

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS KOMPLEKS
İZOLATLARINDA İZONİAZİD VE RİFAMPİN DİRENCİNİN
BELİRLENMESİNDE GENOTYPE MTBDR YÖNTEMİNİN
KULLANIMI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Turgut GÜNEY**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mustafa YILMAZ**

**ELAZIĞ
2011**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. İrfan ORHAN

DEKAN

Bu tez uzmanlık tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Mustafa YILMAZ

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mustafa YILMAZ

Danışman

Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Mustafa YILMAZ

Prof. Dr. Zülal AŞÇI TORAMAN

Prof. Dr. Adnan SEYREK

Doç. Dr. Mehmet ÖZDEN

Prof. Dr. Ahmet GÖDEKMERDAN

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca bilgi ve birikimiyle yardımlarını esirgemeyen, sabırla destekleyen değerli hocam, tez danışmanım ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Mustafa YILMAZ'a, tez çalışmamı yönlendiren, emeğini, bilgisini ve desteğini sonuna kadar benden esirgemeyen sevgili hocam Doç. Dr. Yasemin BULUT'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca uzmanlık eğitimim sırasında yetişmemde önemli katkıları olan bilgi ve deneyim kazanmama olanak sağlayan değerli hocalarım; Doç. Dr. Ahmet KIZIRGİL, Prof. Dr. Zülal AŞÇI TORAMAN, Prof. Dr. Adnan SEYREK'e

Bir aile gibi olduğum araştırma görevlisi arkadaşlarıma, laboratuarda beraber çalıştığım Levent SERT ve diğer teknisyen arkadaşlarıma bana destek oldukları için teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak çok sevdiğim ama işlerimden dolayı yeterince zaman ayıramadığım kızlarım Zeynep ve Ayşe'ye,

Çok sevgili eşim ve hayat arkadaşım Dr. Seçil DAĞ GÜNEY'e sonsuz teşekkürler.

Dr. Turgut GÜNEY

ÖZET

Tüberküloz, dünya çapında bir hastalığa bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir. Çok ilaca dirençli tüberküloz yüksek vaka ölüm oranı ile birliktedir. Tüberkülozun hızlı ve yeterli tedavisini sağlamak için, *Mycobacterium tuberculosis* kompleks izolatlarında antibiyotik direncinin tespiti önemli bir sorundur. Dünya Sağlık Örgütü, daha önce tedavi almış hastaların %100'ünde ve çok ilaca dirençli tüberküloz riski altında olan yeni tüberküloz hastalarında da çok ilaca direnç açısından test yapılmasını önermektedir. Genotype MTBDR, klinik izolatlarda rpoB ve katG mutasyonlarının hızlı tespiti için düzenlenmiş bir multipleks PZR DNA strip yöntemidir. Bu çalışmanın amacı Genotype MTBDR'nin RİF ve INH direncinin tespitinde hızlı bir yöntem olarak değerini belirlemektir.

Fırat Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda farklı klinik örneklerden izole edilmiş 50 *M. tuberculosis* kompleks suşu bu çalışmada kullanılmıştır. BACTEC 460TB ve Genotype MTBDR yöntemiyle antimikrobiyal duyarlılık testleri çalışılmıştır. Genotype MTBDR yönteminin sonuçları altın standart olan BACTEC 460TB sonuçları ile karşılaştırılmıştır. BACTEC ile 50 suşun 11'inde (%22) INH direnci ve 3'ünde (%6) INH ve RİF direnci birlikte görülmüştür. 39 (%78) suş ise hem INH hem de RİF'e duyarlı bulunmuştur. 11 INH dirençli izolatın 8'i (%72,7) ve 3 MDR izolatın hepsi (%100) Genotype MTBDR yöntemi ile doğru olarak tanımlanmıştır.

Genotype MTBDR yönteminin INH ve RİF direncini belirlemede duyarlılığı sırasıyla %78,6 ve % 100 olarak bulunmuştur. Her iki ilaç için de testin özgüllüğü %100 olarak bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçları, Genotype MTBDR yönteminin RİF ve INH direncinin hızlı tespiti için genelde iyi bir performans ve özgüllüğe sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Çok ilaca dirençli tüberküloz, *Mycobacterium tuberculosis* kompleks, rpoB, katG, İzoniazid, Rifampin.

ABSTRACT

USE OF GENOTYPE MTBDR ASSAY FOR DETECTION OF ISONIAZID AND RIFAMPIN RESISTANCE IN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX ISOLATES

Mycobacterium tuberculosis is one of the leading causes of death due to an illness worldwide. Multidrug resistant tuberculosis is associated with a high case fatality rate. The rapid detection of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates is an important challenge to ensure a rapid and adequate therapy of tuberculosis. World Health Organisation recommends testing of 100% of previously treated tuberculosis patients for multi drug resistance, as well as testing of any new tuberculosis patients considered at high risk of having multi drug resistant tuberculosis. The Genotype MTBDR is a multiplex PCR DNA strip assay designed for the rapid detection of rpoB and katG mutations in clinical isolates. The aim of this study was to evaluate Genotype MTBDR as a rapid assay to detect RIF and INH resistance.

A total of 50 *M. tuberculosis* complex strains isolated from different clinical specimens in Firat University Hospital Microbiology Laboratory were used in this study. Antimicrobial susceptibility testings for INH and RIF were performed by BACTEC 460TB and Genotype MTBDR assay. The results of Genotype MTBDR assay were compared with gold standart BACTEC 460TB. Eleven (22%) out of 50 strains were INH resistant and 3 (6%) strains were both INH and RIF resistant by BACTEC.

Thirty nine (%78) strains were susceptible to both INH and RIF. Eight (72,7%) out of 11 INH resistant isolates and all of 3 MDR isolates (100%) were correctly identified by Genotype MTBDR assay.

Sensitivity of Genotype MTBDR assay to detect INH and RIF resistance were 78,6 and 100%, respectively. Specificity of the test were 100% for both drug. The results of this study indicate that the Genotype MTBDR assay has an overall good performance and sensitivity for rapid detection of RIF and INH resistance.

Keywords: Multi drug resistance tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis* complex, rpoB, katG, Isoniazid, Rifampin.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ	ix
KISALTMALAR LİSTESİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	2
1.1.2. Tarihçe	2
1.1.3. Mikobakterilerin Genel Özellikleri	4
1.1.4. Tüberkülozda Bulaş	7
1.1.5. Epidemiyoloji	7
1.1.5.1. Dünyada Tüberküloz	7
1.1.5.2. Türkiye’de Tüberküloz	8
1.1.6. Patogenez	11
1.1.7. Laboratuvar Tanısı	13
1.1.7.1. Mikroskopi	14
1.1.7.2. Örneklerin İşlenmesi	15
1.1.7.3. Besiyerleri ve Kültür Yöntemleri	15
1.1.7.4. Moleküler Tanı Yöntemleri:	20
1.1.7.6. Tüberkülin Deri Testi:	22
1.1.8. Duyarlılık Testleri	23
1.1.8.1. Klasik Kültür Yöntemleri	23
1.1.8.2. Hızlı Duyarlılık Testleri	24
1.1.8.3. Bakteri Varlığına Dayanan Yöntemler	26
1.1.8.4. Genotipik Yöntemler	27
1.1.9. Tüberküloz Tedavisinde Kullanılan İlaçlar	29

1.1.9.1. Birinci Seçenek İlaçlar	29
1.1.9.2. İkinci seçenek İlaçlar	29
1.1.10. İlaç Direnci	31
1.1.10.1. İzoniazid Direnci	31
1.1.10.2. Rifampin Direnci	32
1.1.10.3. Etambutol Direnci	33
1.1.10.4. Streptomisin Direnci	33
1.1.10.5. Pirazinamid Direnci	34
1.1.10.6. Florokinolon Direnci	34
1.1.11. Tüberküloz Tedavisinde Bir Sorun Olarak İlaç Direnci	34
2. GEREÇ VE YÖNTEM	37
2.1. BACTEC 460TB Antibiyotik Duyarlılık Testi	37
2.1.1. Antibiyotik solüsyonlarının hazırlanması:	37
2.1.2. Antibiyotik içeren BACTEC 12B besi yerlerinin hazırlanması:	37
2.1.3. İnokulum hazırlanması:	38
2.1.4. Sonuçların değerlendirilmesi:	38
2.2. Genotype MTBDR Yöntemi	38
2.2.1. DNA ekstraksiyonu	39
2.2.2. Amplifikasyon	40
2.2.3. Hibridizasyon	41
2.2.4. Sonuç Değerlendirme	42
2.3. Kalite Kontrol	43
2.4. İstatiksel Analizler	43
3. BULGULAR	44
4. TARTIŞMA	48
5. KAYNAKLAR	61
6. ÖZGEÇMİŞ	70

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Mikobakteri hücre duvarı yapısı	6
Şekil 2. Türkiye ve DSÖ Avrupa Bölgesinde 1990, 2002 ve 2006 yıllarında Nokta Prevalans Hızları	11
Şekil 3. Genotype MTBDR testi sonucu DNA striplerinin hibridizasyon paternleri.	47

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1. Klinik önemi olan mikobakteriler	5
Tablo 2. İlaç Duyarlılık Testi (İDT) Çalışılan Hastalarda Olgu Tanımına Göre Her Bir TB İlacı İçin Toplam Direnç Sonuçları, 2005-2008	10
Tablo 3. Selektif Olmayan Besiyerleri (31)	16
Tablo 4. Seçici Besiyerleri	16
Tablo 5. TDT değerlendirme kriterleri	22
Tablo 6. INH ve RİF için stok solüsyon ve BACTEC 12B'deki final konsantrasyonları	37
Tablo 7. PZR karışımı hazırlanması	40
Tablo 8. Çalışmaya alınan suşların izole edildikleri örneklere göre dağılımı.	44
Tablo 9. Çalışmaya alınan 50 suşun ait olduğu hastaların yaş ve cinsiyete göre dağılımları.	45
Tablo 10. Çalışmaya alınan 50 suşun BACTEC yöntemiyle ilaç duyarlılık sonuçları	45
Tablo 11. Çalışmaya alınan 50 suşun yıllara göre dağılımı	45
Tablo 12. Primer ve sekonder hasta gruplarında direnç oranlarının karşılaştırılması	46
Tablo 13. Genotype MTBDR test sonuçları ile fenotipik direnç paternlerinin karşılaştırılması	46
Tablo 14. BACTEC ile direnç görülen izolatların genotipik ve fenotipik test sonuçlarının karşılaştırılması	47

KISALTMALAR LİSTESİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AIDS	: Acquired Immunodeficiency Syndrome
ARB	: Aside Dirençli Basil
ATCC	: American Type Culture Collection
BAL	: Bronko Alveolar Lavaj
BCG	: Bacille Calmette Guerin
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
CFU	: Colony Forming Unit
ÇİD	: Çok İlaç Dirençli
ÇİD TB	: Çok İlaç Dirençli Tüberküloz
DGTS	: Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi
DOTS	: Directly Observed Treatment, Short Course
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ELISA	: Enzyme Linked Immune Sorbent Assay
EMB	: Etambutol
ESAT	: Early Secretory Antigenic Target
EZN	: Ehrlich-Ziehl-Neelsen
GI	: Üreme İndeksi
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
INF	: İnterferon
INH	: İzoniazid
LAM	: Lipoarabinomannan
MGIT	: Micobacterium Growth Indicator Tube
MİK	: Minimal İnhibitör Konsantrasyon
MOTT	: Myobacterium Other Than Tuberculosis
M.Ö.	: Milattan Önce
M.S.	: Milattan sonra
NaCl	: Sodyum Klorür
NALC	: N-asetil-L-Sistein
NaOH	: Sodyum Hidroksit

- NAP** : N-asetil beta hidroksi propiyofenon
- OADC** : Oleik asit, Albumin, Dekstroz, Katalaz
- OT** : Old Tüberkulin
- PANTA** : Polimiksin B, Amfoterisin B, Nalidiksik asit, Trimetoprim, Azlosilin
- PAS** : Para Aminosalisilik Asit
- PPD** : Purified Protein Derivative
- PZN** : Pirazinamid
- PZR** : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
- QRDR** : Quinolon Resistance Determining Region
- RD** : Region of Difference
- RIF** : Rifampin
- SM** : Streptomisin
- SSCP** : Single Strand Conformation Polymorphism
- TB** : Tüberküloz
- TDT** : Tüberkulin Deri Testi
- YİD** : Yaygın İlaç Dirençli
- YİD TB** : Yaygın İlaç Dirençli Tüberküloz

1. GİRİŞ

Mycobacterium tuberculosis, insanlarda hastalık yapan patojenlerin en sık rastlanımı ve en çok ölüme neden olanıdır. Tüm dünya genciyle, yaşlısıyla, kadınıyla, erkeğiyle bu enfeksiyonun tehdidi altındadır (1).

Tüberküloz, ara bir taşıyıcıya ihtiyaç duymadan insandan insana yayılarak bulaşan bir hastalıktır. Öncelikli hedefi akciğerler olmasına rağmen, tüberküloz cilt de dahil birçok organı tutabilir. Aşısı olmasına rağmen polio ve çiçek gibi viral hastalıkların aksine, tüberkülozun ortadan kaldırılması mümkün olmamıştır. 20. yüzyılın ikinci yarısı ile beraber, hastalığın tedavisini sağlayan ilaçlar birer birer bulunmuştur. Yüzlerce yıl boyunca amansız, ölümcül bir hastalık olarak bilinen tüberküloz son 50-60 yılda nihayet şifa ile sonuçlanan bir tedaviye kavuşmuştur. Tüberkülozla savaşta kazanılan bu zaferler, gelişmiş ülkelerde hastalığın gerilemeye başlamasını sağlamıştır. Ancak, 1985 yılında HIV/AIDS ile birlikte tüberküloz yeniden yayılmaya başlamıştır. T lenfositlere saldırarak hücrel immüniteyi bozan HIV virüsü, hastaları daha önce almış oldukları tüberküloz basilinin aktive olması veya yeni enfeksiyonlara karşı hassas bir duruma sokarak dünya çapında tüberküloz olgularında büyük bir artışa yol açmıştır (1).

Karşılaştırmalı genom analizlerinde, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. canetti* ve *M. microti* arasında yüksek düzey DNA-DNA homolojisi bulunduğu ve 16S rRNA dizilimlerinin aynı olduğu saptandığından bugün *Mycobacterium tuberculosis* kompleks adı altında tek bir tür olarak kabul edilmiştir (2).

Tüberkülozun kesin tanısında 'altın standart' etkenin kültürde üretilmesidir. Bu kültür metodları arasında yer alan ve bir sıvı besiyeri kullanan yarı otomatize BACTEC 460 TB sistemi tüm dünyada altın test olarak kabul görmekte ve yeni geliştirilen kültür yöntemlerinin karşılaştırılmasında standart olarak kullanılmaktadır. Bu sistemle kısa bir zaman içinde mikobakterilerin hızlı primer izolasyonu, *Mycobacterium tuberculosis* kompleks ve diğer tüberküloz dışı mikobakterilerin ayırımı ile antimikobakteriyel ilaç duyarlılık testleri yapılabilmektedir (3,4).

Tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlar, birinci seçenek veya majör antitüberküloz ajanlar ve ikinci seçenek veya minör antitüberküloz ajanlar olmak üzere iki gruptur. Majör olanlar izoniazid, rifampin, etambutol, streptomisin ve

pirazinamiddir. Birbirinden bağımsız olarak birer birer ortaya çıkan mutasyonların birikmesi ile fenotipik olarak birden çok ilaca dirençli (ÇİD) izolatlar ortaya çıkmıştır. Çok ilaca dirençli enfeksiyonların sayısı 1990'lardan bu yana giderek artış göstermektedir. *M. tuberculosis* kompleks'te çoklu ilaç direnci öncelikli olarak izoniazid (INH) ve rifampine (RİF) karşı olan direnci ifade etmektedir (2).

Çok ilaca dirençli (ÇİD) tüberküloz oranlarında dünya genelindeki artış dirençli *M. tuberculosis* kompleks suşlarının en kısa sürede tanınmasını, etkili bir tedavi elde edebilmek ve dirençli suşların yayılmasını önlemek için çok önemli bir hale getirmiştir. İzoniazid ve rifampin birinci seçenek antitüberküloz ilaçlardır ve bunlara karşı oluşacak direnç tedavide başarısızlığa ve ölümcül klinik sonuçlara yol açabilmektedir (5).

1.1. Genel Bilgiler

1.1.2. Tarihçe

İnsanların mikobakterilerle ilk karşılaşmasının, M.Ö. 8000 yıllarında yerleşik toplulukların oluşmasıyla birlikte olduğu tahmin edilmektedir. Bu döneme ait Almanya'da bulunan insan iskeletlerinde asit ve alkole dirençli basiller saptanmıştır. M.Ö. 3500-3000 yıllarına ait Mısır mumyaları ve Ürdün'de bulunan insan iskeletlerinde tüberkülozu düşündüren vertebra lezyonları (Pott hastalığı) ve psoas abseleri görülmüştür. M.Ö. 2700 yıllarına ait eski Çin kaynaklarında tüberkülozu düşündüren ifadeler bulunmaktadır (6,7).

Hipokrat (M.Ö. 460-375), tükenme, elden ayaktan düşme manasına gelen 'fitizis' terimini kullanmıştır. Hipokrat'ın ardıllarından Celsus (M.Ö. 10-M.S. 50) çalışmalarında tüberkül kelimesini kullanmıştır. Bergamalı Galenus da (M.S. 12-200) Hipokrat'a benzer şekilde hastalığı iltihaplı, gizli, yaralı dönem olarak üç döneme ayırmıştır. Ayrıca veremin bulaşıcı bir hastalık olduğundan bahsetmiştir. Andreas Vesalius'un (1514-1564) çalışmalarında tüberkülozlu hastaların otopsilerinde kaviter lezyonlar bildirilmiştir. Franciscus Sylvius (1614-1672) hastalığın kaynağının tüberküller olduğundan ve bunları bir tür lenfatik dejenerasyondan köken aldığını söylemiştir (6).

Bugün akciğer veremini tanımlamak için kullandığımız 'tüberküloz' kelimesi, ilk kez 19. yüzyılda Laennec ve Bayle tarafından kullanılmıştır (6).

1800'lü yılların ikinci yarısında sanayi devriminin getirilerinin yanı sıra, kötü yaşam koşulları ve tüberkülozla birlikte diğer hastalıkların yaygınlığı devam etmekteydi. Bu nedenle tüberkülozun tedavisi için çalışmalar yoğunlaşmıştır. Herman Brehmer 1858 yılında bir enstitü inşa ederek, burada tüberküloz hastalarını iyi beslenme, temiz hava ve bol güneşlenme ile tedavi etmeye çalışmıştır. Bu çalışmadan sonra senatoryum adıyla oluşturulan yapılanmalar, antibiyotik tedavisi keşfedilinceye kadar hastalığa karşı eldeki tek silah olmuştur (6).

Mycobacterium tuberculosis'in verem hastalığının sebebi olduğunu 1843-1910 yılları arasında yaşamış olan Dr. Robert Koch göstermiştir. Koch 1882 yılında tüberkülozdan ölen Heinrich Günther adındaki hastasının akciğerindeki lezyonlarında basili göstermiş, kültürde üretmiş ve ürettiği basil ile hayvanlarda tüberküloz oluşturmuştur. Enfekte hayvanlardan bakteriyi yeniden üreterek "Koch postülası" teorisini ileri sürmüştür. *Bacterium tuberculosis* adı ile anılmaya başlanan basil, 1886 yılında Lehman ve Neuman tarafından *Mycobacterium tuberculosis* olarak isimlendirilmiştir (8,9).

Albert Calmette ve Camile Guerin, Nocard'ın inek memesinden ürettiği bovin tipi basil üzerinde yıllar boyunca 200'ün üzerinde pasaj yaparak verem aşısı için gerekli olan zararsız basili 1921 yılında bulmuşlardır. Aşıya da bu ikilinin ismine ithafen "Bacillus Calmette-Guerin" (BCG) adı verilmiştir. 1939 yılında Florence Seibert ve Glenn, old tüberkülini saflaştırmış ve elde edilen saflaştırılmış protein türevi (PPD) ile tüberküloz enfeksiyonunun varlığı saptanmaya başlanmıştır (8, 9).

Waksman'ın 20 Kasım 1944'de streptomisini keşfetmesiyle tüberküloz tedavisinde antibiyoterapi dönemi başlamıştır. Ancak, tek antibiyotik uygulamasına kısa zamanda direnç gelişmiştir. 1946'da İsveç'te para-aminosalisilik asit (PAS)'ın basile etkisi gösterilmiş, 1952 yılında Robizeg ve Selikof tarafından INH bulunmuştur. Bu gelişme ile 18-24 ay süre ile üçlü antibiyotik tedavisine başlanmıştır. 1954 yılında pirazinamid (PZA), 1962 yılında etambutol (EMB), 1966 yılında RİF bulundu. Artık elde çok ilaç vardı. Tüberküloz kesin olarak tedavi edilebilir bir hastalık haline gelmişti. Ancak 18-24 aylık tedavi süresi çok uzundu. 1975-1985 yılları arasında özellikle RİF ve PZA içeren kombinasyonlarla kısa süreli tedavi rejimlerine yönelik çalışmalar yapıldı. Tedavi süresi 6-12 aya kadar indirildi (10, 11).

Bu gelişmelerin sonunda, tüberküloz önemli bir hastalık olmaktan çıkmıştı. Bütün dünyada görülme oranları düştü. Özellikle gelişmiş ülkelerde tamamen kontrol altına alındı. Ancak, 1985'den sonra başta az gelişmiş ülkeler olmak üzere tüberküloz yeniden artmaya başladı. Bu durum başlıca üç nedenle açıklanmaya çalışılmaktadır. Bunlar, hastalığa verilen önemin azalması nedeniyle kontrol programlarında aksamalar sonucu baskılanmış enfeksiyonun yeniden ortaya çıkması, çok ilaca dirençli basil suşlarının artması ve HIV (Human Immunodeficiency Virus) enfeksiyonunun yaygınlaşması olarak sıralanabilir. Sonuçta tüberküloz günümüzde yine önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir (11).

1.1.3. Mikobakterilerin Genel Özellikleri

Mycobacterium, Yunanca mantar (myces) ve küçük çubuk (bacterion) kelimelerinden türetilmiştir. İsmi mantar kısmı, bu mikroorganizmanın sıvı besiyerlerinde üreme özelliklerinin küflere benzemesinden kaynaklanmaktadır. Mycobacterium cinsi, yüksek G+C (guanin+sitozin) içerikli gram pozitif bakterilerin sınıflandırılmasında, 16S rRNA dizilimlerine göre Corynebacterium ve Nocardia ile birlikte, Actinomycetales takımında sınıflandırılmış olup, Mycobacteriaceae ailesinde yer alan tek cinistir (1, 12).

Mycobacterium tuberculosis kompleks dışında kalan tüm mikobakteriler tüberküloz dışı mikobakteriler "Mycobacteria other than *M. tuberculosis* (MOTT)" olarak adlandırılırlar. Ernest Runyon 1950'li yılların sonlarına doğru *M. tuberculosis* dışındaki diğer mikobakterilerin de görülme sıklığının artması üzerine bu atipik organizmaları üreme hızı ve pigment üretimlerine göre dört gruba ayırmıştır (13).

1. Fotokromojen
2. Skotokromojen
3. Non-fotokromojen
4. Hızlı üreyenler

Bu sınıflandırma uzun yıllar boyunca *M. tuberculosis* dışındaki mikobakterilerin tanımlanmasında kullanılmıştır. Ancak, ilerleyen yıllarda bu sınıflamanın yetersiz olduğu görülmüştür. Mikobakterilerin hücre yapısı ve genetiğine ait bilgilerin artışıyla birlikte, 1987 yılında Woods ve Washington tarafından yeni bir sınıflandırma önerilmiştir. Tablo 1'de Woods ve Washington'un sınıflandırması görülmektedir (12, 13).

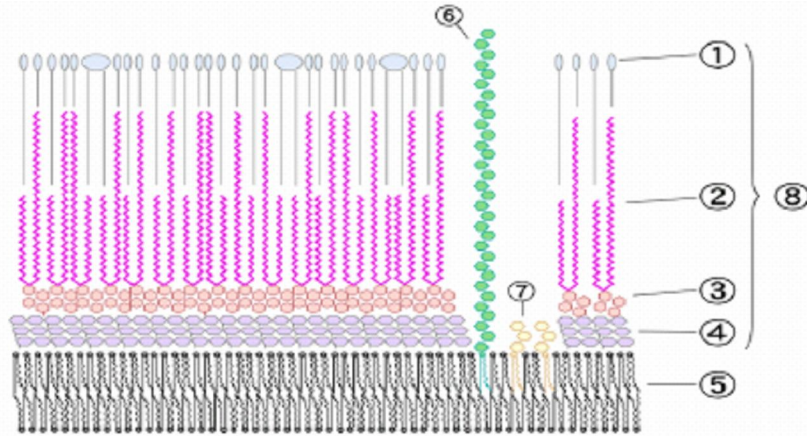
Tablo 1.Klinik önemi olan mikobakteriler (13)

İnsanlar için Potansiyel Patojen Olan türler
<i>M. avium-intracellulare complex</i>
<i>M. kansasii</i>
Hızlı üreyenler: <i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. abscessus</i>
<i>M. scrofulaceum</i>
<i>M. xenopi</i>
<i>M. szulgai</i>
<i>M. malmoense</i>
<i>M. simiae</i>
<i>M. genavense</i>
<i>M. marinum</i>
<i>M. ulcerans</i>
<i>M. haemophilum</i>
<i>M. celatum</i>
İnsanlarda Nadiren Hastalık Yapan Saprofitik Mikobakteriler
<i>M. gordonae</i>
<i>M. asiaticum</i>
<i>M. terrae</i>
<i>M. triviale</i>
<i>M. shimoidei</i>
<i>M. gastri</i>
<i>M. nonchromogenicum</i>
<i>M. paratuberculosis</i>
Orta Büyüme Hızı Olan Türler
<i>M. flavescens</i>
Hızlı Üreyen Diğer Türler
<i>M. thermoresistibile</i>
<i>M. smegmatis</i>
<i>M. vaccae</i>
<i>M. parafortuitum complex</i>
<i>M. phlei</i>

Mikobakteriler aerop, sporsuz, hareketsiz, 0,2-0,6µm en ve 1-10µm boyunda, düz veya hafif kıvrık basillerdir. Mikroskopik olarak dallanmış, uzun filamentöz veya kokoidal formda görülebilirler. Tek ya da ikili, üçlü gruplar halinde ve birbirine paralel ya da uçlarından birbirlerine yaklaşarak X, V, L harfleri oluşturacak biçimde bir arada görülebilirler. Hücre duvar yapıları gram pozitif bakterilerinkine benzemesine rağmen, gramla boyanmazlar. Hücre duvarları yüksek oranda lipid içerir. Bu yüzden, gram boyasıyla boyanmazlar. Boyayı alabilmeleri için uzun süre ve ısıtılarak boyayla muamele edilmeleri gerekir. Mikobakteriler, aldıkları boyayı asit-alkol ile yıkanmalarına rağmen bırakmazlar. Bu özelliklerinden dolayı aside dirençli bakteriler (ARB) olarak da adlandırılırlar (9, 14).

Mikobakterilerin ikiye bölünme süresi ortalama 18-24 saattir. *M. tuberculosis* için optimal üreme ısı 37°C'dir. Optimal ısı bazı türlerde 30-32°C (*M. ulcerans*, *M. marinum*, *M. haemophilum*), bazı türlerde de (*M. xenopi*) 42°C'dir. Katı besiyerlerinde bazı türler R (*M. tuberculosis*) tipi, bazıları da S (*M. avium-intracellulare*) tipi koloni oluşturur. Bazı türlerin pigment üretme özelliği vardır. Mikobakteriler standart kültür ortamlarında 10-15 günde gözle görülür koloni oluştururlar. Yumurtalı besiyerinde (Lowenstein-Jensen) optimal ısıda pH 6,5-6,8'de ve %5-10CO₂'li ortamda *M. tuberculosis* hızlı bir şekilde ürer (9).

Hücre duvar yapısı, diğer bakterilerden belirgin olarak fark gösterir. Yüksek oranda lipid ve mikolik asit içerir. Mikobakteri hücre duvarında bulunan peptidoglikan, diğer gram pozitif bakterilerden farklı olarak, protein ve polisakkarit yerine lipid bakımından zengindir. Her ne kadar hücreye şeklini peptidoglikan tabakası veriyorsa da, bu tabakanın üzerinde yer alan ve mikolik asit esterlerini taşıyan lipoarabinogalakton tabakasının esas olarak hücre geçirgenliğinin sınırlandırılmasından sorumlu olduğuna inanılmaktadır (Şekil 1). İlk olarak *M. tuberculosis* türünde gözlemlenen, basillerin düzensiz kümeleşmesi veya birbirine paralel dizim oluşturacak şekilde üreme özelliğinin, daha sonraları başka mikobakteri türlerinde de görülebildiği ve bu tip üremeden sorumlu kord faktörün, mikolik asit içeren makromoleküller olduğu belirlenmiştir. Mikolik asitler, mikobakterilerde tüm hücre duvarı kuru ağırlığının %50'sini, hücre lipidlerinin %60'ını oluşturur (12, 15).



Şekil 1. Mikobakteri hücre duvarı yapısı (16)

1.Dış duvar lipidleri 2.Mikolik asit 3.Polisakkaritler 4.Peptidoglikan 5.Plazma membranı
6.Lipoarabinomannan (LAM) 7.Fosfatidilinozitol mannosid 8.Hücre duvar iskeleti

1.1.4. Tüberkülozda Bulaş

Tüberkülozda bulaşma, esas olarak solunum yolu ile oluşur. Tüberküloz hastalarının öksürme, konuşma, şarkı söyleme gibi aktiviteleri esnasında havaya damlacıklar yayılmaktadır. Bu damlacıkların bir kısmı hemen yere çökerken, bir kısmı havada asılı kalan damlacık çekirdekleri halini alır. Bu çekirdekler 0,5-3µm çapında ve 1-3 basil içermektedirler. Enfeksiyon bu çekirdeklerin inhalasyon yolu ile şahsın alt solunum yollarına yerleşmesiyle başlamaktadır. Tüberküloz basilinin akciğerde enfeksiyon oluşturması basilin virulansına ve bakteriyi fagosite eden alveoler makrofajın mikrobisidal yeteneğine bağlıdır. Bu savunmayı aşabilen basil, alveoler makrofajların içinde çoğalmaya başlar. Yeterli hücrel immünite gelişene kadar basiller çoğalmaya devam ederler (17, 18).

1.1.5. Epidemiyoloji

1.1.5.1. Dünyada Tüberküloz

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün verilerine göre, dünya nüfusunun üçte biri tüberküloz basili ile enfektedir. Her yıl dünyada yaklaşık 9 milyon yeni tüberküloz hastası ortaya çıkmaktadır ve 1,7 milyon hasta tüberküloz sebebiyle ölmektedir. Bu rakamlara göre her gün yaklaşık 5000 kişi tüberkülozdan ölmektedir. 2015 yılına kadar hasta sayısının 15 milyona ulaşacağı, bunların üç milyonunun HIV enfeksiyonu ile birlikte olacağı tahmin edilmektedir. DSÖ 1997 yılından bu yana yıllık tüberküloz kontrolü programı yayınlamaktadır. Bu raporlar, epidemiyolojik bilgiler yanında tüberküloz kontrolü ile ilgili uygulamaları ve bütçeleri de ortaya koymaktadır (19,20).

Tahminen dünyada 2009 yılında 9,4 milyon yeni tüberküloz vakası ortaya çıkmıştır. Bunların yaklaşık 1,1 milyonu aynı zamanda HIV hastasıdır. Bu rakam insidans olarak 100000 nüfusta 137 hastaya karşılık gelmektedir. 2004 yılında 100000 nüfusta 142 olan bu rakam görünüşe göre azalmakta ama bu azalma çok yavaş olmaktadır. 2009 yılında 1,7 milyon insan tüberkülozdan ölmüştür. Bu hastaların 380000'i HIV pozitif hastalardı. 2009 yılında bildiri yapılan tüberküloz hastası sayısı 5,8 milyondur (20).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), 1993 yılında tüberküloz konusunda dünya çapında acil durum ilan etmiş ve bütün ülkelere 'Doğrudan Gözetimli Tedavi

Stratejisi'ni (DGTS) önermiştir. DGTS bugün 190 ülkeye yayılmıştır. Bu ülkeler dünya popülasyonunun %93'ünü ve tahmini tüberküloz olgularının %99'unu içermektedir. DSÖ, yayma pozitif olguların %70'ine tanı koymayı ve bu olguların %85'inin başarı ile tedavi edilmesini hedef olarak belirlemiştir. "Milenyum Gelişme Hedefi" adı verilen bu hedefle aynı zamanda 2015 yılına kadar prevalans ve ölüm oranlarının yarıya indirilmesi hedeflenmiştir. 2005 yılında yayma pozitif olguların %60'ına tanı konulmuş ve bunların %85'i başarı ile tedavi edilmiştir. İzleyen yıllarda da tedavi başarısında istenen oran tutturulmuş ama olgu bulma oranı %61'de kalmıştır(19, 20).

Dünya Sağlık Örgütü , tüberküloz kontrolü için, 2002'de daha geniş kapsamlı bir yaklaşım benimsemiştir. DGTS'ne ÇİD-TB, HIV+TB ve başka konuları da eklemiş ve buna "Stop TB Stratejisi" adını vermiştir (18).

Dünyadaki tüberküloz hastalarının %81'i 22 ülkededir. Çoğunluğu Asya ve Afrika'da olan bu ülkelere "Yüksek Olgu Yüklü Olan Ülkeler" denilir. Afrika bölgesi en yüksek tüberküloz insidansının bulunduğu bölgedir. Sahraaltı Afrika ve Güney Doğu Asya, HIV ile tüberküloz birlikteliğinin en yoğun olduğu bölgelerdir (20).

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2010 raporuna göre tüberküloz insidansı yavaş bir şekilde düşmektedir. 1990 ile 2009 yılları arasında tüberkülozdan ölüm oranları global seviyede %35 oranında azalmıştır. Bu düşüş eğilimi devam ederse 2015 yılındaki %50 oranında azalma hedefine ulaşılabilir. 1995-2009 yılları arasında DGTS ile toplam 41 milyon insan başarı ile tedavi edilmiştir. Yüksek olgu yükü olan 22 ülkeden 13 tanesi "Milenyum Gelişme Hedefi"ne ulaşma yolundayken, 12 ülkede "Stop TB Stratejisi" hedeflerine ulaşmaya yaklaşmıştır. 2008 yılında tahminen 440000 yeni ÇİD-TB vakası görülmüş ve ÇİD-TB'den 150000 kişi ölmüştür. 2009 yılındaki yeni tüberküloz olgularının %3,3'ü ÇİD-TB vakasıdır (20).

1.1.5.2. Türkiye'de Tüberküloz

Türkiye'de tüberküloz ile ilgili bilinen en yüksek hasta sayıları (ölüm kayıtlarına dayanılarak tahmin edilen sayılar) 1920'li yıllardadır. 1940'lı yıllarda tüberküloza bağlı ölümler azalmaya başlamıştır. Ancak asıl düşüş ilaç tedavilerinin başladığı 1950'li yıllardan itibaren başlamıştır. 1960'lı yıllarda hastalık sıklığı 100000'de 170'dir. 1970'li yıllarda azalan olgu hızı, 1980'lerden sonra yeniden

artmaya başlamış ancak, 1990'larla beraber yeniden vaka sayısı düşmeye başlamıştır (19).

Toplam 18452 tüberküloz hastası 2008 yılında verem savaşı dispanserleri kayıtlarına girmiştir. Toplam olgu hızı yüz bin nüfusta 27,9'dan 25,8'e (%7,5) düşüş göstermiştir. Hastaların 11476'sı (%62,2) erkek, 6976'sı (%37,8) kadındır. Erkek/Kadın oranı 1,6'dır. Olgu hızı erkeklerde 100000'de 32,0 ve kadınlarda 100000'de 19,6'dır. Olgu hızının yaş gruplarına dağılımı incelendiğinde, 15-24 yaş grubundan başlayarak yüksek bir düzey izlemekte ve 55-64 ile 65 ve üzeri yaşlarda en yüksek düzeye ulaştığı görülmektedir. Toplam 18452 hastada yeni olguların oranı %90,8 (16760 kişi) iken daha önce tedavi görmüş olguların oranı %9,2 (1.692 kişi) bulunmuştur (21).

İlaç duyarlılık testi yapılan toplam 4963 hastanın sonuçları incelendiğinde; %19,1'inde en az bir ilaca direnç saptanırken, en yüksek oranlarda direncin de INH'a karşı geliştiği görülmüştür. İlaç duyarlılık testi yapılan olguların %5,3'ü (263 kişi) ÇİD TB bulunmuş olup, çok ilaca direnç oranı yeni olgularda %3, tedavi görmüş olgularda %18,6 olarak saptanmıştır (21).

Dünya Sağlık Örgütü'nün tüberküloz insidansı ile ilgili hedefi, 2015 yılına kadar insidans hızı artışının durdurularak geriye çevrilmesidir. Türkiye'nin tüberküloz insidans hızı, yıllara göre azalmakta olup 2002 yılında yüz binde 40 iken 2008 yılında yüz binde 30'dur (21).

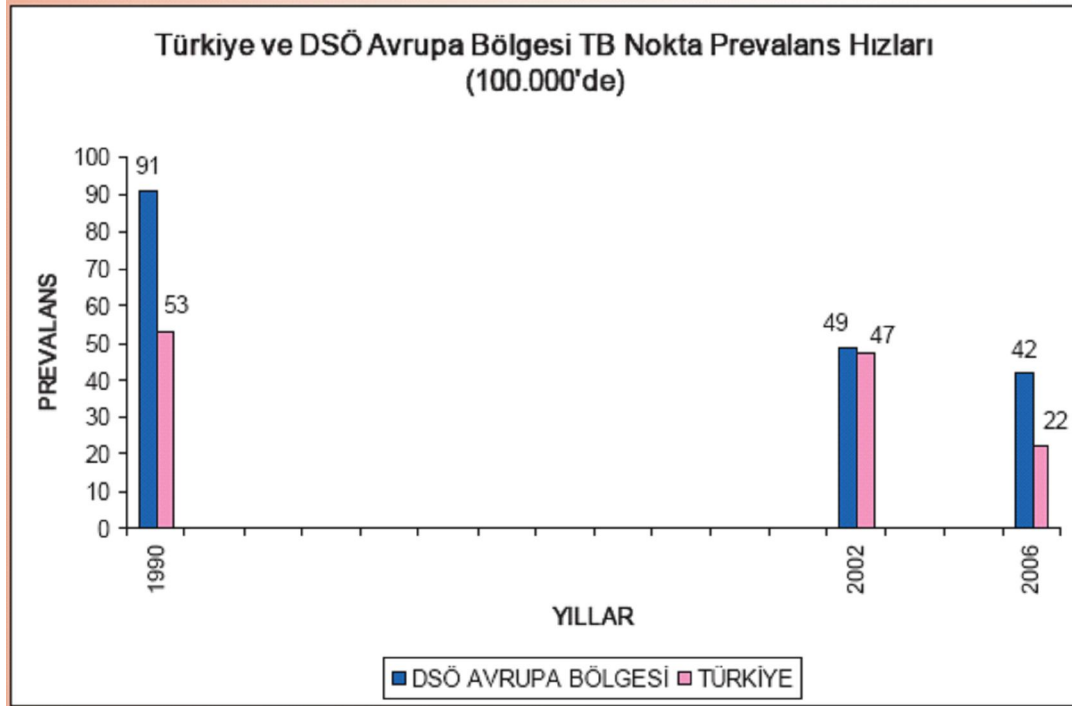
Dünya Sağlık Örgütü, tüberküloz kontrol programlarının başarı göstergesi olarak prevalansı esas almaktadır. DSÖ'nün tüberküloz prevalansı ile ilgili hedefi, "tüberküloz prevalansını 2015 yılına kadar, 1990 yılına kıyasla yarıya düşürmektir". Türkiye, 1990 yılında yüz binde 53 olan tüberküloz nokta prevalansını 2002 yılında yüz binde 47'ye düşürebilmiştir. Yapılan tüberküloz kontrol çalışmalarıyla 2005 yılında bu rakam yüz binde 26'ya düşürülmüştür ve prevalans hedefine ulaşılmıştır, 2006 yılında ise hedef aşılmıştır (Şekil 2) (21).

Tablo 2. İlaç Duyarlılık Testi (İDT) Çalışılan Hastalarda Olgu Tanımına Göre Her Bir TB İlacı İçin Toplam Direnç Sonuçları*, 2005-2008 (21)

OLGU TANIMI	2005**		2006		2007		2008	
	Dirençli Sayı	Dirençli %	Dirençli Sayı	Dirençli %	Dirençli Sayı	Dirençli %	Dirençli Sayı	Dirençli %
Yeni Hastalar	(n=3.237)		(n=4.135)		(n=4.142)		(n=4.221)	
İzoniiazid	291	9,0	444	10,7	492	11,9	479	11,3
Rifampisin	144	4,4	185	4,5	202	4,9	166	3,9
Etambutol	97	3,0	147	3,6	115	2,8	143	3,4
Streptomisin	227	7,0	348	8,4	296	7,1	275	6,5
ÇİD	101	3,1	131	3,2	120	2,9	125	3,0
Tedavi Görmüş Hastalar	(n=508)		(n=711)		(n=775)		(n=742)	
İzoniiazid	139	27,4	169	23,8	214	27,6	207	27,9
Rifampisin	107	21,1	141	19,8	145	18,7	162	21,8
Etambutol	51	10,0	94	13,2	64	8,3	71	9,6
Streptomisin	77	15,2	121	17,0	107	13,8	96	12,9
ÇİD	90	17,7	118	16,6	120	15,5	138	18,6
Tüm Hastalar	(n= 3.745)		(n=4.846)		(n=4.917)		(n=4.963)	
İzoniiazid	430	11,5	613	12,6	706	14,4	686	13,8
Rifampisin	251	6,7	326	6,7	347	7,1	328	6,6
Etambutol	148	4,0	241	5,0	179	3,6	214	4,3
Streptomisin	304	8,1	469	9,7	403	8,2	371	7,5
ÇİD	191	5,1	249	5,1	240	4,9	263	5,3

* Her bir ilaç için toplam dirençli hasta sayısı belirlenirken, diğer ilaçlara dirençli ya da duyarlı olması dikkate alınmamıştır.

** 2005 yılında etambutol için 3 yeni, 1 tedavi görmüş; streptomisin için 1 yeni, 1 tedavi görmüş hastanın İDT sonucu bulunmamaktadır. 2006 yılı için 2 yeni hastada etambutol, 1 yeni 1 nüks hastada streptomisin için İDT sonucu yoktur.



Şekil 2. Türkiye ve DSÖ Avrupa Bölgesinde 1990, 2002 ve 2006 yıllarında Nokta Prevalans Hızları (21)

Türkiye 2005 yılından itibaren “çok ilaca dirençli vakalarını iki yıl boyunca takip edip tedavi sonuçlarını raporlayabilen” bir ülke haline gelmiştir. “Dünya Sağlık Örgütü Küresel Tüberküloz Kontrolü 2009 Raporu’na göre dünyada bunu başarmış toplam beş ülke vardır (21).

1.1.6. Patogenez

Mycobacterium tuberculosis, profesyonel fagositlerin öldürücü mekanizmalarından başarıyla kaçabilen hücre içi bir patojendir. Damlacık çekirdekleri yoluyla bulaşan basil, alveollere kadar ulaştığında, aktive olmamış alveoler makrofajlar tarafından tutulur. Basiller makrofajlara; kompleman reseptörleri, mannoz reseptörleri veya çöpçü reseptörler (scavenger receptor) denilen reseptörler yolu ile tutunur ve Toll benzeri reseptörler ile tanınarak girer. Makrofajların bakterisidal aktivitesi ile basilin virulansı arasındaki savaşta dört olasılık vardır (22, 23).

1. Konağın immun yanıtı basili makrofaj içinde öldürür ve enfeksiyon gelişmez.
2. Basil makrofaj içinde çoğalır ama daha sonra gelişen immun yanıtla enfeksiyon kontrol altına alınır ve koruyucu immünite gelişir. Bu duruma

“primer enfeksiyon” denir. Klinik ve radyolojik bulgu yoktur ancak, PPD pozitifleşmesi söz konusudur.

3. Basiller primer enfeksiyonu takiben çoğalmaya devam eder ve “primer tüberküloz” meydana gelir. Yani klinik hastalık ortaya çıkar.
4. Primer enfeksiyon sonrası meydana gelen kazeöz nekroz içinde canlı kalan basiller, hayatın herhangi bir devresinde herhangi bir nedene bağlı olarak reaktif olabilir ve “sekonder tüberküloz” meydana gelir.

Alveoler makrofajlar tarafından fagosite edilen ve sindirilemeyen basiller çoğalarak makrofajları parçalar ve alveoler boşluğu geçerler. Makrofajlardan salınan kemotaktik faktörler dolaşımdaki monositlerin lezyon bölgesine toplanmasını sağlayarak granülom oluşumunu başlatır. Makrofajlar tarafından hücre içine alınan basiller, hücre içinde çeşitli toksik maddelerle öldürülmeye çalışılır. Basil de bu mekanizmayı, çeşitli yollarla engellemeye çalışır. (23, 24).

Mycobacterium tuberculosis'in inhalasyonundan sonra, 2-6 hafta içinde etkene karşı özgül hücre sel immün yanıt gelişir. Lezyon bölgesinde çoğalan basillerin tüberkülin benzeri proteinleri, doku hasarı yapan gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonuna yol açar. Gecikmiş tip aşırı duyarlılık yanıtı, tüberkülin testi pozitifliğine ve tüberkülozda görülen kazeifikasyon, likeifikasyon ve kavitasyona neden olur. Konağın bu yanıtı, basil içeren makrofajlar ile çevre dokuları harap ederek, inaktif makrofajlar içindeki basillerin çoğalmasını durdurur ve granülom merkezinde kazeöz nekroz dokular oluşturur. Oluşan kazeöz nekroz ortamında basiller, anoksik koşullar nedeniyle çoğalamazlar, yıllarca hatta yaşam boyu dormant halde kalırlar. Primer enfeksiyon ve primer odakların (Ghon odağı) olduğu bu evrede tüberkülin testi pozitifdir. Bazı olgularda primer odak ve lenfadenomegali birlikte görülebilir. Bu olaya primer kompleks (Ranke kompleksi) denir (24, 25).

Primer tüberküloz enfeksiyonu, olguların %90-95'inde sessiz seyrederek ve immünite tarafından kontrol edilir. Bu olguların primer enfeksiyonu geçirdiği sadece PPD pozitifliği ile saptanabilir. Hastalık belirtisi görülmez. Geriye kalan %5-10 hastada ise primer tüberküloz hastalığı gelişir. Hastalarda ateş, öksürük, kilo kaybı, iştahsızlık gibi semptomlar vardır (25).

Primer tüberkülozun radyolojik tanısı hiler, paratrakeal lenfadenopati saptanması ile konur. Primer kompleks görülebilir. Hastaların yaklaşık %5'inde

primer tüberküloz kontrol altına alınamaz hematogen yayılımla miliyer tüberküloz gelişebilir (22, 25).

Primer enfeksiyonu geçiren kişilerin %10 kadarında, hayatlarının herhangi bir bölümünde klinik hastalık gelişebilir. Sekonder tüberküloz denilen bu tablo, genellikle primer enfeksiyon sırasında akciğerin apikal, subapikal bölgelerine yerleşen ve burada sessiz halde canlılığını sürdüren basillerin, immünsüpresif tedavi veya AIDS gibi hücrel immün yanıtı baskılayan bir hastalık sonucu reaktif olmasıyla meydana gelir. Sekonder tüberküloz, bu endojen reaktivasyon yanında, primer enfeksiyonu olan bir kişinin eksojen olarak tüberküloz basili ile yeniden enfekte olması ile de ortaya çıkabilir. Eksojen reaktivasyonda da immün sistemin baskılanması tetikleyici etkindir. (12, 22).

Sekonder tüberküloz başlangıçta sıklıkla asemptomatiktir. Bazı hastalarda yorgunluk, iştahsızlık, halsizlik, kilo kaybı, subfebril ateş, gece terlemesi, kuru öksürük gibi belirtiler görülebilir. Daha sonra balgamlı öksürük gelişir. Balgam mukopürülan veya kanlı olabilir. PPD, çok ilerlemiş olgular dışında daima pozitiftir. Sekonder tüberküloz en sık olarak akciğerin apeksinde görülür (12).

1.1.7. Laboratuvar Tanısı

Tüberkülozdan korunmanın en etkin yolu hastalığın erken tanınması ve tedavi edilmesidir. DSÖ kararına göre bir hastaya kesin tüberküloz tanısı konulabilmesi için uygun şekilde alınan klinik örneğin laboratuvara gönderilmesi, ekim yapılan besiyerlerinde üretilmesi ve tanımlanması gerekir. Tüberküloz tanısı için rutin çalışan laboratuvarların yapılması DSÖ tarafından belirlenmiş olup 3 aşamadan oluşmaktadır. “Birinci Aşama Laboratuvarlar” hasta örneklerinden sadece mikroskopik inceleme ile asit ve alkaliye dirençli bakteri varlığını araştırmakta iken, “İkinci Aşama Laboratuvarlar” kültür ve *M. tuberculosis*'in diğer mikobakterilerden ayrılmasını, “Üçüncü Aşama Laboratuvarlar” ise bunlara ek olarak mikobakterilerin tür düzeyinde idenfikasyonunu ve ilaç duyarlılıklarının çalışılması ile görevlendirilmiştir. Ülkemiz bu açıdan değerlendirildiğinde, DSÖ'nün önerdiği laboratuvar derecelendirmesine benzer bir yapılanmanın, Sağlık Bakanlığı Verem Savaşı Daire Başkanlığı'na bağlı laboratuvarlarda mevcut olduğunu, birçok Üniversite hastanesi, özellikle eğitim araştırma hastaneleri ile ihtisaslaşmış hastanelerin 3. aşama laboratuvar hizmeti verdikleri söylenebilir (26).

Tüberkülozun mikrobiyolojik tanısının tam ve doğru olarak yapılabilmesi, klinik örneğin uygunluğuna bağlıdır. Çok çeşitli organları ve dokuları tutabilen bir hastalık olduğu için, materyal seçimine özen gösterilmeli, endojen flora ve çevresel kontaminasyonu en aza indirmek için de örnek alınırken aseptik koşullara dikkat edilmelidir. Tüberküloz tanısında kullanılan geleneksel yaklaşımlar, klinik örneklerden doğrudan hazırlanan aside dirençli boyamalardan sonra mikroskopik inceleme ile basilin görülmesi ve sıvı veya katı besiyerlerine ekimlerden sonra üreyen basillerin tanımlanması esasına dayanmaktadır (27, 28).

1.1.7.1. Mikroskopi

Mikroskop ile hasta örneğindeki tüberküloz basillerinin saptanması, tüberküloz hastalığının tanısını koymak için en hızlı, en ucuz ve en pratik yöntemdir. Tüberküloz basilinin ikiye bölünme süresi ortalama 18 saat olduğundan, kültür ile üretilerek izole edilmesi uzun zaman almaktadır. Bu yüzden mikroskopik tanı günümüzde de hala önemini korumaktadır. Hasta örneklerinden hazırlanan preparatlara, değişik boyama yöntemleri uygulanarak mikroskopik değerlendirme yapılır. Günümüzde en sık kullanılan Erlich-Ziehl-Neelsen'in (EZN) aside dirençli boyama (ARB) yöntemidir. Bu yöntem ve Kinyoun'un yönteminin temel ilkeleri, mumlu, bol lipid içeren mikobakteri hücre duvarının karbol-fuksin boyasına çekiciliğine dayanır. EZN yönteminde lam alttan ısıtılarak karbol fuksin dökülür. Hücreler bir kere boyayı aldıktan sonra, asit-alkol dökülmesine rağmen dekolorize olmazlar. Sonra, lama metilen mavisi (EZN) ya da malaşit yeşili (Kinyoun) dökülerek zıt boyama yapıldığında, zıt boya zemini üstünde kırmızı boyanmış basiller görülür (1, 26).

Modern laboratuvarlarda 1989 yılından beri floresan mikroskop, aside dirençli boyaların yerini almıştır. Bu teknolojinin temeli de boyalar için yağın çekiciliği esasına dayanmaktadır. Fakat buradaki boyalar, auramine-rhodamine'dir. Mikobakteri bu maddeyi emer ve asit-alkol ile boyasını vermez. Ultraviyole mikroskopunda, 25x veya 40x gibi küçük büyütme objektifleri kullanılarak yapılan taramalarda koyu zeminde parlak yeşil refle veren yapıların görülmesi anlamlıdır. Florokrom boyama tekniği, gözü daha az yorması, kısa zamanda daha fazla alanın incelenmesi ve bakterilerin daha kolay seçilmesi gibi avantajları nedeniyle, birçok laboratuvar tarafından tercih edilmektedir (1, 9).

1.1.7.2. Örneklerin İşlenmesi

Normalde steril olması beklenen kan, biyopsi materyali, aspirasyon sıvıları ve kemik iliği gibi örnekler doğrudan kültür ortamına ekilebilir. Ancak, normal flora ile kontamine olan balgam, dışkı gibi örneklerde mikobakterilerin yanında birçok mikroorganizma da bulunur. Diğer bakterilerin ikiye bölünme süreleri mikobakterilerden daha kısa olduğundan, besiyerinde *M. tuberculosis*'den önce üreyerek, ortamı elverişsiz hale getirirler (9, 29).

Tüberküloz etkeni bakterilerin izolasyonu amacıyla, klinik örneklerde lökosit, eritrosit, vücut sıvıları ve doku gibi organik kalıntılardan arındırmak ve aside dirençli bakteri yoğunluğunu artırmak için homojenizasyon/dekontaminasyon ve konsantrasyon işlemi uygulanır (9, 30).

Homojenizasyon-dekontaminasyon-konsantrasyon işleminde en sık N-asetil-L-Sistein (NALC) + Sodyum hidroksit (NaOH) ve NaOH (%3-4) gibi yöntemler kullanılmakla birlikte, zefiran-trisodyum fosfat, oksalik asit, setilpridinyum klorid-sodyum klorid gibi farklı yöntemlerden de yararlanılabilir (30).

1.1.7.3. Besiyerleri ve Kültür Yöntemleri

Mikroskopik muayenede ARB araştırılması, tüberküloz tanısı için çok değerli, basit ve ucuz bir yöntemdir ve ön tanı değeri taşır. Fakat tüberkülozun kesin tanısı için etkenin kültür ortamında tekrar gösterilmesi ve bazı testler ile doğrulanması gerekir. Kültür, *M. tuberculosis* tanısı için 'altın standart' yöntemdir (31).

Konvansiyonel olarak mikobakteri izolasyonu için kullanılan besiyerleri özelliklerine göre, katı ve sıvı besiyerleri olarak ayrılabilir. Sıvı besiyerlerine, Middlebrook 7H9 ve Dubos Tween albumin sıvı besiyerleri örnek verilebilir. Katı özellikteki besiyerleri, de yumurta ve agar bazlı olarak ikiye ayrılır. Yumurta bazlı besiyerlerine, Lowenstein-Jensen, Petraghani ve American Thoracic Society Medium örnek verilebilir. Agar bazlı besiyerleri ise Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11'dir (26).

Aşağıdaki tablolarda antibiyotik içerip (seçici), içermemelerine (seçici olmayan) göre mikobakterilerin kültürde üretilmeleri için kullanılan besiyerleri sıralanmıştır.

Tablo 3. Selektif Olmayan Besiyerleri (31)

Besiyeri	İçerik	İnhibitör Ajan
Lowenstein-Jensen	Koagüle tam yumurta, bazı tuzlar, gliserol, patates unu	Malaşit yeşili 0,025g/100ml
Petragnani	Koagüle tam yumurta, yumurta sarı, süt, gliserol, patates, patates unu	Malaşit yeşili 0,052g/100ml
Middlebrook 7H10	Bazı tuzlar, vitaminler, kofaktörler, oleik asit, albumin, katalaz, gliserol, dekstroz	Malaşit yeşili 0,0025g/100ml
Middlebrook 7H11	Bazı tuzlar, vitaminler, kofaktörler, oleik asit, albumin, katalaz, gliserol, dekstroz, %0,1 kazein hidrozilat	Malaşit yeşili 0,0025g/100ml
American Thoracic Society Medium (ATSM)	Koagüle taze yumurta sarısı, Gliserol, patates unu	Malaşit yeşili 0,02g/100ml

Tablo 4. Seçici Besiyerleri (31)

Besiyeri	İçerik	İnhibitör Ajan
Lowenstein-Jensen (Gruft modifikasyonu)	Standart besiyeri içeriği RNA-5mg/100ml	Malaşit yeşili 0,025g/100ml
Lowenstein-Jensen	Standart besiyeri içeriği	Malaşit yeşili 0,025g/100ml Sikloheksimid 400mg/ml, Linkomisin 2mg/ml Nalidiksik asit 35mg/ml
Middlebrook 7H10	Standart besiyeri içeriği	Malaşit yeşili 0,0025g/100ml Sikloheksimid 360mg/ml Linkomisin 2mg/ml Nalidiksik asit 20mg/ml
Middlebrook 7H11 (Mitchison besiyeri)	Standart besiyeri içeriği	Karbenisilin 50mg/ml Amfoterisin B 10mg/ml Polimiksin B 200mg/ml Trimetoprim laktat 20mg/ml

Sıvı besiyerleri arasında yer alan Middlebrook 7H9 ve Dubos Tween albumin, mikobakterilerin stok suşlarının subkültürlerinin yapılması ve duyarlılık

deneylerinde kullanılır. Ayrıca, bakteri sayısının az olduğu steril bölgelerden alınan örneklerde bakteriyi çoğaltmak amacıyla da kullanılabilir (32).

Bu besiyerlerinde yapılan kültürlerin hepsi organizmaların üremesi için en az birkaç haftaya ihtiyaç duymaktadır. Amerikan Hastalık Kontrol Mekezi (CDC) klinik örneklerden *M. tuberculosis*'in izolasyon ve identifikasyonu için gerekli sürenin 14-21 gün ile sınırlandırılmasını önermektedir. Bu nedenle tüberküloz basilinin daha hızlı üremesini ve üremenin erken dönemde tespitini sağlamayı amaçlayan hızlı kültür sistemleri geliştirilmiştir (32, 33).

BACTEC 460TB (Becton Dickinson, ABD):Hızlı kültür sistemleri içinde yer alan yarı otomatize Bactec 460TB sistemi, izolasyon, identifikasyon ve duyarlılık deneylerinin uygulandığı bir sistem olarak uzun yıllardır başarı ile kullanılmaktadır. Cihaz, radyoaktif parıltıyı sayan bir sintilasyon sayacı, bir aspirasyon iğnesi ve üzerine 60 adet kültür şişesi yerleştirilebilen bir raylı sistem içerir. Raylı sistem hareket ettikçe, her kültür şişesi sırayla 80 saniyede bir aspirasyon iğnesinin altından geçer. Test şişesi aspirasyon iğnesinin tam altına gelince, iğne şişenin tepesindeki lastik tapaya doğru iner. Şişenin üst kısmından bir miktar gaz aspire edilir ve sintilasyon sayacına verilir. Cihazda, aynı zamanda test alanında negatif basınç altında havayı filtre eden bir parça ve ek bir güvenlik kaynağı olarak ultraviyole ışık kaynağı vardır. Aspirasyon iğnesi, bir sonraki şişeye sıra gelene kadar elektrikle ısıtılarak sterilize edilmektedir (13).

BACTEC 12B sıvı kültür şişesi işlem için anahtar özelliindedir. Şişe, dar boyunlu, 20 ml hacminde, ağız kısmı ince lastik bir tapa ile kapatılmış cam bir şişedir. 4 ml Middlebrook 7H9 besiyeri bazında, sığır serum albumini, kazein hidrolizat, katalaz ve polioksilen stearat içerir. Küçük bir miktar polimiksin B, amfoterisin B, nalidiksik asit, trimetoprim ve azlosilin karışımı (PANTA) kontaminantların üremesini engellemek için ortama eklenir. Besiyerinin içeriğinde üremeyi tespit için ¹⁴C işaretli palmitik asit de bulunur (13).

BACTEC 12B şişesine 0,5 ml homojenizasyon-dekontaminasyon-konsantrasyon işlemlerinden geçirilmiş örnek inokule edilir ve 35°C'de inkübe edilir. Ortamda mikobakteri varsa, şişenin üst boşluğunda ¹⁴CO₂ birikir. ¹⁴CO₂ miktarı, üreme miktarı ile orantılıdır. Belirli bir inkübasyon periyodundan sonra raylı sisteme yerleştirilen şişeler üreme olup olmadığı yönünde değerlendirilir. Aspire edilen

gazdaki radyoaktif parıltı miktarının ölçümü “Growth Index” (GI) adı verilen sayısal bir değere çevrilir. 10’un üstünde bir GI değeri pozitif kabul edilir. Üreme görüldüğünde BACTEC 12B şişesinden bir miktar alınıp ARB bakılır (13).

Konvansiyonel katı besiyerleri ile karşılaştırıldığına BACTEC ile klinik örneklerden pozitif kültür elde etme oranında artış görülürken, pozitif kültürün tespiti için gereken sürede de azalma vardır. Sistemin dezavantajları olarak, sarf malzemelerin pahalı olması, koloni morfolojisinin gözlenememesi, karışık kültürlerin tespit edilememesi ve radyoaktif atıkların uzaklaştırılmasındaki zorluklardan bahsedilebilir. İğnenin bir sonraki aspirasyondan önce yetersiz sterilizasyonu çapraz kontaminasyona yol açabilir (13, 32).

Bu sistemde, izolasyonun yanı sıra, *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi ile tüberküloz dışı mikobakterilerin (MOTT) ayrımı yapılabilmekte ve *M. tuberculosis* kompleksi suşlarının primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılığı denetlenmektedir. Tüberküloz dışı mikobakterilerin ayrımında p-nitro- α -asetilamino- β -hidroksi-propifenon (NAP) kullanılır. NAP içeren kültür ortamında *M. tuberculosis* kompleks üyeleri üremezken, diğerleri ürer. ‘Altın Standart’ olarak kabul edilen Bactec 460TB sistemi günümüze değin hızlı mikobakteri izolasyonu için geliştirilmiş en iyi sıvı besiyeri bazlı sistem olmasına rağmen, yerini artık radyometrik olmayan sistemlere bırakmaktadır. Çünkü radyoaktif materyallerin temini ve atılması büyük bir problem oluşturmaktadır (13, 32).

MGIT 960 (Becton Dickinson, ABD) (Mycobacteria Growth Indicator Tube“Mikobakteri Üreme Gösterge Tüpü”): Bu sistemde kullanılan tüplerde, Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri ve dip kısımlarda oksijene duyarlı rutenyum metal kompleksi içeren silikon bulunur. Klinik örnekler ekilmeden önce besiyerlerine OADC (oleik asit, sığır albumin, dekstroz, katalaz) ve PANTA ilave edilir. Daha sonra 0,5 ml klinik örnekten ilave edilir. Besiyerleri 37°C’de inkübe edilir. Klinik örneğin ekiminden sonraki gün başlayarak, her gün örnekler okutulur. Kullanılan besiyerlerinde herhangi bir üreme olmadığında oksijen varlığına bağlı olarak silikon tabakaya gönderilen ultraviyole ışınına karşı floresans oluşmazken, mikobakteri veya başka mikroorganizmalar ürediğinde oksijenin kullanılması sonucu ultraviyole ışığına karşı floresans oluşmakta ve oluşan floresans miktarı üreme indeksi olarak değerlendirilmektedir. Tam otomatize bir sistem olmakla birlikte, homojen olmayan

bir bulanıklık oluşumu da üremeyi makroskopik olarak değerlendirmeyi mümkün kılmaktadır. (13, 32).

MB/BacT Sistemi (Organon Teknika, İrlanda): Mikobakterileri tespit etmek için geliştirilmiş otomatize bir sistemdir. MB/Bac T şişeleri, vakumlu, CO₂, nitrojen ve oksijen içeren bir atmosfer içinde geliştirilmiş Middlebrook 7H9 besiyeri içerir. Şişenin içeriği, en sık rastlanan mikobakteri türleri için elverişli beslenme ve çevre koşullarını sağlar. PANTA ve özel büyüme faktörleri içeren bir karışım her ekimden önce ilave edilir. Besiyerinin dip kısmında üremeyi değerlendirmek için, CO₂ varlığında koyu yeşilden açık sarıya dönen kolorimetrik bir sensör vardır (13).

ESP II Kültür Sistemi (Trek Diagnostic Systems, ABD): Besiyeri şişeleri, modifiye Middlebrook 7H9, kaziton, gliserol ve selüloz sünger içerir. Süngerler, mikobakterilere akciğerlere benzer bir üreme alanı sağlar. Örneklerin ekimi yapılmadan önce, polimiksin B, vankomisin, nalidiksik asit ve amfoterisin B (PVNA) içeren antibiyotik karışımı besiyerine ilave edilir. Her kültür şişesinde, mikroorganizmaların metabolik aktivitesine bağlı oluşacak gaz basıncındaki değişiklikler sürekli olarak bilgisayarda izlenir (13).

BACTEC 9000 MB (Becton Dickinson, ABD): Bu sistemde modifiye bir Middlebrook 7H9 besiyeri olan MYCO/F kullanılır. Ekimden önce besiyerine PANTA ilave edilir. Üreyen mikroorganizmaların tükettiği oksijen, besiyeri ortamındaki floresan artışı ile tespit edilir. BACTEC 9000 MB sisteminde, bilgisayar destekli olarak floresan seviyesi ve üreme takip edilir (34).

Septi-Chek AFB (Becton Dickinson, ABD): Bu sistem bifazik bir sistemdir. Biri sıvı diğerleri katı olmak üzere dört besiyeri içermektedir. Sıvı besiyeri Middlebrook 7H9 ve katı besiyerleri Middlebrook 7H11, Lowenstein-Jensen ve çukolata agardır. Kültür işleminden önce besiyerine glukoz, gliserin, oleik asit, pridoksal HCl, katalaz, albumin ve PANTA içeren zenginleştirici ilave edilir. Özel bir araca gereksinim göstermemekte ve radyoaktif madde kullanmamaktadır. Klinik örneklerin ekilmesinden sonra besiyerleri ilk 24 saat ters olarak bekletilir ve süre sonunda dik konuma getirilir. Kültür süresince besiyerleri hafifçe çalkalanarak sıvı besiyerinin katı besiyerlerine teması sağlanmalıdır. Tanısal duyarlılığı geleneksel kültürlerden üstün, BACTEC'e yakın ya da ondan biraz daha iyidir. Üremeyi saptama süresi ise BACTEC'den biraz daha uzundur (13, 32, 35).

1.1.7.4. Moleküler Tanı Yöntemleri:

Günümüzde tüberkülozun rutin laboratuvar tanısında moleküler yöntemlerin kullanılması halen tartışmalı bir konudur. Bugün halen birçok merkezde tüberküloz tanısı amacıyla mikroskopik inceleme ve kültür kombinasyonu kullanılmaktadır. Özellikle dirençli olgu sayısındaki artış nedeniyle, tedaviye bir an önce başlayabilmek ve yeni bulaşları önleyebilmek amacıyla, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, hızlı sonuç veren, uygulaması kolay ve pahalı olmayan laboratuvar yöntemlerinin günlük kullanıma girmesi önemli bir gereksinim haline gelmiştir. Bu amaçla yapılan çalışmalarda geliştirilmiş olan moleküler yöntemler, günümüzde tüberküloz tanısında rutin kullanımda yer almaya başlamışlardır (27).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) uygulamalarında sıkça gözlenebilen kontaminasyon riskini ortadan kaldırabilmek, duyarlılık ve özgüllüğü arttırabilmek için birçok yeni yöntem geliştirilmiştir. Bu amaçla günümüzde, hasta örneklerinden direkt olarak *M. tuberculosis* varlığını araştırmak amacıyla nükleik asit amplifikasyon esaslı sistemler geliştirilmiştir. Kültürde üreyen mikobakterilerin kısa sürede tür düzeyinde tanımlanmasını ve/veya tüberküloz ilaçlarına karşı direnç ile ilişkili mutasyonları saptamaya yönelik; DNA prob hibridizasyonu esaslı ürünler, DNA sekans analiz kitleri ve moleküler biyoloji ve bilgisayar teknolojisini birleştiren DNA mikroarray teknolojisi ürünleri geliştirilmiştir (36).

Nükleik asit amplifikasyonuna dayalı sistemler, IS 6110 insersiyon dizisi ve 16S rRNA ve 23S rRNA'yı hedef alır. Mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanmasında genellikle 16S rRNA, hps65, rpoB ve daha pek çok gen bölgesi hedef olarak seçilir. Günümüzde ticari olarak kullanılan moleküler sistemlerin bazıları şunlardır (36):

- *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (MTD: Gen-Probe, ABD)
- Cobas Amplicor MTB Assay (Roche Diagnostic System, İsviçre)
- LCx MTB Assay (Abbott Laboratories, ABD)
- BD ProbeTec ET (Becton Dickinson Biosciences, ABD)
- Q-Beta Replicase-Amplified Prob Assay (Downers Grove, ABD)
- Real-Time PCR MTB Assay (LightCycler-Roche, iCycler-BioRad, ABD)
- The AccuProbe System (Gen-Probe, ABD)

- INNO-LIPA Mycobacteria (Innogenetics, Belçika)
- MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Sequencing Kit (PE Applied Biosystems, ABD)

1.1.7.5. Tüberkülozun Serolojik Tanısı

Tüberküloz tanısında serolojik testlerin kullanılmasına uzun zaman önce başlanılmış olmasına rağmen, bu testler rutin olarak kullanılacak performansı gösterememiştir. Tüberkülozun serolojik olarak tanımlanması amacıyla geliştirilen testler üç grupta toplanabilir. Bunlar; mikobakterilere özgül antijenler veya bu antijenlere karşı oluşan antikorları tespit eden testler ve tüberküloz enfeksiyonu sırasında artan IFN- γ ölçüm testlerinden oluşur. Tüberkülozun serolojik tanısı amacıyla yapılan çalışmalarda, ELISA temelli yöntemler, immünokromotografik yöntemler ve Western Blot kullanılmaktadır. Serolojik çalışmalarda en çok üzerinde çalışılan antijenler şunlardır (37, 38):

- Antijen 5
- Antijen 60
- 38 kDa Antijen
- 30 kDa Antijen
- 88 kDa Antijen
- Lipoarabinomannan (LAM)

Serolojik testler basit, pahalı olmayan ve kolay değerlendirilebilen testlerdir. Özellikle akciğer dışı tüberküloz tanısında, çocuklar ve düşükün hastalar gibi örnek almanın zor olduğu durumlarda avantaj sağlamaktadır. Ancak, bu testlerin duyarlılığı yayma pozitif hastalarda yüksek olmasına rağmen, çocuklarda, akciğer dışı tüberküloz vakalarında, HIV ile enfekte kişilerde ve yayma negatif hastalarda daha düşüktür. Latent enfeksiyon ile aktif tüberküloz hastalığını veya *M. tuberculosis*'i MOTT'lardan güvenli bir şekilde ayıramaz. Bu özellikleri testlerin kullanımını sınırlamaktadır (27).

Günümüzde moleküler biyolojideki ilerlemeler sonucu tüberkülin deri testine (TDT) alternatif olarak T hücre temelli IFN- γ serbestleştirme testleri geliştirilmiştir. *M. tuberculosis*'e spesifik ESAT-6 (early secretory antigenic target protein 6) ve CFP-10 (culture filtrat protein 10) antijenleri tüberküloz tanısı için büyük potansiyel

oluşturmaktadırlar. Son çalışmalar bu antijenleri kullanan IFN- γ testlerinin, TDT üzerinde avantajları olabileceğini göstermektedir (27).

Günümüzde ticari olarak kullanılan IFN- γ testleri; enzim linked immunospot (ELISPOT) yöntemini kullanan T SPOT-TB (Oxford Immunotec, ABD), orijinal QuantiFERON-TB ve onun geliştirilmiş versiyonu olan QuantiFERON TB Gold testtir (Cellestis International, Avustralya) (27).

1.1.7.6. Tüberkülin Deri Testi:

Bu test *M. tuberculosis* ile oluşan enfeksiyonda ortaya çıkan geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonunu gösteren, intradermal uygulanan bir yöntemdir. Testin pozitif sonuçlanması, o kişinin tüberküloz basili ile enfekte olduğunu gösterir ama tüberküloz hastalığının varlığını ya da yokluğunu göstermez. Tüberkülin deri testinde antijen olarak tüberküloz basilinin proteinleri kullanılır. Old tüberkülin, tüberküloz basilinin kaynatılmış kültüründen elde edilen özür. 1934’de Siebert old tüberkülininden basit bir protein çökeltisi elde etmiş ve buna PPD (pürifiye protein derivesi) adını vermiştir. Günümüzde birçok yerde tüberkülin deri testi için tercih edilen preparat PPD’dir. Standart solüsyonda 0,1 ml içinde 5 TU (tüberkülin ünitesi) PPD dozu bulunur (12, 23).

Tüberkülin deri testi uygulamasında genellikle altın standart olan Mantoux testi kullanılır. Mantoux testinde, 0,1 ml solüsyonda 5 TU PPD ince bir iğne ile ön kol deri içine verilerek 6-10 mm çapında bir papül oluşturulur. 48-72 saat içinde oluşan endürasyonun çapı ölçülür. Tablo 5.’da Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı tarafından çıkarılan “Türkiye’de Tüberkülozun Kontrolü İçin Başvuru Kitabı”ndan alınmış TDT değerlendirme kriterleri görülmektedir (23, 39).

Tablo 5.TDT değerlendirme kriterleri (39).

BCG’lilerde	
0-5 mm	Negatif kabul edilir
6-14 mm	BCG’ye atfedilir
15 mm ve üzeri	Pozitif olarak kabul edilir, enfeksiyon olarak değerlendirilir
BCG’sizlerde	
0-5 mm	Negatif kabul edilir
6-9 mm	Şüpheli kabul edilir, 1 hafta sonra test tekrarlanır; yine 6-9 mm bulunursa negatif kabul edilir; 10 mm ve üzeri pozitif kabul edilir
10 mm ve üzeri	Pozitif kabul edilir
Bağışıklığı baskılanmış kişilerde 5 mm ve üzeri pozitif kabul edilir	

1.1.8. Duyarlılık Testleri

Antitüberküloz ilaç direncinin sürveyansı, tüberküloz kontrol programlarının başarısını değerlendirmede önemli bir yöntemdir. Duyarlılık sonuçları olmaksızın yapılan tüberküloz tedavileri, tedavi başarısızlığı riskini ve antitüberküloz ilaçlara karşı direnç gelişimi riskini arttırmaktadır. DSÖ, tüberküloz tedavi programlarının etkilerinin takip edilebilmesi için, standart tedavi rejimlerine ilaveten ilaç duyarlılık testlerinin de srveyansını önermektedir. Özellikle tedavinin üçüncü ayında hala yayma pozitif olan hastalar veya tedaviye yanıtırsızlığı olan hastalar ile daha önce tüberküloz tedavisi almış olan hastalara mutlaka ilaç duyarlılık testi yapılması önerilmektedir(40, 41).

1.1.8.1. Klasik Kültür Yöntemleri

- 1. Mutlak Konsantrasyon Yöntemi:** Antibiyotikli ve antibiyotiksiz besiyerlerine, 2×10^3 - 1×10^4 cfu/ml civarında mikobakteri içeren ekim yapılır. İlaçlı besiyerinde 20 koloniden fazla olması o ilaca bakterinin dirençli olduğunu gösterir. Ekim örneğinin bu kadar hassas bir şekilde hazırlanması hem zorluk getirmekte, hem de hata oranını arttırmaktadır (41).
- 2. Direnç Oranı Yöntemi:** İlaçlı besiyeri içeren tüplerin bir sırasına da antitüberküloz ilaçların hepsine duyarlı olduğu bilinen *M. tuberculosis* H37Rv inokule edilir. Bu yöntemde 10^5 cfu/ml'lik bir inokulum kullanılır. Farklı dilüsyonlarda ilaç içeren besiyerlerine ekilen bakteriler için ilaçların minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) saptanabilmektedir. Test edilen suşun MİK değeri, *M. tuberculosis* H37Rv'nin MİK değerinden 8 kat veya daha fazla yüksekse o ilaca dirençli olduğu kabul edilir. Değerlendirilmesi zor, hata oranı yüksek bir yöntemdir (41).
- 3. Proporsiyon Yöntemi:** Antitüberküloz ilaçlara dirençli basil oranı, yapılan çalışmalar sonucu %1 olarak kabul edilir. Direncin %1 oranını tayin etmek için kontrol besiyerinde kullanılan bakteri miktarı ilaçlı besiyerindekinden 100 kat daha azdır. İlaçlı besiyerinde üreyen kolonilerin kolonilerin sayısı, kontrol besiyerindeki kolonilerin sayısı ile karşılaştırılır. Belli bir ilaca dirençli basillerin oranı hesaplanıp, test edilen popülasyona yüzdesi olarak belirtilir. Bu test için koagülasyondan önce ilaç eklenmiş Lowenstein-Jensen besiyeri, Middlebrook

7H10 kullanılabilir. İlaçsız kontrol besiyerinde 200-300 koloni oluşturan ekim örneği, bu yöntem için en uygun olanıdır. Bu yoğunlukta basil içeren örneğin elde edilebilmesi için önce kültürde üretilmiş bakteriden Mc Farland No 1 bulanıklığında süspansiyon hazırlanır. Hazırlanmış homojen süspansiyondan 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} veya 10^{-2} , 10^{-4} 'lük dilüsyonlar hazırlanmaktadır. Bu dilüsyonlardan ilaçsız kontrol besiyerine ve ilaçlı besiyerine ekim yapılır. Ekim yapılmış tüpler 3-4 hafta inkübe edildikten sonra oluşan koloniler sayılır. Test edilen suş belli bir antibiyotiğe karşı %1 veya daha yüksek oranda dirençli ise sonuç duyarlı olarak yorumlanır. Bu yöntemle birinci ve ikinci seçenek antitüberküloz ilaç duyarlılıkları test edilebilir. Uzun yıllar boyunca test edilmiş, uluslararası komitelerce onaylanmış referans bir yöntemdir (41).

1.1.8.2. Hızlı Duyarlılık Testleri

- 1. Radyometrik Kültür Sistemi (BACTEC 460TB)(BD):** Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içeren şişelere ekilen klinik örnekler, periyodik olarak $^{14}\text{CO}_2$ varlığı yönünden tetkik edilir. Oluşan $^{14}\text{CO}_2$ miktarı üreme indeksi (GI) olarak cihaz tarafından saptanır. GI: 500-800 arasına geldiğinde, duyarlılık testi yapılır. Birinci ve ikinci seçenek antitüberküloz ilaçlarla duyarlılık testi yapılabilir. Test edilecek ilaçları içeren Middlebrook 7H9 besiyerlerine 0,1 ml üreyen suşun bulunduğu şişeden ekim yapılır. İlaç içermeyen bir besiyerine de diğer besiyerlerindeki 100'de biri oranında ekim yapılır. Yüzde bir oranında basil içeren kontrol şişesi ve antibiyotik içeren diğer besiyeri şişelerinin günlük üreme indeksi (GI) ölçülür. Dünya Sağlık Örgütü'nün standart olarak önerdiği bir sistemdir. Günlük iş yükü fazlalığı ve radyoaktivite içeren atıklarının fazla olması dezavantajıdır. Geleneksel yöntemlerle ortalama 21 günde sonuç alınırken, bu sistemde sonuçlar 5-7 günde çıkmaktadır (41).
- 2. Floresan Kültür Sistemi (BACTEC MGIT 960)(BD):** Middlebrook 7H9 içeren, dip kısmı rutenyum kompleksi bulunan silikon tabaka ile kaplı tüplere ekim yapıldıktan sonra, bakterilerin üremesi nedeniyle azalan oksijen yoğunluğuna bağlı olarak, tüp dibine gönderilen ultraviyole ışınının floresan vermesiyle üremenin tespit edildiği bir sistemdir. Saptanan floresan miktarı, üreme indeksi olarak ele alınmakta ve kültür pozitifliği açısından değerlendirilmektedir (41, 42).

Duyarlılık testi için ilaçlı ve ilaçsız tüplere eşit miktarda bakteri ekimi yapılır bu tüplerdeki üreme karşılaştırılır. İlaçsız tüpte üreme saptandıktan sonra 48 saat içerisinde ilaçlı bir tüpte üreme olursa, bakterinin o ilaca dirençli olduğu kabul edilir. Üreme oranı ve saptama zamanı BACTEC 460 ile aynıdır. Sürekli monitorizasyon ile 960 tüpün aynı anda takibini sağlaması ve bilgisayar verileri vermesi nedeniyle iş yükü daha azdır. Kontaminasyon oranları yüksektir (41, 42).

3. Kolorimetrik Kültür Sistemi:

A. MB/BacT/ALERT MB (Organon Teknika, İrlanda): Kolorimetrik olarak besiyerinde oluşan CO₂ düzeyini ölçerek mikobakteri üremesini değerlendirir. Radyoizotop içermez. Tam otomatiktir, bilgisayar desteği mevcuttur. Duyarlılık testi yapılabilmektedir. Testlerin sonuçlanma süresi BACTEC 460'dan daha uzundur. Etambutol için duyarlılığı düşüktür (41).

B. Alamar Blue Oxidation-Reduction Indicator (Accumed, ABD): Alamar mavisi, bakteri üremesi sonucunda rengi pembeye dönüşen üreme indikatörü olarak kullanılan bir oksidasyon-redüksiyon boyasıdır. Middlebrook 7H9 besiyerinde üretilen *M. tuberculosis* suşundan, McFarland No 1'e göre bir süspansiyon hazırlanır ve buyyonda 1:5 oranında sulandırılır. Test edilecek antitüberküloz ilaçların da sıvı besiyerinde çift kat sulandırılmaları yapılır. Dilüe edilmiş ilaç içeren tüplere, dilüe edilmiş kültür süspansiyonlarından eklenir. Tüplerdeki son bakteri konsantrasyonu 6×10^5 cfu/ml'dir. Bu esnada ilaç içermeyen üç kontrol tüpüne de ekim yapılır ve tüm tüpler 35°C'de inkübe edilir. Kontrol tüpleri 7-10-14. günlerde test edilir. Test için kontrol tüpüne 0,02 ml Alamar mavisi solüsyonu ile 0,05 ml %5 Tween 20 ve Tween 80 eklenir ve iki saat 50°C'de inkübe edilir. Sürenin sonunda tüpün rengi maviden pembeye dönerse, ilaçlı besiyerlerine de aynı işlemler yapılır. Renk değişimini önleyen ilaç konsantrasyonu MİK değeri olarak alınır. Bu yöntem, kantitatif, radyometrik olmayan bir yöntem olup, yedi ile on gün arasında sonuç verir. Sonuçları, proporsiyon yöntemiyle %97 oranında uyumlu bulunmuştur (43).

4. Karbondioksit Oluşumunu Saptayan Sistem; ESP Culture System II (Accumed, ABD): Modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içeren şişelerde mikobakterilerin oluşturduğu gaz ve oluşan basıncı ölçerek üreme değerlendirmesi yapan, tam otomatik bilgisayar destekli bir sistemdir. İlaç

duyarlılık testi için, antibiyotik içeren şişelere ve bir kontrol şişesine aynı oranda ekim yapılır. Şişeler cihaza yerleştirilip, periyodik aralıklarla üreme açısından değerlendirilir. Kontrol şişesinde pozitif sinyalin görüldüğü tespit zamanı hesaplanır. Kontrol şişesinde pozitiflik görüldükten sonra ilaçlı şişeler en az üç gün daha takip edilir. İlaç içeren şişede hiç üreme olmazsa veya ilaçlı şişedeki tespit zamanı kontrol şişesinden 3 gün daha uzunsa izolat duyarlı kabul edilir. İlaçlı şişedeki tespit zamanı ile kontrol şişesindeki tespit zamanı arasında 3 günden az fark varsa izolat dirençli kabul edilir (41, 44).

- 5. E Test:** Primer antitüberküloz ilaçlara karşı MİK değerlerini belirlemek için kolay bir yöntemdir. Açık sistem olduğundan uygulama ve okunması sırasında dikkatli olunması gerekmektedir (41).

1.1.8.3. Bakteri Varlığına Dayanan Yöntemler

- 1. Lusiferaz Taşıyıcı Faj Yöntemi (LRP):** Bu yöntemde, ateş böceğinin lusiferaz genini taşıyan bir mikobakteri fajı kullanılmaktadır. Bu faj sayesinde ortamda bol miktarda lusiferaz üretilir. Ortama lusiferaz enziminin substratı olan lusiferin eklendiğinde, enzim lusiferini oksilusifenine dönüştürür ve ışık oluşur. Oluşan ışık miktarı, ortamdaki canlı mikobakteri sayısına bağlıdır. Antitüberküloz ilaçlara duyarlı bakteriler ışık oluşturmaz iken, dirençli olanlar ışık oluşturmaya devam eder (43).
- 2. Biyoluminesans Yöntemi: (Hücrel ATP Ölçümü):** İlaçlı tüplere bulanıklığı McFarland No 0,5'e ayarlanmış süspansiyondan ekim yapılır. İlaç içermeyen kontrol tüpleri ile birlikte 10 gün 35°C'de inkübe edilir. Sürenin sonunda, kültürlerden alınan bir miktar sıvı, 0,1 µL TRİS tamponu ve EDTA içeren cam tüplerde beş dakika kaynatılarak hücreler parçalanır, oda ısısında soğumaya bırakılır. Soğuduktan sonra, ATP ışımmasını sağlayan bir madde eklenerek luminometre ile incelenir. Oluşan ışık miktarı, hücrel ATP ile doğru orantılıdır. Ortamda ne kadar çok bakteri varsa ışık üretimi o kadar fazladır. Duyarlı olan izolatların bulunduğu tüplerde ışık üretimi olmaz. ATP aktivitesinin kontrole göre %40 veya daha da az olması, o ilaca karşı duyarlılığı gösterir (43).
- 3. Flow Sitometri Yöntemi:** Flow sitometri, bir sıvı akımı içinde tek tek geçmekte olan hücreler veya biyolojik partiküllerin, fizik ve kimyasal özelliklerini sensörler aracılığıyla ölçebilen bir yöntemdir. Bu yöntemde, *M. tuberculosis*'in florosein

diasetat (FDA)'ı hidrolize etmesi sonucu oluşan, floresan veren mikobakterilerin flow sitometrik analizle saptanması esastır. Mikobakteri içeren Middlebrook 7H9 besiyerlerine çeşitli konsantrasyonlarda antibiyotik ilave edilir. Antibiyotiksiz bir besiyeri kontrol amacıyla kullanılır. 24-48 saatlik bir inkübasyon sonrası, ortama FDA eklenir. Mikobakterilerin FDA'yı hidroliz etmesi sonucu oluşan floresan flow sitometri ile saptanır. Antibiyotiklere duyarlı mikobakteriler FDA'yı daha az hidroliz eder. (43).

1.1.8.4. Genotipik Yöntemler

Mycobacterium tuberculosis, yavaş üreyen bir mikroorganizma olduğu için klasik kültür besiyerleri ile yapılan duyarlılık test yöntemleri uzun zaman almaktadır. Moleküler tanı yöntemleri, ilaç direncinden sorumlu mutasyonların belirlenmesini sağlamakta ve ilaç duyarlılığını hızlı bir şekilde belirleyebilmektedir. Rutin uygulamalarda RİF için rpoB ve INH için katG gen mutasyonları ile ilgili kitler mevcuttur (Genotype MTBDR; Hain Lifescience, Almanya). Pirazinamid için de çalışmalar devam etmektedir. (45).

Rifampine dirençli izolatların yaklaşık %90'ında INH direnci de bulunmaktadır. RİF direncinin, INH direncinin de bir göstergesi olduğu söylenebilir. Bu nedenle pratik uygulamalarda moleküler teknikler çoğu kez RİF direncinin saptanması amacıyla kullanılmaktadır (45,46).

İlaç direncinin saptanmasında kullanılan moleküler yöntemlerin çoğu üç basamaktan oluşmaktadır (46):

1. **DNA eldesi.** Mekanik parçalama ve kaynatma gibi basit teknikler bile genomik DNA'nın eldesi için yeterli olmaktadır.
2. **Hedef DNA'nın amplifikasyonu.** Bu amaçla çoğu kez PZR kullanılmaktadır.
3. **Mutasyonların saptanması.** Uygun primerle amplifiye edilen hedef DNA'daki mutasyonlar aşağıdaki çeşitli yöntemlerden biriyle saptanır.

DNA Dizi Analizi: Mutasyonları saptamak için en dolaysız ve güvenilir yöntemdir. Günümüzde DNA dizi analizi amacıyla Sanger'in zincir sonlandırma temeline dayalı dideoksinükleotid yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntem manuel ve otomatize sistemlere uyarlanmıştır (46)

Line Probe Assay (Solid Faz Hibridizasyon): Line Probe Assay (LIPA) hızlı RİF direnci saptamak amacıyla geliştirilmiş bir kittir. Yöntem revers

hibridizasyon temeline dayanmaktadır. LIPA yönteminde RIF direncinden sorumlu rpoB geninin biyotinle işaretlenmiş PZR ürünleri denatüre edilerek nitroselülöz şerit üzerine yerleştirilmiş 10 farklı özgül proba hibridize edilmektedir. Oluşan hibridler alkalin fosfatazla konjuge edilmiş streptoavidin ve kromojen substrat eklenerek saptanmaktadır. Genotype MTBDR (Hain Lifescience, Almanya), aynı teknoloji ve test prensibine bağlı olarak geliştirilen ve RIF ve INH ilaçlarına karşı oluşan mutasyonları tespit edebilen bir üründür (46, 47).

RNA/RNA Mismatch Analiz: Yöntem, RNA'nın RNazA enziminin yıkıcı etkisine dayanıklı olması temeline dayanmaktadır. Yöntem beş aşamadan oluşur. Test edilen suş ile duyarlı referans suşun hedef DNA'larının RNA polimeraz enzimi için promoter diziler de içeren özgül primerler kullanılarak PZR ile amplifikasyonu birinci aşamayı oluşturur. Daha sonra, RNA polimeraz ile transkripsiyon, hibridizasyon, RNA/RNA dubleksinin eşleşmenin olmadığı mismatch noktasından RNazA ile kesilmesi ve son olarak agaroz jel elektroforezi ile işlem sonlanır. Elektroforezde dirençli kökenlerde üç bantlı patern saptanır (46).

PZR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism): Yöntem, yüksek rezolüsyonlu, denatüre olmayan poliakrilamid jelde mutant ve doğal tip tek sarmallı DNA'nın farklı hareketlilik göstermesi temeline dayanır. Farklı nükleotid dizilerine sahip tek sarmallı DNA fragmanlarının katlanmaları farklı noktalardan olmaktadır. Katlanma yerlerinin değişmesi tek sarmallı DNA'nın tersiyer yapısını değiştirerek jel üzerindeki mobilitesini etkilemektedir. Doğal ve mutant suşlar farklı mobilite gösterirler (46).

Real-Time PZR: Bu yöntemde PZR sırasında oluşan ürünler özgül problemler veya çift sarmallı DNA'ya bağlanma özelliği olan boyalar (Sybergreen, etidyum bromid v.b.) yardımıyla saptanmaktadır. Real-time PZR'da oluşan ampikonların T_m (erime ısı) değerleri belirlenerek özgül mutasyonlar saptanabilmektedir. Real-time PZR'da saptama yayılan ışımının sistemin optik parçası ile okunması temeline dayanmaktadır. Ölçülen floresan PZR sırasında artan PZR ürününün miktarı ile orantılıdır. Sikluslar sırasında reporter boya yaydığı floresan, sistem tarafından kaydedilerek bilgisayar ortamında değerlendirilir ve kantite edilir. Yapılan çalışmalarda Real-time PZR ile aynı reaksiyon tüpünde RIF ve INH direncinden sorumlu rpoB ve katG mutasyonlarının başarıyla saptandığı bildirilmektedir (46).

DNA Microarray: Son yıllarda, küçük bir alanda çok sayıda oligonükleotid probun yoğun bir şekilde bulunduğu microarray'ler ile farklı DNA dizilerinin tek bir hibridizasyon basamağında incelenmesine olanak sağlayan çip teknolojileri geliştirilmiştir. Yöntem, PZR ile elde edilen floresanla işaretli amplikonların çok sayıda farklı oligonükleotid prob içeren alanda kendisine uyan proba hibridize olması temeline dayanmaktadır. Bağlı amplikonların yaydığı floresan sinyaller daha sonra optik tarayıcı ile saptanarak bilgisayar ortamında değerlendirilmektedir. RIF'e dirnçli *M. tuberculosis* kökenleriyle yapılan DNA microarray çalışmalarında DNA dizi analizi ile uyumlu sonuçlar alınmıştır. Farklı ilaç dirençlerini bir arada saptamaya uygun problemler içeren çipler geliştirilmeye çalışılmaktadır (46).

1.1.9. Tüberküloz Tedavisinde Kullanılan İlaçlar

Tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlar birini seçenek (primer) ve ikinci seçenek (sekonder) ilaçlar olmak üzere iki grupta incelenir.

1.1.9.1. Birinci Seçenek İlaçlar

İzoniazid, rifampin, streptomisin, etambutol ve pirazinamid bu gruptaki ilaçları oluşturur. Tüberkülozlu hastaların çoğu bu ilaçlarla başarılı bir şekilde tedavi edilir. Rutin uygulamada, ilaçlar günlük olarak tek dozda alınır. Tedaviye uyum problemine karşı doğrudan gözetimli tedavi gündeme gelmiş olup, intermitan tedavi rejimleri de geliştirilmiştir. İntermitan tedavi rejiminde ilaçlar, haftada iki veya üç farklı günde sorumlu bir elemanın gözetiminde verilir (48, 49).

1.1.9.2. İkinci seçenek İlaçlar

Bu grupta paraamino salisilik asit, sikloserin, etionamid, tiasetazon, viomisin, kapreomisin, kanamisin, amikasin, ofloksasin, siprofloksasin bulunur. Bu gruptaki ilaçlar daha az etkili, daha çok toksik ve daha zor tolere edilirler. Birinci seçenek ilaçlara dirençli tüberküloz hastalarına uygulanır (49).

İzoniazid: Kullanıma girmesinin üzerinden 40 yıldan fazla bir zaman geçmesine karşın tüberküloz basiline karşı en etkili tek ilaç olarak kalmıştır. Uyuyan bakteriler üzerinde bakteriyostatik, hızlı üreyen bakteriler üzerinde bakterisid etkilidir. Ayrıca makrofajlar ve kazeöz lezyonlar içine girebilmesi, iyi absorbe edilmesi, kolay alınması ve ucuz olması bu ilacı en önemli antitüberküloz ilaç yapmaktadır. Katalaz peroksidazı, nikotinamid adeninin dinükleotidi ve peroksidazları içeren bir

mekanizma ile izoniazid basilin içine alınır ve aktif ara ürünlerine parçalanır. Sonuçta hücrede hidrojen peroksit yıkımı yapılamaz ve bu madde toksik etkisiyle hücre harabiyetine neden olur. INH, ayrıca basilin hücre duvarının önemli bir yapı taşı olan mikolik asit sentezini de bozar. INH, dar spektrumludur, *M. tuberculosis*'den başka bakterilere etki etmez. Karaciğerde metabolize olur. Vitamin B6 (piridoksin) bileşiklerinin biyolojik fonksiyonlarını etkiler. Bunun sonucu, periferik nöropati ve anemiye yol açabilir. Bu nedenle beraberinde günde 6-10 mg vitamin B6 verilir (1, 48, 49).

Rifampin: *Streptomyces mediterranei*'den elde edilen rifamisin B'nin semisentetik bir derivativesidir. Tüberküloz tedavisinde INH'den sonra ikinci önemli ilaçtır. Hem hızlı çoğalan, hem de uyuyan bakterilere etkilidir. RNA'ya bağımlı DNA polimeraz enzimine bağlanarak, DNA'nın RNA kripsiyonuna engel olur. RİF kavite içi ve kazeöz odakta hücre içi yavaş üreyen basillere etkilidir. RİF karaciğer mikrozomal enzimlerini güçlü bir şekilde indükler ve pek çok ilacın yıkımını artırır, etkisini azaltır. En önemli yan etkisi hepatotoksitedir. Antirifampisin antikor geliştirmesi nedeniyle alerjik trombositopeniye neden olabilir. İdrar, ter, gözyaşı ve lensleri portakal rengi kırmızıya boyar (49).

Etambutol (EMB): Sentetik olarak elde edilen bakteriyostatik etkili bir ilaçtır. Etkinliği INH ve RİF'e göre düşük olup, ilaca karşı daha düşük düzeyde direnç gelişir. Etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, EMB'nin arabinozil transferaz enzimini inhibe ederek, arabinogalaktan ve lipoarabinomannanın hücre duvarına taşınmasını engellediği bilinmektedir. Çoğalma dönemindeki bakteriler üzerine etkilidir. Yan etkileri oldukça azdır. Nadiren, retrobulber nörit, hiperürisemi ve gut artriti yapabilir (46, 49).

Streptomisin (SM): Aminoglikozid grubundan, ribozomların 30S alt grubunu etkileyerek ribozom fonksiyonlarını ve dolayısıyla protein sentezini bozar. SM, in vitro olarak küçük konsantrasyonlarda mikobakteriler üzerine bakteriyostatik, yüksek konsantrasyonlarda bakterisid etki yapar. Biyolojik zarları ve hücre duvarını geçemez. Hücre içindeki basillere etkisiz olup, kaviteler içine ve kazeöz odaklara nüfuz edebilir. Ciddi yan etkileri nedeniyle klinik kullanımı kısıtlıdır. Nefrotoksik ve ototoksiktir. Anafilaksi, nöromusküler blokaj, agranülositoz, hemolitik anemi diğer yan etkileridir (49)

Pirazinamid (PZA):Nikotinamidin sentetik bir analogudur. PZA hücre içi bir nikotinamidaz yardımı ile pirazinoik asite dönüşerek etki eder. Hem uyuyan, hem çoğalan bakteriler üzerine etkili, bakterisidal bir ilaçtır. Monositler ve makrofajlar içindeki yavaş çoğalan mikobakteriler üzerinde en etkili tüberkülosiddir. INH ve RİF'e ilave olarak PZA'nın kullanılması akciğer tüberkülozunun altı ayda tedavisini mümkün kılmaktadır. Karaciğerde metabolize olup, böbreklerle atılır. PZA'nın hepatotoksik etki yapma potansiyeli vardır. Ürik asit retansiyonu, fotosensitivite ve döküntü de yapabilir (49).

Ülkemizde olduğu gibi izoniazid direncinin %4'ten yüksek olduğu yerlerde tedavinin başlangıç döneminde dört ilaç (genellikle 2 ay), idame döneminde ise en az iki ilaç (genellikle 4 ay) kullanılmaktadır. Ülkemizde, Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi uygulanarak, aşağıdaki tedavi şemaları uygulanır (50):

Standart Tedavi	: 2 ay HRZE (ya da HRZS) + 4 ay HR
Çocuk TB	: 2 ay HRZ + 4 ay HR
Menenjit, Miliyer TB	: 2 ay HRZE (ya da HRZS) + 7-10 ay HR
Tedaviyi Terkten Dönen	: 2 ay HRZES + 1 ay HRZE + 5 ay HRE
Nüks Olgu	: 2 ay HRZES + 1 ay HRZE + 5 ay HRE

(H:İzoniazid, R:Rifampisin, Z: Pirazinamid, E: Etambutol, S: Streptomisin)

1.1.10. İlaç Direnci

1.1.10.1. İzoniazid Direnci

INH direnci en sık karşılaşılan antitüberküloz ilaç direncidir. Sadece INH'a dirençli tüberkülozun tedavisi nispeten kolaydır. Standart tedavi rejimi %98 oranında tedavi başarısı sağlamaktadır. INH'a dirençli klinik izolatların yaklaşık %50'sinde katalaz-peroksidazı kodlayan katG geninde delesyonlar ve anlamsız mutasyonlar saptanmıştır. INH, mikobakteriyel katalaz-peroksidaz ile reaksiyon sonucu aktive edilmesi gereken bir ön ilaçtır. Katalaz- peroksidazdaki mutasyonlar sonucu inaktif enzim ortaya çıkar ve bu enzim ön ilacı aktive etmez ve yüksek derecede INH direncine yol açar. Bu mekanizma en sık rastlanan direnç mekanizmasıdır. INH dirençli kökenlerde katG geninde en sık rastlanan değişiklik 315. kodonda Ser315Thr mutasyonudur (51, 52)

KatG negatif INH dirençli suşlarda, alkilhidroperoksid redüktazı kodlayan ahpC geninin promoter bölgesinde mutasyonlar bulunur. Alkilhidroperoksid

redüktazın aşırı ekspresyonu, katalaz-peroksidaz eksikliğini kompanse ederek, basili toksik radikallerin etkisine karşı korur (51, 52).

Etionamid, tüberküloz tedavisinde ikinci seçenek ilaç olarak kullanılmaktadır. Etionamidin mikolik asit sentezini inhibe ederek, etkili olduğu düşünülmektedir. Bitişik açık okuma çerçevesinden oluşan iki genlik mabA-inhA operonun kodladığı ürünler hem INH, hem de etionamid direncine yol açmaktadır. MabA proteininin 3-ketoaçil-Açil Taşıyıcı Protein (ACP)- redüktaz, InhA proteininin enoil-ACP redüktaz enzimlerini kodladığı düşünülmektedir. InhA proteininin NADH bağlayan bölgesinde oluşan amino asit değişiklikleri mikolik asit biyosentezinin inhibisyonunu önleyerek INH direncine yol açmaktadır. Klinik izolatların %25'inde inhA geninde mutasyonlar saptanmıştır. İzoniazide dirençli kökenlerde mabA geninde herhangi bir mutasyon saptanmamıştır (46, 51, 52).

Mikolik asit sentezinde rol alan bir enzim olan β -ketoaçil ACP sentetaz, kasA geni tarafından kodlanır. kasA geninde mutasyon, hem INH'a dirençli, hem de INH'a duyarlı suşlarda görülmüştür. INH dirençli suşların bazılarında kasA mutasyonunun ilaveten, katG veya inhA genlerinde de mutasyona rastlanmıştır (46, 51, 52).

Son zamanlarda, mikotiol biyosentezinde rol alan bir enzimi kodlayan mshA geninde mutasyonların, in vitro INH ve EMB direncine yol açtığı gösterilmiştir. Ancak, bu genin klinik dirençteki rolü henüz tam aydınlatılamamıştır (53).

1.1.10.2. Rifampin Direnci

Mikobakterilerde RİF'e direnç gelişimi, diğer bakterilerde olduğundan daha yavaştır. RİF'e dirençli *M. tuberculosis* kökenlerinin %95'inden fazlasında RNA polimeraz enziminin β -alt ünitesini kodlayan rpoB geninin 507-533. kodonları arasındaki 81 baz çifti (bç) uzunluğundaki RİF direnç belirleme bölgesi (rifampin resistance determining region, 'RRDR') veya 'hot spot' adı verilen bölgede yanlış anlamlı mutasyonlar, küçük delesyon veya insersiyonların olduğu gösterilmiştir. Dirençli kökenlerde mutasyonlar tek bir kodonda bir nükleotidin değişmesi şeklinde olabileceği gibi bir kodonda birden fazla nükleotidin değişmesiyle ya da birden fazla kodonu kapsayan ikili, üçlü hatta dörtlü kodon mutasyonları şeklinde de olabilmektedir. Kodon 531, 526 ve 513'deki mutasyonlar yüksek düzeyde RİF

direncine neden olurken, 514 veya 533. kodonlarda görülen mutasyonlar genellikle düşük düzey RİF direncine yol açmaktadır (46).

RİF dirençli kökenlerde rifabutin, rifapentin ve KRM-1648 gibi diğer rifamisinlere karşı duyarlılıklar da araştırılmıştır. RİF'e dirençli suşların tümünde rifapentine de çapraz direnç görülmekte ve her iki antibiyotik için de aynı MİK değerleri saptanmaktadır. Buna karşın, RİF'e dirençli kökenlerin rifabutin ve KRM-1648'e duyarlı olabildiği bilinmektedir (46).

1.1.10.3. Etambutol Direnci

Arabinozil transferaz enzimini kodlayan üç gen embC, embA ve embB genleri 10kb'lik bir operon (embCAB) oluşturacak şekilde organize olmuştur. Etambutole dirençli *M. tuberculosis* kökenlerinin önemli bir bölümünün embB geninin kodladığı EmbB proteininde, duyarlı olan kökenlerde bulunmayan amino asit değişiklikleri bulunmaktadır. EmbB proteininde saptanan çok sayıda amino asit değişikliğinin EMB direncine yol açtığı göz önüne alınırsa, embB genindeki mutasyonların ilaç direncinin göstergesi olduğu söylenebilir. EMB'e dirençli kökenlerde embB geninde en sık rastlanan mutasyonlar 306. kodondaki anlamsız mutasyonlardır (46).

1.1.10.4. Streptomisin Direnci

Streptomisin bakteriyel ribozomun 30S alt ünitesine bağlanarak, translasyon esnasında mRNA mesajının yanlış okunmasına neden olur ve bu sayede protein sentezini inhibe eder. SM'in asıl etki yeri ribozomal S12 proteini ve 16SrRNA'dır. SM direnci, rpsL geninin kodladığı S12 proteini ve rrs geninin kodladığı 16SrRNA'da mutasyonlar sonucu meydana gelmektedir. SM direncinin önemli bir bölümünden rpsL genindeki nokta mutasyonlar sorumludur. Lys43Arg SM'e dirençli kökenlerde en sık rastlanan mutasyondur ve yüksek düzey SM direncine yol açar. 16SrRNA'yı kodlayan rrs genindeki nokta mutasyonları ise genellikle 530 ve 915. nükleotidlerin çevresindeki bölgelerde kümelenmişlerdir (46, 51).

Kanamisin ve amikasin gibi aminoglikozidlere karşı, rrs geninde 1400. kodondaki mutasyonlar sonucu yüksek düzey direnç görülür. SM ile amikasin ve kanamisin arasında çapraz direnç görülmez ama amikasin ve kanamisin arasında çapraz direnç vardır (46, 51).

1.1.10.5. Pirazinamid Direnci

Pirazinamidin fagolizozomların asidik ortamında tüberküloz basilinin ürettiği pirazinamidaz ile aktif şekli olan pirazinoik aside dönüşerek etki ettiği düşünülmektedir. Pirazinamide dirençli *M. tuberculosis* izolatlarında pirazinamidaz aktivitesinin olmaması da bu hipotezi desteklemektedir. PZA'ye dirençli suşların %72-97'sinde pirazinamidaz enzimini kodlayan *pncA* geninde çeşitli tipte mutasyonların olduğu bilinmektedir. Mutasyonların çok fazla değişkenlik göstermesi ve gen boyunca dağılmış olması, *pncA* dışındaki direnç genlerinde görülmeyen bir durumdur. *pncA* geninin üç bölgesinde (3 ile 17, 85 ve 132 ile 142. kodonlar arasında) belli bir kümeleşme görülmektedir. Bu bölgede anlamsız mutasyonların yanında, insersiyon ve terminasyon mutasyonlarının da olabileceği bilinmektedir (46).

1.1.10.6. Florokinolon Direnci

Tüberküloz tedavisinde ikinci seçenek ilaç olarak kullanılan siprofloksasin ve ofloksasin, sentetik nalidiksik asit türevleridir. Florokinolonların hedefi DNA giraz enzimidir. DNA giraz *gyrA* ve *gyrB* genleri tarafından kodlanan iki adet A ve iki adet B alt ünitesinden oluşan heterotetramer yapıda bir proteindir. Florokinolonlar arasında çapraz direnç sıktır. *gyrA* geninin kinolon direnci belirleyen bölgesindeki (QRDR), özellikle 90, 91, 94. kodondaki mutasyonlar kinolon direncine yol açmaktadır. *M. tuberculosis* izolatlarında görülen kazanılmış florokinolon direncinin %75-94'ünden QRDR bölgesindeki *gyrA* mutasyonları sorumludur. İlaça geçirgenliğin azalması ve aktif ilaç pompalanması florokinolon direncine yol açabilen diğer mekanizmalardır (46, 51).

1.1.11. Tüberküloz Tedavisinde Bir Sorun Olarak İlaç Direnci

Birçok bakteride görülenin aksine *Myobacterium tuberculosis*'de plazmid veya transpozonlar aracılığıyla oluşan horizontal gen transferine bağlı direnç görülmemektedir. *M. tuberculosis*'de ilaç direnci her antibiyotik için farklı sıklıkta olmak üzere spontan kromozomal mutasyonlar sonucunda ortaya çıkmaktadır. Örneğin, INH'e spontan direnç görülme sıklığı 10^{-6} , RIF'e direnç görülme sıklığı 10^{-8} 'dir. Bir hastanın akciğerindeki tüberküloz kavitesi 10^9 kadar bakteri içerir. Bu durumda teorik olarak kaviter lezyonların içinde çok az sayıda da olsa genetik olarak

ilaç direnci bulunan basiller bulunabilmektedir. Fakat ilaca dirençli bu mutantlar, duyarlı basiller arasında dilüe olmaktadır. Buna karşın özellikle büyük kaviter lezyonları olan hastalarda tedavide tek bir antibiyotiğin kullanılması ya da düzensiz antibiyotik kullanımı ile duyarlı mikroorganizmalar baskılanmakta ve ilaca dirençli suşlar seçilerek bakteri topluluğu içinde baskın duruma geçmektedirler. Başka bir deyişle normal şartlarda doğada var olan bir fenomen, insanoğlu tarafından çoğaltılmaktadır. Bir kavitenin içerebileceği en fazla basil sayısının 10^9 ve bir basilde hem INH hem de RİF direncinin bir arada olma olasılığının 10^{-14} ($10^{-6} \times 10^{-8}$) olduğu göz önünde bulundurulursa, teorik olarak duyarlı bir bakteri topluluğunda çoğul ilaç direnci gelişme olasılığının olmadığını söylemek yanlış olmaz. Çok ilaca direnç hemen daima belli bir antibiyotiğe dirençli topluluktaki basillerde yeni mutasyonlarla oluşan mutant kökenlerin, antibiyotik baskısıyla seçilip topluluk içinde baskın duruma geçmesi sonucunda gelişmektedir. DSÖ'nün tanımlamasına göre "çok ilaca dirençli tüberküloz", en az izoniazid ve rifampinin ikisine birden dirençli suşlarla oluşan tüberkülozdur (46, 51, 54).

Geçmişte tedavi almış hastalarda gelişen dirence kazanılmış direnç ya da sekonder direnç, oluşan dirençli suşların başka birine bulaştırılıp, bu kişinin hasta olmasıyla oluşan dirence ise primer ilaç direnci denir (46).

Son yıllarda, ilaç direncini belirlemek için kullanılan, teknik ve güvenlik açısından kolaylıklar taşıyan radyometrik veya olmayan, yarı otomatik veya tamamen otomatize sistemler geliştirilmiştir. Buna rağmen pozitif bir kültür sonucu elde edildikten itibaren direnci belirlemek için gereken süre hala 7-10 gün civarındadır. İlaç direncini daha hızlı belirleyebilmek için geliştirilen moleküler metodlar, direkt olarak hasta örneklerinden bir gün içinde sonuç verebilmektedir. Bu moleküler metodlardan biri olan Genotype MTBDR yöntemi *M. tuberculosis* kompleks suşlarında izoniazid ve rifampin direncine neden olan rpoB ve katG mutasyonlarını tespit edebilen revers hibridizasyon esasına dayalı bir DNA strip yöntemidir. *M. tuberculosis* kompleks suşlarında rifampin direncinin yaklaşık %95'inden rpoB geninin 81bç'lik (baz çifti) bölümündeki mutasyonlar sorumludur. İzoniazid direncine neden olan mutasyonlar çeşitlilik göstermesine rağmen direncin yaklaşık %90'undan katG ve inhA bölgesindeki mutasyonlar sorumludur (5, 55-57).

Duyarlı tüberküloz basilleriyle enfekte hastalarda kür oranı %100'e yakınken ÇİD TB'da kür oranları %70'lerdedir. Eğer ÇİD TB'un yayılmasını önlemek istiyorsak etkenin izolasyonu, tipinin tayini ve ilaç direnci için harcanan ve klasik metodlarla haftalar alan süreyi kısaltmamız gerekmektedir. Hızlı moleküler tanı yöntemleri bu yönde mikrobiyoloji laboratuvarlarına büyük kolaylıklar getirmektedirler. Genotype MTBDR yöntemi kullanımı pratik, günlük rutin çalışmada kolay uygulanabilir ve aynı gün içinde sonuç alınabilen bir yöntemdir (58).

Bu çalışmanın amacı, Genotype MTBDR yönteminin hızlı antibiyotik tanısındaki değerini belirlemektir. Bu amaçla, Genotype MTBDR ve referans yöntem olan BACTEC 460 TB yöntemleriyle, *M. tuberculosis* kompleks suşlarının rifampin ve izoniazid direnci araştırılacaktır. Genotype MTBDR yöntemi ile elde edilen sonuçlar BACTEC 460TB ile elde edilenlerle karşılaştırılacaktır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Ocak 2008-Aralık 2010 tarihleri arasında, Fırat Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Tüberküloz Laboratuvarına gönderilen rutin örneklerden izole edilen 50 *Mycobacterium tuberculosis* kompleks suşu çalışmaya alındı.

Suşlar Middlebrook 7H9 besiyerinde +4°C’de, altı ayda bir pasajlar yapılarak saklandı. Çalışma sırasında Löwenstein–Jensen katı ve BACTEC 12B (Becton Dickinson, ABD) besiyerlerine subkültürleri yapılarak canlandırıldı. BACTEC 460TB (Becton Dickinson, ABD) ve Genotype MTBDR (Hain Lifescience, Almanya) yöntemleriyle INH ve RİF duyarlılıkları çalışıldı.

2.1. BACTEC 460TB Antibiyotik Duyarlılık Testi

2.1.1. Antibiyotik solüsyonlarının hazırlanması:

BACTEC SIRE (Becton Dickinson) kitinden INF ve RİF’in stok solüsyonları hazırlandı. Her liyofilize antibiyotik şişesinin kapağı alkollü pamukla silindi ve tüm şişelere 5 ml steril distile su eklenip çözündürüldü. Her antimikrobiyal ajan için tek bir konsantrasyon kullanıldı. Tablo 6’da antimikrobiyal ajanların dilüsyon şeması ve son konsantrasyonları görülmektedir. Stok solüsyonları parçalara bölünüp 2-8°C’de 3 gün veya -20’de duyarlılık testi yapılana kadar saklandı. .

Tablo 6. INH ve RİF için stok solüsyon ve BACTEC 12B’deki final konsantrasyonları

Antibiyotik	Şişedeki liyofilize miktar	Sulandırma sıvısı	Sulandırma sonrası konsantrasyon	BACTEC 12B’ye konulan miktar	BACTEC 12B’deki son konsantrasyon
INH	0,02 mg	5 ml	4 µg/ml	0,1 ml	0,1 µg/ml
RİF	0,4 mg	5 ml	80 µg/ml	0,1 ml	2,0 µg/ml

2.1.2. Antibiyotik içeren BACTEC 12B besi yerlerinin hazırlanması:

Her bir antibiyotik duyarlılık testi için üç adet 12B şişesi ve bir adet dilüsyon sıvısı (Becton Dickinson) şişesi hazırlandı. Şişelerin üzerine hasta numaraları ve çalışılacak antibiyotiklerin adları yazıldı. Tüberkülin enjektörü ile, daha önce hazırlanan stok solüsyonlardan, şişelerin birine 0,1 ml INH, birine de 0,1 ml RİF eklendi.

2.1.3. İnokulum hazırlanması:

Gerek subkültür yapılan, gerekse primer izolasyon şişesi kullanıldığında, günlük olarak GI değerleri okundu ve GI değeri 500-800 arası olan şişelerden antibiyotik duyarlılığı için kullanılacak 12B besiyerlerine 0,1 ml ekim yapıldı. GI değeri >800 olan şişeler, dilüsyon sıvısı ile 1/1 oranında dilüe edildi ve bu süspansiyon inokulum için kullanıldı. Şişelerin lastik kapakları alkollü pamukla dezenfekte edilip, inokulum için kullanılacak besiyerlerinden, antibiyotik içeren besiyerlerine 0,1ml inokule edildi. Dilüsyon sıvısına da 0,1 ml inokulum eklenerek 1/100 oranında sulandırıldı. Daha sonra bu solüsyondan 0,1 ml antibiyotik içermeyen BACTEC 12B şişesine inokule edildi. Bu şişe kontrol şişesi olarak kullanıldı. Şişeler kapakları önce dezenfektan sonra alkol içeren pamukla silindikten sonra, 37°C'de etüvde inkübe edildi. İnkübasyon süresince şişeler her gün aynı saatte (\pm 2 saat) BACTEC 460 (Becton Dickinson) cihazında okutulup, günlük GI değerleri not edilmiştir.

2.1.4. Sonuçların değerlendirilmesi:

Günlük okutulan GI ile bir önceki günün GI'sı arasındaki fark Δ GI olarak belirtilmektedir. Negatif Δ GI üremede bir azalmayı gösterirken, pozitif Δ GI üremede artışı göstermektedir. Kontrol şişesinin GI'sı 30'a ulaştığında sonuçlar yorumlandı.

Δ GI kontrol > Δ GI ilaç \rightarrow Duyarlı

Δ GI kontrol < Δ GI ilaç \rightarrow Dirençli

Δ GI kontrol = Δ GI ilaç \rightarrow Sınırdaki

Sınırdaki sonuçlar söz konusuysa, şişeler 2-3 gün daha okutuldu veya test tekrar edildi.

2.2. Genotype MTBDR Yöntemi

Genotype MTBDR testi, DNA-strip teknolojisini baz alan ve örneklerden *M. tuberculosis* kompleksinin moleküler genetik identifikasyonuna ve rifampin ve/veya izoniazid direncinin tespitine olanak veren bir yöntemdir. RIF direncinin identifikasyonu, rpoB genindeki en anlamlı mutasyonların tespiti ile yapılır. INH direncinin tespiti için katalaz peroksidazı kodlayan katG geni incelenir. İşlemin tamamı üç basamaktan oluşur:

1. Kültürlerden DNA'nın izolasyonu

2. Biotinlenmiş primerlerle multipleks amplifikasyon
3. Revers hibridizasyon

Hibridizasyon da aşağıdaki basamakları içerir:

1. Amplifikasyon ürünlerinin kimyasal denatürasyonu
2. Tek zincirli, biotinle işaretli ampikonların membrana bağlı problara hibridizasyonu
3. Stringent solüsyonu ile yıkama
4. Streptavidin/alkalin fosfataz (AP) konjugatının ilavesi
5. AP aracılı boyama reaksiyonu
6. Band paternlerinin hızlı yorumu

2.2.1. DNA ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu BACTEC 12B sıvı besiyerinden DNA Ekstraksiyon kiti (Invitek, Almanya) ile üreticinin direktifleri doğrultusunda Sınıf II güvenlik kabininde aşağıdaki gibi yapıldı.

1. 12B şişesinin lastik kapağı dezenfektanlı ve alkollü pamukla silindikten sonra, tek kullanımlık tüberkülin enjektörü ile 1 ml örnek alınıp 1,5 ml'lik ependorf tüpüne konuldu.
2. 15 dakika 10000 rpm'de santrifüj edilip, bakteriler çöktürüldü.
3. Üstteki sıvı atılıp, 1,5 ml'lik Ekstraksiyon Tube L'ye aktarıldı.
4. Üzerine 400 µl Resuspension Buffer R eklenip önce 65°C'de 15 dakika çalkalamalı olarak inkübe edildi.
5. Daha sonra tüpler 95°C'de 5-10 dakika inkübe edildi.
6. Bu arada Elution Buffer 65°C'de ön ısıtmaya alındı.
7. Ardında tüp 13 000 rpm'de 2 dak. Santrifüj edildi.
8. Üstte kalan sıvı yeni 1,5 ml'lik tüpe aktarıldı.
9. 400 ml Binding Buffer B6 eklendi ve vortekslendi.
10. Bu arada bir spin kolon 2 ml'lik ependorf tüpüne yerleştirilip, süspansiyon spin kolona aktarıldı.
11. 1 dak.lık inkübasyon sonrası, 10 000 rpm'de 1 dak. santrifüj edildi.
12. Spin kolon yeni bir tüpe aktarılıp, üzerine 500 µl Wash Buffer I eklendi.
13. 10 000 rpm'de 1 dak. santrifüj edilip, spin kolon yeni bir tüpe aktarıldı.

14. Üzerine 700 µl Wash Buffer II eklenip, 10 000 rpm’de 1 dak. santrifüj edildi.
15. Spin kolon yeni bir tüpe aktarılıp 12 000 rpm’de, alkolün uzaklaştırılması için 3 dak. santrifüj edildi.
16. Sonra spin kolon yine başka bir tüpe aktarılıp, üzerine daha önceden ısıtılmış Elution Buffer’den 200 µl eklendi.
17. 1 dak. inkübasyon sonrası, 8000 rpm’de 1 dak. santrifüj edildi.
18. Spin kolon atıldıktan sonra ekstraksiyon tamamlandı.

2.2.2. Amplifikasyon

Amplifikasyon, üretici firmanın direktifleri doğrultusunda, bir kısmı Genotype MTBDR kiti ile birlikte temin edilen malzemelerle aşağıdaki gibi yapıldı.

Önce örnek başına 45 µl PZR karışımı hazırlandı ve üzerine 5µl ekstrakte edile DNA’dan eklendi. PZR karışımına konan reaktifler ve miktarları aşağıdaki tablo 7’de gösterilmektedir. PZR karışımı hazırlandıktan sonra bir “thermal cycler” ile (Applied Biosystems, ABD) üretici firmanın önerdiği amplifikasyon protokolü uygulandı.

Tablo 7. PZR karışımı hazırlanması

Reaktif	Miktarı
*PN miks (Primer Nükleotid Miks)(PNM)	35 µl
10xPCR Buffer (Fermentas, Kanada)	5 µl
MgCl ₂ 25mM(Fermentas, Kanada)	4 µl
Su	1 µl
HotStart Taq DNA Polimeraz 500U (Fermentas, Kanada)	0,2 µl
Örnek	5 µl
Toplam PZR reaksiyon hacmi	50 µl

*Kitle birlikte bulunur.

Amplifikasyon protokolü:

5 dak. 95°C → 1 siklüs
 30 san. 95°C 10 } siklüs
 2 dak. 58°C
 25 san. 95°C
 40san. 53°C 0 } siklüs

40 san. 70°C

8 dak. 70°C → 1 siklüs

Amplifikasyon sonrası %2'lik agaroz jel ile PZR ürünlerinin jel elektroforezi yapıldı.

2.2.3. Hibridizasyon

Ön İşlemler

Hibridizasyon için bir çalkalamalı su banyosu (Memmert, Almanya) kullanıldı

- Su banyosunun ısısı 45±1°C'ye ayarlandı
- Hibridizasyon (HYB) ve Stringent (STR) solüsyonları kuru ısı bloğunda 37-45°C'ye kadar ısıtıldı
- Konjugat (CON-C) ve Substrat (SUB-C) +4°C'de korunurken diğer tüm solüsyonlar oda ısısında bekletilerek ısıtıldı
- Falkon tüpleri içinde CON-C ve SUB-C konsantreleri kendi sulandırma solüsyonları ile 1:100 oranında sulandırıldı.
 - CON-C, CON-D ile
 - SUB-C, SUB-D ile

Her bir strip için;

10 µl konsantre+ 1 ml (1000 µl) sulandırma solüsyonu

1. 20 µl denatürasyon (DEN) solüsyonu her tray'in (striplerin yerleştirildiği plak) örneklerin çalışılacağı kuyucukların köşelerine pipetlendi.
2. 20 µl PZR ile çoğaltılmış örnekler DEN solüsyonuna pipetlenerek karıştırılıp ve oda sıcaklığında 5 dak. inkübe edildi.
3. Tray'in örneklerin konulduğu kuyucuklarına dikkatlice önceden ısıtılmış 1 ml HYB solüsyonu konulup, homojen renk elde edilene kadar yavaşça çalkalandı.
4. Stripler dikkatlice trayin kuyularına yerleştirildi.
5. Tray önceden hazırlanan su banyosunda 45°C'de 30 dak. inkübe edildi.
6. HYB solüsyonu pasteur pipeti kullanılarak tamamen kuyucuklardan boşaltıldı.
7. Her bir kuyucuğa 1 ml STR solüsyonu eklendi ve 15 dak. 45°C'de çalkalanarak inkübe edildi.

8. STR solüsyonu, kuyucuklardan tray atık kabına komple şekilde dökülerek boşaltıldı ve kuyucuklar içinde kalan bir miktar sıvı da yine tray ters çevrilerek üst ucu kurutma kağıdına emdirilerek uzaklaştırıldı.
NOT: Bu basamaktan itibaren oda sıcaklığında çalışıldı.
9. Her bir kuyucuktaki strip üzerine 1 ml Rinse solüsyonu (RIN) eklenerek 1 dak. çalkalanarak yıkandı. Daha sonra tray ters çevrilerek sıvı döküldü.
10. Kuyucuklardaki striplerin üzerine 1 ml daha önceden sulandırılmış CON-C eklendi ve 30 dak. çalkalamalı olarak inkübe edildi.
11. CON-C boşaltıldı ve her strip 2 kez 1 ml RIN solüsyonu ile 1 kez de distile su ile 1'er dakika çalkalanarak yıkandı.
12. Her strip üzerine 1 ml daha önceden sulandırılmış Substrat solüsyonu eklendi ve karanlıkta, bantların oluşmasına göre 3 ile 20 dak. arasında çalkalamadan inkübe edildi.
13. Bant oluşma işlemi, striplerin distile su ile iki kez yıkanması ile sonlandırıldı.
14. Son olarak, stripler kuyucuklardan alınarak kurutma kağıdının arasına konularak kurutulup, değerlendirme aşamasına geçildi.

2.2.4. Sonuç Değerlendirme

Çalışmanın kabul edilebilir olması için aşağıdaki koşulların sağlanması gerekmektedir.

1. Conjugate control bandı (konjugat kontrol): Konjugat kontrolü, strip üzerinde konjugat bağlanma ve substrat reaksiyonunun verimliliğini göstermektedir. Konjugat kontrol bandının oluşması gerekir.
2. Universal control bandı (Universal kontrol): Bilinen tüm mikobakterileri ve yüksek G+C içeriği olan gram pozitif bakterileri tanımlar.
3. *M. tuberculosis* kompleks bandı (TUB): *M. tuberculosis* kompleks üyelerinden oluşan ampikonların varlığında band paterni oluşur. Eğer TUB bölgesinde band oluşmamışsa test edilen bakteri *M. tuberculosis* kompleks olarak değerlendirilmez.
4. rpoB ve katG bandı: İlgili gen bölgelerini göstermektedir. Vahşi (Wild) tip bölgesinde oluşan bandlar duyarlılığı, mutasyon (MUT) bölgelerinde oluşan

bandlar ilaç direncini belirlemektedir. Vahşi tip bölgesinde band oluşmaması örneğin direncini gösterir.

5. rpoB bandları: rpoB Uni bölgesi, genin rpoB'ye özgü bölgesini göstermektedir ve her zaman bu bölgede band oluşmalıdır. Beş farklı vahşi gen bölgesi (rpoB WT 1-5) ve dört adet mutant (rpoB MUT: D516V, H526Y, H526D ve S531L) bölgesi bulunmaktadır. Band şiddeti Universal kontrol band şiddeti kadar veya daha güçlü olan band paternleri değerlendirmeye alınır. Vahşi tip bölgesindeki tüm bandlar oluştuğunda çalışılan gen bölgesinde mutasyon yok demektir. En azından bir vahşi tip bölgesinde band oluşmaması, çalışılan örnekte rifampin direnci olduğunu göstermektedir.
6. katG bandları: katG Uni bölgesi, genin katG'ye özgü bölgesini göstermektedir ve her zaman bu bölgede band oluşmalıdır. katG vahşi tip probu 315. pozisyondaki INH direnç bölgesini saptamaktadır. İki katG mutant bandı, katG geninde sıklıkla rastlanan INH direnç mutasyonlarını saptamaktadır. Vahşi tip bölgesinde band oluştuğunda, diğer iki mutant bölgede band gözlenmeyecektir. Duyarlılığı gösterir. Vahşi tip bölgesinde band oluşmaması çalışılan örnekte INH direnci olduğunu göstermektedir. Eğer direnç bu iki INH mutasyon bölgesinden kaynaklanıyorsa (S315T1/2), vahşi tip bölgesinde band oluşmayacak, ancak mutant iki bölgede (katG MUT1-MUT2) band gözlenecektir. Eğer INH direnci iki mutant gen bölgesinden değil de vahşi tip gen bölgesinin olduğu yerden kaynaklanıyorsa ne vahşi tip prob, ne de iki mutant prob bölgesinde band gözlenmeyecektir.

2.3. Kalite Kontrol

Kalite kontrol için *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), RİF dirençli *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 35838 ve INH dirençli *Myobacterium tuberculosis* ATCC 35822 suşları kullanıldı.

2.4. İstatiksel Analizler

Veriler SPSS for Windows (version11.0) paket programı kullanılarak bilgisayar ortamına aktarıldı. Ortalama değerler aritmetik ortalama \pm standart sapma olarak gösterildi. Sayısal olmayan veriler ise % olarak ifade edildi ve istatistiksel değerlendirilmesi' ki kare' testi ile yapıldı.

3. BULGULAR

Bu çalışmada, Ocak 2008-Aralık 2010 tarihleri arasında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Tüberküloz Laboratuvarına gönderilen farklı rutin örneklerden izole edilen 50 *Mycobacterium tuberculosis* kompleks suşunun ilaç duyarlılıkları incelenmiştir. INH ve RİF duyarlılığı hem BACTEC 460TB, hem de Genotype MTBDR yöntemleriyle çalışılmıştır.

Çalışmaya alınan suşların ait olduğu hastaların 26'sının kadın (%52), 24'ünün erkek (%48) olduğu gözlenmiştir. Hastaların yaş ortalaması 52,5±3,0 (11-87)dir. Suşların %74'ü balgam örneklerine aittir. Çalışmaya alınan suşların izole edildikleri örneklere göre dağılımı Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8. Çalışmaya alınan suşların izole edildikleri örneklere göre dağılımı.

Hasta Örneği	N	%
Balgam	37	74
Bronkoalveoler lavaj	2	4
Doku	2	4
Apse	1	2
Plevra	4	8
Periton	1	2
İdrar	1	2
Sinovyal sıvı	1	2
Açlık mide sıvısı	1	2
Toplam	50	100

Çalışmaya alınan 50 suşun ait olduğu hastaların yaş ve cinsiyete göre dağılımı Tablo 9.'de gösterilmiştir.

Çalışmaya alınan 50 suşun BACTEC yöntemi ile 11'inde (%22) INH direnci, 3 suşta ise (%6) hem INH, hem de RİF direnci birlikte görülmüştür. Tek başına RİF direnci gösteren suşa rastlanmamıştır. Duyarlılık sonuçları Tablo 10'da görülmektedir.

Tablo 9. Çalışmaya alınan 50 suşun ait olduğu hastaların yaş ve cinsiyete göre dağılımları.

Yaş Grupları	Kadın		Erkek		Toplam	
	N	%	N	%	N	%
0-15	1	2	1	2	2	4
16-25	2	4	4	8	6	12
26-35	4	8	2	4	6	12
36-45	3	6	2	4	5	10
46-55	4	8	3	6	7	14
56-65	2	4	5	10	7	14
65+	10	20	7	14	17	34
Toplam	26	52	24	48	50	100

Tablo 10. Çalışmaya alınan 50 suşun BACTEC yöntemiyle ilaç duyarlılık sonuçları

İlaç	Dirençli		Duyarlı		Toplam	
	N	%	N	%	N	%
İsoniazid	11	22	39	78	50	100
Rifampin	3	6	47	94	50	100
ÇİD (INH+RİF)	3	6	47	94	50	100

Çalışmaya alınan 50 suşun yıllara göre dağılımı da Tablo 11’de görülmektedir.

Tablo 11. Çalışmaya alınan 50 suşun yıllara göre dağılımı

YIL	N	%
2008	12	24
2009	19	38
2010	19	38
Toplam	50	100

Çalışmaya alınan 50 suşun ait olduğu hastaların 11 (%22) tanesi daha önce antitüberküloz tedavisi almış hastalardı. Bunların 2'sinde INH+RİF direnci vardı. İki tanesinde de sadece INH direnci vardı. Daha önce tedavi almamış hasta grubunda 1 hastada INH+RİF direnci görülürken 6 hastada sadece INH direnci vardı. Tablo 12'de primer, sekonder ve tüm hastalar gruplarında direnç oranlarının karşılaştırılması görülmektedir.

Tablo 12. Primer ve sekonder hasta gruplarında direnç oranlarının karşılaştırılması

Direnç Durumu	Primer (Yeni Hasta)		Sekonder (Tedavi Görmüş)		Tüm Hastalar	
	N	%	N	%	N	%
INH dirençli	7	14	4	8	11	22
RİF dirençli	1	2	2	4	3	6
ÇİD TB	1	2	2	4	3	6

Genotype MTBDR testinde, BACTEC ile duyarlı olduğu gözlenen izolatların hiçbirinde direnç paternine rastlanmamıştır. BACTEC ile INH direnci gözlenen 11 izolatın 8'inde (%72,7) INH direnç paternleri gözlenirken, 3'ünde duyarlılık paterni gözlenmiştir. INH+RİF direnci gözlenen (ÇİD TB) 3 hastanın tamamında bu bulguyu destekleyen paternlere rastlanmıştır. Tablo 13'de genotipik ve fenotipik test sonuçları karşılaştırılmaktadır. Tablo 14'de Genotype MTBDR testinde ortaya çıkan hibridizasyon ürünlerine göre yorumlanan genotipik direnç sonuçlarının fenotipik sonuçlarla karşılaştırılması görülmektedir.

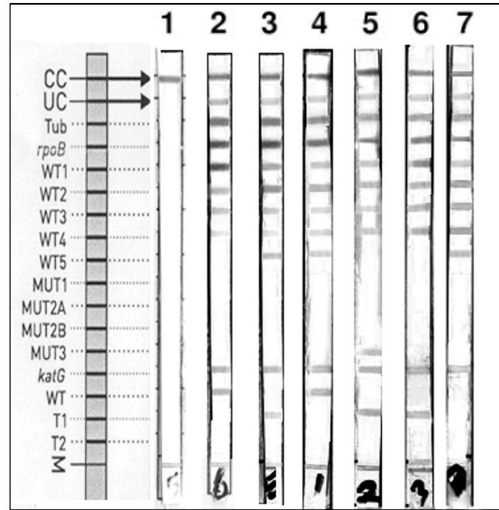
Tablo. 13. Genotype MTBDR test sonuçları ile fenotipik direnç paternlerinin karşılaştırılması

İzolat Sayısı	Genotype MTBDR Paterni				Direnç	
	N	%	Pozitif WT prob	Pozitif Mutant Prob	Mutasyonları n Yerleşimi	RİF INH
4	36,3	rpoB,WT1,2,3,4,5/katG	katGT1	S315T1	S	R
1	9,1	rpoB,WT 1,2,3,4,5/katG	yok	yok	S	R
2	18,2	rpoB,WT 1,2,3,4/katG	rpoBMUT3/katGT1	S531L/S315T1	R	R
1	9,1	rpoB,WT 1,2,3,4/katG	katGT1	S315T1	R	R
3	18,2	rpoB,WT1,2,3,4,5/katG WT	yok	Yok	S	R

Tablo 14. BACTEC ile direnç görülen izolatların genotipik ve fenotipik test sonuçlarının karşılaştırılması

İzolat Sayısı		BACTEC 460 TB		Genotype MTBDR	
N	%	RİF	INH	RİF	INH
5	45,5	S	R	S	R
3	27,3	R	R	R	R
3	27,2	S	R	S	S

Şekil 3’de Genotype MTBDR testinde, DNA striplerinin hibridizasyon sonucu oluşan tipik görüntüleri görülmektedir.



Şekil 3.Genotype MTBDR testi sonucu DNA striplerinin hibridizasyon paternleri.

Kolon 1: negatif kontrol, Kolon 2: RİF dirençli *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 35838 suşu, Kolon 3: rpoB WT1,2,3,4,5/katG T1 (RİF duyarlı, INH dirençli), Kolon 4: rpoB WT1,2,3,4,5/katG WT (RİF ve INH duyarlı), Kolon 5: rpoB WT1,2,3,4 MUT3/katG T1 (RİF ve INH direnci), Kolon 6: rpoB WT 1,2,3,4/katG T1 (RİF ve INH direnci), Kolon 7: rpoB WT1,2,3,4,5/katG (RİF duyarlı, INH dirençli).

4. TARTIŞMA

Tüberküloz, dünyada HIV/AIDS'den sonra erişkinlerde en çok ölüme yol açan ikinci enfeksiyon hastalığı olarak hala ciddi derecede önemini korumaktadır. Tüberkülozun 1970'li ve 1980'li yıllarda kontrol altına alındığı sanılıyordu. Bu durum Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nin epidemiyolojik verilerine dayanan bir yanılgıydı. 1990'lı yıllar ile birlikte, tüberkülozun önemli bir sağlık sorunu olduğu yeniden hatırlandı çünkü dünya nüfusunun üçte biri *M. tuberculosis* ile hala enfekteydi ve yılda 8 milyon insan tüberküloz hastalığına yakalanıyor, 3 milyon kişi bu hastalıktan ölüyordu (19, 59).

Son 30 yıl içinde sosyo-ekonomik sorunlar, göçler, savaşlar, tüberküloz kontrol programlarının ihmal edilmesi ve özellikle HIV/AIDS salgınının ortaya çıkması ile tüberküloz insidansında birçok ülkede artış olmuştur. Kötü kontrol programları sonucu ilaç direnci yaygınlaşmış, özellikle de ÇİD TB insan sağlığı için önemli bir tehdit niteliğini kazanmıştır (59).

Bütün bu sorunların ortaya çıkması nedeniyle DSÖ 1993 yılında tüberküloz konusunda acil durum ilan etmiş ve bütün ülkelere "Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi"ni (DGTS) önermiştir. Bu stratejide amaçlar; hükümetlerin politik kararlılık göstermesi, balgamın mikroskopik muayenesinin yaygınlaştırılması, gerekli tüberküloz ilaçlarının kesintisiz ve ücretsiz temini, standart kısa süreli tedavi rejimlerini direk gözetim altında uygulamak ve standart kayıt ve rapor sistemi ile tüberküloz kontrol programının değerlendirilmesi olarak belirlenmiştir. Bu programın 2015 için koyduğu hedef, olası tüm yayma pozitif vakaların en az %70'ine tanı konulması ve en az %85'inin kür edilmesidir. Günümüzde 190 ülkede uygulanan DGTS ile bakteriyolojik tanı oranları ve tedavi başarısı dünya çapında artmıştır (19, 59).

Dünya genelinde tüberküloz hastalığının artışı konusunda DSÖ, dört önemli unsur üzerinde durmuştur:

1. Hükümetlerin hastalığı ihmal etmeleri sonucunda TB kontrol sistemleri kötüleşmiş ve hatta birçok yerde kaybolmuştur.
2. Kötü yönetilen ya da doğru yaklaşımların uygulanmadığı TB kontrol programları, hastalığın artışı yanında ilaca dirençli tüberkülozun artışına yol açmıştır.

3. Tüberküloz ve HIV'in birlikte olduğu hallerde, HIV'in endemik olduğu yerlerde TB patlayıcı artış yapmıştır.
4. Nüfus artışı, TB olgularının sayılarında artışa yol açmıştır. Hastalık insidansının yüksek olduğu ülkelerden göçlerle gelen TB olguları, sanayileşmiş ülkelerde artış nedenlerinden birisini oluşturmaktadır (60).

Dünyadaki hastaların yaklaşık %80'i 22 farklı ülkede bulunmaktadır. DSÖ'nün "Yüksek Olgu Yüklü Olan Ülkeler" olarak adlandırdığı bu ülkeler şunlardır: Hindistan, Çin, Endonezya, Nijerya, Bangladeş, Pakistan, Etiyopya, Güney Afrika, Filipinler, Kenya, Kongo, Rusya Federasyonu, Vietnam, Tanzania, Brezilya, Uganda, Tayland, Mozambik, Zimbabve, Myanmar, Afganistan ve Kamboçya (59).

Dünya Sağlık Örgütü 1997 yılından beri her yıl, tüberkülozun kontrolüne dair yıllık rapor yayınlamaktadır. Raporun ana amacı, tüberküloz epidemisinin geniş kapsamlı ve güncel bir değerlendirmesini yapmak ve tüberküloz tedavi ve kontrolündeki global, bölgesel ve ülkeler seviyesindeki ilerlemeyi görmektir. 2010 yılındaki rapora göre, 2009 yılında dünyada yeni vaka sayısı 9,4 milyon olarak tahmin edilmiştir. 2007'de bu sayı 9,27 milyon idi. Toplam sayı artmış gibi görünebilir ama 2007'de insidans 100 000 nüfusta 139 iken, 2009'da 100 000 nüfusta 137'ye düşmüştür. Nüfus sürekli arttığı için insidans oranları da düşük çıkmaktadır. Her yıl yavaş da olsa insidans oranlarında bir azalma görülmektedir. Tüm vakaların sayısı 2007'de 13,7 milyon olarak tahmin edilmişken, 2009 tahmini 14 milyondur. Bu değerlerin prevalansı da 2007'de 100 000 nüfusta 206 iken, 2009'da 100 000 nüfusta 200'e düşmüştür. 2007 yılında tahminen, 1,3 milyon HIV negatif kişi tüberküloz nedeniyle ölmüştür (100 000 nüfusta 20). İlaveten, 456 000 HIV pozitif kişinin tüberküloz nedeniyle öldüğü tahmin edilmektedir. 2009 yılında da tüberkülozdan ölenlerin sayısı HIV negatif hastalarda 1,3 milyon olarak ve oranı da 100 000 nüfusta 20, HIV pozitif hastalardan ölenlerin sayısı da 400 000 civarında olarak tahmin edilmektedir. Tüberkülozdan toplam ölümlerin sayısı 1,7 milyon ve yüzbin nüfusta 26 olarak tahmin edilmektedir. 1990'lı yıllarda artış gösteren global tüberküloz insidansı 2004 yılından beri yavaş yavaş düşmektedir. 1990 ile 2009 arasında global seviyedeki ölüm oranları, %35 oranında azalmıştır. Bu düşüş oranları korunabilirse 2015'te hedeflenen %50 azalma gerçekleştirilebilir (20, 61).

İlk antitüberküloz ilaç streptomisin kullanılmaya başlanmasıyla birlikte ilaç direnci de görülmeye başlanmıştır. Çünkü monoterapi sonucu, streptomisin dirençli suşlar canlı kalabilmiş ve bunlarla hastalığın tekrarladığı görülmüştür. İlerleyen yıllarda diğer ilaçların da devreye girmesi ile kombine tedavi protokollerine geçilmiş ve bu sayede direnç oluşumunun önüne geçilemese de nöksler önemli miktarda azaltılabilmektedir. Ancak, yetersiz tüberküloz kontrol programları, hastaların tedaviye devam etmemeleri, tüberküloz ilaçlarının gereksiz yerlerde reçete edilmesi, tüberkülozla savaşta kaynak yetersizliği gibi nedenlerle ilaç direnci giderek artış göstermiştir (62).

İlaç direnci ilk defa, 1992 yılında New York şehrinde tüberküloz hastalarının %12'sinin ÇİD TB'lu olduğu fark edildiğinde büyük bir problem olarak görülmeye başlanmıştır (62).

2008 yılında, 440 000 ÇİD TB vakası görüldüğü tahmin edilmektedir. Bu vakaların %86'sı 27 ülkede (15 tanesi Avrupa bölgesinde) görülmektedir. Bu ülkelerin dört tanesinde vaka sayısı diğerlerinden daha yüksektir. Çin'de 100 000, Hindistan'da 99 000, Güney Afrika'da 13 000 ve Rusya Federasyonu'nda 38 000 ÇİD TB vakası olduğu tahmin edilmektedir. Global tüberküloz insidansında görülen düşüğe rağmen ÇİD TB hastalarının %96'dan fazlasına tanı konulmadığı ve standart tedavi rejimleriyle tedavi oldukları tahmin edilmektedir. Global plandaki hedeflere ulaşmak için, özellikle ÇİD TB vakalarının %57'sinin görüldüğü üç ülkede (Çin, Hindistan, Rusya Federasyonu) tanı ve tedavi oranlarını yükseltmek gerekir. Aksi takdirde 2010 raporunda 58 ülkeden en az bir vakanın bildirildiği “yaygın ilaç dirençli” (YİD TB) tüberküloz vaka sayısı artacaktır. YİD TB terimi (XDR-TB “Extensively Drug Resistant-TB”) ilk defa Mart 2006'da Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) ile DSÖ'nün birlikte yayınladıkları bir raporda kullanılmıştır. Bu rapora göre YİD TB, sadece INH ve RİF'e dirençli değil, aynı zamanda altı gruba ait ikinci seçenek ilaçlardan (aminoglikozidler, polipeptidler, florokinolonlar, tioamidler, sikloserin ve PAS) en az üçüne daha dirençli olan *M tuberculosis* suşları ile oluşan tüberkülozdur. Fakat sonradan bu tanımlamanın ilaç duyarlılık testlerinde bir takım zorluklara neden olduğu görülmüş ve DSÖ Ekim 2006'da İsviçre'de yapılan bir toplantıda bu tanımlamada düzeltmeye gitmiştir. Buna göre YİD TB, birinci seçenek ilaçlardan en az INH ve RİF direncine

ilaveten her hangi bir florokinolon (siprofloksasin, ofloksasin, levofloksasin) ve en az bir ikinci seçenek parenteral ilaca (amikasin, kanamisin ve kapreomisin) dirençli *M. tuberculosis* suşları ile oluşan tüberkülozdur (20, 63, 64)

Sahra altı Afrika'nın bazı ülkelerinde, tüberküloz ve HIV birlikteliği oranı dramatik olarak artmaktadır. HIV pozitif hastaların %50-80'i latent tüberküloz enfeksiyonu taşımaktadırlar ve bunlar, tüberküloz gelişimi için büyük risk altındadırlar. Tüberküloz, HIV ile enfekte kişilerde, ölümün ana sebeplerinden biridir. Dirençli suşlar, dirençli olmayanlara göre daha az virulan ve daha az yeni enfeksiyon yapma potansiyeline sahip olmalarına rağmen, HIV pozitif hastalarda yüksek direnç oranı görülmesinin nedeni dirençli suşlara karşı yüksek oranda duyarlılık olabilir. Hastaneye yatma da etkene maruz kalma riskini arttırır. 2006 yılında Güney Afrika'da YİD tüberküloz bulaşı nedeniyle, HIV prevalansının yüksek olduğu bir bölgede, hem hastalar hem de çalışanlar arasında çok fazla ölüm meydana gelmiştir (62).

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, bir ÇİD TB hastasının yalnızca ilaçlarının maliyeti duyarlı bir tüberküloz hastasının ilaç maliyetinden 50-200 kat daha fazladır. 2010-2015 arası, 27 yüksek ÇİD TB olgu yükü olan ülkelerde, 1,3 milyon ÇİD TB vakasının tedavisi için tahmin edilen maliyet 16,2 milyar dolardır. 2015'te ÇİD TB ile savaşta ihtiyaç duyulacak finansman 2010'dakinin 16 katı olacaktır. Tüberküloz tedavi edilebilir bir hastalık olmasına rağmen, ÇİD TB'de kür oranları çok düşüktür ve ölümcül olabilir. ÇİD TB yönetimi zor, komplike, pahalı, deneyimli ve kalifiye sağlık personeli gerektiren bir hastalıktır. Tüberküloz tanısı kolay bir hastalık olmasına rağmen, ÇİD TB tanısı koymak için güvenilir ve pahalı kültür ve duyarlılık testleri gerekir. Ne yazık ki, dünyanın birçok yerinde bu olanaklar mevcut değildir. ÇİD TB tedavisinde kullanılan ikinci seçenek ilaçlar daha az etkili, daha çok yan etkiye sahip ve daha pahalı ilaçlardır (20, 64).

Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi'nin de ÇİD TB prevalansının yüksek olduğu bölgelerde başarısız olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle, bu bölgelerde DGTS'nin başarıyla uygulanmasına ek olarak ilaç duyarlılık testlerinin yapılmasını ve ikinci seçenek tüberküloz ilaçlarının kullanılmasını içeren DGTS-Artı (DOTS-Plus) uygulamasına geçilmiştir. DSÖ, daha önce tedavi almış veya ÇİD TB olma ihtimali bulunan hastalara mutlaka ilaç duyarlılık testlerinin yapılmasını

önermektedir. Ayrıca özellikle HIV'li ve mikroskopisi pozitif hastalara mutlaka moleküler yöntemlerle ilaç duyarlılık testi yapılmasını önermektedir (40, 60, 65)

Ancak, konvansiyonel yöntemlerle ilaç duyarlılık testleri oldukça uzun bir zaman almaktadır. Her ne kadar sıvı bazlı, yarı otomatik, radyometrik BACTEC 460TB yöntemi (BD), *M. tuberculosis* kompleks suşlarının üreme ve ilaç duyarlılık testleri için gerekli zamanı oldukça azaltmış olsa da hala ilaç direncinin belirlenmesi için gerekli sürenin kısaltılmasına ihtiyaç vardır. Diğer radyometrik olmayan, tam otomatize sistemler de süreyi kısaltamamışlardır. Bu nedenle *M. tuberculosis* kompleks suşlarının saatler içerisinde tanısını ve ilaç direncini belirleyebilen moleküler yöntemler geliştirilmiştir (67).

Resmi verilere göre Türkiye, tüberküloz insidansının orta düzeyde olduğu ülkeler arasında yer almaktadır. Elimizdeki resmi rakamlar tüberküloz insidansının 1965'de yüzbinde 172, 1980'de yüzbinde 52,2, 1990'da yüzbinde 43,8 olduğunu belirtmektedir. Görüldüğü gibi tüberküloz insidansı hala yüksek olmasına rağmen, yıllar içerisinde düşüş göstermektedir. Verem Savaşı Daire Başkanlığı verilerine göre 2005 yılında yeni vaka sayısı 18753 ve insidans yüzbin nüfusta 26,0 iken, 2008 yılında yeni vaka sayısı 16760 ve insidans yüzbin nüfusta 23,4'tür. 2005 yılında toplam olgu sayısı 20535 ve prevalans yüzbinde 28,5 iken, 2008 yılında toplam olgu sayısı 18452 ve prevalans yüzbin nüfusta 25,8 olarak bulunmuştur (21, 59).

Türkiye genelinde direnç oranlarıyla alakalı çok merkezli bir çalışma yoktur. Durmaz'ın (69) 1995-2004 yılları arasında çeşitli bölgelere ait çalışmalardan yaptığı analizde ÇİD TB, yeni hastalarda %1,3-4,8, daha önce tedavi görmüş hastalarda 4,4-16,6 arasında bir dağılım göstermiştir (68).

Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda direnç oranları oldukça yüksek, fakat farklı oranlarda belirlenmiştir. Bu çalışmalarda direnç bulguları arasında saptanan farklılıklar, büyük ölçüde değişik direnç ölçütlerinin kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Uçan tarafından yapılan bir araştırmada, 1953-1994 dönemini kapsayan konuyla ilgili çalışmalar tolanmış, 105 yayın ve 135679 suşla ilgili direnç verilerinin analizi yapılmıştır. Primer direnç oranları SM, RİF, INH ve EMB'de sırasıyla %16, %13,%12 ve %3; sekonder direnç oranları %30, %25, %35 ve %10; toplam direnç oranları ise %31, %22, %34 ve %7 olarak belirlenmiştir (70).

Yolsal ve ark. (70), 1984-1989 ve 1990-1995 yılları arasında yayınlanmış makalelerden, karşılaştırmalı ilaç direnci analizleri yapmışlardır. Yaptıkları meta analizde 1985-1989 yılları arasına ait 11, 1990-1995 yılları arasına ait 12 araştırma değerlendirmeye alınmıştır. 1984-1989 yılları arasına ait primer ilaç direnç oranları SM, INH, RİF ve EMB için sırasıyla %8,8, %14,4, %5,7, %2,2'dir. 1990-1995 arası primer direnç oranları SM, INH, RİF ve EMB için sırasıyla %10,1, %8,8, %8,9, %3,0 olarak bulunmuştur. Sekonder ilaç direnci oranları ise, 1984-1989 arası SM için %24,6, INH için %34,1, RİF için %23,1, EMB için %13,3 olarak belirlenmiştir. 1990-1995 yılları için, sekonder direnç oranları SM'de %17,7, INH'da %30,1, RİF'de %31,9, EMB'de %13,7'dir. 1984-1989 arası toplam direnç oranları, SM'de %22,5, INH'da %27,8, RİF'de %22,3, EMB'de %7,8 olarak tespit edilmiştir. 1990-1995 dönemine ait toplam SM direnci %17,9, INH direnci %23,8, RİF direnci %22,1, EMB direnci %7,7 çıkmıştır. Araştırmacılar, farklı kaynaklarca verilen direnç oranlarının bir homojenlik göstermediğini belirtmişlerdir. Ancak, bulgular her ne kadar tartışmalı olarak değerlendirilse de, Türkiye'de direnç oranlarının gelişmiş ülkelerle kıyaslanmayacak ölçüde yüksek olduğu sonucuna varılmıştır.

Arseven ve ark. (71) Doğu Karadeniz bölgesinde antitüberküloz ilaç direnci ile ilgili bir çalışma için, önce 1985-1990 yılları arasında Giresun, Trabzon, Rize, Artvin ve Gümüşhane illerini kapsayan iki Göğüs Hastalıkları Hastanesi ve 10 Verem Savaş Dispanserinde tedavi gören, kültür pozitif ve antibiyogram incelemesi yapılmış, 1388 tüberkülozlu hastanın kayıtlarını tarayarak, antibiyogram sonuçlarını elde ettiler. Çalışmanın ikinci bölümünde yine aynı bölgede, 1993 yılında ve 1994 yılının ilk altı ayında kültür pozitif olarak saptanan ve ilaç duyarlılık sonuçları alınan 333 tüberkülozlu hastanın dört major ilaca karşı direnç durumunu belirlemişlerdir. 1985-1990 yılları arasında tespit edilen 1388 hastada INH direnci %29,6, RİF direnci %17,1, SM direnci %23,3 ve EMB direnci %8,8 olarak bulunmuştur. ÇİD TB oranı ise %9,1'dir. 1993-1994 yıllarında saptanan 333 hastanın INH direnci %34,8, RİF direnci %25,2, SM direnci %29,4 ve EMB direnci %10,5 olarak belirlenmiştir. ÇİD TB oranı ise %22,5 olarak bulunmuştur. bu çalışmanın yapıldığı tarihlerde Karadeniz bölgesi tüberküloz prevalansı açısından Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nden sonra ikinci sırada gelmekteydi.

Kartaloğlu ve ark. (72) Ocak 1999-Ocak 2000 tarihleri arasında Gülhane Askeri Tıp Akademisi Çamlıca Göğüs Hastalıkları Hastanesinde 365 tüberküloz hastası üzerinde bir araştırma yapmışlardır. Bu araştırmaya göre, INH'a direnç oranı %14,8, RİF'e direnç %3, EMB direnci %10,7, SM direnci %2,5 olarak bulunmuştur. 10 hastada (%2,7) ÇİD TB tespit etmişlerdir. Bir veya daha fazla birinci seçenek ilaca direncin sıklığından dolayı özellikle asker koğuşları, okul yurtları ve hapishaneler gibi kapalı alanlarda yaşayan tüberküloz hastalarına mutlaka ilaç duyarlılık taraması yapılması gerektiği sonucuna varmışlardır.

Tahaoğlu ve ark. (73) yaptığı çalışmada primer tüberküloz vakalarında SM direnci %20,6, RİF direnci %10,8, INH direnci %5,1 bulunmuştur. Sekonder tüberküloz vakalarında direnç SM için %31,9, INH için %30,0 ve RİF için %36,2 olarak bulunmuştur.

Durmaz ve ark. (74) 2000 yılında 88 yeni tüberküloz hastası üzerine yaptıkları bir araştırmada, tek ilaca direnç oranlarını INH için %10,22, SM için %7,95, EMB için %4,54, RİF için %0,0 olarak bulmuşlardır. Yalnızca iki hastada (%2,26) birden fazla ilaca direnç tespit etmişlerdir.

Talay ve ark. (75) 1997-2000 yılları arasında 135'i daha önce hiç tedavi almamış 185 vaka üzerine yaptıkları bir çalışmada, primer ilaç dirençleri SM, INH, RİF, EMB için sırasıyla %13,3, %8,9, %3,0, %2,2 olarak bulunmuştur. Sekonder ilaç direnç oranları ise SM için %18,5, INH için %22,2, RİF için %22,2 ve EMB için %13,9 olarak bulunmuştur. Toplam ilaç direnç oranları ise SM'de %14,8, INH'da %12,7, RİF'de %8,5, EMB'de %5,3'dr. ÇİD TB açısından incelendiğinde ise primer ÇİD TB oranı %2,9, sekonder ÇİD TB oranı %16,6, toplam oran ise %6,8 olarak bulunmuştur.

Baylan ve ark. (76) 2002 yılında yaptıkları çalışmada, *M. tuberculosis* kompleks üreyen 63 hastanın 5 tanesinde (%7,9) sadece INH direnci, 1 tanesinde (%1,6) sadece SM direnci, 1 tanesinde INH+SM direnci (%1,6) ve 1 tanesinde INH+RİF+SM+EMB (ÇİD TB) direnci (%1,6) tespit etmişlerdir. Isparta yöresinde, Yaylı ve ark. (77) yaptığı çalışmada INH, RİF, SM ve EMB dirençleri sırasıyla %13,88, %1,85, %1,85 ve %0,92 olarak bulunmuştur.

Tansel ve ark. (78) yaptığı çalışmada BACTEC yöntemiyle *M. tuberculosis* kompleks olduğu belirlenen 139 izolata, birinci seçenek antitüberküloz ilaçlarla

duyarlılık testi yapılmıştır. Dört major antitüberküloz ilacın hepsine duyarlı suş sayısı 119 bulunmuştur (%88,8). İzolatların %9'unda INH, %4,5'inde RİF, %2,2'sinde SM, %1,5'inde EMB direnci belirlenmiştir. ÇİD TB oranı da %3 olarak bulunmuştur.

Karadağ ve ark. (79) Ondokuz Mayıs Üniversitesi'nde 50 *M. tuberculosis* kompleks izolatu üzerinde yaptıkları ilaç duyarlılık testinde INH direnci %16, RİF direnci %4, SM direnci %4, EMB direnci %2 ve en az izoniazid ve rifampine birlikte dirençli suş oranı %4 olarak bulunmuştur.

Korkmaz ve ark. (80). BACTEC 460TB sistemi ile *M. tuberculosis* kompleks olarak soyutlanan 104 örneğin antibiyotik duyarlılık testlerini hem BACTEC ile hem de agar proporsiyon yöntemi ile yapmışlardır. BACTEC yöntemi ile toplam 59 kökenin (%56,73) en az bir ilaca dirençli olduğu, 26 suşun (%25) INH'e, 11 suşun (%10,58) RİF'e, 19 suşun (18,27) EMB'e, 3 suşun (2,89) SM'e dirençli olduğu bulunmuştur. ÇİD TB oranı da %5,76 olarak bulunmuştur. Agar proporsiyon yöntemi ile 66 suşun (%63,46) en az bir ilaca dirençli olduğu, 25 suşun (24,04) INH'e, 11 suşun (%10,5) RİF'e, 27 suşun (%25,96) EMB'e, 3 suşun (%2,89) SM'e dirençli olduğu saptanmıştır. ÇİD TB oranı %5,77 olarak hesaplanmıştır. RİF duyarlılığı için her iki yöntem karşılaştırıldığında duyarlılık ve özgüllüğün her ikisi de %100 olarak bulunmuştur. INH duyarlılığı için her iki yöntem karşılaştırıldığında duyarlılık %100, özgüllük %98,7 bulunmuştur.

Gönlügür ve ark. (81) 2004-2006 yılları arasında yaptıkları çalışmada, 158 *M. tuberculosis* kompleks suşunun, %17,7'sinde INH direnci, %4,4'ünde RİF direnci, %11,4'ünde SM direnci, %5,1'inde EMB direnci ve %3,8'inde de ÇİD belirlenmiştir.

Dündar ve Sönmez Tamer'in (82) 2007 ve 2008 yıllarını kapsayan çalışmalarında, *M. tuberculosis* izolatlarının 2007 yılında %62'si, 2008 yılında %72'si tüm primer ilaçlara duyarlı bulunmuştur. İki yılın ortalaması olarak tek başına INH direnci %13, SM direnci %4, EMB direnci %3 bulunurken, tek başına RİF direnci gösteren izolata rastlanmamıştır. İki yılın ortalaması olarak çok ilaca dirençli izolatlar %5 oranında bulunmuştur.

Aslan ve ark.(83) Ocak 2005-Haziran 2006 tarihleri arasında yaptıkları çalışmada, 84 *M. tuberculosis* kompleks izolatu üzerinde BACTEC 460TB ve agar proporsiyon yöntemleriyle birinci seçenek ilaç duyarlılıklarının sonuçlarını

karşılaştırmışlardır. BACTEC ile INH, RİF, SM ve EMB direnci sırasıyla % 36,9, %23,8, %20,2, %13,1 ve ÇİD oranı % 11,9 olarak bulunmuştur. Agar proporsiyon yöntemiyle INH, RİF, SM ve EMB direnci sırasıyla %33,3, %22,6, %17,8, %14,3 ve ÇİD oranı %10,7 olarak belirlenmiştir. BACTEC 460 sisteminin, agar proporsiyon yöntemine göre antitüberküloz ilaç duyarlılıklarındaki tanısal performansının değerlendirilmesinde, INH için duyarlılık %100, özgüllük %94,9, RİF için duyarlılık %100, özgüllük %98,4 olarak belirlenmiştir.

Bayraktar ve ark. (84) 1998-2004 yılları arasında tespit edilen 442 *M. tuberculosis* izolatında %24,6 oranında INH direnci, %15,8 oranında RİF direnci, %9,9 oranında SM direnci ve %18,8 oranında EMB direnci belirlemişlerdir. ÇİD TB oranını ise % 14,7 olarak tespit etmişler ve yıllara göre bu oranı incelediklerinde 1999 yılında %19,6 ile en yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. ÇİD TB suşlarının örnek dağılımını incelediklerinde de %87,7'sinin balgam örneği olduğunu tespit etmişlerdir.

Aydın (85), yaptığı çalışmada primer direnç oranlarını SM, INH, RİF ve EMB için sırasıyla %13,1, %18,2, %2,0 ve %3,0 olarak bulmuştur. Sekonder direnç oranlarını ise yine aynı sırayla %50, %42,9, %35,7 ve %14,3 olarak tespit etmiştir. ÇİD TB oranını ise %8 olarak belirlemiştir.

Elazığ ilinde daha önce Atalar'ın (86) yaptığı bir çalışmada, 1999-2004 yılları arasında izole edilen *M. tuberculosis* suşlarından 27 tanesinin antitüberküloz ilaç duyarlılık çalışması, BACTEC 460TB yöntemi ile yapılmıştır. Bu çalışmada INH direnci %21, RİF direnci %25, SM direnci %17 ve EMB direnci %37 olarak tespit edilmiştir. ÇİD TB oranı da %14,1 olarak bulunmuştur.

Tüm bu çalışmalar bir arada değerlendirildiğinde, birbirinden oldukça farklı direnç oranları görülmektedir. Kullanılan yöntemler, bölgesel farklılıklar, hasta gruplarının farklılıkları gibi birçok etken direnç oranlarındaki değişkenlikleri etkilemektedir. Verem Savaşı Dairesi Başkanlığı'nın verilerine göre Türkiye'de 2008 yılında yeni hastalarda, INH direnci %11,3, RİF direnci %3,9, EMB direnci %3,4 ve SM direnci %6,5'tir. Tedavi görmüş hastalarda, INH, RİF, EMB ve SM direnci sırasıyla %27,9, %21,8, %9,6 ve % 12,9 olarak belirtilmiştir. Tüm hastalarda INH, RİF, EMB ve SM direnci sırasıyla %13,8, %6,6, %4,3, %7,5'tir. ÇİD TB oranları ise

yeni hastalarda %3,0, tedavi görmüş hastalarda %18,6 ve tüm hastalarda %5,3 olarak belirtilmiştir (21).

Bu çalışmada ilaç duyarlılığı çalışılan 50 izolatın 8 tanesinde sadece INH direnci, 3 suşta da INH+RİF direnci görülmüştür. Primer ilaç direnci INH için %17,9, RİF için %2,6 ve INH+RİF dirençli suşlar için %2,6 olarak bulunmuştur. Sekonder ilaç direnci INH'te %36,3, RİF'te %18,2 ve ÇİD izolatlarında %18,2 olarak tespit edilmiştir. Tüm hastalarda direnç oranları ise INH için %22, RİF için %6 ve ÇİD oranı da %6 olarak bulunmuştur. Bu çalışmadaki INH direnç oranları Verem Savaşı Dairesi Başkanlığı'nın yayınladığı Türkiye ortalamalarının üstünde çıkmıştır. RİF ve çok ilaca direnç oranları ise Türkiye ortalamalarına yakın bulunmuştur.

Bu çalışmada, yaş grupları ve yıllar arasında tüberküloz vakaları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Daha önce tedavi almış hastalar ile yeni hastalar arasında da direnç oranları açısından anlamlı bir farka ($p>0,05$) rastlanmamıştır.

Duyarlılık sonuçları olmaksızın yapılan tedaviler, beraberinde direnç sorununu ve tedavi başarısızlıklarını da getirmektedir. DSÖ, tüberküloz tedavi programlarının etkilerinin takip edilebilmesi için, standart tedavi rejimlerine ilaveten ilaç duyarlılık testlerinin de sürveyansını önermektedir. Klasik yöntemlerle, tüberküloz etkeninin kültürde üretilmesi ve ilaç duyarlılık çalışmalarının yapılması oldukça uzun bir zaman almaktadır. Otomatize veya yarı otomatize hızlı kültür yöntemleriyle bile bu süre en az 2-3 haftadır. Bu nedenle özellikle ilaç direnci olma ihtimali yüksek olan olgularda, DSÖ moleküler hızlı ilaç duyarlılık testlerini önermektedir. Bu yöntemlerden biri olan Genotype MTBDR yöntemi ile ilgili ülkemizde yayınlanmış çok fazla yayın yoktur (20).

Bu yayınlardan biri Aslan ve ark. (87) tarafından yapılan bir çalışmaya aittir. Aslan ve ark. RİF direnci saptanan 1, INH direnci saptanan 15 ve INH+RİF direnci saptanan 10 *M. tuberculosis* suşu üzerinde Genotype MTBDR yönteminin güvenilirliğini test etmişlerdir. RİF'e dirençli 11 izolatın 4'ünün (%36,3) rpoB MUT3 (S531L) mutasyonu ve 1 tanesinin (%9,1) rpoB MUT1 (D516V) mutasyonuna sahip olduğu gözlenmiştir. 4 izolatda da (%36,4) WT hibridizasyon probunda hibridizasyon gözlenmemesi ile ortaya çıkarılan mutasyonlar da mevcuttur. İzolatların %81,8'ini Genotype MTBDR yöntemiyle RİF'e dirençli olarak tespit

etmişlerdir. INH dirençli 25 izolatın 16'sında (%64) INH direnci doğru olarak tespit edilmiştir. Bu izolatların 14'ünün (%56) katG T1 mutasyon probunda, S315T1 mutasyon tipini taşıdığı saptanmıştır. Genotype MTBDR testi ile fenotipik duyarlılık testi arasındaki uyum oranı RİF için %81, INH için % 64 olarak belirlenmiştir.

Çavuşoğlu ve ark. (88) proporsiyon metodu ile 37'si çok ilaca dirençli 41 RİF dirençli izolat üzerinde Genotype MTBDR testini çalışmışlardır. RİF dirençli 41 izolatın, 22 (%53,7) tanesinde bu yöntemle mutasyon problemleriyle hibridizasyon gözlenmiştir. 41 RİF dirençli izolatın 17'sinde (%41,5) en az WT rpoB problemlerinden birinde negatif sinyal gözlenmiştir. En sık rastlanan mutasyon kodon 531'de (%56,1) görülmüştür. İki RİF dirençli izolat Genotype MTBDR ile RİF duyarlı olarak tespit edilmiştir. 41 izolatın 39 tanesinde RİF direncini tespit eden Genotype MTBDR yönteminin, RİF direncini belirleme oranı %95,1 olarak bulunmuştur. 37 INH dirençli izolatın 27'sinde (%73) kodon 315'de mutasyon tespit edilmiştir. Bu izolatlardan sadece 31 tanesi yüksek düzey INH direnç paterni taşıdığından dolayı, Genotype MTBDR yönteminin yüksek düzey INH direncini belirleme oranı %87,1 (27/31) olarak tespit edilmiştir.

Bu iki çalışmada olduğu gibi Fırat Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda da yapılan bu çalışmada en sık gözlenen RİF direnç paterni kodon 531'de gözlenmiştir. INH dirençli izolatlarda da en çok katG T1 probunda hibridizasyon paterni gözlenmiştir.

İtalya'da yapılan bir çalışmada, Miotto ve ark. (89), 142 RİF dirençli izolatın 141'inde (%99,3) Genotype MTBDR yöntemi ile direnç tespit etmişlerdir. En çok mutasyon kodon 531'de gözlenmiştir. 64 fenotipik olarak RİF duyarlı suşun 61'i doğru olarak tanımlanmıştır. 173 INH dirençli suşun 115'inde (%66,5) Genotype MTBDR yöntemiyle direnç saptanırken, 33 duyarlı suşun hiçbirinde direnç paternine rastlanmamıştır. 139 ÇİD izolatın sadece 97'si (%69,8) Genotype MTBDR ile doğru olarak tespit edilebilmiştir. Yöntemin duyarlılığı, RİF, INH direnci ve ÇİD suşlar için sırasıyla %91,5, %67,1, %69,8 olarak hesaplanmıştır. Sensitivite ise yine aynı sırayla, %99,3, %100, %99,3 olarak hesaplanmıştır .

Somoskovi ve ark. (67) yaptığı çalışmada 57 yüksek düzey INH dirençli izolatın 48'inde (%84,2) Genotype MTBDR yöntemiyle de direnç saptanırken, 35 düşük düzey INH dirençli izolatın sadece iki (%5,7) tanesinde direnç

saptanabilmiştir. 26 RİF dirençli izolatın 25'inde (%96,2) Genotype MTBDR yöntemiyle de direnç saptanmıştır.

Hilleman ve ark. (55) yaptığı çalışmada 103 ÇİD ve 40 tamamen duyarlı izolatta Genotype MTBDR yöntemiyle ilaç direnci çalışılmıştır. 203 ÇİD izolatın 102'sinde rpoB gen bölgesinde bir mutasyona rastlanmıştır. En sık kodon 531'de direnç paterni görülmüştür. 103 örneğin 91'inde (%88,4) katG kodon 315'de direnç görülmüştür. Duyarlı suşların hiç birinde mutasyon paterni görülmemiştir. Genotype MTBDR testinin INH direncini belirlemede duyarlılığı %88,4 ve özgüllüğü % 100 olarak bulunmuştur.

Bang ve ark. (90) yaptığı çalışmada, Genotype MTBDR ile elde edilen genotipik sonuçların BACTEC ile elde edilenlerle %95 oranında uyumlu olduğundan bahsedilmektedir. Uyumsuz sonuçların, kodon 315 dışındaki lokalizasyonlarda bulunan mutasyonların da INH direncine neden olmasıyla açıklanabileceğinden bahsetmişlerdir.

Brossier ve ark. (91) yaptıkları çalışmada, Genotype MTBDR yönteminin yüksek düzey INH direncini saptamada %89 oranında başarı gösterirken, RİF direncini belirlemede ise %100 oranında başarılı olduğunu bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda Genotype MTBDR testinin RİF dirençli ve ÇİD suşlar için duyarlılığı %100, özgüllüğü %100 olarak bulunmuştur. INH direnci belirlemek için ise duyarlılığı %78,6 ve özgüllüğü %100 olarak bulunmuştur. RİF direnci ve çok ilaca direnç için oranların yüksek çıkmasının sebebi örnek sayısının azlığına bağlanabilir. Ancak INH direncini belirlemede duyarlılık genellikle diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

Genotype MTBDR yöntemi RİF direncini belirlemede büyük bir duyarlılığa sahiptir. Ancak INH direncini belirlemede bazı dezavantajları vardır. RİF'e dirençli *M. tuberculosis* kökenlerinin %95'inden fazlasında RNA polimeraz enziminin β -alt ünitesini kodlayan rpoB geninin 507-533. kodonları arasındaki 81 baz çifti (bç) uzunluğundaki RİF direnç belirleme bölgesi (rifampin resistance determining region, "RRDR") veya "hot spot" adı verilen bölgede mutasyonlar vardır. Yöntem de bu bölgeyi hedeflediğinden dolayı duyarlılığı yüksektir. INH direnci taşıyan *M. tuberculosis* kökenlerinin çoğunda da katG gen bölgesinde mutasyonlar mevcutsa da %25 oranında inhA ve bazı suşlarda da ahpC gen bölgelerinde mutasyon vardır.

Bu nedenle en azından inhA gen bölgesini de içerecek şekilde bir yapılanma, testin duyarlılığını ve güvenilirliğini daha da arttıracaktır. Bu durumu göz önünde bulundurarak yakın zamanda Genotype MTBDR yönteminin bir üst versiyonu olan Genotype MTBDR plus testi (Hain Lifescience, Almanya) üretici firma tarafından piyasaya sürülmüştür. Genotype MTBDR plus yöntemiyle, RİF direncini belirleyen rpoB bantlarının sayısı artırılarak testin RİF direncini belirleme duyarlılığı artırıldığı gibi, INH direncini belirlemek için inhA gen bölgesini içeren bant paternleri de DNA striplerine yerleştirilmiştir. Lacoma ve ark. (52) yaptığı çalışmada, yeni bantların eklenmesiyle testin RİF direncini belirlemede duyarlılığının %8,4, INH direncini belirlemede de %31,4 oranında artış gösterdiği belirtilmektedir (66).

Bu çalışmanın asıl amacı hızlı moleküler tanı yöntemlerinin, *Mycobacterium tuberculosis* kompleks varlığını tespit etmede ve ilaç direncini belirlemedeki güvenilirliğini belirleyerek, bu yöntemlerin rutinde kullanımı konusundaki tartışmalara katkıda bulunmaktır. Daha az gelişmiş bir yöntemle bile oldukça iyi sonuçlar elde edilmiş olması, hızlı moleküler tanı testlerinin en azından acilen ilaç duyarlılığı çalışılması gereken durumlarda güvenilirliğini göstermektedir.

Sonuç olarak, Genotype MTBDR yöntemi, en sık rastlanan RİF ve INH direnç bölgelerini tespit etmesi, uygulanması kolay bir test olması, test için kullanılan PZR teknolojisinin ve revers hibridizasyon metodunun etkili ve tekrarlanabilir olması ve sonuçları yorumlamak için yetişmiş uzman denetimine ihtiyaç duyulmaması nedeniyle rutin laboratuvarlarda kolaylıkla kullanılacak bir moleküler yöntemdir. Ancak, hiçbir moleküler yöntemin klasik kültür bazlı ilaç duyarlılık testlerinin yerini tamamen alamayacağı unutulmamalıdır.

5. KAYNAKLAR

1. Iseman MD. Klinisyenler İçin Tüberküloz Kılavuzu. Özkara Ş (Çeviren). Nobel Matbaacılık, İstanbul 2002.
2. Babacan F, Hasdemir U. *Mycobacterium tuberculosis* complex. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (eds). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Etkenlere Göre Enfeksiyonlar. Nobel Matbaacılık, İstanbul 2008;2283-2301.
3. Baylan O, Kısa Ö, Albay A, Doğancı L. Mikobakteriyoloji laboratuvarımızda 2002 yılında tüberküloz olgularından izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* complex suşları ve antitüberküloz ilaç duyarlılık sonuçları. *Gülhane Tıp Dergisi* 2003; 45(3); 256-262.
4. Rodrigues CS, Shenai SV, Almeida DVG, Sadani MA, Goyal N, Vadher C, Mehta A. Use of BACTEC 460 TB system in the diagnosis of tuberculosis. *Indian Journal of Medical Microbiology* 2007; 25: 32-36.
5. Hillemann D, Rüsç-Gerdes S, Richter E. Evaluation of the GenoType MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2007; 2635-2640.
6. Aksu M (ed). Tıp tarihi açısından Türkiye’de verem savaşı. Ankara, Gazi Üniversitesi İletişim Fakültesi Basımevi, 2007.
7. Kocabaş A (ed). Günümüzde tüberküloz Sorunu. Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü. Adana, Çukurova Üniversitesi Basımevi, 1991: 3-6.
8. Barış Yİ. Çağlar Boyu Tüberküloz. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun. 2003: 1-7
9. Kıyan M. Mycobacteriaceae. Cengiz AT, Ustaçelebi Ş (eds). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara, Güneş Kitabevi; 1999: 419-457.
10. Seber E. Tüberkülozun dünü. *ANKEM Derg* 2010;24:52-60.
11. Erkan ML. Tüberkülozun Tarihçesi, Ülkemiz ve Dünyadaki Durumu. *O.M.Ü Tıp dergisi*,1996; 13: 291-295.

12. Babacan F, Över U. Mikobakterilerin genel özellikleri ve Mycobacterium tuberculosis complex. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (eds). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Etkenlere Göre İnfeksiyonlar. İstanbul, Nobel Matbaacılık, 2002: 1675-1690.
13. Koneman EW, Winn WJ, Allen S, Janda W, Procop G, Schreckenberger P, Woods G (eds). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2006; 1064-1124.
14. Goodwin A. *Mycobacterium tuberculosis* and Other Nontuberculosis Mycobacteria. Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G (eds). Textbook of Diagnostic Microbiology, Third edition. Saunders Elsevier, 2007: 683-717.
15. Köksal F. Farklı bir bakteri topluluğu mikobakterilerde hücre duvarı yapısı. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Samsun 2003: 34-46.
16. Baykal ES. Van yöresinde izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının dört farklı yöntemle antimikrobiyal ajanlara duyarlılık tespiti. Uzmanlık Tezi, Van: Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2008.
17. Kılıçaslan Z. Akciğer Tüberkülozu ve Atipik Mikobakteri İnfeksiyonları. Arseven O. Akciğer Hastalıkları (ed). İstanbul, Alemdar Ofset, 2002: 282-301.
18. Çetin M. Tüberküloz basilleri kompleksi'nin izoniazid ve rifampisin duyarlılıklarının Real-Time PCR (Floresans Rezonans Enerji Transferi) yöntemi ile araştırılması. Doktora Tezi, Samsun: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2002.
19. Özkara Ş. Tüberkülozda güncel durum. XXXVI. Hematoloji Kongresi Bildiri Özetleri Kitabı. Antalya, 2010: 34-39.
20. WHO global tuberculosis control. WHO report 2010. WHO/HTM/TB/2010.7
21. Türkiye'de Verem Savaşı 2010 Raporu. T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaşı Daire Başkanlığı. Bozkurt H (ed). Ankara, Başak Matbaacılık, 2010.

22. Ryan KJ, Ray CG (eds). Sherris Medical Microbiology, Fifth Edition. McGraw Hill Companies, 2010: 489-505.
23. Yüce A, Şener A. Akciğer Tüberkülozu. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M(eds). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Sistemlere Göre Enfeksiyonlar. İstanbul, Nobel Matbaacılık, 2008: 832-849.
24. Özbal Y. Tüberküloz immunolojisi. Erciyes Tıp Dergisi 2006; 28: 25-34.
25. Yaman M. Tüberküloz patogenezi. İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Erişkin ve Çocukta Tüberküloz Sempozyumu. İstanbul, 1999: 15-20.
26. Özakın C, Gedikoğlu S: Tüberküloz tanısında tüberküloz laboratuvarının rolü: tanı ve ilaç duyarlılık testlerinde rutin laboratuvar yöntemlerinin rolü. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı; Samsun, 2003: 397-401.
27. Albay A. Tüberkülozun tanısında yenilikler. 14. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi Kitabı. Antalya, 2009: 150-155.
28. Özkütük N. Klinik materyallerin alınması ve laboratuara gönderilmesi. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Samsun, 2003: 278-282.
29. Hana BA. Laboratory Diagnosis. Rom WN, Garay SM (eds). Tuberculosis. Lippincott Williams & Wilkins. Philedelphia, 2004: 163-176.
30. Ersöz G. Örneklerin işlenmesi ve kültür yöntemleri. V. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kurs Kitabı. Diyarbakır, 2006: 22-26.
31. Mikobakteri Kültür Yöntemleri. www.rshm.gov.tr.
32. Uzun M. Örneklerin işlenmesi ve kültür yöntemleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı, Samsun, 2003: 285-290.

33. Haris G, Rayner A, Blair J, Watt B, Comparison of three isolation systems for the culture of *Mycobacteria* from respiratory and non- respiratory samples, J Clin Pathol 2000; 53: 615-618..
34. Griethuysen AJ, Jansz AR, Buiting AGM. Comparison of fluorescent BACTEC 9000 MB System, Septi-Chek AFB System and Lowenstein-Jensen Medium for detection of Mycobacteria. J Clin Microbiol 1996; 2391-2394.
35. Köksal İ. Tüberkülozda tanı. Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi 2000.
36. Özyurt M. Tüberkülozun laboratuvar tanısında kullanılan moleküler ticari tanı sistemleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı, Samsun, 2003: 325-337.
37. Özerol H.İ. Tüberkülozun serolojik tanısı. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı, Samsun 2003: 411-427.
38. Öz T, Çavuşoğlu C, Yaygın E, Aydoğan Ö, Korkmaz M, Bacakoğlu F. Akiğer tüberkülozunda *Mycobacterium tuberculosis* antijenlerine karşı serolojik yanıtın Western blot yöntemiyle değerlendirilmesi. Ege Tıp Dergisi 2009; 48: 153-158.
39. T. C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaşı Daire Başkanlığı. Türkiye’de Tüberkülozun Kontrolü İçin Başvuru Kitabı, Ankara: 2003.
40. Treatment of Tuberculosis Guidelines. Fourth Edition. WHO/HTM/TB/2009.420.
41. Tansel Ö. Klasik antibiyotik duyarlılık test yöntemleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı, Samsun: 2003:348-351.
42. Özakin C. Tüberküloz kültüründe kullanılan yeni yöntemler. Uzun M, Erturan Z. 4. Ulusal Mikobakteri Simpozyumu Kitabı. İstanbul; 2002: 49-56.
43. Aktoprak H.B. Çok ilaca dirençli *Mycobacterium tuberculosis* kökenlerinde artmış ilaç direncinin belirlenmesi. Uzmanlık Tezi,İzmir: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2009.

44. Ruiz P, Zerolo FJ, Casal MJ. Comparison of susceptibility testing of *M. tuberculosis* using the ESP Culture System II with that using the BACTEC Method. J Clin Microbiol 2000: 4663-4664.
45. Saniç A. Tüberküloz tanısında moleküler yöntemlerin yeri. ANKEM Derg 2007; 21: 81-85.
46. Çavuşoğlu C. *Mycobacterium tuberculosis*'de moleküler antibiyotik duyarlılık test yöntemleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Samsun.2003: 369-385.
47. Özyurt M. Moleküler tanıda ticari sistemler. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Samsun. 2003: 224-239.
48. Çilli A. Antitüberküloz ilaçlar ve etki mekanizmaları. 21 yüzyılda tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Samsun. 2003:163-172.
49. Saniç A. Antitüberküloz İlaçlar. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S (eds). Antibiyotikler. Bilimsel Tıp Yayınevi. Ankara. 2008: 691-705.
50. Aile Hekimleri İçin Tüberküloz El Kitabı 2011. Ankara İl Sağlık Müdürlüğü. Arabula EA, Şimşek AÇ, Özlü A (eds). Ankara, 2011.
51. Zhang Y, Yew W. W. Mechanism of Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis 2009; 13: 1320-1330.
52. Kiraz N. Antitüberküloz ilaçlara direnç mekanizmaları ve yeni ilaçlar. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Samsun. 2003: 173-177.
53. Chang Y. Isoniazid. Rom WN, Garay SM (eds). Tuberculosis. Lippincott Williams & Wilkins. Philedelphia, 2004;739-758.
54. Harkin TJ, Condos R. Management of multidrug resistant tuberculosis. Rom WN, Garay SM. Tuberculosis. Second Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philedelphia, 2004: 729-738.

55. Hillemann D, Weizenegger M, Kubica T, Richter E, Niemann S. Use of the GenoType MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. J Clin Microbiol 2005; 3699-3703
56. Çavuşoğlu C, Hilmioğlu S, Güneri S, Bilgiç A. Characterization of rpoB mutations in rifampin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Turkey by DNA sequencing and Line Probe assay. J Clin Microbiol 2003; 40: 4435-4438.
57. Çavuşoğlu C, Karaca-Derici Y, Yaygın YE, Bilgiç A. In-vitro activity of rifabutin against rifampicin-resistant *Mycobacterium* isolates with known rpoB mutations. Clin Microbiol Infect. 2004;10: 662-665.
58. Karagöz T, Yazıcıoğlu Moçin Ö, Pazarlı P, Şenol T, Duman DG, Saltürk C, Ünal Ö, Halezeroğlu S. The treatment results of patients with multidrug resistant tuberculosis and factors affecting treatment. Tüberküloz ve Toraks Dergisi 2009; 57: 383-392.
59. Kılıçaslan Z. Dünyada ve Türkiye’de tüberküloz. ANKEM Derg 2007; 21: 76-80.
60. Bilgiç H. Türkiye’de tüberkülozun durumu ve eradikasyon (kontrol) programı. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı, Samsun. 2003:18-33.
61. WHO global tuberculosis control.:Epidemiology, Strategy, Financing.WHO report 2009. WHO/HTM/TB/2009.411.
62. Loddenkemper R, Hauer B. Drug Resistant Tuberculosis. A worldwide epidemic poses a new challenge. Dtsch Arztebl Int 2010; 107: 10-19.
63. Epidemiology and challenges to the elimination of global tuberculosis. Clin Infect Dis 2010; 50: 156-164.
64. Jain A, Dixit P. Multidrug resistant to extensively drug resistant tuberculosis: what is next? J Biosci 2008; 33: 605-616.
65. Guidelines for National Programmes. Treatment of Tuberculosis. WHO/TB/97.220.
66. Lacombe A, Garcia-Sierra N, Prat C, Ruiz-Manzona J, Haba L, Roses S, Maldonado J, Dominguez J. Genotype MTBDR_{plus} assay for molecular detection of rifampin

and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical samples. J Clin Microbiol 2008; 3660-3667.

67. Somoskovi A, Dormandy J, Mitsani D, Rivenburg J, Salfinger M. Use of Smear – Positive Samples To asses the PCR Based Genotype MTBDR assay for rapid detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex as well as its resistance to Isoniazid and Rifampin. J Clin Microbiol 2006;44:4459-4463.
68. Aktoprak HB. Çok ilaca dirençli *Mycabacterium tuberculosis* kökenlerinde artmış ilaç direncinin belirlenmesi. Uzmanlık Tezi, İzmir: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2009.
69. Durmaz R. *Mycobacterium tuberculosis*’de direnç sorunu. ANKEM Derg 2005; 19: 107-110.
70. Yolsal N, Malat G, Dişçi R, Örkün M, Kılıçaslan Z. Türkiye’de tüberküloz ilaçlarına direnç sorununun 1984-1989 ve 1990-1995 yılları için karşılaştırılması: Meta Analiz. Klimik Derg 1998; 11:6-9.
71. Arseven O, Eraksoy H, Uzun Y, Sepkin C, Kalaycıoğlu A, Özmenoğlu M, Bölükbaşı O. Doğu Karadeniz bölgesinde tüberküloz ilaçlarına direnç durumu. Klimik Derg 1995; 8: 63-67.
72. Kartaloglu Z, Bozkanat E, Ozturkeri H, Okutan O, Ilvan A. Primary antituberculosis drug resistance at Turkey military chest diseases hospital in İstanbul. Med Princ Pract 2002;11: 202-205.
73. Tahaoglu K, Kizkin O, Karagoz T, Tor M, Partal M, Sadoglu T. High initial and acquired drug resistance in pulmonary tuberculosis in Turkey. Tuber Lung Dis 1994; 75: 324-328.
74. Durmaz R, Ozerol IH, Durmaz B, Gunal S, Senoglu A, Evliyaoglu E. Primary drug resistance and molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in a population with higher tuberculosis incidence in Turkey. Microb Drug Resist 2003; 9: 361-366.
75. Talay F, Altın S, Karasulu L, Kümbetli Ş. İstanbul Eyüp Verem Savaş Dispanserinde 1997-2000 yıllarında belirlenen ilaç direnç oranları .Van Tıp Dergisi 2003; 10: 10-15.

76. Baylan O, Kısa Ö, Albay A, Doğancı L. Mikobakteriyoloji laboratuvarımızda 2002 yılında tüberküloz olgularından izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTC) suşları ve antitüberküloz ilaç duyarlılık sonuçları. *Gülhane Tıp Dergisi* 2003; 45: 256-262.
77. Yaylı G, Sözen H, Ağalar C. Isparta yöresinde izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının antitüberküloz ilaçlara duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 2003; 33: 24-30.
78. Tansel Ö, Yüksel P, Kuloğlu F, Akata F. *Mycobacterium tuberculosis* Suşlarının antitüberküloz ilaçlara direnci: Trakya Üniversitesi Hastanesi'nin iki yıllık sonuçları. *İnfeksiyon Derg* 2003; 17:23-26.
79. Karadağ A, Tokaç M, Güvenli A, Sünbül M, günaydın M, Saniç A. Klinik örneklerden izole edilen tüberküloz basili kompleksinin majör antitüberküloz ilaçlara direnç oranları. *ANKEM Derg* 2004; 18: 189-192.
80. Korkmaz G, Balcı İ, Bayram A, Karslıgil T. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks kökenlerinin birinci seçenek antitüberküloz ilaçlara duyarlılığının saptanmasında BACTEC ve agar proporsiyon yöntemlerinin karşılaştırılması. *İnfeksiyon Derg* 2006; 20: 7-14.
81. Gönlgür U, Bakıcı MZ, Gönlgür TE, Hasbek M. Kısa Bildiri: Sivas İlinde antitüberküloz ilaçlara direnç oranları. *Mikrobiyoloji Bült* 2007; 41: 459-463.
82. DüNDAR D, Sönmez-Tamer G. *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi izolatlarının primer antitüberküloz ilaçlara direnç oranları. *Klinik Derg* 2009; 22: 52-54.
83. Aslan G, Delialioğlu N, Yıldız Ç, Direkel Ş, Emekdaş G. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının primer antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılığının belirlenmesinde BACTEC 460 ve agar proporsiyon yöntemlerinin karşılaştırılması. *İnfeksiyon derg* 2007; 21: 75-80.
84. Saral ÖB, Sucu N, Boz GA, Erdem M, Köksal İ. 442 *Mycobacterium tuberculosis* suşunda BACTEC yöntemi ile kombine ilaç direncinin araştırılması. *Toraks Derg* 2007; 8: 174-178.
85. Aydın A. Zonguldak ilinde izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının primer antitüberküloz ilaçlarına duyarlılığının BACTEC MGIT 960 sistemiyle

belirlenmesi. Uzmanlık Tezi,Zonguldak: Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2006.

86. Atalar D. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının majör antitüberküloz ilaçlara duyarlılığının BACTEC 460TB sistemi ile tespit edilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,2004.
87. Aslan G, Tezcan S, Emekdaş G. *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi klinik izolatlarında rifampisin ve izoniazid direncinin hızlı tespitinde ‘Genotype MTBDR’ testinin değerlendirilmesi. Mikrobiyoloji Bült 2009; 43: 217-226.
88. Çavuşoğlu C, Turhan A, Akinci P, Soyler I. Evaluation of the Genotype MTBDR assay for Rapid Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. J Clin Microbiol 2006: 2338-2342.
89. Miotto P, Piana F, Penati V, Canducci F, Migliori GB, Cirillo DM. Use of Genotype MTBDR assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains in Italy. J Clin Microbiol 2006: 2485-2491.
90. Bang D, Andersen AB, Thomsen VO. Rapid genotypic detection of Rifampin and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* directly in clinical specimens. J Clin Microbiol 2006: 2605-2608.
91. Brossier F, Veziris N, Truffot-Pernot C, Jarlier V, Sougakoff W. Performance of the Genotype MTBDR line probe assay for detection of resistance to rifampin and isoniazid in strains of *Mycobacterium tuberculosis* with low and high level resistance. J Clin Microbiol 2006: 3659-3664.

6. ÖZGEÇMİŞ

20 Nisan 1969 tarihinde, Samsun'un Terme ilçesinde dünyaya geldim. İlkokulu Samsun'un Çarşamba ilçesinde, ortaokul ve lise eğitimimi Samsun Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 1987 yılında İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi'nde Tıp eğitimime başladım. 1995 yılında mezun oldum. 1995-1996 yılları arasında Samsun Vezirköprü Merkez Sağlık ocağında, 1996-2003 yılları arasında Samsun Çarşamba Verm Savaş Dispanseri'nde, 2003-2007 tarihleri arasında Anakara Yenimahalle ilçesinde çeşitli sağlık ocaklarında çalıştım. 2007 yılı Temmuz ayında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda ihtisas eğitimime başladım. Evliyim ve biri henüz bir yaşında, diğeri altı yaşında iki kızım var.