozitif saptanan preparatların EZN ile tekrar boyanmaması gerektiği vurgulanmıştır (21). Bu nedenle araştırmamızda LED FM ile şüpheli pozitif saptanan preparatlar tekrar boyanmamıştır. Mikroskopik inceleme sonucunun şüpheli pozitif olması örnekteki basil yükünün düşük olmasına bağlı olabildiği gibi yanlış pozitifliğe de bağlı olabilir. Basil yükü düşük olan HIV pozitif hastalarda LED FM'nin duyarlılığının daha yüksek olduğunu bildiren araştırmalar vardır (22, 23). Araştırmamızda 52 örnekte LED FM şüpheli pozitif, kültür negatif bulunmuştur. LED FM ile yanlış pozitif sonuç alınmasının bir nedeni örnekteki inorganik materyallerin florokrom boya ile boyanmaları olabilir. Bu sonuç testin özgüllüğünü etkilemektedir. Ancak araştırmamızda yanlış pozitif örnek sayısının beklenenden fazla olmasının en önemli nedeninin okuyucuların LED FM konusunda deneyimlerinin az olmasına bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Floresan mikroskoplar ile yanlış pozitif sonuçların alınabileceği ve bu nedenle okuyucuların deneyimlerinin önemli olduğu vurgulanmaktadır (17, 24). Arjantin'de yapılan bir araştırmada daha önce konvansiyonel floresan mikroskop konusunda deneyimi olmayan TB laboratuvarı çalışanları LED floresan mikroskop konusunda eğitim programına alınmış ve yeterlilikleri değerlendirilmiştir (17). İlk üç günlük eğitim sonrası panel sonuçları teknisyenlerin %70'nin yanlış pozitif sonuç verdiğini göstermiştir. Sonraki iki aylık eğitim döneminde ise yanlış pozitif sonuçlarda anlamlı azalma olduğu gözlenmiş, duyarlılık %96.8, özgüllük %99.8'e ulaşmıştır. Yeterli performans değeri için günde en az üç, yılda en az 750 örneğin incelenmesinin gerekli olduğu gösterilmiştir. Araştırmamızda deneyim eksikliğinin giderilmesi amacı ile okuyucular

araştırma başlamadan önce florokrom boyama ve LED floresan mikroskop kullanımı için iki hafta süreli eğitim almıştır. Araştırmacıların okuma süreleri arasında anlamlı fark bulunmakla birlikte araştırma sonunda her iki okuyucunun sonuçları uyumlu bulunmuştur. Ancak LED FM ile şüpheli pozitif sonuçların fazla bulunması iki haftalık eğitim süresinin bizim laboratuvarımız gibi örnek sayısı az olan laboratuvarlar için yeterli olmadığını, eğitim süresinin uzatılması ile şüpheli pozitif sonuçların sayısında azalma olabileceğini, bu süre içinde ise şüpheli sonuçların EZN boyama ile doğrulanmasının gerekli olacağını düşündürmektedir.

Araştırmamızda LED FM ile %69 zaman tasarrufu sağlandığı görülmüştür. İnceleme süresinin kısa olması LED FM'nin önemli avantajlarından biridir. Hindistan'da yapılan bir araştırmada EZN inceleme süresi beş dakika iken, LED FM'nin iki dakika olduğu bildirilmiştir (15).

Her iki inceleme yönteminin maliyetleri değerlendirildiğinde LED floresan mikroskop ışık mikroskobuna oranla yaklaşık üç kat daha pahalı bulunmuştur. Araştırmamızda florokrom boyanın ticari kitler yerine laboratuvarında hazırlanarak yapılması maliyeti belirgin ölçüde düşürmüştür. Güney Afrika'da yapılan bir araştırmada da maliyetler lam başına EZN için 2.10 USD, LED FM için 1.63 USD olarak bulunmuştur (14). LED floresan mikroskopların daha pahalı olması tüberküloz laboratuvarlarında kullanımını kısıtlayabilir. Ancak konvansiyonel floresan mikroskoplara oranla daha ucuz olması ve kullanım avantajları dikkate alınmalıdır. Ayrıca LED floresan mikroskopların TB tanısı dışında malarya, tripanozomiyaz ve koksidiyoz gibi hastalıkların tanısında da kullanılabilmesi entegre laboratuvarlar için avantaj oluşturmakta ve maliyet etkinliğe katkı sağlamaktadır (25). Tayland'da yapılan kapsamlı bir maliyet etkinlik analizinde, bina ve personel giderleri, cihaz ve ekipmanlar, sarf malzemelerinin tümü analize dahil edilmiş ve sonuçta LED FM'nin maliyeti 1.03 USD, EZN'nin maliyeti 1.16 USD olarak hesaplanmıştır (26). LED FM'nin kullanıcı dostu

olması da önemli bir avantaj olarak bildirilmektedir (27). Mikroskopun açıldığı anda kullanılabilmesi, sık bakım gerektirmemesi, pille çalışabilmesi, karanlık oda gerektirmemesi, inceleme süresinin kısa olması kullanıcılar için tercih nedeni olmaktadır. Araştırmamızda görevli teknisyenler de alan bulma ve okuma kolaylığı nedeni LED FM yöntemini tercih edeceklerini belirtmişlerdir.

Sonuç olarak araştırmamızda akciğer TB tanısında LED FM'nin duyarlılığı EZN incelemeye göre %12.7 fazla bulunmuş, LED FM ile %69 zaman tasarrufu sağlanmıştır. Araştırmamızda LED FM ile şüpheli pozitif

sonuç oranı beklenenden yüksektir. Okuyucuların LED FM konusunda deneyimsiz olması bu konuda etkili olabilir. Bu nedenle LED FM'nin rutin kullanıma girmeden önce kullanıcıların yeterli eğitim almaları gerektiği düşünülmüştür. LED floresan mikroskoplar ışık mikroskoplarından daha pahalı olmakla birlikte olgu yükü yüksek olan laboratuvarlarda kullanılmaları durumunda maliyet etkin olabilirler. Bu nedenle olgu yükü düşük olan ülkemizde LED FM'nin öncelikle göğüs hastalıkları hastanelerinin laboratuvarlarında ve büyük ölçekli diğer laboratuvarlarda kullanımının yararlı olacağı düşünülmüştür.

TEŞEKKÜR

Araştırmamızı destekleyen Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkürlerimizi sunarız (proje no: 2017-203).

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Sağlık Bilimleri Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirildi (Tarih:26.10.2017 ve Karar No: 20.478.486).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization, Global Tuberculosis Report, 2019. https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
2. Somöskövi A, Hotaling JE, Fitzgerald M, O'Donnell D, Parsons LM, Salfinger M. Lessons form a proficiency testing event for acid fast microscopy. Chest 2001;120(1):250-7.
3. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. (çeviri editörü: Ahmet Başustaoglu) Manuel of Clinical Microbiology. 9. Baskı. Cilt:1. Ankara: Atlas Kitapçılık, 2009: 543-601.
4. World Health Organization, Fluorescent light-emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis policy Policy statement, 2011 https://www.who.int/tb/publications/2011/led_microscopy_diagnosis_9789241501613/en/ (2019).
5. Özyurt M. Tüberküloz tanısında neredeyiz? Boyama ve kültüre dayalı tanı yöntemleri. 2. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi. Kasım, 9-13, Antalya, Türkiye. 2013.

6. Albay A, Albayrak N, Arslantürk A, Aslan G, Baylan O, Biçmen C, et al. Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 935, Ankara, 2014.
7. Chang EW, Page AL, Bonnet M. Light-emitting diode fluorescence microscopy for tuberculosis diagnosis: a meta-analysis. *Eur Respir J*, 2016;47(3):929-37.
8. Thapa B, Reza LW, Kumar AM, Pandey A, Satyanarayana S, Chadha S. Light Emitting Diode Fluorescence Microscopy increased the detection of smear-positives during follow-up of Tuberculosis patients in India: program implications. *BMC Res Notes*, 2015;8:596.
9. Marais BJ, Brittle W, Painsczyk K, Hesselting AC, Beyers N, Wasserman E et al. Use of light-emitting diode fluorescence microscopy to detect acid-fast bacilli in sputum. *Clin Infect Dis*, 2008;47(2):203-7.
10. Reza LW, Satyanarayana S, Enarson DA, Kumar AMV, Sagili KD, Kumar S et al. LED-fluorescence microscopy for diagnosis of pulmonary tuberculosis under programmatic conditions in India. *PLoS One*, 2013;8(10):e75566.
11. Albert H, Manabe Y, Lukyamuzi G, Ademun P, Mukkada S, Nyesiga B et al. Performance of three LED-based fluorescence microscopy systems for detection of tuberculosis in Uganda. *PLoS One*, 2010;5(12):e15206.
12. Khatun Z, Kamal M, Roy CK, Sultana T, Rahman MQ, Azad MBAS et al. Usefulness of light emitting diode (LED) fluorescent microscopy as a tool for rapid and effective method for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Bangladesh Med Res Counc Bull*, 2011;37(1):7-10.
13. Cattamanchi A, Huang L, Worodria W, Boon SD, Kalema N, Katagira W et al. Integrated strategies to optimize sputum smear microscopy: a prospective observational study. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011;183(4):547-51.
14. Whitelaw A, Peter J, Sohn H, Viljoen D, Theron G, Badri M et al. Comparative cost and performance of light-emitting diode microscopy in HIV-tuberculosis-co-infected patients. *Eur Respir J*, 2011;38(6):1393-7.
15. Bhalla M, Sidiq Z, Sharma PP, Singhal R, Myneedu VP, Sarin R. Performance of light-emitting diode fluorescence microscope for diagnosis of tuberculosis. *Int J Mycobacteriol*, 2013;2(3):174-8.
16. Chaidir L, Parwati I, Annisa J, Muhsinin S, Meilana I, Alisjahbana B et al. Implementation of LED fluorescence microscopy for diagnosis of pulmonary and HIV-associated tuberculosis in a hospital setting in Indonesia. *PLoS One*, 2013;8(4):e61727.
17. Imaz M, Allasia S, Aranibar M, Gunia A, Poggi S, Togneri AM et al. *Biomedica*, 2017;37(2):164-174.
18. Gizaw N, Abera A, Sisay S, Desta K, Kreibich S, Adima LG et al. The yield of Auramine O staining using led microscopy with bleach treated sputum samples for detection of pulmonary tuberculosis at St. Peter tuberculosis specialized hospital, Addis Ababa, Ethiopia. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis*, 2019;18:100140.
19. Ngabonziza JC, Ssengooba W, Mutua F, Torrea G, Dushime A, Gasana M et al. Diagnostic performance of smear microscopy and incremental yield of Xpert in detection of pulmonary tuberculosis in Rwanda. *BMC Infect Dis*, 2016;16(1):660.
20. Can Ş. Tüberküloz tanısında LED floresan mikroskop yöntemi ile Ziehl Neelsen yönteminin karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı.
21. Lumb R, Deun A.V, Bastian I, Gerald M.F. Laboratory diagnosis of tuberculosis by sputum microscopy. the handbook global edition. South Australia: SA Patology, 2013.
22. Bhadade A, Mehta P, Kanade S, Nataraj G. Utility of light-emitting diode microscopy for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in HIV infected patients. *Int J Mycobacteriol*, 2015;4(1):31-5.
23. Goel S, Pandey R, Kumar M, Kankaria A, Khaneja R. Impact of introducing light-emitting diode fluorescence microscopy services for diagnosis of pulmonary tuberculosis under Revised National Tuberculosis Control Program India. *Lung India*, 2018;35(4):307-11.
24. Frieden T. *Toman's tuberculosis: case detection, treatment, and monitoring: questions and answers*. 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 2004.
25. Sagili KD, Muniyandi M, Nilgiriwala KS, Shringarpure KS, Satyanarayana S, Kirubakaran R et al. Cost-effectiveness of GeneXpert and LED-FM for diagnosis of pulmonary tuberculosis: A systematic review. *PLoS One*, 2018;13(10):e0205233.
26. Sohn H, Sinthuwattanawibool C, Rienthong S, Varma JK. Fluorescence microscopy is less expensive than Ziehl-Neelsen microscopy in Thailand. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2009;13(2):266-8.
27. Van Deun A, Chonde TM, Gumusboga M, Rienthong S. Performance and acceptability of the FluLED Easy module for tuberculosis fluorescence microscopy. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2008;12(9):1009-14.