

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

**TÜBERKÜLOZ TANISINDA MİKROSKOPİ, KÜLTÜR VE MOLEKÜLER  
YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ  
Dr. Rojda ASLAN**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Zülal Aşçı TORAMAN**

**ELAZIĞ  
2015**

## DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. Murad ATMACA

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**

.....

\_\_\_\_\_

.....

\_\_\_\_\_

.....

\_\_\_\_\_

.....

\_\_\_\_\_

.....

\_\_\_\_\_

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalıőmalarım boyunca bilgi ve birikimiyle yardımlarını ve desteğini esirgemeyen, sabırla destekleyen değerli hocam, tez danıőmanım Prof.Dr.Zülat AŐCI TORAMAN'a, eğitimim sırasında yetiőmemde önemli katkıları olan bilgi ve deneyim kazanmama olanak sağlayan değerli hocalarım; Prof.Dr.Adnan SEYREK, Prof.Dr.Ahmet KİZİRGİL, Prof.Dr.Yasemin BULUT ve Prof.Dr.Mustafa YILMAZ'a

Birlikte çalıőmaktan mutluluk duyduğum araştırma görevlisi ve teknisyen arkadaşlarıma,

Benden desteklerini esirgemeyen değerli ve fedakâr aileme,

Ve hayatımın her döneminde desteğini, anlayıőını ve sevgisini hep hissettiğim eőim Yılmaz ASLAN'a ve kızım İrem'e sonsuz teőekkürler....

## ÖZET

Çalışmamızda tüberküloz ön tanısı ile Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen, her biri farklı hastalardan alınmış 100 klinik örnek mikobakteriyolojik inceleme amacıyla çalışmaya dahil edilmiştir. Bu çalışmada tüberküloz tanısı alan hastaların örneklerinde kültür altın standart kabul edilerek Asido Rezistan Boyama (ARB), kültür ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi ile tüberküloz basili varlığını araştırıp, bu üç yöntemin özgüllüğünü ve duyarlılığının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Örneklerin 50 tanesi kültür altın standart kabul edilerek kültür pozitif hastalardan; diğer 50 örnek ise kültür negatif hastalardan mikroskopi ve moleküler yöntemler ile karşılaştırılmak üzere çalışmaya dahil edilmiştir. Asido Rezistan Boyama yöntemlerinden Ehrlich Ziehl Neelsen yöntemi, kültürde MGIT 960 Sistemi ve moleküler yöntem olarak da GeneXpert MTB/RIF cihazı kullanılmıştır.

Kültür pozitif 50 örneğin mikroskopik değerlendirmesinde 39 örneğin ARB pozitif, 11 örneğin ise ARB negatif olduğu görülmüştür. ARB negatif olan 11 örneğin 10'unun PZR pozitif olduğu görülmüştür. Bu örneklerin 49'u PZR pozitif, sadece 1'i PZR negatif olarak saptanmıştır. Kültür negatif 50 kontrol hasta örneğinin değerlendirmesinde ARB veya PZR pozitif örnek saptanmamıştır. ARB ve PZR'nin duyarlılıkları sırasıyla %76 ve %98, her iki yöntemin özgüllüğü ise %100 olarak saptanmıştır. Kültür pozitif 50 örneğin ilaç duyarlılık testinde RIF direnci görülmemiştir. Aynı örneklerin GeneXpert MTB/RIF cihazıyla değerlendirilmesinde benzer şekilde RIF direnci görülmemiştir.

Sonuç olarak, tüberküloz kültürü altın standart kabul ederek yaptığımız bu çalışmada PZR ve ARB'nin özgüllük oranlarının eşit olduğu fakat PZR'nin ARB'ye göre daha yüksek duyarlılık oranına sahip olduğu görülmüştür. Kısa sonuç verme süresi, yüksek duyarlılık ve özgüllük oranları nedeniyle GeneXpert MTB/RIF cihazının rutin kullanıma girmesinin tüberküloz tanısı ve ilaç direnci tespitine olumlu yönde katkı sağlayacağı düşünülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Tüberküloz, PZR, Kültür, Mikroskopi, ARB.

## ABSTRACT

### THE COMPARISON OF MICROSCOPY, CULTURE AND MOLECULAR METHODS FOR DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS

In our study 100 clinical specimens sent to the Firat University School of Medicine Clinical Microbiology Laboratory that was taken from different patients with a preliminary diagnosis of tuberculosis were included for mycobacterial examination. In this study we aimed to investigate the presence of TB bacilli with smear, culture and PCR methods, and also aimed to compare the specificity and sensitivity of these three methods on the samples of tuberculosis diagnosed patients by considering culture gold standard.

Culture positive 50 patients' samples and culture negative 50 patients' samples were included to the study for comparing the microscopic and molecular methods by considering culture the gold standard. In this study EZN was used for the microscopic examination, MGIT 960 System was used for the culture and GeneXpert MTB/RIF device was used for the molecular methods.

In microscopic evaluation of 50 culture positive samples, 39 samples were AFB positive and 11 samples were AFB negative. 10 of the 11 AFB negative samples were PCR positive. It was detected that 49 of these 50 culture positive samples were PCR positive and only one of them was PCR negative. In the evaluation of 50 samples of control patients, AFB or PCR positive samples were not detected. The sensitivity of AFB and PCR were 76% and 98% respectively, and the specificity of both methods was 100%. RIF resistance was not detected in the drug susceptibility testing of 50 culture positive samples. RIF resistance was not detected similarly in the evaluation of the same samples with GeneXpert MTB/RIF device.

In conclusion, in this study we found that the specificity ratio of PCR and AFB was equal to each other but the sensitivity ratio of PCR was higher than AFB by accepting the culture of tuberculosis gold standard. Entering the routine use of the genexpert MTB/RIF device thought to contribute at TB diagnosis and detection of drug resistance in a positive way due to short turn around time and high sensitivity, specificity rates.

**Key Words:** Tuberculosis, PCR, Culture, Microscopy, AFB

## İÇİNDEKİLER

<b>BAŞLIK SAYFASI</b>	<b>i</b>
<b>ONAY SAYFASI</b>	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>v</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>vi</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b>	<b>viii</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	<b>viii</b>
<b>KISALTMALAR</b>	<b>ix</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Genel Bilgiler	3
1.1.1. Mikobakterilerin Genel Özellikleri	3
1.1.2. Tüberküloz dışı mikobakteriler	5
1.1.3. Tüberküloz	7
1.1.3.1. Tarihçe	9
1.1.3.2. Epidemiyoloji	11
1.1.3.3. Virülans Faktörler	16
1.1.3.4. İmmünopatogenez	17
1.1.4. Tüberkülozun Mikrobiyolojik Tanısı	22
1.1.4.1. Klinik Örneklerin Alınması ve Laboratuvara Gönderilmesi	22
1.1.4.1.1. Örneklerin Alınması	23
1.1.4.1.2. Örneklerin Taşınması ve Saklanması	27
1.1.4.1.2.1. Etiketleme	27
1.1.4.1.2.2. Taşıma ve Saklama	28
1.1.4.1.2.3. Örneklerin İşlenmesi	29
1.1.4.1.3. Mikroskopik İnceleme	30
1.1.4.1.4. Kültür	32
1.1.4.1.4.1. Hızlı Kültür Yöntemleri	35
1.1.4.1.4.2. BACTEC 460 TB (Becton Dickinson, Diagnostic Instruments, Sparks, MD) sistemi	35
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>49</b>
2.1. Dekontaminasyon- Homojenizasyon- Konsantrasyon İşlemi	49
2.2. Direkt Mikroskopik İnceleme	50

2.3. BACTEC MGIT 960 Sıvı Kùltür Sistemi	51
2.4. GeneXpert Real-Time PCR Yöntemi	55
2.4.1. Ekspektore Balgam örnekleri	55
2.4.2. Konsantre Sedimentler	55
2.4.3. Xpert MTB / RIF Kartuş Yükleme	56
<b>3. BULGULAR</b>	<b>57</b>
<b>4. TARTIŞMA</b>	<b>62</b>
<b>5. KAYNAKLAR</b>	<b>75</b>
<b>6. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>86</b>

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b>	Sıklıkla insanlarda hastalığa neden olan mikobakteri türlerinin sınıflandırılması	5
<b>Tablo 2.</b>	Runyon sınıflaması	6
<b>Tablo 3.</b>	Akciğer tüberkülozu tanısında kullanılan örneklerin alınmasına ilişkin özellikler	24
<b>Tablo 4.</b>	Akciğer-dışı tüberkülozun tanısında kullanılan örneklerin alınmasına ilişkin özellikler	27
<b>Tablo 5.</b>	Örnek kabında yer alması gereken asgari bilgiler	28
<b>Tablo 6.</b>	Laboratuvar istem formunda bulunması gereken asgari bilgiler	28
<b>Tablo 7.</b>	Tüberküloz tanısında kullanılan örneklerin taşınması ve saklanması	29
<b>Tablo 8.</b>	EZN Boyama Sonrası Yayma Preperatının İncelenmesi	32
<b>Tablo 9.</b>	<i>M.tuberculosis</i> kompleks kültürü için kullanılan besiyerleri	33
<b>Tablo 10.</b>	Kültür pozitif izolatların klinik örneklerle göre dağılımı	58
<b>Tablo 11.</b>	Kültür negatif izolatların klinik örneklerle göre dağılımı	59
<b>Tablo 12.</b>	Kültür (+) izolatlarda ARB ve PZR sonuçlarının klinik örneklerle göre dağılımı	59
<b>Tablo 13.</b>	ARB ve PZR yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllükleri	61

## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil 1.</b> Mikobakterilerin Ehrlich Ziehl Neelsen (EZN) boyama görüntüsü	4
<b>Şekil 2.</b> Tahmini TB insidans oranı (2013)	12
<b>Şekil 3.</b> DSÖ Avrupa Bölgesi ve Türkiye'nin yıllara göre TB insidansı	14
<b>Şekil 4.</b> DSÖ Avrupa Bölgesi ve Türkiye'nin yıllara göre TB prevalansı	14
<b>Şekil 5.</b> DSÖ Avrupa Bölgesi ve Türkiye'nin yıllara göre TB mortalite oranı	15
<b>Şekil 6.</b> DSÖ Avrupa Bölgesi ve Türkiye'nin yıllara göre yayma pozitif TB olgularının tedavi başarısı	15
<b>Şekil 7.</b> Kültür pozitif örneklerde ARB' nin duyarlılığı ve özgüllüğü	60
<b>Şekil 8.</b> Kültür pozitif örneklerde PZR' nin duyarlılığı ve özgüllüğü	61

## KISALTMALAR

<b>ARB</b>	: Asido-Rezistan Boyama
<b>BCG</b>	: Bacillus Calmette-Guerin
<b>DGTS</b>	: Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi
<b>DSÖ</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>EZN</b>	: Ehrlich Ziehl Neelsen
<b>FDA</b>	: Gıda ve İlaç Yönetimi
<b>HPLC</b>	: High-Pressure Liquid Chromatography
<b>LJ</b>	: Löwenstein Jensen
<b>LTBE</b>	: Latent M.tuberculosis Enfeksiyonu
<b>MAK</b>	: Mycobacterium avium Kompleks
<b>MGIT</b>	: Mycobacterium Growth İndicator Tube
<b>MTC</b>	: Mycobacterium Tuberculosis Complex
<b>NAA</b>	: Nükleik Asit Amplifikasyon
<b>OADC</b>	: Oleik asid-Albumin-Dextroz-Katalaz
<b>PANTA</b>	: PolimixinB, AmfoterisinB, Nalidiksik Asit, Trimetoprim, Azlosilin
<b>PPD</b>	: Pürified Protein Derivative
<b>PZA</b>	: Pirazinamid
<b>PZR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RIF</b>	: Rifampisin
<b>SSCP</b>	: Tek zincir biçim çeşitliliği
<b>TAT</b>	: Transport ve Analiz Süresi ( Turn Around Time)
<b>TDM</b>	: Tüberküloz Dışı Mikobakteri

## 1. GİRİŞ

Tüberküloz (TB) halen tüm dünya sağlığını tehdit eden en önemli enfeksiyöz hastalıklardan biridir. Dünya sağlık örgütü verilerine göre tüm dünyada 2012 yılında 8,6 milyon yeni vaka saptanmış ve 1,3 milyon hasta tüberküloz nedeniyle hayatını kaybetmiştir (1).

Yüzyıllardır bilim adamları etkili bir tüberküloz tedavisi bulmak için araştırmalar yapmaktadır. Klinik çalışmalara dayanılarak ilaç duyarlı pulmoner tüberkülozlu hastalara 2 ay yoğun faz ve 4 ay da idame faz olacak şekilde kombine ilaç tedavisi önerilmektedir (2).

Yoğun faz tedavisi izoniyazid, rifampisin, pirazinamid ve etambutolden oluşmaktadır. Bu tedavi rejimi 2 aylık tedavi sonunda %70-95 balgam kültürü negatifliği, %62,3-88 kür ve %0-3,4 relaps oranları ile etkili bulunmuştur (3).

Dünya sağlık örgütü raporlarına göre 2011 yılında tedavisi başlanan 2,6 milyon yeni pulmoner tüberkülozlu hastanın tedavi başarı oranı %87 olarak saptanmıştır (1).

Tedavi etkinliğinin değerlendirilmesinde ardışık 2 balgam kültür sonucu negatif saptanana kadar aylık balgam mikroskopik inceleme ve balgam kültürü yapılması önerilmektedir. Tüberküloz tedavisinin 2. ayında saptanan balgam kültürü pozitifliği tedavi sonrasında relaps gelişebileceğinin önemli ve güvenilir bir göstergesidir (4)

Kaviter lezyonlar, tedavi öncesi yüksek dereceli sürüntü örneği, sigara, kontrolsüz diyabet, geçmiş tüberküloz öyküsü ve ilk balgam kültüründe mikobakteri tespit süresi, tedavi alan hastalarda balgam kültürü değişimindeki gecikmeler için bağımsız risk faktörleridir (5, 6).

Tüberküloz dünyada en çok mortalite ve morbiditeye yol açan hastalıklardan biri olması nedeniyle hastalıkla mücadelede epidemiyolojik verilerin büyük önemi vardır. Enfeksiyonun yayılımının önlenmesi ve spesifik tedaviye gecikmeksizin başlanması için *M.tuberculosis*'in tanımlamasının mümkün olan en kısa sürede yapılması gereklidir. *Human immunodeficiency virus* (HIV) enfeksiyonları tüberkülozun yayılmasına önemli katkı sağlamaktadır. Enfeksiyonun yayılımının önlenmesi ve spesifik tedaviye gecikmeksizin başlanabilmesi için *M.tuberculosis* basili mümkün olan en kısa sürede laboratuvar koşullarında gösterilmelidir.

Tüberkülozun tanısında kullanılan geleneksel yaklaşım, örneklerin asido rezistan boyama (ARB) ile boyanarak mikroskopik incelenmesi ve etkenin kültüre edilerek tanımlanmasıdır (7).

Aside rezistan boyama mikobakterilerle özdeşleşmişse de, *Nocardia* gibi bazı diğer organizmalarda aside dirençli boyanma özelliği gösterir. Klinik örneklerde standart boyanma yöntemi Ehrlich Ziehl Neelsen boyamadır. Bu yöntemde karbol-fuksin ile kapatılan fiske edilmiş materyal ısıtılır, asit-alkol ile dekolorize edilerek metilen mavisi ile tekrar boyanır. Bir başka boyama yöntemi de fenolikauramin veya auramin-rodamin ile fluorokrom boyamasıdır. Daha hızlı ve duyarlı bir yöntemdir. Duyarlılık sonuçları ile ilgili çalışmalar da %50-90 arasında oranlar bildirilmiştir (8).

Kültür, klinik örneklerde mikobakterilerin saptanmasında altın standart yöntemdir. Mikobakterilerin kültüründe kullanılan üç tip ortam vardır. Katı yumurtalı (örn: Löwenstein Jensen (LJ) ), katı agarlı (örn. Middlebrook 7H11), sıvı broth (örn. Middlebrook 7H12) . Sıvı broth besiyerinde inkübasyon için 1-3 hafta gerekirken, katı besiyerlerinde 3-8 hafta gerekir. %5-10 karbondioksit üremeyi hızlandırır. Otomatize hızlı kültür yöntemlerinden “Mycobacterium growth indicator tube” (MGIT) 960 sistemi, BACTEC 460 TB sistemi, BACTEC 9000 MB sistemi, MB/BACT Myco E SP 2 sistemi gibi ticari sistemler sayılabilir. Bu yöntemlerle mikobakterilerin hızlı primer izolasyonu, “*Mycobacterium tuberculosis complex* (MTC)” ve TB dışı mikobakterilerin ayrımı ile mikobakterilerin antitüberküloz ilaçlara duyarlılıklarının saptanması gerçekleştirilmektedir (9).

Geleneksel yöntemler kullanılarak tüberküloz basilinin tespiti için, ARB yönteminde mililitrede 5-10 bin basil, kültür yönteminde ise birkaç basil olması yeterlidir. Ancak kültür yönteminde basillerin üreyerek gözle görünür koloni oluşturmaları 3-4 hafta kadar süre almaktadır. Bu nedenle tüberküloz tanısında geleneksel yöntemlerin yanında bunları tamamlayan duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, çabuk sonuç veren, uygulaması kolay, pahalı olmayan moleküler tanı yöntemleri geliştirilmiştir (7).

Kary B. Mullis tarafından 1980'li yılların ortalarında geliştirilen polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) tekniği bilim çevrelerinde bir devrim olarak kabul edilmiştir. PZR daha sonraki yıllarda modifiye edilerek nükleik asit amplifikasyon (NAA) esaslı moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerde seçilmiş bir gen bölgesinin dış

ortamda kısa süre çoğaltılması ve görüntülenmesi işlemleri yapılmaktadır. PZR metodunun mikrobiyolojide kullanım gerekçeleri belirtilirken özellikle geç ve güç üreyen etkenlerin tanımlanmasında kullanım hedeflenmiştir. Bu özellik dikkate alındığında *Mycobacterium* cinsinde bulunan *M.tuberculosis complex* (*M.tuberculosis*) ve Tüberküloz Dışı Mikobakteri (TDM) akla gelmektedir. Günümüzde klinik örneklerden direkt olarak *M.tuberculosis* varlığının gösterilmesi ve kültürde üreyen mikobakterilerin kısa sürede tür düzeyinde tanımlanması, tüberküloz ilaçlarına duyarlılıklarının araştırılması, ilaca dirençli olguların tespiti, dirençle ilgili mutasyonların saptanması amacıyla NAA ve probhidridizasyon yöntemleri kullanılmaktadır (10).

Kliniğimizde tüberküloz teşhisi için ARB boyama, kültür için BACTEC MGIT 960 otomatize sistemi, moleküler yöntem olarak ise GeneXpert Dx sistem (Cepheid) kullanılmaktadır.

Bu çalışmada tüberküloz tanısı alan hastalarda kültür altın standart kabul edilerek; ARB, kültür ve PZR yöntemi ile TB basili varlığını araştırıp, bu üç yöntemin özgüllüğünü ve duyarlılığını karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## **1.1. Genel Bilgiler**

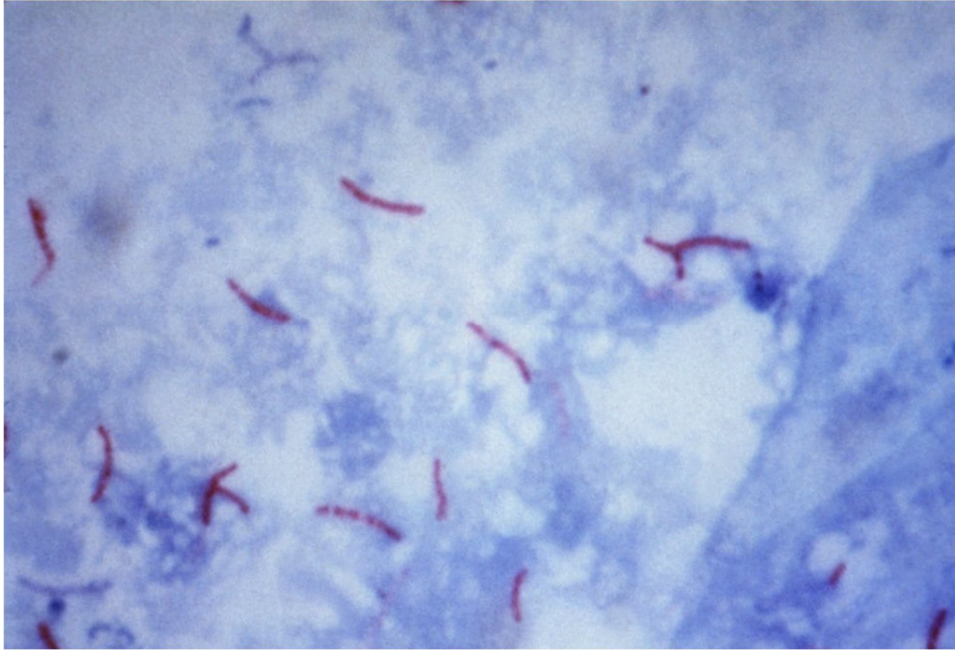
### **1.1.1. Mikobakterilerin Genel Özellikleri**

*Actinomycetales* takımına ait *Mycobacteriaceae* ailesinin tek cinsi *Mycobacterium* cinsidir. Genel özellikleri arasında; aerop, katalaz üreten, hareketsiz, sporsuz ve aside dirençli olmaları, yavaş üremeleri, hücre duvarlarında bol miktarda lipit içermeleri sayılabilir. Mikobakteri türlerinin yüksek Guanin (G) + Sitozin (C) içerikleri, diğer mikolik asit içeren *Gordonia*, *Tsukamurella*, *Nocardia* ve *Rhodococcus* gibi mikroorganizmalar ile benzerlik göstermektedir (11).

*Mycobacterium* cinsinin tüm üyeleri diğer bakterilerden belirgin olarak küçüktürler; enleri 0,2-0,6 µm, boyları 1-10 µm arasında değişmektedir. Görünüm olarak hafif kıvrık veya düzgün çomak şekilli bakteriler olup, bazen filamentöz formda veya kokobasil şeklinde görülebilirler ve mikobakteri türleri arasında sıklıkla pleomorfik morfolojiye rastlanır. Koloni morfolojileri türler arasında çeşitlilik göstermekte olup, S (*smooth*) tipi koloniden, R (*rough*) tipi koloniye ve pigmentli koloniden (kromojenik), pigmentsiz koloniye (nonkromojenik) kadar değişen morfolojide kolonileri vardır (12).

Üremeleri için gerekli en uygun ısı derecesi, türler arasında geniş çapta değişkenlik göstermektedir (<30-45°C). Mikobakteri türüne göre değişmekle beraber uygun ısılarda kolonilerin görülmeye başlaması 2-60 gün almaktadır (11, 13).

Mikobakteriler hücre duvar yapılarında bol miktarda lipid bulunduğu için, boyayı zor alırlar; ancak bir defa boyandıklarında boyayı kolay bırakmaz ve asit-alkol ile yapılan dekolorizasyona direnç gösterirler. Bu dört nedenle aside dirençli bakteriler (ARB, Asido Rezistan Bakteri) olarak anılırlar (Resim 1). Yüzey lipidlerinin hidrofobik etkileri, boyanın suda kolay eriyen organik bir madde (fenol) içinde eritilmesi ve ısıtılması ile en aza indirilir. Fenollü fuksin içine yüzey gerilimini azaltan Tween 80, dimetil sülfonat ve propilen glikoz gibi maddelerin eklenmesi de boyanma özelliğini kuvvetlendirir (14).



**Şekil 1.** Mikobakterilerin Erlich Ziehl Neelsen (EZN) boyama görüntüsü (15).

Gram yöntemi ile kolayca boyanmamalarına rağmen mikobakteriler genellikle Gram pozitif kabul edilirler. Hücre duvarının temel yapısı tipik Gram pozitif bakterilerin hücre duvarına benzer, temel yapı peptidoglikandır. Ancak peptidoglikan tabaka arabinogalaktan-mikolik asit moleküllerine kovalan olarak bağlanmıştır ve bu tabakanın da üzerinde serbest lipidler ve polipeptitler bulunur. Hücre duvarı %60 lipid, %15 polipeptit, %25 de karbonhidrat içerir. Bu özellikleri ile

kendilerini hücre içi ve hücre dışı zararlılara karşı koruyan *M.tuberculosis* insanda kronik granülomatöz bir hastalık olan tüberküloza neden olur (16).

Hücre duvarının yüksek lipid içermesi mikobakterilere özgü aside direnç, konak hücreler tarafından salınan litik enzimlere, dezenfektanlara ve bakterisidal ilaçlara direnç gibi bazı temel özelliklerin oluşmasına yol açmaktadır. İnsanlarda hastalığa neden olan mikobakteriler belirli gruplara ayrılmıştır (Tablo 1) (17)

**Tablo 1.** Sıklıkla insanlarda hastalığa neden olan mikobakteri türlerinin sınıflandırılması (18).

---

I. *Mycobacterium tuberculosis complex*

*M.tuberculosis*

*M.bovis*

*M.africanum*

*M.microti*

II. Yavaş Üreyen Mikobakteriler

A. Fotokromojenler

*M.kansasii*

*M.marinum*

B. Skotokromojenler

*M.gordonae*

*M.scroflaceum*

C. Nonkromotojenler

*M.avium complex- M. avium, M. intracellulare*

*M.terrae complex*

*M.ulcerans*

*M.xenopi*

*M.simiae*

*M.malmoense*

III. Hızlı Üreyen Mikobakteriler

*M.fortuitum*

*M.chelonae*

*M.abscessus*

---

### 1.1.2. Tüberküloz dışı mikobakteriler

*Mycobacterium tuberculosis* kompleks dışındaki tüm mikobakterilere, Tüberküloz Dışı Mikobakteri (TDM) (*nontuberculosis mycobacteria-NTM*) (*Mycobacteriae other than tuberculosis-MOTT*) denilmektedir. İlk defa 1950 yıllarında geleneksel TB tedavisine cevap alınamayan TB hastalarının %1-2'sinde insan patojeni olarak tanımlanmışlardır (19).

Günümüzde belirsiz ve özgül olmayan semptomlara neden olan 125'den fazla TDM; çevrede her yerde, sıklıkla toprakta, hem doğal hem de işlenmiş su kaynaklarında bulunmaktadır. Tüberkulozdan farklı olarak TDM'lerle gelişen hastalık, çevresel organizmalarla maruziyete bağlıdır. İnsandan insana geçişle ilgili hiçbir vaka bildirilmemiştir. Genellikle immun supresif tedavi alan ya da immun yetmezliği olan insanlarda hastalık oluşturmaktadır (20).

Tüberkuloz dışı mikobakteriler insanlarda önemli klinik tablolara neden olmaktadır. Bunlar arasında pulmoner enfeksiyonlar, lenfadenitler, dissemine enfeksiyonlar, lokalize deri ve yumusak doku enfeksiyonları, tendon-kemik-eklem enfeksiyonları ve kateter enfeksiyonları bulunmaktadır (21).

Tüberkuloz dışı mikobakterilerin; a) fakültatif patojen olmaları, b) insandan insana geçişi konusunda yeterli kanıt olmaması, c) türüne ve neden olduğu hastalığa bağlı olarak tedavilerinin zor ve farklı olması, d) mikroorganizma ve konağın immün sistemi arasındaki ilişkiye bağlı olduğu düşünülen hastalık patogenezinin belirsizliği ortak özellikleridir (22).

Ernest Runyon; TDM'leri üreme hızları, koloni morfolojileri ve pigment üretimlerine göre fotokromojenler, skotokromojenler, fotokromojen olmayanlar ve hızlı üreyenler olarak 4 grupta sınıflandırmıştır (Tablo 2) (23).

**Tablo 2.** Runyon sınıflaması

Grup	Üreme Hızı	Pigment Üretme		Örnek Türler
		Işıktaki	Karanlıkta	
I- Fotokromojenler	Yavaş	+	-	<i>Mycobacterium kansasii</i> , <i>Mycobacterium marinum</i> , <i>Mycobacterium simiae</i>
II- Skotokromojenler	Yavaş	+	+	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i> , <i>Mycobacterium szulgai</i> , <i>Mycobacterium gordonae</i>
III- Fotokromojen olmayanlar	Yavaş	-	-	<i>Mycobacterium malmoense</i> , <i>Mycobacterium xenopi</i> , <i>Mycobacterium avium</i> kompleks, <i>Mycobacterium ulcerans</i> , <i>Mycobacterium haemophilum</i>
IV- Hızlı üreyenler	Hızlı	-	-	<i>Mycobacterium fortuitum</i> , <i>Mycobacterium chelonae</i> , <i>Mycobacterium abscessus</i>

Grup I, II, III kolonilerinin gözle görülür hale gelebilmesi için 7 gün veya daha fazla süre gerekirken, Grup IV kolonileri 7 günden daha kısa sürede üremektedir (24).

Günümüzde TDM sınıflandırması mikobakterilerin öncelikle enfeksiyon oluşturdıkları organa göre yapılmaktadır. Akciğer tutulumundan en sık *M.avium* kompleks (MAK) ve *M.kansasii* sorumlu bulunurken *M.abcessus*, *M.fortuitum*, *M.xenopi*, *M.malmoense*, *M.celatum*, *M.asiaticum* da daha nadir etkenler arasında gösterilmektedir. Akciğer dışında ise; çocuklarda görülen lenf nodu tutulumundan MAK, *M.scrofulaceum* ve *M.malmoense*; deri tutulumundan genellikle *M.marinum*, *M.ulcerans* ve hızlı üreyen mikobakteriler; kemik eklem tutulumundan ise *M.fortuitum*, *M.abcessus*, *M.chelonae* ve *M.kansaii* sorumlu bulunmuştur. Solid organ transplantasyonu, kronik kortikosteroid kullanımı, kollajen vasküler hastalık, lösemi, lenfoma gibi immün sistemi baskılanmış hastalarda sık görülen yaygın TDM enfeksiyonlarında ise patojen suşlar MAK, *M.kansasii*, *M.chelonae* ve *M.haemophilium*'dur. TDM'lerin, nadir olarak prostetik kalp kapak enfeksiyonları ve genitoüriner enfeksiyonlara da neden olduğu bildirilmektedir (25).

### 1.1.3. Tüberküloz

*Mycobacterium tuberculosis* genellikle akciğer tüberkülozlu hastaların hapşırma, öksürük ve konuşması ile ortaya saçılan; içinde canlı basil bulunan damlacık çekirdeklerinin, duyarlı kişilerce inhale edilmesi ile bulaşır ve tek doğal kaynağı insandır (26).

1-5 µm çapında olan bu partiküller, normal hava akımında asılı dururlar. İn hale edilen partiküllerle alveollere ulaşan basiller, alveoler makrofajlar tarafından tutulur. Sıklıkla konak hücre sel bağışık yanıtı *M.tuberculosis*'in çoğalmasını ve yayılmasını engeller. Ayrıca, bazı basiller ilk enfeksiyondan sonra yıllarca canlı ama "dormant" basiller olarak kalabilirler. Latent *M.tuberculosis* enfeksiyonu (LTBE) olan hastalar genellikle PPD (Pürified Protein Derivative) cilt testi pozitif olup asemptomatikler ve bulaştırıcı değillerdir. HIV enfeksiyonu latent enfeksiyonun aktif tüberküloza dönüşmesinde bilinen en önemli risk faktörüdür (11).

Basiller alveoler makrofajlar tarafından fagosite edildikten sonra hücre içinde çoğalabilirler ve enfekte makrofajlar aracılığı ile lenf nodlarına veya uzak organlara (kemik iliği, dalak, böbrek, santral sinir sistemi) taşınabilirler. Makrofajların

bakterisidal aktivitesi ile basil virölansı ve yoğunluğu arasındaki denge olayları belirler. Basil az miktarda ise doğal savunma mekanizmaları ile basil yok edilir ve minimal doku hasarı ile hastalık geçirilir. Basil fazla miktarda ise bu kez hücrel immün yanıt sonucu doku nekrozu gelişir (primer enfeksiyon). Doku nekrozunun nedeni sitokin toksisitesi, iskemi, makrofajlardan çıkan hidrolitik enzimler ve reaktif oksijen metabolitleridir. Aktive makrofajlar 3 mm'den küçük granülomlar içine penetre olarak basilleri öldürebilirler. Ancak daha büyük nekrotik veya kazeöz granülomlar fibrin ile çevrili olduğundan bu odaktaki basiller makrofajların etkisinden kurtulurlar. Bu durumda hastalık kontrol altına alınmaz ise primer tüberküloz gelişir, ya da hastalık kontrol altına alınır, fakat basiller kazeöz nekroz içinde canlı halde (dormant basil) kalır ve latent tüberküloz gelişir. Kazeöz nekrozda canlı kalan basiller hayatın herhangi bir döneminde, herhangi bir nedenle reaktif olabilirler ve bu duruma sekonder tüberküloz adı verilir.

Primer hastalık genellikle alt solunum yollarını tutar. Hastalığın aktif olduğu dönemde tek veya her iki üst lobta pnömoni ya da apse oluşumu ve kavite gelişebilir. Basilin ilk çoğaldığı odaktan hematogen yolla diğer organlara yayılması ile ekstrapulmoner tüberküloz ortaya çıkar (16).

Milier tüberküloz, primer enfeksiyon sırasında kazeöz bir odağın damara açılması veya erken hematogen yayılım esnasında büyük damar intimasına yerleşen basillerin kana karışması ile gelişir. Genellikle 0-4 yaş arası çocuklarda, primer enfeksiyonun erken komplikasyonu olarak ortaya çıkar. Milier tüberkülozlu hastalarda bir kaç hafta içinde tüberküloz menenjit gelişebilir. İleri yaşlarda da ortaya çıkabilen milier tüberküloz, eski bir tüberküloz lezyonunun aktive olup kan damarına açılması, lezyon bulunan bir organa yapılan cerrahi girişime bağlı olarak inaktif haldeki basillerin kana karışması gibi çok değişik nedenlerle de gelişebilir. Fakat milier tüberküloz çocuklara göre erişkinlerde daha az görülür (27).

Reenfeksiyon tüberkülozu endojen reenfeksiyon ve ekzojen reenfeksiyon olarak iki şekilde ortaya çıkar. Endojen reenfeksiyon tüberkülozu, sıklıkla primer enfeksiyon sırasında lenföhematojen yolla akciğerin apikal-subapikal bölgelerine yerleşen (Simon odağı) ve çoğalmadan burada canlılığını sürdüren dormant basillerinin, hayatın herhangi bir döneminde hücrel immün yanıtta meydana gelen supresyon nedeniyle aktif hale geçmesi ile meydana gelir. Ekzojen reenfeksiyon ise

önceden primer enfeksiyon geçirmiş kişinin, basil yayan aktif tüberkülozlu bir hastadan çok sayıda virulan basil alması ile meydana gelir (28).

### 1.1.3.1. Tarihçe

İnsanlık tarihi kadar eski bir tarihi olan tüberküloz ya da verem hakkında ilk bilgiler Milattan üç bin yıl önce Nil nehri kenarındaki Dra Abu-El Naga isimli kasabada yaşamış olan ve kanlı balgam çıkararak ölen genç bir kızıdan öğrenilmiştir. M.Ö. binyıl önce yaşamış olan rahip Nesperehan'ın mumyasında Pott apsesi denilen vertebra tüberkülozu görüldüğü ortaya çıkarılmıştır. Günümüzden 2,500 yıl önce Bodrum'un karşısındaki Kos adasında yaşamış olan Hippocrates'in kitabında veremin daha çok 18-35 yaşlarındaki kişilerde görüldüğü yazılıdır.

Verem hastalığına birçok isim verilmiştir. İnsanları eriterek öldürdüğü için "Tüketim hastalığı" anlamındaki "Consumption", hastaları soldurarak yok ettiği için "Beyaz Ölüm" veya "Beyaz Veba" ve çok insanın yaşamını sonlandırdığı için de "Ölümün Kaptanı (Captain of the Death) diye anılırdı. Romalılar bu hastalığı, hırıltılı nefes alıp verme ve öksürükle balgam atma anlamındaki "Phytisis" adını koydular. Bizim dilimizde ise "İnce Hastalık" en çok kullanılan tanımdır (29, 30).

Tarihsel süreç içerisinde TB hastalığını düşündürecek bulgular arasında; Almanya'da bulunan insan iskeletlerinde (M.Ö. 5000) aside rezistan basil (ARB) saptanması, M.O. 3.500-3.000 yıllarına ait Mısır mumyaları ve Ürdün de bulunan insan iskeletlerinde Pott hastalığı ve Psoas apseleri görülmesi, Mısır'da Nil yakınlarındaki bir mezarda (M.O. 1500) lenf bezi TB'sine ait belgenin bulunması sayılabilir. En iyi TB kanıtı, M.S. 700 civarında yaşayan, sekiz yaşındaki İnka erkek çocuğu mumyasından elde edilmiştir. Bu mumyanın omurga grafisinde Pott hastalığına ait bulgular saptanmış ve lezyon yaymalarında aside dirençli basiller görülmüştür (31).

Robert Koch (1843-1910); 1882 yılında TB'den ölen Heinrich Gunther isimli 32 yaşındaki hastasının akciğerindeki lezyonlarından basili izole etmiştir. Daha sonra saf kültürünü üretmiş ve deneysel olarak hayvanlarda hastalık oluşturmuş ve enfekte hayvanlardan bakteriyi yeniden üreterek Koch postulatını tanımlamıştır. Bakteri ilk başlarda *Bacterium tuberculosis* olarak adlandırılmış; ancak daha sonra 1886 yılında Lehmann ve Neuman tarafından koloni morfolojisi ve yavaş üreme özelliği nedeniyle *Mycobacterium tuberculosis* olarak isimlendirilmiştir. Koch 1890 yılında

*M.tuberculosis* ekstresi olan “*old tuberculin*” ile hastalığın özel bağışıklık ve allerjisini ortaya koymuştur (32).

Fransız araştırmacılar 1921 yılında Albert Calmette ve Camile Guerin sığır TB basilini 230 kez pasaj yaparak ilk TB aşısı olan Bacillus Calmette-Guerin (BCG)’i geliştirmişlerdir. Seibert ve Glenn 1939 yılında “*old tuberculin*”in saflaştırılmasıyla elde edilen tuberkulinin saflaştırılmış protein türevi olan PPD’yi hazırlamıştır (33, 34).

Sert ve temiz dağ havasının iyi geldiği düşünülerek yirminci yüzyılın başlarında yüksek yerlerde sanatoryum denilen verem hastaneleri kuruldu. İlk sanatoryumun 1854 yılında Almanya’da açılmasıyla TB tedavisinde farklı bir yaklaşım başlamıştır. W. Roentgen’in 1895 yılında X ışınını bulmasından sonra sanatoryumlar; radyolojik, bakteriyolojik ve floroskopik incelemelerin yapıldığı TB tanı, tedavi ve araştırma merkezleri haline gelmişlerdir. Bu dönemde TB hastalığı, sanatoryum ve cerrahi yöntemler ile tedavi edilmeye çalışılmıştır. Ancak bu yöntemlere tam bir yanıt alnamamakta ayrıca hastaların sanatoryumlarda izole olmaları ve cerrahi sonrası toraksın görünümünün bozulması nedeniyle ruhsal durumları etkilenmekteydi (35).

Tüberkuloz tedavisinde yeni bir dönem 1940’lı yıllarda para-aminosalisilik asit (PAS) ve streptomisin bulunmasıyla başlamıştır. Ancak bu ilaçların monoterapilerine kısa sürede direnç gelişmesi ve sık relaplara yol açması neticesinde PAS ve streptomisin birlikte verilmeye başlanmıştır. 1952 yılında izoniazidin (INH) bulunmasından sonra üç ilacın 18-24 ay süreyle uygulanması sonucunda TB tedavi edilebilir bir hastalık olmuştur. Daha sonra 1954 yılında pirazinamid (PZA), 1962 yılında ethambutol (EMB), 1966 yılında rifampisin (RIF) bulunmuştur. 1980’li yılların başlarında izoniazid ve rifampisin birlikte verildiğinde tedavinin 9 aya indirilebileceği, üstelik bunlara PZA de eklendiğinde 6 ay gibi daha kısa bir sürede tedavinin yeterli olabileceği tespit edilmiştir (36).

Günümüzde tüberkuloz insidansı batı toplumlarında düşüktür. Ancak yine de bu toplumlarda tüberkuloz korkutucu olma özelliğini devam ettirmektedir. Hastaların etkili bir şekilde tedavileri sağlanmadığı takdirde, hiç kimse güvende değildir. İkincil önemli neden de HIV enfeksiyonunun ortaya çıkması, göçler yolu ile bu toplumlarda ciddi salgınlar ve ekonomik yüklerin ortaya çıkmasıdır. İlaçlara dirençli olan

tüberküloz, özellikle çok ilaca dirençli tüberküloz oldukça korkutucudur. Çünkü bu tipte tüberkülozun tedavisi oldukça zordur (37).

Tüberkülozun hala bir sorun olduğu Türkiye'de tüberküloz hastalığının sağlık kurumları ve diğer tüberküloz hastası bulunma riski taşıyan kurumlarda bulaşmaya karşı alınacak önlemler önem taşımaktadır. Dünyada yüzyıldan uzun süredir devam eden bu sorun daha uzun yıllar sürecektir (38).

### **1.1.3.2 Epidemiyoloji**

Genellikle yoksul ve gelişmekte olan ülkelerin bir sorunu olan TB halen önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) bunun nedenini; doğru yaklaşımların uygulanmadığı TB kontrol programları, HIV epidemileri, TB'nin sık görüldüğü ülkelerden göçler ve ekonomik yetersizlikler olarak açıklamaktadır. Tüberküloz hasta sayılarındaki artışlar ve TB kontrolü çabalarının yeterince başarı sağlayamaması nedeniyle, DSÖ 1993 yılında ilk kez bir hastalık için acil durum ilan etmiş ve yeni bir TB kontrol stratejisi hızla yayınlanmıştır. Günümüzde TB kontrolünün temel yöntemi olan bu strateji, doğrudan gözetimli tedavi stratejisidir (DGTS) (39).

DGTS stratejisi:

1. TB kontrolü ile ilgili uygulamalar için politik iradenin ortaya konması,
2. Semptomatik hastalarda pasif yöntemle bakteriyolojik tanı,
3. Gözetimli tedavi,
4. Ücretsiz ve sürekli ilaç sağlanması,
5. Kayıt-raporlama-analiz sistematığının kurulması, unsurlarını içermektedir.

Tüberküloz halen dünyanın en ölümcül bulaşıcı hastalıklarından biri olmaya devam etmektedir. 2013 yılında tahmini olarak 9 milyon insanda TB gelişti ve 360.000'i HIV pozitif olmak üzere 1,5 milyon hasta TB nedeniyle hayatını kaybetmiştir. TB hastalığının her yıl yavaş yavaş azaldığı ve etkili tanı ve tedavi yöntemleri sonucu 2000 ve 2013 yılları arasında 37 milyon hastanın hayatının kurtarıldığı tahmin edilmektedir. Fakat halen TB nedeniyle verilen hasta kayıplarının kabul edilemeyecek düzeyde yüksek olması ve çoğunun önlenemez sebepler sonucu oluşması nedeniyle TB ile savaş için harcanan emek ve zaman artırılmalıdır.

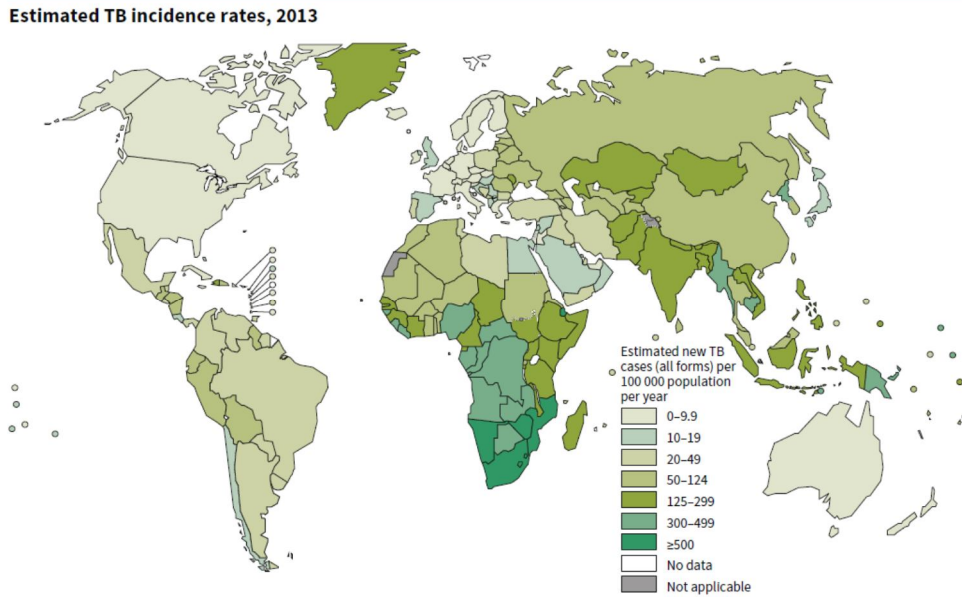
Tüberküloz gelişen tahmini 9 milyon insanın yarısından fazlası 2013 yılında (%56) Güney-Doğu Asya ve Batı Pasifik Bölgelerindedir. Diğer bir %25'i nüfusa

oranla en yüksek vaka ve ölümün görüldüğü Afrika Bölgesi'di. Hindistan ve Çin sırasıyla %24 ve %11 ile en fazla vakanın görüldüğü ülkelerdendi (Şekil 1).

Tüberkuloz vakalarının ve ölümlerinin yaklaşık %60'ı erkekti, fakat kadın vaka sayısı da oldukça yüksekti. 2013 yılında 1/3 ünden fazlasında HIV pozitif olmak üzere yaklaşık 510.000 kadın TB nedeniyle hayatını kaybetmiştir. Aynı yıl 80.000 HIV negatif çocuk TB nedeniyle hayatını kaybetmiştir.

Tüberkuloz gelişen 2013'te 9 milyon insanın 1,1 milyonu (%13) HIV pozitifti. Son yüzyıl içinde HIV zemininde TB gelişen hastalarda ölüm oranı düştüğü görülmektedir. Her yeni 5 HIV pozitif TB hastasının 4'ü ve her 5 HIV pozitif TB nedeniyle hayatını kaybeden hastanın 4'ü Afrika Bölgesinde görülmektedir.

Tüm dünyada 1990 ile 2013 yılları arasında TB mortalite oranı tahmini olarak %45 düşmüştür aynı periyotta TB prevalans oranı da yaklaşık olarak %41 düşmüştür (40).



Şekil 2. Tahmini TB insidans oranı (2013)

Son beş yılda küresel tedavi başarı oranı, Dünya Sağlık Asamblesi tarafından belirlenen %85 hedefine ulaşılmış ya da aşılmıştır (40).

Tüberkuloz insidansının 2015 yılına kadar, prevalansının ve ölümlerinin azaltılması dünyanın çoğunda elde edilebilir, ancak sorun Afrika ve Doğu Avrupa'da büyük olacaktır (41).

Tüberküloz karşı mücadelede, Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi (1995-2005 yılları) ve 2006 yılında başlatılan halefi Stop TB stratejisini uygulamak için 15 yıllık yoğun çaba uygulanmaktadır. 1995-2011 yılları arasında, kümülatif toplam 51 milyon tüberküloz hasta, bu programlar ile tedavi edildi, başarıyla 20 milyon hayat kurtarılmıştır.

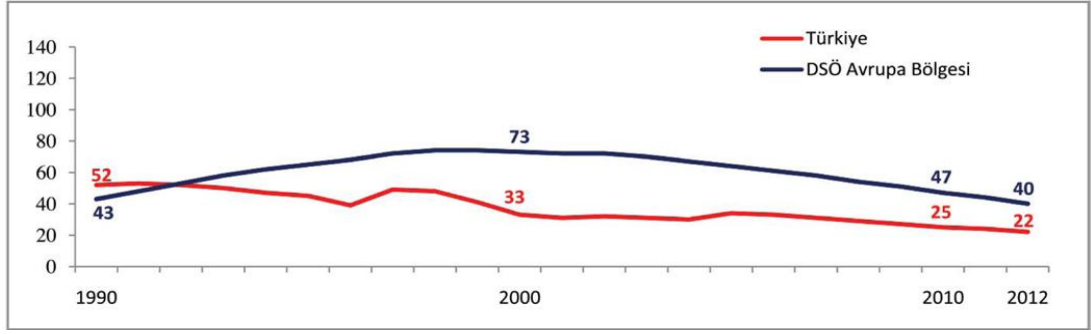
Tüm bunlara rağmen küresel tüberküloz kontrolünde büyük sorunlar bulunmaktadır. Tüm tüberküloz olgularının üçte birden fazlası DGTS protokolü kullanılarak tedavi almamaktadır. Saptanan hastalar arasında çok ilaca dirençli tüberkülozlu tahmini 310.000 olgunun çoğu uluslararası kurallara göre tanı ve tedavi almamaktadır. Birçok tüberkülozlu olgunun arasında HIV pozitifli kişiler vardır. HIV durumu bilinmemektedir. Bu hastalar antiretroviral tedavi almamaktadır (42).

Tüberkülozun son epidemiyolojik göstergeleri, 2050 yılında tüberküloz eliminasyonunun Binyıl Kalkınma Hedefleri ile elde edilemeyeceğini göstermektedir (43).

Dünya sağlık örgütü nün tüberküloz kontrolü için önerdiği DGTS'nin beş bileşeni Türkiye'de uygulanmaktadır. Türkiye'de tüberküloz kontrolünün temelini DGTS oluşturmaktadır. DSÖ'nün önerilerini içeren "Berlin Deklarasyonu" kapsamında Türkiye de "Stop TB Stratejisi"ni uygulamayı taahhüt etmiş ve strateji gereklerini uygulanmaya başlamıştır (44).

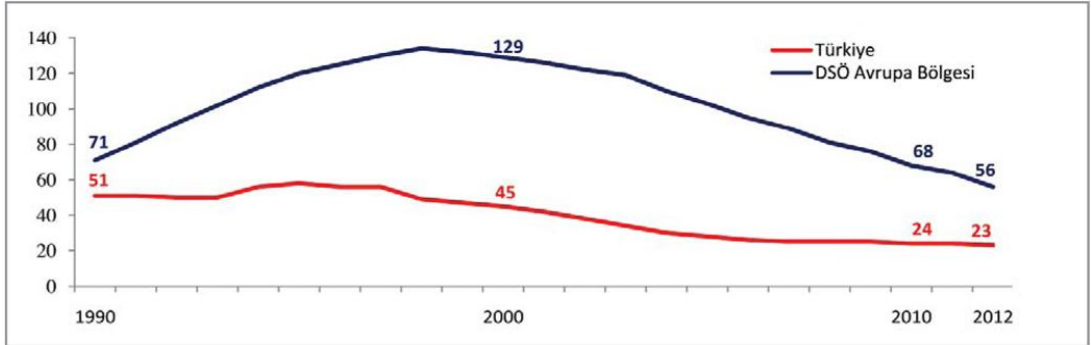
Türkiye, DSÖ Avrupa Bölgesi'nde tüberküloz açısından yüksek öncelikli 18 ülke arasındadır (45).

Dünya sağlık örgütü'nün tüberküloz insidansı ile ilgili hedefi, 2015 yılına kadar insidans hızı artışının durdurularak geriye çevrilmesidir. Türkiye'nin de içinde yer aldığı DSÖ Avrupa Bölgesi'nde 2012 yılı tüberküloz insidansı 100.000'de 40 iken, Türkiye'nin tüberküloz insidansı 100.000'de 22'dir. Türkiye'nin tüberküloz insidans hızı, yıllara göre azalmakta olup, 2000 yılında 100.000'de 33 iken 2010 yılında 100.000'de 25, 2012 yılında 22'dir (Şekil 3) (40).



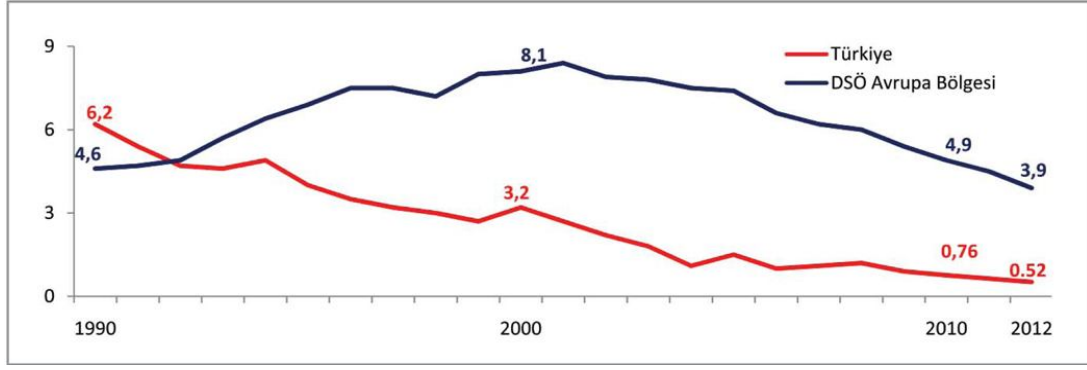
**Şekil 3.** DSÖ Avrupa Bölgesi ve Türkiye'nin yıllara göre TB insidansı

Dünya sağlık örgütü'nün tüberküloz prevalansı ile ilgili hedefi, tüberküloz prevalansını 2015 yılına kadar, 1990 yılına kıyasla yarıya düşürmektir. DSÖ Avrupa Bölgesi'nde 2012 yılı tüberküloz prevalansı 100.000'de 56 iken Türkiye için bu rakam 100.000'de 23'tür. Türkiye, 1990 yılında 100.000'de 51 olan tüberküloz prevalansını 2007 yılında 100.000'de 25'e düşürmüştür ve prevalans hedefine ulaşmıştır (Şekil 3) (40).



**Şekil 4.** DSÖ Avrupa Bölgesi ve Türkiye'nin yıllara göre TB prevalansı

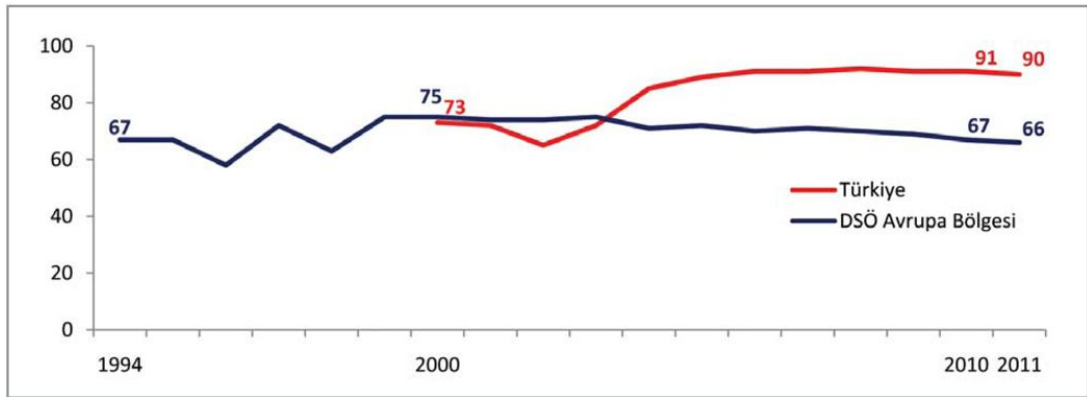
Binyıl Kalkınma Hedefi kapsamında 2015 yılında tüberküloz mortalitesini 1990 yılı seviyesinin yarısına düşürmek hedefi bulunmaktadır. Türkiye 1990 yılında mortalite oranı 100.000'de 6,2'dir. Türkiye, 1998 yılında tüberküloz mortalitesini 100.000'de 3'e düşürerek bu hedefe ulaşmıştır (Şekil 5) (40).



**Şekil 5.** DSÖ Avrupa Bölgesi ve Türkiye'nin yıllara göre TB mortalite oranı

Dünya sağlık örgütü'nün tüberküloz kontrol programlarındaki hedefi "yayma pozitif yeni tüberküloz olguların en az %70'ine ulaşmak, ulaşılan bu olguların %85'ini başarıyla tedavi etmektir". Türkiye ilk defa 2004 yılında beklenen olguların %87'sini bulup, bunların %85'ini tedavi ederek bu hedefe ulaşmıştır.

Dünya sağlık örgütü Avrupa Bölgesi'nde 1994 yılında yayma pozitif tüberküloz hastaların tedavi başarısı %67 iken, Türkiye için bu rakam 1996 yılında %71, 1998 yılında %66'dır. Türkiye için 1997 ve 1999 yıllarına ait rakam belirtilmemiştir. 2000 yılında bu oran DSÖ Avrupa Bölgesi için %75 iken, Türkiye için %73'tür. Türkiye, tedavi başarısında önemli aşama kaydetmiş olup, 2012 yılında yayma pozitif tüberküloz olgularının tedavi başarısı %90 iken, DSÖ Avrupa Bölgesi'nin tedavi başarısı %66'dır (Şekil 6) (40).



**Şekil 6.** DSÖ Avrupa Bölgesi ve Türkiye'nin yıllara göre yayma pozitif TB olgularının tedavi başarısı

Ekonomik İşbirliği Teşkilatı üye ülkelerin 2009 yılında tüberküloz durumunun değerlendirildiği ve Binyıl Kalkınma Hedefleri kapsamında başarı ve eksikliklerin tespit edildiği bir çalışmada; üye ülkelerden sadece iki ülkenin 2015 yılına kadar Binyıl Kalkınma Hedefleri'ne ulaşacağı, bunlardan birinin Türkiye olduğu, diğer ülkelerin acil müdahale hazırlaması gerektiği, yoksa hedeflere ulaşmalarının mümkün olmayacağı belirtilmiştir (46).

Tüberküloz kontrolü için ayrılan bütçenin artırılması, tüberküloz kayıt sisteminde iyileştirme, tüberküloz laboratuvar ağının güçlendirme çalışmaları, doğrudan gözetimli tedavinin yaygınlaştırılması, verem savaşı dispanserlerinin yeniden yapılandırılması sonucunda Türkiye bu hedeflere ulaşmıştır (47).

Türkiye'nin geçmişten gelen tüberkülozla mücadele kararlılığı devam etmektedir. Sağlık Bakanlığı, tüberküloz insidansını 2017 yılında 100.000'de 16'ya, 2023 yılında 100.000'de 12'ye indirmeyi hedeflemiştir (48).

### **1.1.3.3. Virülans Faktörler**

*Mycobacterium tuberculosis* virülansında rol oynayan kesin bir faktör şimdiye kadar gösterilememiş olmasına rağmen kord faktör ve sülfatidler gibi bazı immünoreaktif komponentlerin virülanstan sorumlu olabileceği ortaya konabilmiştir. Bakterinin bilinen histolitik enzimler, endo veya ekzotoksinleri yoktur. Ancak hücre duvarında bulunan bazı yapıların toksik olduğu geçmişte yapılan çalışmalarla gösterilebilmiştir.

**Polisakaritler (arabinogalaktan ve arabinomannan);** duyarlı deney hayvanlarında anaflaktik tipte aşırı duyarlılık reaksiyonlarına neden olurlar. Gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonlarında rolleri yoktur. Konak hücre makrofajından TNF- $\alpha$  salınımını artırırlar. Nötrofillerin damardan dokuya geçmesini ve yangısal tepkimenin oluşmasını sağlarlar.

**Fosfatidil inositol mannosid;** Lipid yapısında olup, esas itibarıyla haptendir. Çapraz koruyucu immunitede rolünün olabileceği sanılmaktadır.

**Muramil dipeptid(MDP);** tek başına etkisi olmadığı halde trehaloz dimikolatla birleşince immün sistemi stimüle eder ve antitümör aktivite ortaya çıkar.

**Wax D;** peptidoglikolipid yapıda olup Freund's adjuvanının etkisini artırıcı özelliğe sahiptir. BCG aşısının, belli tümörlerde gerileme gösteren immunoterapik etkisinde rolü vardır.

**Kord faktor (trehaloz 6'-6'-dimikolat);** tüberküloz basillerine küme oluşturma kabiliyeti kazandırdığı gibi adjuvan etkiyi de içeren çok sayıda özelliğe sahiptir. Alternatif kompleman yolunu aktif eder. Polimorfonükleer (PNL) lökosit göçünü önler. Granülom oluşumunda rol oynar. Anti tümör özelliği de vardır. Konak hücre membranına tutunarak solunum ve oksidatif fosforilasyonda hasara yol açar. Farelerde karakteristik bir toksisiteye sahiptir (14).

#### **1.1.3.4. İmmünopatogenez**

İnsanlık tarihinin bilinen eski hastalıklarından biri olan tüberküloz, *Mycobacterium tuberculosis kompleksi* (*M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.africanum*, *M.microti*) basilleri tarafından oluşturulan ve basiller ile konağın inflamatuvar hücrelerinin ilişkilerine bağlı olarak gelişen kronik granülomatöz bir enfeksiyondur.). Enfeksiyon, genellikle inhalasyon ile alınan içinde 1-3 basil içeren 1-3 µm büyüklüğündeki damlacık partiküllerin üst solunum yolunun fiziksel engellerini aşarak alveollere ulaşmasıyla başlar. Akciğer tüberkülozlu bir hasta ile karşılaşan PPD negatif olguların yaklaşık %30'unda tüberkülin deri testi pozitifleşen fakat hiçbir klinik belirti oluşmayan primer enfeksiyon oluşur. Bu ve primer enfeksiyonlu kişilerin ancak %10'unda primer tüberküloz gelişmektedir (27).

Enfeksiyon veya hastalığın oluşup oluşmaması, konağın direnci ile basilin virulansı arasındaki dengeye bağlıdır. Konağın tüberküloza karşı yanıtında hem doğal hem de kazanılan immünite rol oynamaktadır (50).

*Mycobacterium tuberculosis* alveollere ulaştığında, başlangıçta yok edilebilir, basillere karşı kazanılan immün yanıtla enfeksiyon kontrol altına alınabilir veya primer enfeksiyondan sonra çoğalarak primer tüberküloz oluşturabilir. Primer enfeksiyon sırasında dormant hale geçen basiller, yıllar sonra çoğalmaya başlayabilir ve reaktivasyonla sekonder tüberküloza neden olabilir. Primer enfeksiyon, bir latent dönemden sonra (yıllar veya onlarca yıl) her hangi bir yaşta aktifleşebilmekte ve en sık akciğerin üst bölgelerinde olmak üzere diğer organlarda sekonder tüberküloza neden olabilmektedir. Hastalığın tipini konağın basil antijenlerine karşı oluşturduğu immünolojik yanıtlar (hücrel immünite ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu), belirlemektedir. Akciğer tüberkülozunun immünopatogenezini, ilk enfeksiyondan kavite oluşumuna kadar evrelendirilmektedir (51).

**1. Başlangıç evresi:** *M.tuberculosis*'in alveole inhalasyonu ile ilk evre başlar ve lezyon bölgesinde alveoler makrofajlar toplanarak inflamatuvar bir yanıt gelişir. Alveoler makrofajlar tarafından fagosite edilen basilin virulans özelliklerine ve alveoler makrofajların mikrobisidal gücüne bağlı olarak basiller sindirilir veya zayıf alveoler makrofajlarda basiller çoğalarak enfeksiyonu başlatır. Genetik bozukluk ve kazanılan immün yetersizlikler mikobakteriyel enfeksiyonlara duyarlılık yaratmaktadır.

**2. Basillerin çoğalma evresi:** 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. Alveoler boşluğa geçen basilleri yeni makrofajlar fagosite etseler de henüz aktive edilmedikleri ve hücresele immün yanıt gelişmediği için çoğalmalarına engel olamazlar ve lenfo-hemotojen yolla tüm vücuda yayılarak yeni granümler oluştururlar.

**3. Enfeksiyonun kontrolü evresi:** *M.tuberculosis*'in inhalasyonundan 2-6 hafta içinde, etkene karşı özgül hücresele 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. Makrofaj ve polimorf nüveli lökosit kaynaklı hidrolitik enzimler ile toksik oksijen radikallerinin etkisiyle doku harabiyeti artar. Oluşan kazeöz nekroz ortamında basiller, anoksik koşullar nedeniyle çoğalamazlar, yıllarca hatta yaşam boyu dormant halde kalırlar. Primer enfeksiyon ve primer odakların (Ghon odağı) oluştuğu bu evrede tüberkülin testi pozitifdir.

**4. Hücresele immün yanıt ile Gecikmiş tip aşırı duyarlılık arasında etkileşim evresi:** Granümlerde kazeöz odağın etrafında toplanan aktif makrofajlar, kazeöz odaklardan kaçar basilleri fagosite ederek hızla sindirirler. Aktif makrofajların yakaladığı basiller çoğalmayı sürdürürse, gecikmiş tip aşırı duyarlılık yanıtı tekrarlanarak doku harabiyeti artar. Eğer kazeöz odak erimezse, hücresele

immün yanıt tarafından primer infeksiyonun ilerlemesi durdurulur. Akciğer ve lenfo-hemotojen yolla vücudun diğer bölgelerine ulaşan basillerin oluşturdukları küçük kazeöz odaklar makrofajlar tarafından temizlenir. Büyük kazeöz odaklar ise bir fibröz kapsülle çevrilerek izole edilir (tüberküloz). Immün sistemi baskılanmış kişilerde oluşan kazeöz odaklardan kaçan basiller, inaktif veya düşük aktivitedeki makrofajlar tarafından fagosite edilir, fakat sindirilemezler. Bu makrofajların basil çoğalmasını durdurabilmesi için, gecikmiş tip aşırı duyarlılık yanıtını tekrarlanması gerekir. Bu yanıt tekrarlandıkça kazeöz nekrozlar genişler ve primer tüberküloz oluşur. Lenfo-hematojen yolla basiller akciğerden vücudun diğer kısımlarına yayılır ve pulmoner ven duvarında oluşan kazeöz odağın açılması ile miliyer ve dissemine tüberküloz gelişir.

**5. Kavite oluşum evresi:** Hücrel immün yanıtı primer tüberkülozu kontrol edemeyen kişilerde, primer tüberküloz endojen reaktivasyonla veya ekzojen reenfeksiyonla ilerleyerek yıllar sonra gelişen kaviter lezyonlar oluşur (sekonder tüberküloz). Primer tüberkülozun ilerlemesi, makrofajlardan salınan hidrolitik enzimlerin protein ve lipitleri hidrolize etmesi ile granülom ortasındaki kazeumun erimesi, likeifikasyon ve kavitasyon ile sonuçlanır. Basiller, hücre dışında erimiş materyal içinde çoğalarak eriyikle birlikte akciğerin diğer bölgelerine yayılırlar.

Alveollere ulaşan *M.tuberculosis* basilleri, doğal savunma yollarıyla yok edilebilir veya çoğalarak klinik görünümü oluşturabilirler. Konağın doğal savunmasında; üst solunum yolunun fiziksel engeli, fagositoz, fagositik hücrelerin reaktif nitrojen ve oksijen ürünleri, inflamatuvar hücreler ve saldıkları sitokinler, alveoler makrofajların kimyasal yapısını değiştirmesi, apoptoz ve genetik faktörler rol oynar. Üst solunum yolunun fiziksel engeli Respiratuvar bronşiyol epiteli, genellikle virulan *M.tuberculosis* dışında mikobakteriyel enfeksiyonlara dirençlidir. Lizozim, laktoferrin gibi antibakteriyel sekresyon içeren üst solunum yolunun silialı epitelleri, basil bulunan büyük molekülleri tutarak doğal savunmaya katkıda bulunurlar (14).

Hücre duvarlarının zengin lipit tabakası sayesinde mikobakteriler oldukça korunaklıdır. Kord faktörü denilen *trehaloz 6,6 dimikolat* sadece virulan suşlarda bulunan bir virülans faktörüdür. Mikobakteriler, makrofaj üzerindeki reseptörlere bağlanmayı sağlayan ligantlara sahiptir. Bu sayede makrofaj içerisine giren basiller,

makrofajın öldürücü etkisinden korunmuş olurlar ve canlı kalırlar. *M.tuberculosis* ortama bolca amonyak salarak, hem lizozom-fagozom oluşumunu engeller hemde birleşme olsa dahi litik enzimlerin fonksiyonlarını bozarak etkisizleştirirler. *M.tuberculosis* tarafından üretilen trehaloz 2- sülfat türevleride fagozom- lizozom birleşmesini önler. Bu basiller hücre duvarındaki lipoarabinomannan ve fenolik glikolipidler sayesinde, makrofajlarca üretilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve diğer oksijen radikallerinin öldürücü etkisini bloke ederler. Lipoarabinomannan, hem oksijen radikallerini bloke eder hemde protein kinaz C'yi inaktive eder. Lipoarabinomannanın ucuna mannoz molekülünün bağlanması sonucu IL-10 sentezi uyarılarak immün yanıtın humoral yöne kaymasına ve TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor), IL-12 gibi sitokinlerin salınımı için uyarının azalmasına neden olur. TNF- $\alpha$ , IL-12 yapımının azalması, reaktif oksijen radikallerinin sentezinin azalmasına ve makrofajların öldürme fonksiyonlarının bozulmasına apoptosise neden olur (52).

Bugün tüberküloza karşı immün yanıtta ve korunmada esas rolü hücrel immün yanıtın (Th1) oynadığı açıkça bilinmektedir. Bu yanıtta etkin hücreler CD4+T, CD8+T hücreleri, aktive olmuş makrofajlar ve dendritik hücreler olup bunlarla birlikte IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$  gibi sitokinler önemli rol almaktadır. Enfeksiyondan yaklaşık 7-21 gün sonra doku aşırı duyarlılığı ve hücrel immünitinin gelişmesiyle birlikte, basillerin üremesi ve yayılması sınırlandırılmaya başlar. Basil taşıyan makrofajlar ve dendritik hücreler bir yandan başta IL12 olmak üzere proinflamatuere sitokinleri salgılayarak hücrel immün sistem hücrelerini (CD4+T, CD8+T) aktive ederek, hücrel proliferasyona diğer yandan da fagosite ettikleri basilleri aktive ettikleri hücrelere sunmaya çalışırlar. IL12'nin etkisiyle aktif lenfositler 3-9 haftada yeterli sayıya ulaşırlar ve bu hücreler enfekte dokuya giderek burada hem regülatör hem de efektör olarak fonksiyon görürler. Başta CD4+ T hücreleri olmak üzere Th1 yanıtın diğer aktif hücreleri tarafından salgılanan IFN- $\gamma$  makrofajları güçlü bir şekilde aktive eder. Aktif makrofajlar basilleri hapsederek fagozoma dönüşürler. Fagozom-lizozom birleşmesinin gerçekleşmesiyle lizozomal enzimler basil üzerinde litik etki gösterirler. Hücre içi basillerinin imhasında etkili olan reaktif oksijen molekülleri, reaktif nitrojen ara moleküller indüklenebilir nitrik oksit sentetaz (iNOS) yapımı da makrofaj aktivasyonunu indükler. Yapımı

indüklenen diğer bir molekül tümör nekroze edici faktör (TNF- $\alpha$ ) enfeksiyonun sınırlandırılmasında çok önemli rol oynar.

Aktif makrofajlar ve hücrel immun sistem hücrelerinin canlı basillerin bulunduğu ilk enfeksiyon odağında birikmesi sonucu tüberkül denen küçük granülomlar oluşmaya başlar. Primer Tüberküloz denilen bu dönemde yeterli konak savunmasının oluşturulduğu, basil üremesinin ve enfeksiyonun sınırlandırıldığı bir süreç olmakla birlikte basiller tamamiyle eradike edilememektedir. Oluşan granülomlar zamanla kalsifiye olmakta, uyur fazdaki basiller vücutta varlıklarını sürdürebilmektedir. Latent dönem de denilen bu dönemde primer enfeksiyon sırasında geliştirilen hücrel immun yanıt, konağı tüberkülozdan korumaya devam eder. Latent fazdaki basillerin konak bağışık yanıtını aşarak çoğalması ve yeni odaklara taşınması sonucu oluşan tüberküloza sekonder tüberküloz (reaktif) denir.

Sıklıkla akciğerin apikal bölgelerinde oluşan reaktif tüberküloz odakları basille immun sistem arasındaki etkileşimler sonucu granülomlar oluşur. Bu granülomlar zamanla nekroze olurlar ve yüzeye yakın granülomların oluşturduğu doku harabiyeti sonucu kaviteasyonlar meydana getirirler. Bunun sonucu olarak tüberkülozun prototipik semptomu olan kanlı balgamla birlikte öksürüğe yol açarlar. İlerlemiş tüberkülozda immun profil oldukça farklıdır ve bu hastalarda Th2 sitokinlerinin (özellikle IL4) artışı, serum IgE düzeyindeki artışla ve akciğer kaviteasyonunun büyümesiyle kuvvetli paralellik göstermektedir. Enfeksiyonun başlangıcında etkin olan Th1 yanıtının, ilerleyici hastalık fazında (pinömoni, intertisyel firozis) azaldığı ve bu dönemde IL4 ve Th1 yanıtının inhibitörü olan “transforming growth factor beta” (TGF- $\beta$ ) düzeylerinde belirgin artış olduğu görülmüştür. Tüberkülozun gelişiminde anahtar olay Th1 yanıtının Th2’ye dönüşümüdür. Tüberkülozun çeşitli semptomları (ateş, kilo kaybı, doku hasarı), Th-1 yanıtının başlıca sitokinlerinden biri olan TNF- $\alpha$ ’nın salınımı sonucu ortaya çıkmaktadır.

TNF- $\alpha$ ’nın, IL4 seviyesinin yüksek olduğu enfeksiyon bölgesinde salgılanmasının doku hasarını indüklediği gösterilmiştir. TNF- $\alpha$  ve iNOS üretimlerinde belirgin azalma gösteren vakuollü makrofajlar aktif tüberkülozun baskın makrofaj tipidir. Bunlar CD4+T hücreleri üzerinde apoptotik etki gösterirler. Makrofajlar tarafından enfeksiyonun erken fazında üretilen az miktardaki PGE-2’nin,

iNOS ifadesini arttırarak basil yükünün azalmasında etkin rol aldığı gösterilmiştir. Aktif tüberkülozdaki tipik vakuollü makrofajlarda PGE-2 yapımının artması sonucu Th1 hücrelerinin üzerinde immunosupresif etki oluşur. Yine vakuollü makrofajlarda, Th1 yanıtını baskılayan TGF- $\beta$  yapımı da artmaktadır. Bu sitokin tüberkülozda akciğerdeki fibrotik değişikliklere neden olur (53-55).

#### **1.1.4. Tüberkülozun Mikrobiyolojik Tanısı**

Tüberkülozun tanısı klinik, histopatolojik, immünolojik ve mikrobiyolojik olarak konulmaktadır. Tüberkülozun kesin tanısı ise mikrobiyolojik olarak klinik örneklerde tüberküloz basilinin gösterilmesi ile konur. Mikrobiyolojik tanıda kullanılan yöntemler, mikroskopik inceleme, kültür ve moleküler testlerdir (26).

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında mikobakterinin saptanması ve identifikasyonu, tür tayini ve üretilen basilin ilaç duyarlılığının saptanması gibi testler uygulanır. Bu süreç; incelenmesi istenen klinik örneğin hastadan uygun şekilde elde edilip, laboratuvarında homojenize ve dekontamine edildikten sonra mikroskopik incelemesinin yapılması, kültürünün yapılarak tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması ile sonuçlanır. Centers for Disease Control (CDC) bu işlemlerin örnek laboratuvara kabul edildikten sonra 28 gün içinde sonuçlanmasını önermektedir (56).

##### **1.1.4.1. Klinik Örneklerin Alınması ve Laboratuvara Gönderilmesi**

Tüberkülozun mikrobiyolojik tanısının doğru bir şekilde konulmasında tanı yöntemlerinin duyarlılığı kadar incelenecek örneklerin seçilmesi, bu örneklerin hastalardan uygun şartlarda, uygun yöntemlerle ve yeterli miktarlarda alınması, örneklerin laboratuvara belirli kurallara uyularak taşınması ve laboratuvarında en kısa zamanda işlenmesi gerekir. Test sonuçlarının kalitesini etkileyen en önemli basamak analiz öncesi (preanalitik) evredir. Bu yüzden örneğin seçimi, alınması, laboratuvara ulaştırılması ve gerektiğinde uygun koşullarda saklanması ile ilgili kurallara uyulması son derece önemlidir.

Genel kurallar;

Örnek tercihen antitüberküloz tedavi başlamadan önce alınmalıdır.

Örnek endojen flora ve çevresel kontaminasyonu en aza indirmek için olabildiğince aseptik şartlarda alınmalıdır.

İzolasyon şansını artırmak için örnek uygun kalitede, yeterli miktarda ve sayıda olmalıdır.

Örnek uygun zamanda alınmalı, en kısa sürede ve uygun taşıma koşullarında laboratuvara gönderilmelidir.

#### **1.1.4.1.1. Örneklerin Alınması**

Tüberküloz, değişik organ ve sistemleri etkileyebilen sistemik bir enfeksiyon hastalığıdır. Tanı amaçlı laboratuvara gönderilecek örnek çeşidi, hastalığın etkilediği organ dikkate alınarak seçilmelidir. Hastalığın tanısında akciğer veya akciğer dışı olmak üzere ve floralı veya steril alanlardan farklı tipte örneklerden yararlanılmaktadır.

Örneklerin alındığı kaplar, tek kullanımlık, steril, vida kapaklı sızdırmaz kaplar olmalıdır. Akciğer tüberkülozunun tanısında kullanılan örnekler ve bu örneklerin alınmasında dikkat edilecek hususlara ilişkin bilgiler Tablo 3'de özetlenmiştir.

**Tablo 3.** Akciğer tüberkülozu tanısında kullanılan örneklerin alınmasına ilişkin özellikler

Örnek Türü	Endikasyon	Örnek Alma Özelliği
Balgam	Akciğer tüberkülozu şüphesinde ilk tercih edilen ve basil saptama oranı en yüksek örnek türüdür	Hastalardan aç karnına derin ve kuvvetli bir öksürükle akciğerlerden gelen kıvamlı, sabah ilk balgam örneğini vermeleri istenmelidir (Kutu-1). Tercihen üç ardışık günde* sabah aç karnına 3-5 mL alt solunum yollarından gelen örnek alınmalıdır
Uyarılmış (indüklenmiş) Balgam	Balgam çıkaramayan ayakta hastalar	Nebülizatör yardımı ile aerosol haldeki 10 mL %3-10'luk hipertonic tuzlu su 15-30 dk boyunca hastaya yavaşça solutulduktan sonra, derin ve kuvvetli öksürük ile yaklaşık 10 mL balgam örneği alınır
BAL Bronş lavajı veya bronşiyal fırçalama örneği Trakeal aspirat	Hiçbir şekilde balgam veya uyarılmış balgam örneği veremeyen tanı konulamamış olgular	5-10 mL bronş lavajı / BAL örneği 5 mL serum fizyolojik içerisine alınan fırçalama örneği En az 3 mL trakeal aspirat alınır
Endotrakeal Aspirat	Baska şekilde örnek veremeyen yoğun bakım hastaları	En az 3 mL endotrakeal aspirat alınır
AMS	Nörolojik hastalık, koma hali vb. nedenlerle uyum gösteremeyen hastalar 10 yaşından küçük çocuklar Uyarılmış balgam alınamayan hastalar	Üç ardışık günde, sabah 8-10 saatlik açlığı takiben, hasta yatağından kalkmadan, gastrik tüp ile 25-50 mL steril su veya serum fizyolojik (SF) verilip aspire edildikten sonra en az 5 mL örnek alınır
Akciğer doku örneği	İnvazif olmayan teknikler ile tanı konulamayan akciğer tüberkülozu şüphesi olan olgular	Aseptik şartlarda kazeöz lezyondan alınan en az 1 gr doku biyopsisi veya ince iğne aspirasyonu Açık akciğer biyopsi doku örneği 2-3 mL'lik steril SF içine alınır.
Larinks sürüntüsü	Çocuklarda ve diğer akciğer örneklerinin hiçbirisinin elde edilemediği hastalar	Larinks sürüntü örneği silgiç ile alınıp 2-3 mL'lik steril SF içine konur

\* En uygun balgam örneği **üç gün üst üste sabah** alınan **ilk balgam** örneğidir! Ancak hasta, üç gün üst üste sabah ilk balgam örneğini verecek durumda değil ise,

- İlk balgam örneği; klinik başvuru sırasında (anlık),
- İkinci balgam örneği; ikinci gün sabahı (evde),
- Üçüncü balgam örneği; ikinci balgam örneğini getirdiğinde (anlık) veya üçüncü gün sabahı (evde) alınır.

Akciğer tüberkülozu tanısında biri sabah balgamı olmak üzere en az iki örneğin incelenmesi önerilmektedir.

- Hastaya üç adet steril örnek kabı verilir. (Hastaya bir kap verip ertesi gün örneği getirdiğinde yeni kabı vermek daha uygun olabilir.)
- Sabah aç karnına önce dişlerini fırçalaması veya ağızını iyice çalkalaması istenir. (Yiyecek artıkları, ağız florası, tükürük ve oral ilaçlar ile balgamın kontaminasyonunu önlemek için hastaya balgam çıkarmadan önce ağızını bol suyla (mümkünse şehir şebekesi harici su ile) çalkalaması gerektiği hatırlatılmalıdır.)
- Bir bardak ılık su içmesi önerilir. (Kendiliğinden balgam çıkaramayan hastalara öncelikle bol sıvı alması ve kültürel hareketleri yapması veya merdiven inip çıkması tavsiye edilebilir.)
- Örnek kabının ağızını dikkatli bir şekilde açması, kapağı uygun, temiz bir yere koyması söylenir.
- İzolasyon odasının olmadığı yerlerde açık havada örnek vermesi istenir.
- Derin bir nefes alıp bir süre nefesini tuttuktan sonra derin ve kuvvetlice öksürük ile balgamını doğrudan kabın içine çıkartması istenir. (Balgam ve tükürük farkını tam olarak bilmeyen hastalar yanlışlıkla balgam çıkarmadan kaba tükürmesinler diye, hastaya "balgamını kaba tükür" denmemelidir. Hastalara tükürük veya nazofaringeal sekresyonların (burun ve yutak kaynaklı sıvıların) balgam olmadığı ve bu nedenle laboratuvarında test için uygun örnek olarak kabul edilmediği anlatılmalıdır.)
- Örnek kabının kapağını dikkatli bir şekilde sıkıca kapatması ve bu şekilde, her örnek için ayrı örnek kabı kullanması söylenir.
- Her kabı aynı gün en geç iki saat içerisinde laboratuvara getirmesi istenir.

Uyarılmış balgam, sulu özellikte olduğundan görünüm açısından tükürüğe benzer.

Örneğin tükürük zannedilerek reddedilmemesi için istem kâğıdına mutlaka "uyarılmış balgam"notu eklenmelidir.

Örnek alma sırasında oluşabilecek biyolojik riskler

- Balgam çıkarılması
- Nebulizatör ile uyarılmış balgam alınması

- Bronkoskopi işlemi
- İnvaziv işlemler sırasında hastadan çevreye bulaş olabilir.

Bu işlemler;

- Enfeksiyon kontrol önlemlerinin alındığı yerlerde,
- Uygun güvenlik standartları altında,
- Eğitimli personel (balgam hariç) tarafından işlemler sırasında eldiven, önlük ve solunum maskesi kullanılarak yapılmalıdır (57)

İdrar, steril vücut sıvıları, abse örnekleri ve aspirasyon sıvıları, kan-kemik iliği, dışkı ve doku örnekleri, ekstrapulmoner örneklerdir. İdrar örnekleri birbirini izleyen en az 3 gün süre sabah idrarı alınmalıdır. Örnek miktarı en az 40 ml olmalıdır ve yirmi dört saat biriktirilen idrarlar kabul edilmemelidir. Beyin omurilik sıvısı (BOS), plevral, perikardiyal, peritoneal veya sinovyal sıvılar steril vücut sıvılarıdır ve en az 5 ml olmalıdır. Abse örnekleri ve aspirasyon sıvıları aseptik koşullarda alınmalıdır ve mümkün olduğu kadar çok materyal aspire edilmelidir. Kutanöz lezyonlarda optimal üreme ısısı daha düşük olan mikobakterilerden biri (*M.haemophilum*, *M.marinum*, *M.ulcerans*) enfeksiyon ajanı olabileceğinden, ikinci bir kültür seti 30°C’de inkübe edilmelidir. Doku örnekleri en az bir gram olacak şekilde steril bir kap içinde alınmalıdır. Kan-kemik iliği örneklerinin, MYCO/F LYTIC şişeleri (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD) veya BacT/ALERT MB kan besiyeri (bioMerieux SA, Lyon, France) gibi alternatif besiyeri kullanılarak tüberküloz kültürleri yapılabilmektedir. BACTEC 460TB sisteminde kan ve kemik iliği kültürü için standardize edilmiş olan BACTEC 13A şişesi günümüzde artık kullanılmamaktadır. BACTEC 460TB (12B şişelerinde) sisteminde mikobakteriler için inhibitör etki gösteren polipropilen glikol komponenti bulunmaktadır. Mikobakterilerin üremesi üzerine benzer etki, Septi-Chek AFB sıvı besiyeri ve MGIT sıvı besiyerinde de bildirilmiştir. Dışkı örnekleri *M.tuberculosis* tanısında sık tercih edilen örnekler değildir. Sadece AIDS’li hastalarda *M.avium* kompleks tanısında yararlı olabileceği belirtilmiştir ve dışkı örneğinin en az bir gram olması önerilmektedir (11)

Ekstrapulmoner tüberkülozunun tanısında kullanılan örnekler ve bu örneklerin alınmasında dikkat edilecek hususlara ilişkin bilgiler Tablo (4)de özetlenmiştir.

**Tablo 4.** Akciğer-dışı tüberkülozun tanısında kullanılan örneklerin alınmasına ilişkin özellikler

Örnek Türü	Endikasyon Örnek Alma Özelliği
İdrar	Üriner sistem Ardışık en az üç gün üst üste dış ürogenital bölge tüberkülozu şüphesi temizlendikten sonra en az 40 mL sabah idrarı alınır
BOS	İdrar veremeyen hastalardan mesaneden kateter ile ya da suprapubik aspirasyon ile alınabilir Santral sinir sistemi Aseptik şartlarda en az 2 mL (optimal 10 mL) alınır tüberkülozu şüphesi
Doku biyopsi örneği	İnvaziv olmayan Aseptik şartlarda kazeöz kısımlardan en az 1 gr kadar teknikler ile tanı doku biyopsi örneği alınır konulamayan akciğer- dışı tüberküloz şüphesi
Steril vücut sıvıları (plevra, periton, perikard, eklem vb.)	Akciğer dışı tüberküloz Aseptik şartlarda en az 10 mL alınır*
Apse ve yara örneği	Akciğer dışı tüberküloz Aseptik şartlarda yüzeysel eksuda uzaklaştırıldıktan şüphesi sonra apse içeriği ve aspire edilen sıvı alınır
Kemik iliği	Yaygın tüberküloz Aseptik şartlarda heparin, SPS içeren steril tüplere şüphesi ve nedeni ve/veya ticari mikobakteriyel kan kültür besiyerlerine bilinmeyen ateşte alınır
Kan Dışkı**	Yaygın tüberküloz Aseptik koşullarda, 5-10 mL kan SPS veya heparin şüphesi ve nedeni içeren steril tüplere veya ticari mikobakteriyel kan bilinmeyen ateşte kültür besiyerlerine önerilen miktarda alınır İntestinal tüberküloz 3-5 gr dışkı örneği alınır şüphesi

\* Steril vücut sıvıları; periton, perikard ve plevral biyopsinin mikobakteriyolojik tanı değeri, vücut sıvılarından daha yüksektir ve bu yüzden tanı için biyopsi örneği tercih edilmelidir.

\*\* Dışkı örneği; tüberküloz tanısında dışkıdan yapılan mikroskopi ve kültür işlemleri, klinik yarar açısından tartışmalıdır.

#### 1.1.4.1.2. Örneklerin Taşınması ve Saklanması

Tüberkülozun laboratuvar tanısının doğru yapılabilmesi için uygulanan yöntemlerin duyarlılığının yanı sıra, örneklerin laboratuvara gönderilmesinde belirli kurallara uyulması gerekmektedir.

##### 1.1.4.1.2.1. Etiketleme

Örnek kabında ve istem formunda yer alması gereken asgari bilgiler Tablo 5 ve 6'da verilmiştir. Hasta bilgilerinin kabın üzerine etiketlenmeyip sadece kapakta bulunması, işlem esnasında kapakların açılması ile örneklerin karışabilmesi bakımından sakıncalıdır.

#### 1.1.4.1.2.2. Taşıma ve Saklama

Hastalardan alınan örnekler aşırı sıcak ve soğuk, ani basınç değişikliği veya aşırı kuruma gibi olumsuz koşullardan korunarak laboratuvara en kısa sürede ulaştırılmalıdır. Örneklerin taşınması ve saklanmasına ilişkin hususlar Tablo 7'de verilmiştir.

Başka bir kuruma gönderilecek klinik örnek veya üremiş kültürler;

- Uygun tüp içerisinde ağızları sıkıca kapatılmış olarak kendinden fermuarlı naylon poşete konulmalı
- Taşıma kutusunun içinde ayrılmış gözlere iyice yerleştirilmelidir.
- Uygun üçlü taşıma kabı ile taşıma kurallarına uygun olarak laboratuvara yollanmalıdır.

**Tablo 5.** Örnek kabında yer alması gereken asgari bilgiler

- 
- Hasta adı-soyadı
  - Dosya / örnek numarası
  - Örnek alınma tarih ve saati
  - Örnek türü
- 

**Tablo 6.** Laboratuvar istem formunda bulunması gereken asgari bilgiler

- 
- **Sağlık merkezi bilgisi**
    - Merkez adı
    - Doktor adı-soyadı, imzası
    - İletişim bilgisi
  - **Hasta kimlik bilgileri**
    - Adı-soyadı
    - T.C. kimlik numarası
    - Doğum tarihi
    - Baba adı
    - Adres
  - **Hastalık bilgisi**
    - Ön tanı
    - Tedavi öyküsü
  - **Örnek bilgisi**
    - Örnek türü
    - Örnek alınma tarih ve saati
  - **İstenen tetkik**
-

**Tablo 7.** Tüberküloz tanısında kullanılan örneklerin taşınması ve saklanması

---

■ Kurum içinde örnek gönderimi ikincil kap ile kurum dışına örnek gönderimi üçlü taşıma kapları ile yapılmalıdır ( <i>bkz.</i> Enfeksiyöz Madde ile Enfeksiyöz Tanı ve Klinik Örneği Taşıma Yönetmeliği).
■ Örnekler, oda ısısında mümkün olan en kısa süre içerisinde laboratuvara ulaştırılmalıdır.
■ Örneklerin laboratuvara ulaştırılması 1 saati geçecek ise 24 saate kadar +4°C'de bekletilebilir.
■ BOS, kemik iliği, kan örnekleri <b>kesinlikle</b> buzdolabına konulmaz.
■ <b>AMS örnekleri</b> 5-10 mL örnek başına 100 mg sodyum karbonat veya %4'lük NaOH ile nötralize edilir ve en kısa sürede laboratuvara ulaştırılır

---

#### 1.1.4.1.2.3. Örneklerin İşlenmesi

Örneklerin işlenmesi, kontamine veya steril alan örnekleri olmalarına göre farklılık göstermektedir. Örneklerin işlenmesinde dekontaminasyon, homojenizasyon, nötralizasyon ve konsantrasyon basamakları uygulanmaktadır.

Dekontaminasyon; kontamine örneklerin içerisindeki mikobakterilerin canlılığı korunurken, kontaminant mikroorganizmaların NaOH, oksalik asit vb. kimyasal maddeler ile uzaklaştırılması ve sayıca azaltılması işlemidir. Steril örnekler dekontamine edilmeden işleme alınır.

Eklem sıvıları, BOS veya diğer steril vücut sıvıları, kan ve kemik iliği, aseptik şartlarda cerrahi olarak çıkarılmış doku/biyopsi örnekleri (otopsi örnekleri hariç) dekontaminasyon gerektirmeyen steril örneklerdir.

Homojenizasyon; örneklerde bulunan müköz, epitel ve diğer şekilli elemanlar arasında gizlenmiş olan basilleri ortaya çıkarmak ve mukus yapıları eriterek santrifüjde çökmesini ve basillerin örnek içinde homojen bir şekilde dağılmasını sağlamak için uygulanır. Bu amaçla NaOH ya da N asetil L sistein (NALC) gibi kimyasal maddeler kullanılır.

Nötralizasyon; mikobakteriler en iyi pH 6,8'de ürediği için homojenizasyon-dekontaminasyon işlemleri sırasında kullanılan kimyasal maddeler nedeni ile asidik ya da alkali hale gelen örneklerin nötralize edilmesi işlemidir.

Konsantrasyon; klinik örnekteki basillerin yoğunlaştırılması ve tüberküloz basilinin izolasyon oranını arttırmak için yapılan santrifüjleme işlemidir (57).

Kültürlerde hiç kontaminasyon olmaması veya çok düşük (<%2) kontaminasyon oranları, ön işlem koşullarının çok sert olduğunu ve sadece bakterileri değil aynı zamanda mikobakterileri de elimine ettiğini gösterirken; %5'i geçen kontaminasyon oranları, aşırı kontaminasyon olarak tanımlanır (11).

Dekontaminasyon işlemlerinde en sık N-Asetil-L-Sistein (NALC) + Sodyum hidroksit (NaOH) ve %2-4'lük Sodyum hidroksit (NaOH) gibi yöntemler kullanılmakla birlikte zefiran (benzalkonyum klorid) -trisodyum fosfat yöntemi, oksalik asit yöntemi, CPC yöntemi, sülfürik asit yöntemi gibi farklı yöntemler de kullanılabilir (11, 58).

NALC-NaOH yönteminde NALC mukolitik, NaOH dekontaminant ve Na-sitrat klinik örnekte bulunabilecek ağır metal iyonlarını bağlayarak NALC'ın inaktive olmasını önlemek amacıyla kullanılır (59).

Yöntemde örnek miktarı kadar NALC-NaOH tüpe eklenir ve vortekslenir, karışım 15-20 dakika oda ısısında bekletilir, daha uzun süren işlem, kontaminant mikroorganizmalarla beraber mikobakterileri de öldüreceği için kültürde üretme şansını azaltacaktır. Bu süreçte, karışım bir karıştırıcıda hafif döndürülerek veya birkaç kez elle çalkalanarak homojenizasyon kolaylaştırılır (11).

Daha sonra karışıma fosfat tamponu ilave edilerek dekontaminasyon işlemi durdurulur. Karışım soğutmalı santrifüjde 15-20 dakika 3.000Xg'de santrifüj edilerek konsantrasyon işlemi gerçekleştirilir. Üstteki sıvı dezenfektan bulunan bir atık kabına boşaltıldıktan sonra tekrar fosfat tamponu ilave edilerek sediment tekrar süspanse edilir. Tüm işlemler biyolojik emniyet kabininde yapılmalıdır. Dekontaminasyon ve konsantrasyon işlemlerinden geçirilmiş örnekler daha sonra mikroskopik inceleme, kültür ve moleküler testler için kullanılabilir (11, 60)

#### **1.1.4.1.3. Mikroskopik İnceleme**

Mikroskopik inceleme hem tanı amacıyla, hem de tedavi alan hastaların izleminde kullanılan hızlı, basit, ucuz ve kolay bir yöntemdir. Yöntemin özgüllüğü yüksek olmasına karşın, duyarlılığı örneğin türü ve kalitesine, içerdiği bakteri miktarına, uygulanan tekniğe, uygulama ve değerlendirme yapanların deneyimine bağlı olarak %20 ile %85 arasında değişmektedir. Mikroskopik incelemede ARB pozitifliğini saptayabilmek için yayma yapılan örneğin mililitresinde 5.000-10.000 bakteri bulunması gerekmektedir (57).

Laboratuvara gelen örnek miktarı, test edilen örneğin tipi, yaymanın kalınlığı, boyama yöntemleri ve okuyucunun deneyimi gibi faktörler duyarlılığı etkileyen önemli faktörler arasında sayılabilir. En yüksek yayma pozitiflik oranı solunum örneklerinde saptanır. Boyama işlemi esnasında lamların çarpaz kontaminasyonu ve TDM ile kontamine suyun kullanılması yanlış pozitif sonuçlara neden olur, mikroskopi için kullanılan immersiyon yağından da ARB geçişi olabilir (61).

Mikobakteriler hücre duvarlarındaki yoğun lipidlerin kazandırdığı hidrofobik özellik nedeniyle suda çözünen boyalarla zor boyanırlar. Mikobakterilerin boyanabilmesi için; boyanın suda kolay eriyen fenol gibi organik bir madde içinde eritilmesi gerekmektedir. Mikobakteriler hücre içine aldıkları boyayı asit-alkol çözeltisi ile bırakmadıkları için "asido rezistan bakteri (ARB)" olarak adlandırılır. Tüberkülozun erken tanısında, mikroskop ile örnekte ARB varlığının aranması, her düzey tanı laboratuvarında uygulanabilen bir yöntemdir (57).

Aside dirençli boyanma özelliği, mikobakterilerle özdeşleşmiş bir özelliktir; bugüne dek tanımlanan mikobakterilerin tamamı aside dirençli boyanmaktadır. Bu özellik kullanılarak başlıca iki tip boyama tekniği geliştirilmiştir, bunlar:

**1- Karbon fuksin boyaları:** fuksinin karbolik asitle karışımıdır.

- a. Ehrlich Ziehl Neelsen yöntemi (sıcak teknik)
- b. Kinyoun yöntemi (soğuk teknik)

**2- Florokrom boya:**

- a. Auromine O boyası
- b. Auromine-rhodamin boyası (12)

Ehrlich Ziehl Neelsen (EZN) yöntemi ve Kinyoun yöntemi, Karbol fuksin boyama tekniklerindedir. En yaygın kullanılan yöntem Ehrlich Ziehl Neelsen yöntemidir (sıcak karbol fuksin boyama) Bu yöntemde karbol fuksin ile ısıtılarak boyanan preparata %3'lük asit-alkol karışımı ile dekolarizasyon işlemi uygulanır ve sonra zıt bir boya (metilen mavisi, brillant yeşili) ile ilk aşamada rengini kaybetmiş hücreler mavi renge boyanır. Boyanan preparat immersiyon objektifi (1000X büyütme) ile incelendiğinde diğer hücreler ve bakteriler mavi görünürken, mikobakteriler mavi zemin üzerinde kırmızıya boyanmış olarak ortaya çıkar. İnceleme sonunda yaymada gözlenen ARB sayısı kantitatif olarak rapor edilir

(Tablo 8). Yaymanın negatif olarak rapor edilmesinden önce, en az 300 alan incelenmelidir (11).

**Tablo 8.** EZN Boyama Sonrası Yayma Preparatının İncelenmesi

Sonuç	ARB sayısı/inceleme alanı (1000x)
Negatif	0
Şüpheli (örnek tekrarı)	1-2/ 300 alan
1 +	1-9/ 100 alan
2+	1-9/ 10 alan
3+	1-9/ 1 alan
4+	>9/ 1 alan

Tüberküloz tedavisi yapan kurumların balgamın direk mikroskopik inceleme sonuçlarına 24 saat içinde erişmeleri ilke olarak kabul edilmelidir. Mikroskopik inceleme ile sağlıklı ve güvenilir sonuçlar elde edebilmek için işlem sistematik bir şekilde yapılmalıdır. Tarama yaparken yayma alanının bir ucundan diğer ucuna yatay ya da dikey doğrultuda yapılmalıdır. Balgam yaymasında ARB'nin pozitif olabilmesi için örneğin 1 ml'sinde 5.000–10.000 basil bulunması gereklidir. Kaviteli akciğer lezyonları yaklaşık 200 milyon basil içerdiğinden dolayı bu lezyonlardan kolaylıkla pozitif sonuç alınmaktadır. Balgam mikroskopisi pozitif olgular asıl bulaştırıcı olgular olduğu için tüberkülozun kontrolünde önemlidir. Klinik örnek içerisindeki yemek artıkları, boya parçacıkları, lamdaki çizikler, atipik bakteriler veya nokardiyalar, laboratuvar bulaşı gibi nedenlerle yanlış ARB pozitifliği saptanabilir. Diğer yandan yetersiz örnekler, balgam veya boyanmış preparatın iyi korunamaması, okuma hataları, kayıt hataları ve deneyimsiz personel nedeniyle yanlış negatif sonuçlara rastlanabilir. Laboratuvar personellerinin *Rhodococcus*, *Nocardia* türleri ve *Legionella micdadei* gibi mikobakteri dışı organizmalar ile *Cryptosporidium* kistlerinin ve *Isospora*, *Cyclospora* ve *Microsporidium* sporlarının değişik derecelerde asido rezistan boyama özelliği gösterdiklerinin farkında olmaları gerekir. Son çalışmalara göre kinyoun karbol fuksin yönteminin, Ehrlich Ziehl Neelsen ve florokrom yöntemlerinden üstünlüğünün olmadığı gösterilmiştir (62).

#### 1.1.4.1.4 Kültür

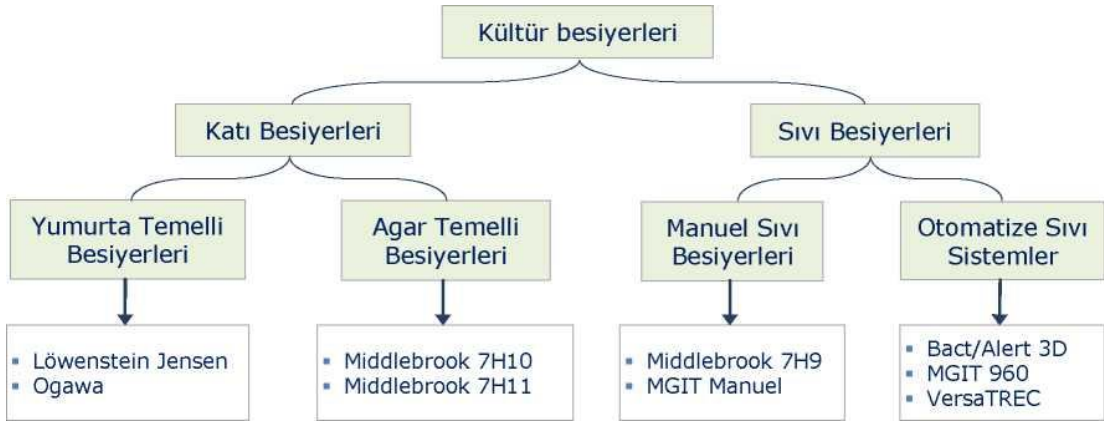
Tüberkülozun tanısında kültür altın standarttır. Kültür yöntemleri; tüberküloz basillerinin üremesine, tanımlanmasına, ilaç duyarlılık testleri ve epidemiyolojik

çalışmaların yapılmasına olanak sağlar. Kültürde mikobakterilerin üretilmesi için hasta örneklerinin mililitresinde 10-100 canlı basilin olması yeterlidir.

Tüberkülozun kesin tanısı bakterinin kültür ortamında üretilmesi ve tanımlanması esasına dayanır. *M.tuberculosis*'in bölünme süresi 18-24 saate kadar uzadığından diğer bakterilere göre kültürde üremesi uzun zaman almaktadır. Bu nedenle kültürde üremenin değerlendirme süresi 6-8 haftaya kadar uzayabilmektedir. Üreme için ortamda özel maddelerin bulunması gerektiğinden *M.tuberculosis* genel üretim besiyerlerinde üretilemez; özgün besiyerlerine ihtiyaç duyulur.

*Mycobacterium tuberculosis* kompleksin (MTBC) üretilmesi için sıklıkla gliserol ve asparajin içeren yumurta temelli besiyerleri, agar bazlı besiyerleri, serum ve sığır albümini ile zenginleştirilmiş sıvı besiyerleri kullanılır. Besiyerlerine diğer kontaminant mikroorganizmaların üremesini engellemek için malaşit yeşili gibi inhibitörler veya çeşitli antibiyotikler eklenebilir. Kültür yöntemlerini katı ve sıvı kültür sistemleri olmak üzere ikiye ayırabiliriz (Tablo 9).

**Tablo 9.** *M. tuberculosis* kompleks kültürü için kullanılan besiyerleri (57)



Katı besiyerleri, yumurta bazlı ve agar bazlı besiyerleri diye ikiye ayrılırlar. Yumurta bazlı besiyerleri; tam yumurta yada yumurta sarısı, patetes, gliserol, malaşit yeşili ve tuzların karışımından oluşmaktadır ve günümüzde en bilineni Löwenstein Jensen (LJ) besiyeridir. Bu besiyerleri, mikobakterilerin üremesini zorlaştıran maddelerin etkisini bloke eden iyi bir tampon özelliğine ve uzun süreli (buzdolabında birkaç ay) raf ömrüne sahiptir. LJ besiyeri tüberkülozu tanımlamada yeterli olmakla birlikte, diğer mikobakterileri tanımlamada yetersiz kalmaktadır. LJ besiyerinde,

*M.tuberculosis*'in tipik koloni oluşturması nedeniyle ilk izolasyon çalışmalarında tercih edilmektedir. *M.bovis* türü için gliserinsiz LJ besiyeri tercih edilmektedir. Agar bazlı besiyerleri, kimyasal olarak daha iyi tanımlanmışlar ve şeffaftırlar, dolayısıyla kolonilerin inokulum akrefatlarından ayırt edilmesini, erken üreyen kolonilerin saptanmasına olanak sağlarlar. Koloniler yumurta bazlı besiyerinde 18-24 günde, bunlarda ise 10-12 günde görünür hale gelirler. Agar bazlı besiyerlerinden en sık kullanılanı Middlebrook 7H10 ve 7H11" dir. Bu besiyerleri kontaminantların üremesini bloke eder, ancak hazırlanmaları pahalı olmakta ve raf mrlерinin (buzdolabında bir ay) kısa olması nedeniyle kullanımları kısıtlanmaktadır (63).

Middlebrook besiyeri MAC'ın üremesini hızlandıran %2 oranında gliserol içerir. *M.bovis*'den şüphe ediliyorsa %0,2'lik pirüvik asit eklenmesi faydalıdır (64).

Middlebrook 7H9 ve Dubos Tween besiyerleri primer izolasyon, stok suşların alt kltrlерinin yapılması, ilaç duyarlılık testleri ve diğer deneylerde kullanılır.

Seçici besiyerleri, genellikle yumurta bazlı yada agar bazlı bir besiyeriyle birlikte kullanılmalıdır. Yumurta bazlı olanlara penisilin, siklohegzimid, nalidiksik asit ve linkomisin eklenerek, agar bazlı olanlara ise karbenisillin, polimiksin-B, trimetoprim laktat, amfoterisin-B eklenerek seçici besiyerleri elde edilir.

Bifazik besiyerleri, septi-cek AFB (BD Biosciences, Sparks MD); zenginleştirilmiş (%25) CO<sub>2</sub>'li ortamda 20 ml modifiye 7H9 sıvı besiyeri içeren, kapaklı bir şişeden oluşan mikobakteriyel kültür sistemidir. Tp içine yerleştirilmiş ikolatamsı agar, Middlebrook 7H11 agar ve modifiye L-J besiyeri gibi üç farklı katı besiyerini içermektedir. İnokülasyondan önce kültür şişesine glikoz, pridoksal HCL, katalaz, bovin albümün, oleik asit (OADC) ve antibiyotikler PANTA (polimixin-B, amfoterisin-B, nalidiksik asit, trimetoprim, azlosilin) içeren supplement eklenir. İnkübasyon süresi esnasında katı besi yerlerine inokülasyon için zaman zaman şişelere dokunulması gerekir. Bu besiyerinde üreme süresi radyometrik yöntemlere göre uzun olmasına rağmen klasik besiyerlerinden daha kısadır.

Sıvı besiyerleri hem mikobakterilerin primer izalasyonu hem de alt kltrlерinin yapılması için kullanılabilir. Sıvı bazlı kltrlер, katı kültür ortamına göre daha hızlı sonuç verirler ve izolasyon oranları daha yüksektir. Bu besiyerlerinde ortama eklenen Tween 80 eklenmesi mikobakteri kmелerinin homojen dağılmasını sağlar. Günümüzde ticari olarak kullanılan MGIT (BD) ve MB Redox gibi basit şişe

ve tüplerden oluşan sistemler yanında yarı otomatize sistemler (BACTEC 460 TB system, BD) ve tam otomatize sistemler (BACTEC 9000 MB ve BACTEC MGIT 960, ESP Culture System II ve MB/ BacT ALERT 3D System gibi) geliştirilmiştir (65, 66).

#### **1.1.4.1.4.1. Hızlı Kültür Yöntemleri**

Hızlı, otomatize kültür yöntemlerine MGIT 960 sistemi, BACTEC 460 TB sistemi, BACTEC 9000 MB sistemi, MB/ BACT Myco ESP2 sistemleri örnek gösterilebilir. MGIT sisteminde radyoaktif madde kullanılmaması, tüm işlemlerin otomatik yapılmış olması, tiplendirme ve duyarlık testlerine olanak sağlaması avantajdır. BACTEC 460 TB sistemi DSÖ tarafından altın standart olarak kabul edilmiş yarı otomatize bir sistemdir. Bu yöntemle mikobakterilerin primer izolasyonu, *M.tuberculosis* kompleks ve tüberküloz cinsi bakterilerin ayrımı, anti tüberküloz ilaçlara duyarlılık saptanması yapılmaktadır (67).

#### **1.1.4.1.4.2. BACTEC 460 TB (Becton Dickinson, Diagnostic Instruments, Sparks, MD) sistemi**

Yıllardır başarı ile kullanılan BACTEC 460 TB sistemi hızlı kültür sistemleri içinde yer alan yarı otomatize, radyometrik, sıvı bazlı ticari bir kültür sistemidir. Sistemde izolasyonun yanısıra, *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi (MTBC) ile tüberküloz dışı mikobakterilerin (TDM) ayrımı yapılabilen ve MTBC suşlarının antitüberküloz ilaçlara duyarlılığı test edilebilmektedir. BACTEC 12B (Middlebrook 7H12) ve Bactec 13A (Middlebrook 7H13) olmak üzere iki tip besiyeri içeren bu sistem; besiyerlerinde bulunan C<sub>14</sub> işaretli palmitik asitin kullanılması ve metabolize edilmesi sonucu oluşan <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> nin 0-999 sayısal değerleri arasında üreme indeksi (GI) olarak ölçülmesi prensibi ile çalışmaktadır. Ekim işleminden önce kontaminasyonu engellemek amacıyla besiyerlerine polimiksin-B, azlosilin, nalidiksik asit, trimetoprim ve amfoterisin-B (PANTA) içeren antibiyotik karışımı ilave edilmelidir. Ekim yapılan 12B şişelerin inkübasyonları etüvlerde gerçekleştirilir. Ekim yapıldıktan sonra ilk iki hafta, haftada üç kez; sonraki altı hafta boyunca haftada bir kez olacak şekilde etüvden çıkarılıp BACTEC 460 cihazına yerleştirilerek GI değerleri ölçülür. Cihazda bulunan okuma iğnesi her şişenin kauçuk kapağından şişeye girip oluşan <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> 'in ölçümünü yapar ve şişeden çıktıktan sonra kor derecesine kadar gelip soğur ve sonra ikinci bir şişeye girer. Sistem başarı ile

kullanılmakla beraber; bu okuma sırasında çapraz kontaminasyon riski vardır. Besiyerlerinin radyoaktif madde içermesi ve bunların ortadan kaldırılmasında yaşanan sıkıntılar, ekim sırasında enjektör kullanılması gerektiği için potansiyel iğne batma riski ve yarı otomatize olması sistemin diğer dezavantajlarıdır (58, 68, 69).

#### **1.1.4.1.4.3. BACTEC Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) 960 (BD, Sparks, MD)**

BACTEC MGIT 960 sistemi, kültür tüplerinin inkübasyonunun cihaz içinde olduğu ve üreme kontrolünün otomatik olarak yapıldığı, radyometrik olmayan tam otomatize bir ticari hızlı kültür sistemidir (11).

BACTEC MGIT 960 sisteminde kullanılan tüplerde (BBL MGIT 7ml tüp), Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri ve dip kısımlarında oksijene duyarlı rutenyum metal kompleksi içeren silikon bulunur. Besiyerlerine klinik örnekler ekilmeden önce OADC ve PANTA ilave edilir. Kullanılan besiyerlerinde herhangi bir üreme olmadığında oksijen varlığına bağlı olarak silikon tabakaya gönderilen UV ışınına karşı floresans oluşmazken; mikobakteri veya diğer mikroorganizmalar ürettiğinde oksijenin kullanılması sonucunda UV ışınına karşı floresans oluşmakta ve oluşan floresans miktarı üreme birimi (growth unit) olarak değerlendirilmektedir. Sistemin olmadığı durumlarda cihazsız olarak kullanıma uygun, UV ışığı altında makroskopik olarak değerlendirme yapılabilen BBL MGIT 4ml tüp besiyerleri mevcuttur. Kan dışındaki diğer tüm klinik örnekler için kullanılabilir. Fazla sayıda örneği aynı anda kontrol edebilen BACTEC MGIT 960 (960 örnek), genellikle yüksek kapasite ile çalışan laboratuvarlarda tercih edilmekle birlikte; daha düşük kapasiteli laboratuvarlarda cihazsız kullanılan besiyerleri önerilmektedir (11, 70).

#### **1.1.4.1.4.4. VersaTREK (ESP Culture System II) (Trek Diagnostics, Inc., Ohio)**

VersaTREK, selüloz sünger ve Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içeren bir sistemdir. Mikroorganizmaların üremesi sonucu oluşan gaz basıncındaki değişiklikler ölçülerek sistemde değerlendirme yapılır. Bilgisayar destekli bir sistemdir ve besiyerinde oluşan gaz basıncındaki değişiklik grafiksel olarak görüntülenir. Besiyerlerine ekim yapılmadan önce, mikobakterilerin üremesini destekleyen OADC ve kontaminasyonu önlemek amacıyla antibiyotik karışımı eklenir (58).

#### **1.1.4.1.4.5. Bactec 9000 MB (BD, Sparks, MD)**

Bactec 9000 MB serisi, besiyerlerindeki oksijen kullanımının floresans ile belirlendiği bir kan kültür sistemidir. Ekimden önce Modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyerlerine PANTA ilave edilir. Sistemde balgam ve diğer solunum yolu örnekleri için Myco/F sputa, kan ve diğer steril vücut bölgelerinden alınan örnekler için MycoF/lytic besiyeri kullanılır (68).

#### **1.1.4.1.4.6. BacT/ALERT 3D (bioMerieux, Lyon, France)**

MB/Bac T, besiyerinin dip kısmında kolorimetrik bir sensor içeren ve oluşan CO<sub>2</sub> düzeyini ölçerek üremeyi değerlendiren bir sistemdir. Bilgisayar desteği bulunan sistemde besiyerleri sürekli kontrol altındadır (58).

#### **1.1.4.1.4.7. Tür Tayini Testleri**

Tüm kültürde üreyen mikobakterilerin MTBC ve TDM ayrımı yapılmalıdır. İnsan mikobakteri enfeksiyonlarının çok büyük bir kısmında etken MTBC olduğundan tür tayininde temel hedef MTBC'nin TDM'den ayrılması olmalıdır.

*Mycobacterium tuberculosis* kompleksinin tanımlanması uygun tedavi kararını belirlediği için hasta yönetiminde önemli bir basamak oluşturmaktadır.

Kültürde üremiş izolatların MTBC-TDM olarak ayrımında üreme özellikleri ve biyokimyasal testler kullanılmakla birlikte, son yıllarda hızlı genotipik ve immünokromotografik yöntemler de kullanılmaya başlanmıştır. MTBC-TDM ayrımında biyokimyasal testler zaman alıcı ve zahmetli olup sonuçların değerlendirilmesi güç olabilmektedir. Günümüzde kullanılan farklı genotipik ve immünokromotografik yaklaşımların çoğu laboratuvarlarda yaygın kullanım alanı bulmuştur. Bu yöntemler hızlı ve güvenilir şekilde MTBC-TDM ayrımı yapabilmektedir. MTBC- TDM ayrımı;

- Fenotipik yöntemler
  - Üreme özellikleri
  - Biyokimyasal testler
  - HPLC (High Performance Liquid Chromatography)
- Genotipik yöntemler
  - PCR restriksiyon enzim analizi
  - Ters hibridizasyon testleri
- İmmünokromotografik yöntemleri kullanılarak yapılmaktadır.

#### 1.1.4.1.4.8. Fenotipik Yöntemler Üreme Özellikleri

Üreme hızı, katı besiyerinde büyütme olmaksızın çıplak gözle görülebilen koloniler oluşması için gereken süreye denir. Yedi gün içerisinde gözle görülebilen koloni oluşturan mikobakterilere hızlı üreyenler, daha uzun sürede üreyenlere yavaş üreyen mikobakteriler denir. Hızlı ve yavaş üreyenler, 16S rRNA gen dizilerinin karşılaştırılması ile de birbirlerinden ayrılır. Kültürler 30-37°C'de gözlemlendiğinde, ısıyla ilgili üreme özellikleri belirlenebilir.

Mikobakteriler pigment üretmelerine göre üç grupta sınıflandırılır. Bunlardan fotokromojen mikobakteriler; karanlıkta üretildiğinde pigmentsiz, ışıklı ortamda üretildiğinde pigmenli koloni üretirler. Skotokromojen mikobakteriler ışıklı veya karanlık ortamda üretildiğinde sarı portakal renginde koloni oluştururlar. Non-kromojen mikobakteriler, ışıkta ve karanlıkta pigment yapmazlar ya da soluk sarı renkte pigment üretirler. Pigment üretimi için testler taze kültürlerden izole edilen kolonilerden yapılmalıdır. Işıklıta pigment oluşturma özelliği, oksijen ve sıcaklık parametreleri ile ilişkili bulunmuştur (71).

*Mycobacterium tuberculosis*; LJ besiyerinde veya Middlebrook agarda 37°C'de 14-28 günlük inkübasyondan sonra pigmentsiz, düzensiz, kuru, krem renkli koloniler oluşturur. Middlebrook 7H10 veya 7H11 agarda 5-10 günlük inkübasyondan sonra oluşan mikrokoloniler mikroskop altında incelendiğinde "yılanvari kordo" görünümü izlenir. Tüberküloz basilleri yavaş üreyen, nonkromojen koloniler yapar (59).

#### Biyokimyasal Testler

MTBC'nin TDM'den ayırımında kullanılan biyokimyasal testler aşağıdaki gibidir:

- Katalaz testi
- Niasin birikim testi
- Nitrat indirgenme testi
- Paranitrobenzoik asit (PNB)'li besiyerinde üreme

Katalaz, niasin ve nitrat indirgenme testleri bir arada kullanılmalıdır, tek başlarına MTBC-TDM ayırımı yapamazlar (57).

**Katalaz testi:** Bazı mikobakterilerde bulunan katalaz, hidrojen peroksidi (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) su ve oksijene ayırıştırır hücre içi bir enzimdir. Semikantitatif katalaz test ile

oluşan hava kabarcıklarının yüksekliği ölçülerek katalaz enzimi miktarı hakkında fikir edinilebilir. Hava kabarcığının olmaması negatif sonuç olarak değerlendirilir. *M.tuberculosis* ve bazı diğer mikobakterilerdeki katalaz enzimleri ise 68°C'de 20 dakika ısıtıldığında inaktive olur. Isıya stabil katalaz testi bu özelliği araştıran bir testtir (11).

Katalaz aktivitesi iki şekilde araştırılır;

- Katalaz üretim miktarı (semikantitatif test)
- 68°C'de ısıya stabil katalaz (57)

**Niasin Testi:** Niasin (Nikotinik asit) NAD ve NADP koenzimlerinin biyosentezinde prekürsör olarak işlev görür. Bütün mikobakteriler nikotinik asit üretmelerine rağmen niasin birikimi siyonojen halidin kültür ortamına eklenmesiyle tespit edilir. *M.tuberculosis*'de nadiren negatiftir. *M.tuberculosis* tanımlanmasında niasin testi yanında katalaz testi mutlaka yapılmalıdır. Niasin testi kimyasal solüsyonlarla yapılabileceği gibi ticari kağıt striplerle de yapılabilir (72).

**Nitrat İndirgenme Testi:** Mikobakteriler nitratı indirgeme kabiliyetlerine göre birbirinden ayrılır. Bu test, nitritin uygun reaktifler ile reaksiyona girdiğinde renk oluşumunun gösterilmesi prensibine dayanır Günümüzde nitrat indirgenmesini tespit eden strip testler bulunmaktadır.

**PNB (p-nitrobenzoik asit) testi:** MTBC'nin tanımlanmasında 37°C'de PNB'li besiyerinde üreme özelliği kullanılabilir. PNB, MTBC'nin üremesini selektif olarak inhibe eder (57).

**Diğer Biyokimyasal Testler:**

**TCH (Thiophene-2-Carboxylic Acid Hydrazide; T2H) İle Üremenin İnhibe Edilmesi:** *M.tuberculosis* ve diğer yavaş üreyen mikobakterilerin çoğu 10 µg/ml TCH konsantrasyonuna dirençlidir. Bu test özellikle *M.bovis* ile *M.tuberculosis*'in ayırımında yardımcıdır.

**Pirazinamidaz Testi:** Pirazinamidaz enzimi pirazinamidi (PZA) pirazinoik asit ve amonyağa hidrolize eder. Pirazinoik asit, pirazinamidin aktif formudur. *Mycobacterium tuberculosis*'in prazinamidaz testinin pozitif olması bu türü *M.bovis*'ten ayırır. PZA direnci olan *M.tuberculosis* suşlarında ise test sonucu negatiftir (11, 59).

**Sodyum Klorür Tolerans Testi:** İçinde %5 NaCl içeren veya tuz bulunmayan LJ besiyerinde 30C° veya 35C°'de üreyebilen sadece *M.triviale* *M.abscesus* ve *M.fortuitum* için ayırt edici özelliktir.

**Tellürit Redüksiyonu:** Tellürit redüksiyonu testi diğer non kromojenik mikobakterilerden *M.avium* ve *M.intracellulare*'yi ayırmak için kullanılır. Bazı hızlı üreyen bakterilerde pozitif sonuç gösterebilir (72).

**Tween 80 Hidrolizi:** Bazı mikobakteri türleri tarafında üretilen lipazlar, polyoxyethylene sorbitan monooleate (tween 80) deterjanı hidrolize ederler. Bu test yavaş üreyen NTM türleri arasındaki ayırım için kullanılır (72).

**Üreaz Testi:** Üreyi, amonyak ve CO<sub>2</sub>'ye çevirme özelliği skotokromojen ve nankromojenlerin tanımlanmasında faydalıdır. *M.scrofulaceum* üreaz pozitifken *M.avium* ve *M.intracellulare* üreaz negatiftir. Üreaz testi özellikle pigment yapan *M.avium* suşlarının tanınmasında yardımcıdır. *M.gordonae* üreaz negatiftir. Bu testte besiyerinin pembe ve kırmızı renge dönüşümü pozitif olarak kabul edilir (72) .

**NAP Testi (Nitro- $\alpha$ -Acetylamino- $\beta$ -Hydroxypropriophenone):**

Radyometrik BACTEC yöntemine adapte edilmeye çalışılmıştır. Bu testte kullanılan p-nitro- $\alpha$ -asetilamino- $\beta$ -hidroksipropio-fenon'un mikobakterilerin gelişimi üzerine inhibitör etkisi vardır. Bu madde *M.tuberculosis* dışındaki mikobakterilerin gelişimini etkilemez veya çok az etkilerken, *M.tuberculosis*'in gelişimini seçici olarak inhibe eder. NAP testi *M.tuberculosis* kompleksini diğer mikobakterilerden ayırabilir. Ancak mutlaka diğer testlerle desteklenmesi gerekir (72).

**HPLC (High Performance Liquid Chromatography):** Mikobakteri kültür izolatlarının tanımlanmasında, mikolik asitlerin ekstraksiyonu ve ayrıştırılmasına dayanan kimyasal bir yöntemdir. Uygulama zorluğu ve ekipman gereksinimi nedeniyle tüberküloz laboratuvarlarında yaygın kullanım alanı bulamamıştır (57).

Mikolik asit analizleri yeni mikobakteri türlerinin tanımlanmasında önemlidir. Mikolik asitler mikobakteriyel hücre duvarının lipit içeriğinin önemli bir komponentidir. Hücre duvarının mikolik asit yapısı türler arasında değişiklik gösterir. Mikolik asit türleri, barındırdığı karbon atomu sayısı ve farklı fonksiyonel grupların varlığına bağlı olarak değişir. Mikolik asit esterlerinin High-Pressure Liquid Chromatography (HPLC)'si çoğu mikobakteri türlerinin tanımlanmasında hızlı ve

uygun yöntemdir. Ayrıca Thin-layer chromatography (TLC) ve gas-liquid chromatography (GLC) yöntemleriyle farklı türdeki mikobakteriler arasındaki mikolik asit yapıları tanımlanabilir (73).

#### 1.1.4.1.4.9.Genotipik Testler

Klasik laboratuvar tanı yöntemlerinden kültür yavaştır, mikroskopinin ise duyarlılığı düşüktür. Hızlı ve güvenilir yöntem arayışı tüberküloz laboratuvarında moleküler yöntemlerin kullanıma girmesine neden olmuştur.

Moleküler yöntemlerin kullanım amaçları;

I. Etkenin kısa sürede saptanması,

II. Saptanan etkenin isimlendirilmesi,

III. *M. tuberculosis* olarak tanımlanan suşların epidemiyolojik tiplendirmelerinin yapılması (genotiplendirme),

IV. Direnci kodlayan gen bölgelerinin incelenerek ilaç direncinin saptanmasıdır.

Bindokuzyüzseksenli yılların ortalarında Kary. B. Mullis tarafından geliştirilen polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) tekniği bilim çevrelerinde bir devrim olarak kabul edilmiştir. Daha sonraki yıllarda PZR, modifiye edilerek nükleik asit amplifikasyon (NAA) esaslı moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerde seçilmiş bir gen bölgesinin dış ortamda kısa süre çoğaltılması ve görüntülenmesi işlemleri yapılmaktadır. PZR metodunun mikrobiyolojide kullanım amaçları belirtilirken özellikle geç ve güç üreyen etkenlerin tanımlanmasında kullanım hedeflenmiştir. Bu özellik dikkate alındığında *Mycobacterium* genusunda bulunan *M.tuberculosis complex (M.tuberculosis)* ve *M.tuberculosis* dışı bakteriler (MOTT) akla gelmektedir. Günümüzde klinik örneklerden direkt olarak *M.tuberculosis* varlığınının gösterilmesi ve kültürde üreyen mikobakterilerin kısa sürede tür düzeyinde tanımlanması, tüberküloz ilaçlarına duyarlılıklarının araştırılması, ilaca dirençli olguların tespiti, dirençle ilgili mutasyonların saptanması amacıyla NAA ve prob hybridizasyon yöntemleri kullanılmaktadır (10).

Moleküler testlerde her ne kadar geleneksel yöntemlere göre daha hızlı sonuç alınsa da, klinik örnekte tüberküloz varlığının saptanmasında altın standart olan kültür ve direkt bakı kombinasyonu ile birlikte uygulanması önerilmektedir. Diğer infeksiyon etkenlerinde olduğu gibi, mikobakterilerde bulunan özgül nükleik asit

dizisinin, tespit edilecek düzeye gelinceye kadar çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemiyle çoğaltılması istenen DNA örneği, replikasyon için gerekli olan primerler, Taq polimeraz, nükleotitler gibi gerekli maddelerle beraber ayrılma (denaturation), birleşme (annealing) ve uzama basamaklarından oluşan döngülerle çoğaltılır. Birçok laboratuvarında kullanılmakta olan in-house PZR yönteminde ekstraksiyon ve amplifiye ürün saptanmasında farklı yöntemlerin kullanılması sebebiyle, yöntemin duyarlılık ve özgüllükleri değişmektedir. Noordhoek ve ark. (74)

Yedi farklı laboratuvarında aynı örneklerden aynı primerler kullanılarak PZR yöntemiyle *M.tuberculosis*'in tespit edilmeye çalışıldığı kör çalışmada, duyarlılık ve özgüllüklerin %2-90, yalancı pozitifliklerin ise %3-77 oranında değiştiğini saptamışlardır. Klinik örneklerde *M.tuberculosis* tanısında kullanılan standardize edilmiş olan iki test Amerika Birleşik Devletlerinde, Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA) tarafından onaylanmıştır. Onaylı testlerden biri olan PZR tabanlı Roche-Amplicor testinde internal kontrol bulunmakta ve AmpErase (UNG) yalancı pozitifliği engellemektedir. Bu testin FDA onayı, son bir yıl içinde tedavi almayan, solunum yolu örneklerinde direkt bakısı pozitif olan olguların ve *M.tuberculosis* ayrımının yapılabildiği merkezlerde kültür ile birlikte yapılması koşulu ile geçerlidir (75).

Onaylı diğer test ise izotermal bir amplifikasyon yöntemi olan TMA (transcription mediated amplification) yöntemidir. Bu yöntemde çoğaltılan hedef nükleik asit ribozomal RNA (rRNA)'dır. Sentezlenen komplementer DNA molekülünden RNA polimeraz enzimi ile yeni RNA kopyaları çıkarıldıktan sonra ürünün varlığı *M.tuberculosis*'e özgül akridinyum ile işaretli prob ile belirlenmektedir (76).

Bu test de; Amplicor'da olduğu gibi son bir yıl içinde tedavi almayan olguların solunum yolu örneklerinde ve *M. tuberculosis* ayrımının yapılabildiği merkezlerde, kültür ile birlikte yapılması koşulu ile FDA onaylıdır. Amplicor'dan farklı olarak sadece direkt bakı pozitif örneklere değil, negatif örneklere de uygulanabilmektedir (75).

#### **1.1.4.1.4.10. Gerçek Zamanlı PZR (Real-time PCR)**

Gerçek zamanlı PZR tekniği amplifikasyon sırasında ürün oluşumunun izlenmesi ve kalıp DNA miktarının tahmini esasına dayanmaktadır. Bu sistemde

fluorescent deteksiyon kimyasallar, amplifikasyon sinyal değişimlerini algılayan ve monitorize eden, bilgisayar programlarıyla destekli sistemler geliştirilmiştir. Günümüzde Gerçek zamanlı PZR'da; SYBR Green prob sistemi, TaqMan prob sistemi ve beacon prob sistemi kullanılmaktadır. Mevcut gerçek zamanlı PZR, tür ayrımında, nükleotit polimorfizimlerinin saptanmasında ve tedavi sırasında etken yükünün tespitinde yeterli olmaktadır. Günümüzde Mikobakteri türleri için kullanılan gerçek zamanlı PZR esaslı ticari sistemler bulunmaktadır. BIO-RAD firmasının ürünü iCycler, Roche Diagnostic Systems tarafından geliştirilen LightCycler, Applied Biosystems tarafından geliştirilen ABI Prism 7700 Detection system ve Abott diagnostik tarafından modifiye edilen ABI Prism 7000 sistemleri gerçek zamanlı PZR esaslı sistemlere örnektirler. Bu sistemlerde sıklıkla bakterinin, 16S rRNA bölgesini kodlayan gen bölgesi (rDNA) veya IS 6110 gen bölgesini hedef alınır. Sonuç olarak floresan ışımaların ölçülmesiyle tanıya yardımcı olunur.

PZR sonrasında elektroforeze gereksinim duyulmaması, kapalı sistem olduğundan dolayı kontaminasyon riskinin düşük olması, PZR'da kullanılacak karışımların hazır olması, duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olması ve çok kısa (1-3 saat) sürede sonuç vermesi bu sistemlerin üstünlükleri olarak sayılabilir (10).

#### **1.1.4.1.4.11. Self-sustained sequence-replication (3SR)**

Genellikle PZR ve NAA esaslı tekniklerin çoğunda hedef bölge DNA'dır. DNA'nın laboratuvar şartlarında stabil olması nedeniyle, sürekli laboratuvar kaynaklı bulaşa neden olmaktadır. Self-sustained sequence-replication (3SR); transkripsiyon esaslı bir NAA yöntemidir. Bu teknik üç tane enzimin aktivitesine bağlıdır. Bu enzimler; retro virus kökenli revers transkriptaz, faj kökenli T7 RNA Polimeraz ve bakteri kökenli ribonükleaz H enzimleridir.

Bu tekniğin en önemli avantajı, izometrik sabit ısıda (41°C) reaksiyonun gerçekleşmesi, PZR'a göre daha kısa sürede sonuç vermesi ve duyarlılığının standart RT PZR'a göre yüksek olmasıdır (10).

#### **1.1.4.1.4.12. Ligaz Zincir Reaksiyonu (Ligase chain reaktion; LCR)**

Enfeksiyon etkeninin saptanmasında ısıya dayanıklı DNA ligazın kullanıldığı prob hibridizasyon bazlı nükleik asit çoğaltma yöntemidir. Ligasyon ürünleri ısı ile denatüre edilerek kalıp DNA'dan ayrılırlar ve diğer oligonükleotitlerin bağlanmasında kalıp rolü üstlenirler. Hibridizasyon, hedef nükleik aside özgül, kalıp

üzerinde komşu olacak şekilde hazırlanmış işaretli problemler ile oluşur. Isıya dayanıklı DNA ligaz tarafından bağlanma ve denatürasyon aşamalarından oluşan döngüler ile çoğaltma meydana gelir (76).

#### **1.1.4.1.4.13. Transkripsiyon aracılı çoğaltma (TMA)**

Bu metot, transkripsiyon esaslı NAA yöntemidir ve izometrik ısıda, bir saat gibi kısa sürede RNA ve DNA hedeflerini bir milyon kat çoğaltabilmektedir. Burada RT ve RNA polimeraz enzimleri kullanılmaktadır. Bu metottaki aşamalar 3SR yöntemindekiyle benzerdir. En son aşamada ürünler prob teknolojisiyle gösterilir. Transkripsiyon esaslı yöntemlerin PZR yöntemine üstünlüğü amplifikasyon problemlerinin oluşmasıdır. Oluşan RNA laboratuvar ortamında DNA'ya göre daha stabil olduğundan kontaminasyon zinciri kırılır. Reaksiyon sonrası oluşan ürün miktarı çok yüksek olduğundan, duyarlılığı oldukça yüksektir (10).

#### **1.1.4.1.4.14. Zincir Ayırma Çoğaltması ( Strand displacement amplification; SDA)**

İzotermal olan bu tepkimelerde restriksiyon enzimi (HincII) ile kesilen kalıp DNA, *Escherichia coli* DNA polimeraz I (Klenow polimeraz)'in kesim noktasından başlayarak bir zinciri ayırıp diğeri üzerinde DNA sentezi yapabilme özelliğine dayanır. IS6110 ve 16SrRNA çoğaltıldığı için cins ve *M.tuberculosis* için tür tespiti yapabilmektedir (77).

#### **1.1.4.1.4.15. Prob Hibridizasyon ve Sinyal Amplifikasyon Teknikleri**

Bu yöntemlerde problemlerin sinyalle işaretli olması ve sinyallerin ölçümüyle değerlendirme yapılması nedeniyle sinyal amplifikasyon yöntemleri denilir. Genel olarak bu sistemde iki prob sistemi kullanılır ve birinci prob hedef nükleotide bağlanırken, sinyal taşıyan ikinci prob; birinci proba bağlanır. Bağlanma anında ışımaya gerçekleşir, sinyal oluşur ve oluşan sinyaller ölçülerek sonuçlar değerlendirilir. Bu sistemlerin modifiye edilmiş şekilleri mevcuttur. ELISA testine benzeyen modifiye hali branched DNA (bDNA) yöntemidir. Burada hedef DNA'ya spesifik problemlerin olduğu ortama hedef DNA eklenir, spesifik problemlerle DNA hibridize edilir. Ortama bDNAlar, uygun problemler eklenerek, bDNA'nın problemlere ve alkalen fosfataza bağlanması sağlanır. En son olarak ortama alkalen fosfatazla reaksiyona giren ve renk oluşumuna neden olan kromojen madde eklenir. Bu yöntem sıklıkla virolojide

(özellikle HIV-HBV-HCV) hastaların viral yükünü belirlemede kullanılmaktadır (10).

Diğer bir Prob Hibridizasyon ve Sinyal Amplifikasyon tekniği ise, hibrit yakalama (hybrid capture) yöntemidir ve birçok yönden ELISA'a benzer. Bu teknikte prob olarak hedef bölgeye spesifik RNA'lar kullanılır ve elde edilen DNA-RNA'lar katı fazdaki antikor ortamına aktarılır, son olarak kromojen madde eklenir. Sonuçta renkli ürünlerin miktarı ölçülerek sonuçlar değerlendirilir. Yakın zamanda geliştirilen yeni hibridizasyon tekniği de peptide nucleic acid in situ hybridization (PNA-FISH) dur. Bu teknikte *M.tuberculosis* kompleks'in 16S RNA'larını hedef alan floresansla işaretli peptid nükleik asit problemleri kullanılır. Klinik örneklerden tür tanımlanması ve ayrımı yapılabilmektedir (10).

#### **1.1.4.1.4.16. DNA Dizi Analizi**

Cihazsız uygulamaların mutasyonların saptanmasında altın standart olmasına rağmen teknik zorlukları vardır. Otomatik DNA sekanslama ise pahalı ve yatırım gerektirmektedir. Amplifikasyon işleminden sonra PZR ürünlerinin saflaştırılması, florokrom işaretli didioksi sekanslama reaksiyonu, sekanslama ürünlerine elektroforez uygulanması ve analiz gibi aşamaların yapılması gerekir. Sekans enzimlerinden birisi kullanılarak DNA iplikçiğinin komplementeri sentezlenirken dNTP eklendiğinde uzama devam eder, ddNTP eklendiğinde ise zincir uzaması durmaktadır. Tepkimeler sonucu ortaya çıkan farklı uzunluktaki DNA parçalarına poliakrilamid jelde elektroforez uygulanır. İşaretleme radyoaktif madde, kemilüminesans veya şorometrik maddelerle yapılmaktadır. DNA dizi analizinde, mikobakterilerde tür tayini ve ilaç direncini belirleyen mutasyonlar gibi filogenetik bilgilere ulaşılabilmektedir. Oldukça hızlı ve kesin sonuçlar vermesine rağmen pahalı ve zahmetli bir yöntem olduğundan dolayı rutin olarak değil, araştırma amacıyla kullanılmaktadır. Tüm mikobakteri türlerinin sahip olduğu 65 kDa'luk ısı şok proteinin (hsp65) kodladığı gen bölgesi, türe özgül allelik varyasyonlarla mikobakteri türlerinin ayırımında kullanılmaktadır. hsp65 ve 16SrRNA gen bölgelerinin kullanıldığı dizi analizlerinde *M.tuberculosis* kompleks üyelerinin genetik benzerliğinden dolayı ayırım mümkün olmamaktadır (78).

#### 1.1.4.1.4.17. Nükleik asit hibridizasyon yöntemleri

Hedef DNA dizisi komplementeri olan işaretli prob ile hibridlenmekte ve tanı konmaktadır. Bu yöntemlerde özgüllükleri yüksek fakat duyarlılıkları düşüktür. Nükleik asitlerin prob olarak kullanılan moleküllerin örneğe yeterince bağlanması için yeterli miktarda bulunması gerekir. Bu yöntemler özellikle kültürde üreyen mikobakterilerin tanı ve tiplendirmesinde kullanılmaktadır. Otomatize ve yarı otomatize kültür sistemlerinin geliştirilmesi ile daha kısa sürede üretilen mikobakteriler, 1980'li yıllardan beri kullanılmakta olan Accuprobe yöntemi ile erken dönemde doğrulanabilmektedir. Bu DNA problemlerinin en büyük dezavantajı; her defasında sadece bir mikobakteri türünün test edilmesidir. Klinik laboratuvarlarda sıklıkla izole edilen *M.tuberculosis* kompleksi, *M.avium* kompleksi, *M.avium*, *M.intracellulare*, *M.kansasii* ve *M.gordonae* türlerinin tanımlanmasında eldeki DNA problemleri biyokimyasal testlere gereksinimi ortadan kaldırmaktadır (79).

Son yıllarda ters hibridizasyon yöntemi olan Line probe Assay (LiPA) ile mikobakterilerin identifikasyonu yapılabilmektedir. Polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldıktan sonra membran üzerindeki problemler tek aşama olan hibridizasyon tek ile; *Mycobacterium spp.*, *M.tuberculosis* kompleks, *M.kansasii*, *M.xenopi*, *M.gordonae*, *M.avium* kompleks, *M.avium*, *M.intracellulare*, *M.scrofulaceum* ve *M.chelonae-abscessus* kompleks olarak tanı yapabilmektedir (80).

#### 1.1.4.1.4.18. İlaç Direncinin Belirlenmesi

1980'li yıllardan itibaren tüm dünyada tüberküloz olgularının artışı ilaç direnci ile birlikte gözlenmiştir. Geleneksel yöntemlerle ilaç dirençlerinin saptanması, izolasyonda olduğu gibi zahmetli ve zaman alıcıdır. Moleküler yöntemlerle, dirençten sorumlu mutasyonların gösterilmesi direnci kanıtlarken, dirençli olduğu saptanan fakat mutasyonların gösterilemediği olgular, dirençte başka gen bölge mutasyonları veya başka mekanizmalar olabileceğini düşündürmektedir. Rifampine dirençli mutasyonlarda genellikle, rpoB'nın 81 bazçiftlik gen bölgesinde nokta mutasyon, delesyon ve insersiyonların olduğu gözlenmiş ve bu bölge RRDR (rifampisin direncini belirleyen bölge= rifampin resistance determining region) olarak adlandırılmıştır. İzonyazit dirençli kökenlerin %50-60'ında katG tarafından kodlanan bölgede; nokta mutasyonları, delesyon ve insersiyonlar saptanmıştır. Bu mutasyonların çoğunluğu 315. kodondadır. izonyazidin mikolik asit sentezi üzerine

etkisi inhA lokusu tarafından kodlanmaktadır. Pirazinamide dirençli mutantlar pirazinamidi aktif formu olan pirazonik aside dönüştüren pirazinamidaz üretmezler. Pirazinamidazı kodlayan pncA mutasyonları dışında pirazinamit ile ilgili mutasyon bulunamamıştır. Etambutole dirençli kökenlerin %70'inde 306. kodonda oluşur ve sıklıkla arabinozil transferaz genini kodlayan embB deki mutasyonlar saptanmıştır. Florokinolonların hedef bölgesi gyrA ve gyrB tarafından kodlanan DNA giraz ve bu enzimin supersarmal yapıcı etkisidir. Mikobakterilerin florokinolonlara direnci hızla meydana gelir ve bu bölge FRDR (Florokinolon direncini belirleyen bölge = Fluoroquinolone resistance determining region) olarak kabul edilmiştir (81).

**DNA dizi analizi:** PZR bazlı yöntemler ile ilaç direncine neden olan mutasyon, delesyon ve insersiyonlar saptanmaktadır. DNA dizi analizi, antimikobakteriyel ilaç duyarlılığında moleküler altın standart olarak kabul edilmektedir (79).

**Tek zincir biçim çeşitliliği (Single strand conformation polymorphism=SSCP):** Bu yöntemde, ilaç direncinden sorumlu gen bölgesindeki çift zincirli DNA, PZR ile çoğaltılır ve ısı ile denatüre edilerek tek zincirler elde edilir. Her zincir içerdiği nükleotit dizisine göre kıvrılmalar ile özgül yapı oluşturur. Uygulanan elektroforez sırasında zincirin özgül yapısı jel gözeneklerinden geçiş hızını etkiler. Hastadan elde edilen SSCP ile ilaca duyarlı bir kontrol köken karşılaştırıldığında farklılığın saptanması, o gende bir mutasyon olduğunu ortaya çıkarır. Tek zincirli DNA'nın elektroforez jelinde görülebilmesi genellikle radyoaktif bir madde ile işaretleme ile sağlanır. Uygulama zorlukları ve deneyim gerektirmesi sebebiyle günlük kullanıma girememiştir (82, 83).

**Heterodupleks analizi:** Bu yöntemde hastadan izole edilen basilden ve ilaca duyarlı olduğu bilinen bir kontrol suşundan ilaç direncine neden olan gen bölgesi, PZR ile çoğaltılır. Çoğaltılan ürünler bir tüpte karıştırılıp, önce 95°C'ye kadar ısıtılarak DNA zincirlerinin birbirinden ayrılması, daha sonra oda sıcaklığına dek soğutulularak zincirlerin yeniden eşleşerek birleşmesi sağlanır. Farklı bakteriden ait olduğu halde uygunluk gösteren tek zincirler de bir araya gelerek heterodupleksler oluşur. Duyarlı bir suшта eşleşme tam olurken, dirençli suşlarda heterodupleksler arasında mutasyon noktasında bozukluk olur. Bu durum çift sarmal yapıyı bozar, elektroforez sırasında zincirdeki bükülmeler molekülün mutasyon bulunmayan

DNA'dan farklı hızda yürümesine neden olur. Çift zincirlerin etidyum bromür ile boyanıp ultraviyole transluminatörde hemen gözlenebilir olması rutinde kullanılmaya uygun olmasını sağlamıştır (82-84)

**Ters hibridizasyon yöntemi:** Rifampisin direncini saptamaya yönelik ticari formu bulunmaktadır. Bu yöntemde dirençten sorumlu gen bölgesine ait dizileri içeren proplar bir nitrosellüloz membran üzerine aktarılmıştır. Proplar üzerinde normal ve mutant gen bölgelerine özgül diziler bulunmaktadır. Dirençten sorumlu gen bölgelerine ait DNA molekülleri, polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldıktan sonra bu proplar ile hibridizasyona sokulur. Dirençli kökenler mutant dizileri taşıyan proplara, duyarlı kökenler ise normal dizileri içeren proplara bağlanır ve böylece ilaç direnci saptanabilir (82-84).

**Floresans rezonanslı enerji aktarımı (FRET-Fluorescence Resonance Energy Transfer):** Polimeraz zincir reaksiyonu sırasında çoğaltılmış DNA molekülüne bağlanan biri 3' diğeri 5' ucu floresans ile işaretli ve çok yakın yerleşimli iki DNA prob arasında enerji aktarımı ile floresansın ortaya çıkması sağlanmaktadır. 3' ucu floresans ile işaretli olan ve DNA molekülüne sıkı bağlanan verici molekül, 5' ucu işaretli olan alıcı moleküle enerji aktarır. Mutasyonların tanımlanması için 5' ucu işaretli propların mutasyonun beklendiği bölgeyi kaplayacak şekilde olması gerekmektedir. Amplifikasyonun sonunda en yüksek miktarda probun birbirlerine yakın tutunmasıyla en yüksek miktarda floresans üretilmektedir. Daha sonra tüpler yavaş yavaş ısıtılırken floresans izlenir ve erime eğrileri elde edilir. Belirli ısılarda 5'ucu floresans işaretli olan probun bağlandığı bölgeden ayrılmasıyla floresans aniden azalır. Floresansın en fazla azaldığı ısıya erime noktası denir. Probu bağlandığı bölgede mutasyon varlığı, gevşek bağlanmaya ve erime nokta ısısının düşmesine neden olmaktadır. Bu yöntem özellikle ilaç dirençlerini belirleyen mutasyonların ve klinik örneklerdeki mikobakterilerin saptanmasında kullanılmaktadır (85, 86).

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda tüberküloz ön tanısı ile her biri farklı hastalardan alınan klinik örnekler, mikobakteriyolojik inceleme amacıyla, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilmiştir. Bu örneklerden 100 tanesi çalışmaya dahil edilmiştir. Örneklerin 50 tanesi kültür altın standart kabul edilerek kültür pozitif hastalardan mikroskopi ve moleküler yöntemlerle karşılaştırılmak üzere seçilmiştir. Diğer 50 örnek ise kültür negatif hastalardan mikroskopi ve moleküler yöntemler ile karşılaştırılmak üzere çalışmaya dahil edilmiştir.

Steril, sızdırmaz burgulu kapaklı, dayanıklı ve tek kullanımlık kaplar içinde yeterli miktarlarda gönderilen klinik örnekler laboratuvarımızda çalışılmak üzere kabul edilmiştir. Kapların üzerine örneğin hangi hastadan, ne zaman alındığı ve örneğin tipinin belirtilmiş olmasına dikkat edilmiştir. İlk örnekler antimikrobiyal tedavi başlanmadan önce alınmış ve en kısa zamanda laboratuvara ulaştırılmıştır.

Beyin omurilik sıvısı (BOS), periton - plevra sıvısı, biyopsi materyali gibi steril vücut örnekler dekontamine edilmeden; balgam, açlık mide suyu, BAL, ve apse materyalleri gibi steril olmayan veya steril şartlarda alınmayan örnekler ise bakteri yoğunluğunu arttırmak için homojenizasyon ve dekontaminasyon işlemine alınmıştır.

### 2.1. Dekontaminasyon- Homojenizasyon- Konsantrasyon İşlemi

Örneklerin dekontaminasyon ve homojenizasyonu için NALC-NaOH yöntemi hazır ticari kit (Tüberküloz Dekontaminasyon ve Konsantrasyon kiti, RTA Laboratuvarları Ltd. Şti., Kocaeli) kullanılarak uygulanmıştır.

1. Örneklerin herbiri en fazla 10 ml olacak şekilde içinde NALC (N-asetil-L-sistein) ve cam boncuklar bulunan, 50 ml'lik polipropilen, dibi konik, burgulu kapaklı steril tüplere (Falkon tüpü) aktarıldı.

2. Örnek toplama tüpündeki örnek üzerine sodyum hidroksit sodyum sitrat çözeltisinde 1:1 oranında eklendi ve tüpün kapağı iyice kapatıldı.

3. Vorteks ile karıştırarak örneğin homojenize olması sağlandı ve oda sıcaklığında 10-15 dakika bekletildi.

4. Örneğin üzerine 50 ml çizgisine kadar fosfat tamponu eklendi, kalan fosfat tamponu sonraki aşamalar için saklandı.

5. Tüpler 10 dakika 3.500xg (yaklaşık 4.000devir/dakika) hızda santrifüj edildi.

6. Üstte kalan sıvı dikkatlice dezenfektan içeren kaba boşaltıldı.
7. Kalan fosfat tamponu örnek toplama tüpüne 12,5 ml çizgisine kadar dolduruldu ve vorteks ile karıştırılarak tekrar süspansiyon haline getirildi.
8. Tüpler 10 dakika 3.500xg (yaklaşık 4.000 devir/dakika) hızda santrifuj edildi.
9. Üstte kalan sıvı dikkatlice dezenfektan içeren kaba boşaltıldı.
10. Çökelti vorteksle karıştırarak süspansiyon haline getirildi. Bu süspansiyon; kültür, mikroskopik incelemeler ve moleküler yöntemler için kullanıldı.
11. İşlem tamamlandıktan sonra tüpler kit içerisindeki dezenfektan çözeltisi ile dezenfekte edilip atıldı.

## **2.2. Direkt Mikroskopik İnceleme**

Hazırlanmış örnek süspansiyonu lam üzerine oval tarzda yayılarak preparat hazırlandı. Preparat biyolojik güvenlik kabininde havada kurumaya bırakıldı. Örneklerden hazırlanan preparatlar Erlich-Ziehl-Neelsen (EZN) yöntemi ile boyanarak mikroskopik inceleme yapıldı.

Ehrlich Ziehl Neelsen (EZN) yöntemi: Hazırlanan yayma preparatlar alevden üç kez geçirilerek fikse edildi. Boyama ızgarasına yerleştirilen preparatlar karbol fuksin ile kaplandı. Buhar çıkıncaya kadar lam alttan yavaşça ısıtıldı (kuruma ve kaynamaya izin vermeden aralıklı ısı ile yaklaşık 3-5 dakika). Preparatlar soğumaya bırakıldı ve su ile yıkandı. %3'lük asit-alkol ile renk akmayana kadar (yaklaşık 2 dakika) yıkanarak dekolorizasyon işlemi uygulandı. Preparatlar su ile yıkandı ve zıt boya olarak metilen mavisi ile 20-30 sn boyandı. Preparatlar tekrar su ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Her boyamada bir negatif kontrol (*Escherichia coli*), bir pozitif (*M.tuberculosis*) kontrol boyamaya dahil edildi (87).

Boyanan yayma preparatı immersiyon objektifi ile (x100) mikroskopta ARB yönünden incelendi. EZN boyası ile boyanmış yayma preparatlarında mikobakteriler parlak pembe, diğer mikroorganizmalar ise mavi olarak boyandılar. Parlak pembe olarak boyanan basillerin görüldüğü örnek için sonuç 'ARB (+)' olarak verildi. En az 300 objektif alanı taranıp basillerin görülmemesi halinde ise sonuç 'ARB (-)' olarak raporlandı. Sonuçlar tabloya (Tablo 5) göre yorumlandı.

### 2.3. BACTEC MGIT 960 Sıvı Kültür Sistemi

The MGIT Mikobakteri Çoğalma İndikatör Tüpü, 7 mL'lik modifiye edilmiş Middlebrook 7H9 Broth bazı içerir. 5,6 OADC (oleic asid-albumin-dextroz-katalaz) ile zenginleştirilen ve PANTA antibiyotik karışımı içeren tam besiyeri, mikobakterlerin kültivasyonunda en sık kullanılan sıvı besiyerlerinden biridir.

Pulmoner ve ekstrapulmoner olmak üzere (kan ve idrar dışında) tüm klinik örnek türleri, geleneksel yöntemler kullanılarak MGIT tüpünde birincil izolasyon için işlendi. İşlenen örnek bir MGIT tüpüne inoküle edildi ve pozitif sonuç alınana veya test protokolü sonlandırılana kadar sürekli olarak izlenmek üzere BACTEC MGIT cihazına yerleştirildi.

Yuvarlak tabanlı 16x100 mm'lik tüplerin alt kısmında silikonla kaplanmış floresan bir bileşim bulunmaktadır. Floresan bileşim, broth'ta çözünen oksijenin varlığına duyarlıdır. Başlangıçta fazla miktarda çözünmüş oksijen, bileşimin emisyonlarını bastırır ve çok az floresans saptanabilir. Daha sonra, aktif olarak solunum yapan mikroorganizmaların oksijeni tüketmesi bileşimin floresan vermesine neden olur. BACTEC MGIT cihazı ne girilen tüpler 37 °C'de sürekli olarak inkübe edilir ve her 60 dakikada bir floresandaki artış açısından izlenir. Floresan analizi tüplerin cihaz pozitif olup olmadığına başka bir deyişle test örneğinin canlı organizma içerip içermediğinin belirlenmesi için kullanılır.

Cihaz pozitif bir tüp milimetrede yaklaşık olarak 105-106 koloni oluşturma birimi (CFU/mL) içerir. En az 42 gün (en çok 56 gün) boyunca negatif sonuç veren ve hiçbir pozitivite belirtisi göstermeyen kültür şişeleri cihazdan alınarak negatif olarak değerlendirilir ve atılmadan önce sterilize edilir. BACTEC MGIT Çoğalma Destekleyicisi, mikobakterin hızlı gelişimi için gerekli maddeleri sağlamak üzere her MGIT tüpüne eklenir. Oleik asit tüberkül bakterisi tarafından kullanılır ve mikobakter metabolizmasında önemli bir role sahiptir. Albumin, Mikobakter türleri için toksik olabilen serbest yağ asitlerini bağlayıp geri kazanımı artırarak koruyucu bir ajan görevi görür. Dekstroz bir enerji kaynağıdır. Katalaz, besiyerinde bulunma ihtimali olan zehirli peroksitleri parçalar. BBL MGIT broth (sıvı besiyer) bazının klinik örneklerle inokülasyondan önce BACTEC MGIT Çoğalma Destekleyicisi/BBL MGIT PANTA antibiyotik karışımı ile desteklenmesiyle kontaminasyon azaltılır.

REAKTİFLER BBL MGIT Mikobakter Çoğalma İndikatör Tüpü'nün içinde, 110 µL floresan indikatörü ve 7 mL broth (sıvı besiyeri) bulunur.

1000 ml Saf Su için Yaklaşık Formül:

Modifiye edilmiş Middlebrook 7H9 Broth bazı..... 5,9 g

Kazein peptonu ..... 1,25 g

BACTEC MGIT Çoğalma Desteği 15 mL Middlebrook OADC ile zenginleştirilmiştir.

1000 ml' deki Saf Su için Yaklaşık Formül:

Bovin albümin ..... 50,0 g

Katalaz ..... 0,03 g

Dekstroz ..... 20,0 g

Oleik asit ..... 0,1 g

Polioksietilen stearat (POES)..... 1,1 g

BBL MGIT PANTA şişesi, antimikrobiyal ajanların liyofilize karışımını içerir. Liyofilize PANTA Şişesi için Yaklaşık Formülü\*:

Polimiksin B ..... 6,000 ünite

Trimethoprim ..... 600 µg

Amfoterisin B ..... 600 µg

Azlosilin ..... 600 µg

Nalidiksik asit ..... 2,400 µg

**MGIT Tüplerinin İnokülasyonu:** BBL MGIT 7 ml'lik Tüpleri bir BACTEC MGIT cihazı ile birlikte kullanılmıştır.

1. Liyofilize bir BBL MGIT PANTA Antibiyotik Karışımı şişesini 15 ml BACTEC MGIT Çoğalma Desteği ile sulandırıldı.

2. MGIT tüpünü örnek numarası ile etiketlendi.

3. Kapağı çıkarıldı ve 0,8 ml Çoğalma Desteği/MGIT PANTA Antibiyotik Karışımını aseptik olarak eklendi. En iyi sonuçları elde etmek için, Çoğalma Desteği/MGIT PANTA Antibiyotik Karışımı örnek inokülasyonundan hemen önce eklendi.

4. Yukarıdaki hazırlanan konsantre örnek süspansiyonundan 0,5 ml eklendi. Ayrıca, bir 7H10 agar plağına veya başka bir mikobakteriyel katı agara veya yumurta bazlı besiyerine bir damla örnek (0,1 mL) eklendi.

5. Tüpün kapağı sıkıca kapatıldı ve tüpler iyice karıştırıldı.

6. Cihaza girilen tüpler önerilen 42 günlük test protokolü süresince otomatik olarak test edildi. Farklı inkübasyon gereksinimlerine sahip mikobakterlerin varlığından şüphelenilen örneklerde, bir çift MGIT tüpü kullanılarak uygun bir sıcaklıkta (örn. 30°C veya 42°C) inkübe edildi. Gerekli sıcaklıkta inoküle ve inkübe edildi. Bu tüpler manuel olarak okundu. *Mycobacterium haemophilum* içerdiğinden şüphelenilen örneklerde, inokülasyon sırasında tüpe hemin kaynağı konularak tüp 30°C'de inkübe edildi. Örnek inokülasyonundan önce hemin eklenmesini gerektiren her MGIT tüpüne BBL Taxo X Faktör Stribi'nden bir stribi aseptik olarak eklendi. Bu tüpler manuel olarak okundu.

7. BACTEC MGIT cihazı ile tespit edilen pozitif tüplerin alt kültürleri hazırlandı ve aside dirençli bir sürme örneği hazırlandı.

**Pozitif bir MGIT Tüpünün İşlenmesi:** Tüm adımlar, biyolojik güvenlik kabininde gerçekleştirildi.

1. MGIT tüpü cihazdan çıkarıldı ve BSL III uygulamaları ve saklama tesisleri kullanılarak bir alana nakledildi.

2. Steril bir aktarım pipeti kullanarak, tüpün alt kısmından (yaklaşık 0,1 mL), boya preparatları için bir alikot alındı (AFB ve Gram boyaları).

3. Sürülen örnek ve preparatlar incelendi. Ön sonuçlar yalnızca aside dirençli sürme örneğinin değerlendirilmesinden sonra raporlandı.

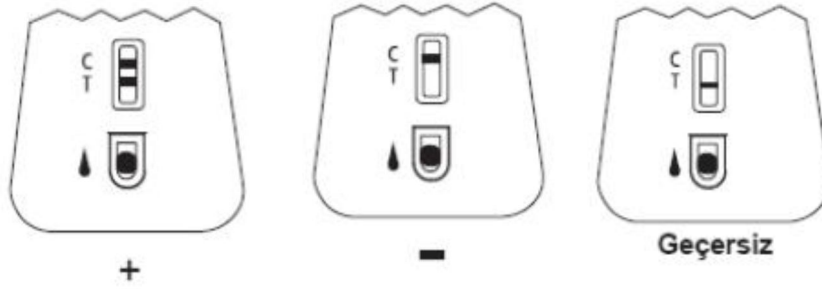
Altı haftalık inkübasyon sonrasında cihaz negatif tüplerin tümü görsel olarak incelendi. Tüp pozitivite belirtisi göstermiyorsa, atılmadan önce sterilize edildi.

MGIT tüpünde pozitiflik veren örnekte ilk gün basil görülmemesi halinde , üç gün üst üste aynı şekilde preparat hazırlandı; (-)ARB basil..... ARB üremedi şeklinde rapor edildi. (+)ARB basil.....*Mycobacterium tuberculosis* tiplendirme kard testi yapıldı.

**Kard test:** Her bir örnek için tek kullanımlık hazır stripler halinde bulunur. Test, mikobakteri türüne karşı antikor içeren kontrol çizgisinden (C) ve MPT64 antijenine karşı spesifik monoklonal antikor içeren çizgiden (T) oluşmaktadır.

• +4°C'de saklanan test stribi kullanımdan önce buzdolabından çıkarıldı ve oda sıcaklığına getirildi.

- Oda sıcaklığına gelen strip kullanmadan hemen önce açıldı ve düz bir zemine yerleştirildi.
- Pozitif MGIT tüpü 10-15 sn vortexlendi ve 100 µl alınıp steril bir pipetle düzgünce örnek kuyucuğuna yerleştirildi.
- 15 dk bekletildi (maksimum 60 dakika).
- Daha sonra Şekil 6'daki gibi değerlendirildi.



Şekil 6. Kard Testi yorumlanması

Şekil 6'da görüldüğü gibi sadece kontrol çizgisinin belirginleşmesi bu bakterinin *M.tuberculosis* olmadığını, MOTT basili olduğunu düşündürür. Sadece T çizgisinin belirginleşmesi ise kard testin çalışmadığını gösterdi, geçersiz olarak değerlendirilir.

**Kontaminasyonun saptanması:** Kontamine edici bakterilerin çoğalması pozitif floresanlıkla sonuçlandığından bütün floresan pozitif MGIT tüpleri görsel olarak türbidite açısından incelendi ve bir ARB yayması hazırlandı.

Kontaminasyonun varlığı aşağıdaki yöntemle teyit edildi:

- Bir yayma hazırlandı ve EZN boyası ile boyandı. Yayma üzerinde aside dirençli olmayan diğer bakterilerin veya mantar elemanlarının varlığı bize kontaminasyonu düşündürdü.

- Kanlı agara pasaj yapıldı. Kültürler  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edildi ve 24-48 saat sonunda incelendi. Kontamine edici çoğalma görüldüğünde, yine Gram ve EZN boyası ile doğrulandı.

- Kontaminasyon, besleme sıvısından negatif ARB yayması ile doğrulandığında, örnek kontamine olarak değerlendirildi.

## **2.4. GeneXpert Real-Time PCR Yöntemi**

Akciğer TB şüphesi olan tüm hastalarda bakteriyolojik inceleme için TB' da Uluslararası Bakım Standartları en az iki balgam örneğinin incelenmesini önermektedir. Özellikle sabah saatlerinde alınan ARB pozitif veya negatif indüklenmiş ya da normal balgam örnekleri Xpert MTB / assay RIF cihazı için kullanılabilir. Cihaz klinik olarak pulmoner tb şüphesi olan hastalardan tüberküloz tedavisi almamış, 7 günden kısa süredir tedavi alan ve son 60 gün içerisinde tedavi almamış hastalarda kullanılması önerilmektedir. Antimikrobiyal tedavi sonrası bakteri DNA'ları halen bulunabileceğinden ilaç tedavi etkinlik takibi için kullanması önerilmemektedir.

### **2.4.1. Ekspektore Balgam örnekleri**

1. Xpert MTB / RIF kartuşu ilgili örneğin tanımlanması için etiketlendi.
2. Steril bir transfer pipeti kullanılarak konik, vidalı kapaklı tüpe 1ml ekspektore balgam aktarıldı (Alternatif olarak, tüm numune orijinal sızdırmaz balgam toplama kabına da konabilir).
3. Steril bir transfer pipeti kullanılarak ekspektore balgam örneğine 2ml Xpert MTB / RIF Örnek Reaktifi (2/1 oranında ) eklendi.
4. Kapağı değiştirildi ve karışım 10-20 kez kuvvetlice çalkalandı (Alternatif olarak, karışım 30 sn santrifüj de edilebilir).
5. Tüp oda sıcaklığında 5 dakika boyunca dik olarak bekletildi.
6. Tüp 10-20 kez kuvvetlice çalkalandı (Alternatif olarak, vorteks 30 sn süresince kullanılabilir).
7. Tüp oda sıcaklığında bir 10 dakika daha dik olarak bekletildi.
8. Örnekleri incelendi: Sıvılaştırılmış numunede görünür balgam kümeleri olmadığı teyid edildi.

### **2.4.2. Konsantre Sedimentler**

1. Xpert MTB / RIF kartuşu ilgili örneğin tanımlanması için etiketlendi.
2. Steril bir transfer pipeti kullanılarak konik, vidalı kapaklı tüpe 1,5 ml Xpert MTB / RIF Örnek Reaktifi aktarıldı.
3. Steril bir transfer pipeti kullanılarak Örnek Reaktifi içeren tüpe en az 0.5 ml konsantre sediment eklendi.

4. Kapağı değiştirildi ve karışım 10-20 kez kuvvetlice çalkalandı (Alternatif olarak, karışım 30 sn santrifüj de edilebilir).
5. Tüp oda sıcaklığında 5 dakika boyunca dik olarak bekletildi.
6. Tüp 10-20 kez kuvvetlice çalkalandı (Alternatif olarak, vorteks 30 sn süresince kullanılabilir).
7. Tüp oda sıcaklığında bir 10 dakika daha dik olarak bekletildi.
8. Örnekleri incelendi: Sıvılaştırılmış numunede görünür balgam kümeleri olmadığı teyid edildi.

#### 2.4.3. Xpert MTB / RIF Kartuş Yükleme

**Not:** Kartuş için örnek eklenerek 30 dakika içinde teste başlandı.

1. Xpert MTB / RIF kartuş ve numune ID etiketleri kontrol edildi.
2. Kartuş kapağı açıldı.
3. Steril transfer pipeti kullanılarak sıvılaştırılmış örnek menisküs asgari işaretinin üstüne kadar aspire edildi ve açık Xpert MTB / RIF kartuş portuna aktarıldı.

**Not:** Aerosol oluşum riski en aza indirmek için yavaş yavaş dağıtıldı.

4. Kartuş kapağı kapatıldı.

Her Xpert MTB / RIF kartuşu MTB kompleksi ve RIF direncini tespit etmek için reaktifler ve hedef bakteri etkinliği ve PZR reaksiyonundaki inhibitör varlığının tespiti için kontrol numune örneği (Sample Processing Control (SPC)) içerir. Prob Check Control (PCC), reaktif rehidrasyonunu, kartuştaki PZR tüp doluluğunu, prob bütünlüğünü ve boya varlığını doğrular. Xpert MTB / RIF testindeki primerler 81 baz çifti "çekirdek" bölgesi içeren *rpoB* geninin bir kısmını amplifiye ederler. Molecular beacons olarak bilinen beş farklı renkteki Flourogenik nükleik asit hibridizasyon problemleri, tüm 81-bp çekirdekleri test eder. Her molecular beacon doğal tip *rpoB* hedef dizisinde bir tek nükleotid bile farklı olduğunda hedefe bağlanmamaktadır. Molecular beacons sadece doğal tip *rpoB* dizini gibi hedeflerine bağlandığında floresans vermektelerdir. Testteki beş renkten herhangi birinin yokluğu korunmuş doğal tip dizinleri ile RIF direnci ile ilişkili çekirdek bölgesindeki mutasyonların ayırımını sağlar.

SPC negatif bir örnekte pozitif olabilir ve pozitif bir örnekte, negatif veya pozitif olabilir. Negatif testte SPC tespit edilemediğinde sonuç "geçersiz" sayılır.

PZR reaksiyonu başlamadan önce, GeneXpert Dx Sistemi boncuk rehidrasyonunu, reaksiyon-tüp dolumunu, prob bütünlüğünü ve boya varlığını izlemek için problardan floresans sinyali ölçer. Problardan geçen floresans sinyali kabul edilen kriterleri karşılıyorsa, PCC geçerli sayılır. GeneXpert Dx Sistemi ölçülen floresan sinyallere ve varolan hesaplama algoritmalarına göre sonuçları yorumlar ve sonuçlar cihazın View Results penceresinde şekildeki gibi görüntülenir.

**MTB Saptandı:** MTB hedef DNA'sı tespit edildiğinde; her iki kontrol de, SPC ve PCC, kabul edilen kriterleri karşılamaktadır. Alt Ct değerleri, DNA kalıbının daha yüksek bir başlangıç konsantrasyonunda olduğunu gösterir; yüksek Ct değerleri DNA kalıbının daha düşük bir konsantrasyonunda olduğunu gösterir. MTB DETECTED sonuçlarında "RIF Resistance DETECTED", "RIF Resistance NOT DETECTED", ya da "RIF Resistance INDETERMINATE" ayrı bir satırda görüntülenir.

**MTB Saptanmadı:** MTB hedef DNA'sı tespit edilmediğinde; her iki kontrol de, SPC ve PCC, kabul edilen kriterleri karşılamaktadır.

**Geçersiz:** MTB varlığı veya yokluğu tespit edilemediğinde: SPC kabul edilen kriterlere uymuyordur, yani örnek düzgün işlenmemiş veya PCR inhibe edilmiştir.

Not: Ekstra numune ile testi tekrar edilir..

**Hata:** PCC sonuçlarından biri veya daha fazlası başarısızdır (FAIL). MTB ve SPC 'nin her ikisi de NO RESULT gösterecektir. Not: Ekstra numune ile testi tekrar edilir. PCC çalışılmadan geçilirse (PASS), hata bir sistem bileşeni probleminde kaynaklanmaktadır.

### 3. BULGULAR

Bu çalışmaya Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına tüberküloz ön tanısı ile gönderilen 100 hasta örneği dahil edildi. Gönderilen klinik örneklerden kültür sonuçları pozitif olan 50 hasta örneği ve kültür sonucu negatif olan 50 hasta örneği çalışmaya alındı. Gönderilen klinik örnekler direk mikroskopi (EZN), kültür (BACTEC MGIT 960) ve PZR (GeneXpert Dx System) ile karşılaştırmalı olarak incelendi.

Kültüründe mikobakteri üreyen hastaların 24'ü(%48) erkek, 26'sı (%52) kadındı. Örneklerin 20'si (%40) göğüs hastalıkları, 19'u (%38) Verem Savaş Dispanseri(VSD), 5'i (%10) çocuk hastalıkları, 2'si (%4) üroloji, 1'i (%2) gastroenteroloji, 1'i (%2) romatoloji, 1'i (%2) acil ve 1'i (%2) göğüs cerrahisi servislerinden gelmişti. Örneklerin 40'ı (%80) balgam, 5'i (%10) bronkoalveolar lavaj (BAL), 2'si (%4) abse, 2'si (%4) mide açlık sıvısı (MAS) ve 1'i (%2) plevral mayiydi (Tablo 10).

**Tablo 10.** Kültür pozitif izolatların klinik örneklere göre dağılımı.

Klinik örnek (Kültür (+))	İncelenen örnek sayısı [n(%)]
Balgam	40 (%80)
Bronkoalveolar lavaj	5 (%10)
Abse	2 (%4)
Mide açlık sıvısı	2 (%4)
Plevral mayi	1 (%2)

Kültüründe mikobakteri üremeyen kontrol gurubu hastaların 29'u (%58) erkek, 21'i (%42) kadındı. Örneklerin 17'si (%34) göğüs hastalıkları, 10'u (%20) çocuk hastalıkları, 7'si (%14) enfeksiyon hastalıkları, 7'si (%14) dahili yoğun bakım, 3'ü (%6) nöroloji, 2'si (%4) gastroenteroloji, 1'i (%2) ortopedi, 1'i (%2) onkoloji, 1'i (%2) Verem Savaş Dispanseri (VSD), 1'i (%2) göğüs cerrahisi servislerinden gelmişti. Bu örneklerin 29'u (%58) balgam, 12'si (%24) bronkoalveolar lavaj (BAL), 6'sı (%12) plevral mayi, 1'i (%2) trakeal aspirat kültürü (TAK), 1'i (%2) torasentez ve 1'i (%2) de mide açlık sıvısıydı (MAS)(Tablo 11).

**Tablo 11.** Kültür negatif izolatların klinik örneklere göre dağılımı

Klinik örnek (Kültür (-))	İncelenen örnek sayısı [n(%)]
Balgam	29 (%58)
Bronkoalveolar lavaj	12 (%24)
Plevral mayi	6 (%12)
Mide açlık sıvısı	1 (%2)
Trakeal aspirat kültürü	1 (%2)
Torasentez	1 (%2)

Çalışmamızda kültür (+) 50 klinik örneğin mikroskopik değerlendirmesinde 39 (%78) örneğin ARB (+), 11 (%22) örneğin ise ARB (-) olduğu görüldü. ARB (+) 39 örneğin 32'si balgam, 4'ü bronkoalveolar lavaj, 2'si mide açlık sıvısı, 1'i de abse örneğiydi. ARB (-) olarak değerlendirilen 11 klinik örneğin 8'i balgam, 1'i bronkoalveolar lavaj, 1'i abse, 1'i de plevral mayi örneğiydi (Tablo 12).

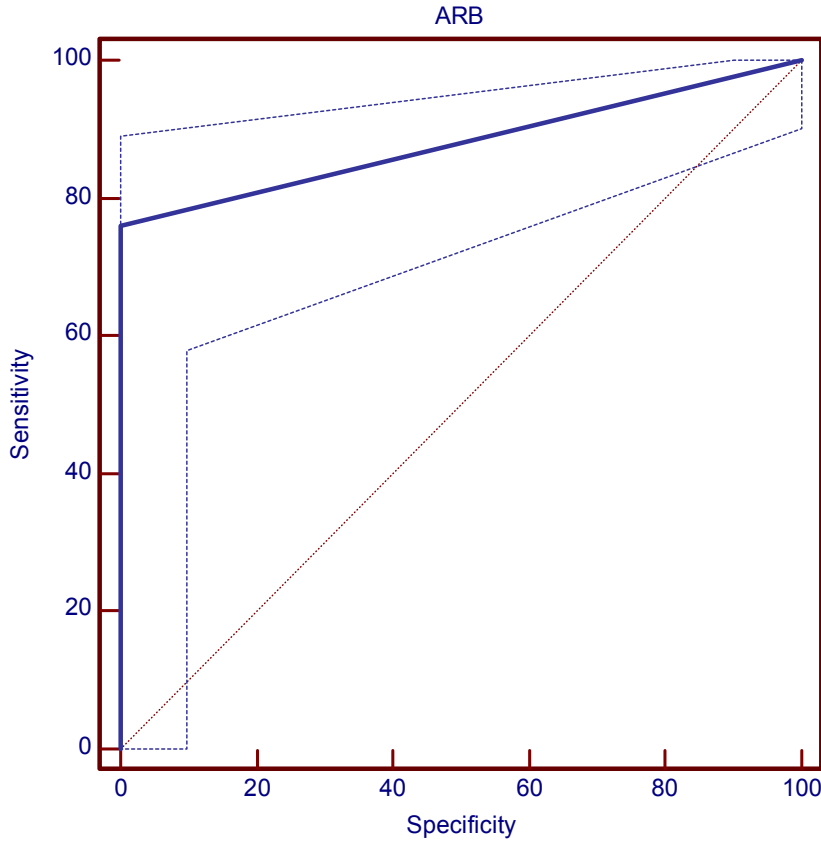
Kültür (-) 50 kontrol hasta örneğinin mikroskopik değerlendirmesinde ARB (+) örnek görülmedi.

**Tablo 12.** Kültür (+) izolatlarda ARB ve PZR sonuçlarının klinik örneklere göre dağılımı

Klinik Örnekler	ARB		PZR	
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
Balgam	32	8	39	1
Bronkoalveolar lavaj	4	1	5	0
Abse	1	1	2	0
Mide açlık sıvısı	2	0	2	0
Plevral mayi	0	1	1	0

Kültür altın standart kabul edilerek kültür (+) 50 klinik örneğin istatistiksel değerlendirilmesi yapıldı. Bu değerlendirmeye göre ARB' nin duyarlılığı (sensitivite) %76, özgüllüğü (spesifite) ise %100 olarak saptandı (Tablo 13). Güven aralığı duyarlılık için 61.8-86.9 (%95 Confidence Interval (CI)), özgüllük için 92.8-100 (%95 CI) olarak saptandı. ROC (Receiver Operating Characteric) eğrisinde eğri

altında kalan alan (Area under the ROC curve (AUC)) 0.880 olarak saptandı (p=0,0001) (Şekil 7).

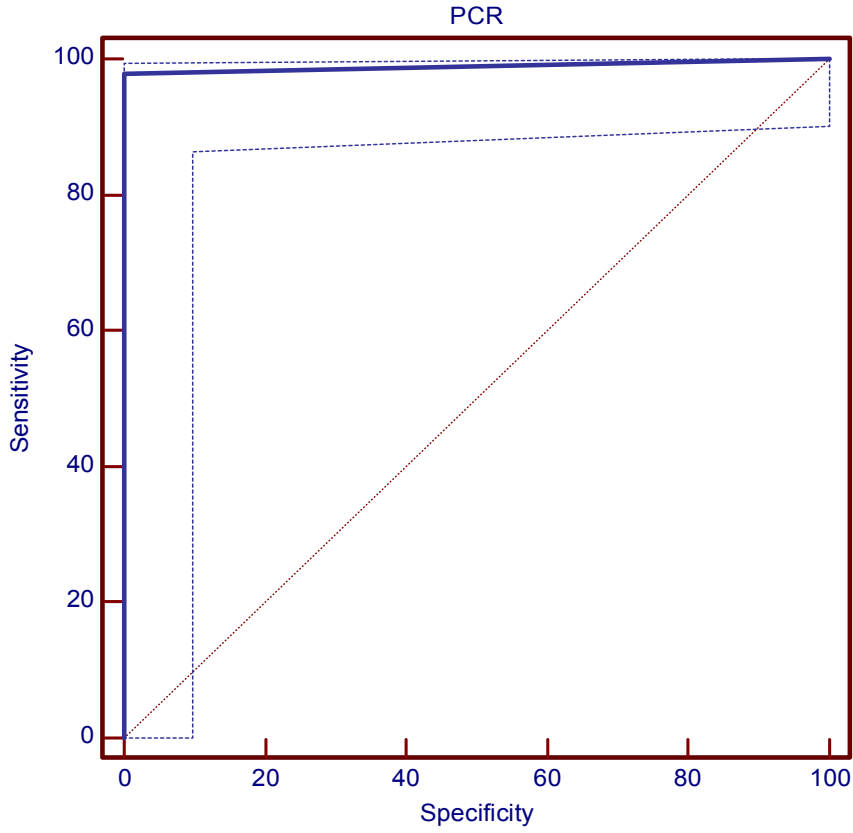


Şekil 7. Kültür pozitif örneklerde ARB' nin duyarlılığı ve özgüllüğü

Çalışmamızda MGIT 960 kültür sistemi ile tüberküloz saptanan 50 klinik örneğin GeneXpert Dx System ile çalışılan PZR sonuçlarından sadece 1 örnek PZR negatif olarak saptandı geri kalan 49 örnek PZR pozitif idi. PZR negatif olan örnek Göğüs Hastalıkları servisinde balgam örneği olarak gönderilmişti. Örnek 52 yaşında bir bayana aitti. Bu örneğin mikroskopik incelenmesinde de ARB negatif olarak saptanmıştı. PZR pozitif örneklerin 39'u balgam, 5'i bronkoalveolar lavaj (BAL), 2'si abse, 2'si mide açlık sıvısı (MAS) ve 1'i plevral mayiydi (Tablo 12).

Kültür altın standart kabul edilerek kültür (+) 50 klinik örneğin istatistiksel değerlendirilmesi yapıldı. Bu değerlendirmeye göre PZR' nin duyarlılığı (sensitivite) %98, özgüllüğü (spesifite) ise %100 olarak saptandı (Tablo 13). Güven aralığı duyarlılık için 89,3-99,7 (%95 Confidence Interval (CI)), özgüllük için 92,8-100 (%95 CI) olarak saptandı. ROC (Receiver Operating Characteric) eğrisinde eğri

altında kalan alan (Area under the ROC curve (AUC)) 0.990 olarak saptandı (p=0,0001) (Şekil 8).



**Şekil 8.** Kültür pozitif örneklerde PZR' nin duyarlılığı ve özgüllüğü

Kültür (+) 50 tüberküloz hastasının MGIT 960 sistemi ile yapılan ilaç duyarlılığı testlerinde hiçbir örnekte Rifampisin direnci saptanmadı. PZR ile pozitif saptanan 49 tüberküloz hasta örneğinde de GeneXpert Dx System ile yapılan Rifampisin duyarlılık testinde Rifampisin direnci görülmedi.

**Tablo 13.** ARB ve PZR yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllükleri

Metod	Duyarlılık (%95 CI)	Özgüllük (%95 CI)
ARB	%76	%100
PZR	%98	%100

#### 4. TARTIŞMA

Tüberküloz, insanlık tarihi kadar eski bir hastalık olmasına rağmen günümüzde tüm dünyada bir halk sağlığı sorunu olarak önemini korumaktadır. Hava yoluyla bulaşan bir hastalık olması nedeniyle toplum sağlığını korumak açısından tüberkülozun kontrolü önemlidir. Dünyada her yıl yaklaşık 9 milyon yeni tüberküloz hastası ortaya çıkmakta, 1,3 milyon insan tüberkülozdan hayatını kaybetmektedir. Dünya genelinde 2006 yılından günümüze tüberkülozlu yeni vaka sayısı düzenli olarak azalmaktadır. Tüberküloz nedeniyle ölüm oranlarında 1990 yılından bu yana %41 oranında düşüş olmuş ve küresel olarak 2015 yılına kadar %50 azalma oranına ulaşılması hedeflenmiştir.

Tüberküloz kontrolü; tüberküloz insidansı, prevalansı, morbiditesi ve mortalitesinde azalmanın sağlanması ve bu azalma eğiliminin sürekli kılınması olarak ifade edilebilir. Tüberküloz kontrolünde, hastalara erken ve doğru tanı konulması, doğru ve etkili tedavi başlanması, tedavinin düzenli olarak doğrudan gözetimli tedavi ile verilmesi ve tedavinin kür sağlanarak tamamlanması çok önemlidir (57).

Tüberkülozun erken tanısında kullanılan ARB yöntemi hızlı testlerden biridir. Pulmoner ve ekstrapulmoner tüberkülozda klinik verilerle ilk tanı konmuş olsa bile, kesin tanı için etkenin konvansiyonel testlerden radyolojik ve histopatolojik incelemelerin dışında, direkt muayenede tespiti ve kültürde üretilerek laboratuvarda doğrulanması temel esastır. Bu nedenle tanıda altın standart, kültür ve klinik tanı birlikteliğidir. Moleküler yöntemlerin, tanısız mikobakteriyoloji içinde yer almasından önce tüberkülozun hızlı tanısı için tek yol, tercihan sabah balgamından hazırlanan EZN yaymalarının direkt mikroskopi ile değerlendirilmesi olmuştur. Mikroskopik incelemede ARB'nin görülebilmesi için hasta örneğinde mililitrede 5.000-10.000 basil bulunması gerekmektedir (76, 88, 89).

Ucuz bir test olmasına ve 1 gün içerisinde sonuç alınabilmesine rağmen, kültürle doğrulanmış tüberküloz olgularına ait örneklerle uygulanan boyama tekniği, santrifügasyon işleminin hızı, yayma preparatını değerlendiren kişinin tecrübesi ve çalışılan popülasyondaki tüberküloz prevalansına bağlı olarak değişen düşük duyarlılığı (%45-80), tüberküloz dışı mikobakterileri ekarte edememesi ve düşük

pozitif prediktif değere (%50-80) sahip olması nedeniyle mikroskopi TB tanısında yetersiz kalmaktadır (90, 91).

Bizim çalışmamızda kültür altın standart kabul edilerek MGIT 960 otomatize sıvı kültür sistemi ile değerlendirilen 50 kültür pozitif örneğin 39'u (%78) ARB pozitif olarak değerlendirildi. ARB'nin duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %76 ve %100 olarak saptandı.

Mikroskopik inceleme ile *M.tuberculosis* ve tüberküloz dışı mikobakterilerin ayırımı yapılamadığından, kültür halen altın standart olarak kabul edilmektedir. Klinik örnekte  $\geq 10$  canlı tüberküloz basilinin bulunması halinde kültürde gösterilebilmesi mümkündür, duyarlılığı %80-85, özgüllüğü yaklaşık %98 olan bir konvansiyonel yöntemdir. *M.tuberculosis* yaklaşık 18 saatte bir bölünerek üremesini gerçekleştirdiğinden, kültür ortamlarında etkenin tanımlanabilmesi için ortalama 2-8 haftaya gereksinim duyulur (76, 88,91).

Son yıllarda tüberküloz ilaçlarına dirençli tüberküloz basillerinin izolasyonlarındaki artış, tanıya yönelik konvansiyonel testlerin pratik olmamaları, sonuçlandırılmalarının uzun zaman alması ve tür düzeyinde tiplendirmede yetersiz kalmaları, rutin kullanımda sorunların çözümüne yönelik arayışları yeniden gündeme getirmiştir. Bu amaçla "Centers for Disease Control and Prevention (CDC)", 2010 yılına kadar tüberküloz olgularının %75'inin 48 saat içerisinde tanısına yönelik "halk sağlığı hedefleri"ne ulaşılabilmesi için, tanısal mikobakteriyolojide standart testlere ilaveten *M.tuberculosis*'in tanısı için mevcut en hızlı yöntemlerin kullanımını önermiştir (76).

Bu kapsamda, üzerinde yoğun araştırmaların yapıldığı belirli standartlarda, özgüllük ve duyarlılığı yüksek, hızlı ve güvenilir tanı testlerinin rutin kullanımlarının önerilebilir hale getirilebilmesi için dünya genelinde çaba gösterilmektedir. CDC'nin tüberküloz tanısına yönelik bu önerileri doğrultusunda, üreticiler tarafından özellikle son 20 yıl içinde doğrudan hasta örneklerinden ve/veya kültür ortamlarından tanıya yönelik kolay uygulanabilir ve hızlı sonuç verebilen birçok tanı sistemi ve test teknikleri geliştirilmiş ve kullanıma sunulmuştur. Bunlar arasında moleküler genetik teknikler ümit vermektedir (76, 92, 93).

Teorik olarak örnekte birkaç basilin bulunması durumunda bile bunu saptayabilen nükleik asit amplifikasyon (NAA) esaslı moleküler tanı testleriyle

yapılan ilk çalışmalar, çoğunlukla laboratuvar tanısına yönelik olmuş, mevcut klinik şüphenin karar verme sürecine katkısı dikkate alınmamıştır. Ancak günümüzde klinik ve laboratuvar tanısını desteklemede halen bu yöntemlerin geliştirilmekte ve çalışma performanslarına yönelik araştırmalar aralıksız olarak devam etmektedir (90).

Laboratuvarımızda tüberküloz tanısında mikroskopi, kültür için MGIT 960 otomatize sistemi ve moleküler yöntem olarak da GeneXpert MTB/RIF testi kullanılmaktadır. Çalışmamızda kültür altın standart kabul edilerek tüm dünyada hızlı ve doğru tüberküloz tanısı için rutin kullanıma girmesi açısından birçok çalışma yapılan GeneXpert MTB/RIF testinin etkinliğini araştırdık. Çalışmamıza kültür pozitif 50 örnek ve kontrol amacıyla 50 kültür negatif örnek dahil edildi. Çalışmamızın sonuçları literatürdeki kaynaklar incelenerek karşılaştırıldı.

Literatürdeki en fazla hasta sayısı ile yapılan çok merkezli çalışmada Boehme ve arkadaşları, 18 yaş üstü tüberküloz şüphesi olan veya çoklu ilaç dirençli tüberküloz hastalarında mikroskopi, kültür ve moleküler yöntemlerin tanıdaki etkinliğini karşılaştırmışlardır. Güney Afrika, Peru, Hindistan, Azerbaycan, Filipinler ve Uganda'dan 2009-2010 tarihleri arasında 6.648 gönüllü hasta çalışmaya dahil edilmiştir. İkinci balgam örneği ilk örnekten 1 hafta sonra alınan hastalar ve geçerli standart referans aralığı tespit edilmeyen ve geçerli MTB/RIF testi olmayan hasta örnekleri çalışmaya dahil edilmemiştir. Dokuz mikroskopi laboratuvarında 2-3 balgam yayması ve 1-3 kültür örneği incelenerek ilaç duyarlılığı testi ile MTB/RIF testi karşılaştırılmıştır.

Kültür pozitif 1.033 örneğin 933'ünde (%90,3) Xpert MTB/RIF testinde tüberküloz saptanmış, 1.041 örneğin mikroskopik incelemesinde ise 699 örnekte (%67,1) tüberküloz basili saptanmıştır. MTB/RIF testinin yayma negatif, kültür pozitif (385 örneğin 296'sı) örneklerde duyarlılığı %76,9 ve özgüllüğü (2.876 tüberküloz basili saptanmayan örneğin 2.846'sı) %99 saptanmıştır. MTB/RIF testinde Rifampisin direncinin duyarlılığı %94,4 (250 örneğin 236'sı) ve özgüllüğü %98,3 (810 örneğin 796'sı) olduğu görülmüştür. HIV ko-enfeksiyonlu hastalarda mikroskopiden farklı olarak MTB/RIF testinin duyarlılığı anlamlı derecede düşük bulunmamıştır. MTB/RIF testinde tüberküloz saptanması için gereken ortalama süre yaklaşık 2 saat iken, mikroskopi için yaklaşık 1 (0-1) gün, katı kültürler için 30 (23-

43) gün ve sıvı kültürler için ise 16 (13-21) gün olduğu belirtilmiştir. İlaç direncinin belirlenmesi için gereken ortalama süre line-probe testi için 20 (10-26) gün ve konvansiyonel ilaç duyarlılık testleri için 106 (30-124) gün olduğu belirtilmiştir. MTB/RIF testinin belirsizlik oranı %2-4 (5321 örneğin 126'sı) iken, kültürün belirsizlik oranı %4-6 (9690 örneğin 441'i) olarak saptanmıştır (94).

Xpert MTB/RIF testi tüberkülozun endemik olduğu bölgelerde erken tanı ve tedavi gereksinimlerini karşılayan, yeni jenerasyon yüksek sensitiviteye sahip nükleik asit amplifikasyon testlerinin ilkidir. Xpert MTB/RIF testiyle balgam örnekleri veya konsantre, dekontamine balgam peletleri kullanılarak yapılan daha önceki kontrollü çalışmalarda yayma negatif tüberküloz örneklerinde duyarlılık %72-75 ve yayma pozitif tüberküloz örneklerinde ise duyarlılık %98-100 oranına ulaşmaktadır (95-99).

Bizim çalışmamızda kültür pozitif yayma negatif saptanan 11 örneğin 10 tanesi Xpert MTB/RIF testinde pozitif olarak saptandı, ayrıca kültür pozitif yayma pozitif 39 örneğin tamamı Xpert MTB/RIF testinde de pozitif olarak saptandı. Çalışmamızın sonuçlarının Boehme ve arkadaşlarının çalışma sonuçları ile benzer olduğu görüldü.

Küçük retrospektif bir çalışmada, 28 yayma negatif donmuş peletin Xpert MTB/RIF testiyle değerlendirilmesinde testin duyarlılığı %57 olarak saptanmıştır (98).

Boehme ve ark. (96) çalışmalarında kültür pozitif örneklerde %90'ın üzerinde Xpert MTB/RIF pozitifliği saptamışlar ve örneklerin yaklaşık %77'sinin yayma negatif olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda kültür pozitif örneklerin %98'inde Xpert MTB/RIF testi pozitif olarak saptandı ve bu örneklerin %20'si yayma negatifti. Bu veriler Xpert MTB/RIF testinin tüberkülozun endemik olduğu bölgelerde tarama testi olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Boehme ve ark. (96) çalışması Xpert MTB/RIF testinin kısa sürede sonuç vermesinin tüberküloz tanı ve tedavisindeki olumlu etkilerini tanımlayan ilk çalışmalardandır. Testlerin 2 saat gibi kısa bir sürede sonuç vermesi özellikle yayma negatif hastalara uygun ve etkin tüberküloz tedavisi başlama süresini kısalttığı ve takip dışı hasta oranını düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Birçok tüberkülozlu hasta tanı aşamasında örnek verildiği dönemde, mikroskopi aşamasında veya sonuç alma

döneminde kontrollere gelmeyip takip dışı kaldığını bildirmişlerdir. Hızlı testin duyarlılığı daha düşük olsa bile daha fazla hastanın etkin ve doğru tedavi edilmesini sağlayabileceğini bildirmişlerdir. Çalışmalarında 7.288 hastanın 640'nın (%9) ikinci balgam örneğini vermediği ve sonuçta çalışma dışı kaldıklarını ve bu oranın rutin şartlarda azaltılabileceğini belirtmişlerdir. Xpert MTB/RIF testi ile sağlanan kısa transport ve analiz süresi sayesinde ilaç duyarlılığı testi ile daha kısa sürede uygun ve etkili anti-tüberküloz tedavi başlanabileceğini bildirmişlerdir.

Boehme ve ark. çalışmada rifampisin direncinin tespiti için MTB / RIF testinin duyarlılığı ve özgüllüğü (%94,4 duyarlılık ve %98,3 özgüllük) yüksek olmasına rağmen (94), önceki yayınlarda daha yüksek oranlarda duyarlılık ve özgüllük oranları (% 99-100duyarlılık ve %100 özgüllük) bildirilmiştir (95, 96, 99).

Cihaz geliştiricileri daha yüksek oranlarda çoklu ilaca dirençli tüberküloz tespiti için Xpert MTB/RIF testi cihazını geliştirmek için çalışma yapmaktadırlar. Çalışmalarında düşük pretest olasılığı görülen çoklu ilaca dirençli tüberküloz tanılı hastalarda MTB/RIF cihazının RIF direnci saptamadaki düşük pozitif prediktif değeri nedeniyle yazarlar testin konvansiyonel bir metodla korele edilebileceğini bildirmişlerdir.

Genel olarak, bu bulgular Xpert MTB/RIF testinin kullanışlı olduğunu ve tüberkülozun kontrol ve bakımında gelişmeye yol açabileceğini düşündürmektedir. Bu gelişmelerin tüberküloz ve ÇİD-TB tanısında artış ve buna paralel olarak birinci basamak ve özellikle ikinci basamak anti-tüberküloz tedavilerinde iyileşmeler gerektirdiğini bildiren yayınlar bulunmaktadır. Xpert MTB/RIF testi ile erken ve uygun tedavi ile tüberküloz ilişkili morbidite ve mortalite oranlarında düşüş ve tüberküloz bulaşında azalma olabileceği bildirilmektedir (100).

Malburny ve ark. (101) tüberküloz şüphesi olan 132 hastadan alınmış 91'i solunum ve 89'u solunum dışı olmak üzere toplam 180 örnekten PZR (Xpert MTB/RIF) ile *M.uberculosis* tespiti için çalışma yapmışlardır. Kültürde tüberküloz saptanan 17'si solunum ve 14'ü solunum dışı 31 (%17,2) örneğin sırasıyla 17 ve 12'sinde PZR pozitifliği saptanmıştır. PZR duyarlılığı ve özgüllüğü solunum ve solunum dışı örnekler için sırasıyla %100 ve %100, ve %85,7 ve %97,3 saptamışlardır.

Tüberkülozun hızlı tanısında birçok kit bazlı Nükleik Asit Amplifikasyon ticari testi kullanılmaktadır. Altmış çalışmanın incelendiği bir metaanalizde bu testlerin ortalama duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla yayma pozitif örneklerde %96 ve %85; yayma negatif solunum örneklerinde ise %66 ve %98 olarak saptanmıştır (102).

Sadece iki küçük çalışmada solunum örneklerinde, Xpert MTB / RIF testi için mükemmel duyarlılık (%98,4-100) ve özgüllük (%100) gösterilmiştir (95).

Ekstrapulmoner TB tanısında NAA'nın etkinliğinin incelendiği bir çalışmada doku örnekleri ve vücut sıvıları için duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %64 ile %86 ve %97 ile %100 arasında değiştiğini bildirmişlerdir (103).

Burada rapor edilen duyarlılık ve özgüllük (%85,7 ve %97,3, sırasıyla), önceki çalışmalarda bildirilenlerden daha yüksek bulunmuştur. Bu fark, kartuşa daha etkili DNA ekstraksiyon prosedürünün katılıp konsantre edilmiş örneğin yüksek hacmine (1 ml'ye kadar) bağlı olabileceği düşünülmüştür. PZR sadece iki paucibacillary plevra sıvısı örneğinde başarısız olmuştur. Bu çalışma TB'un hızlı tanısında *M.tuberculosis* tespiti için Cepheid Xpert MTB/RIF testinin kullanıldığı ilk çalışmalardan biridir (101).

Türkiye'de yapılan bir çalışmada An ve ark. (91) olası tüberküloz hastalarından alınan yayma pozitif ve yayma negatif pulmoner ve ekstrapulmoner örneklerde tüberkülozun hızlı tanısı ve rifampin direnci tespiti için Xpert MTB/RIF testinin etkinliğini değerlendirmişler. 429 hastadan elde edilen 253 pulmoner ve 176 ekstrapulmoner numune çalışmaya alınmıştır. 429 hastanın 110'u (*M.tuberculosis* için 89 kültür pozitif ve 21 kültür negatif) tüberkülozlu kabul edilmiştir. Pulmoner örneklerde, yayma pozitif ve yayma negatif örnekler için duyarlılıklar sırasıyla %100 (27/27) ve %68,6 (24/35) saptanmıştır. Ekstrapulmoner örneklerin daha düşük duyarlılığa sahip olduğu; yayma pozitif örnekler (4/4) için %100 ve yayma negatif örnekler (21/44) için %47,7 saptanmıştır. Test, tüberküloz saptanmayan 319 örneğin tamamının negatif olduğunu saptamıştır. Bizim çalışmamızda da kültür negatif 50 tüberküloz örneğinin tamamı Xpert MTB/RIF testinde negatif olarak sonuçlandı. Xpert MTB/RIF testi kültürle korele olarak bir adet RIF-dirençli örneği ve 88 RIF-duyarlı örneği tespit etmiş ve sonuçlar ilaç duyarlılık testi ile doğrulanmıştır. Bizim çalışmamızda kültür ve Xpert MTB/RIF testinde 50 örneğin hiç birinde RIF direnci

saptanmamıştır. Xpert MTB/RIF testinin basit bir yöntem olduğu ve kısa bir eğitim ile personelin sistemi kullanabileceği sonucuna varılmış. Testin yayma pozitif örneklerde kültür gibi hassas ama basilin düşük sayıda olduğu yayma negatif pulmoner ve ekstrapulmoner örneklerde daha az duyarlı olduğu görülmüş. Bizim çalışmamızda 50 kültür pozitif örnekten sadece birinde Xpert MTB/RIF testi negatifti ve bu örnek yayma negatif pulmoner bir izolattı. Ayrıca çalışmamızda yayma negatif 11 örneğin 10'u Xpert MTB/RIF testinde pozitif saptandı.

Xpert MTB/RIF testiyle yapılan diğer çalışmalarda, testin özgüllüğü %99-100 iken; testin duyarlılığı yayma negatif, kültür pozitif pulmoner tüberküloz olgularında %57-76,9 ve yayma pozitif, kültür pozitif pulmoner tüberküloz örneklerinde % 98-100 arasında saptanmıştır (95,96, 97,98).

Bizim çalışmamızda da benzer olarak önceki tıbbi bildirimlerde sunulan sonuçlar ile uyumlu olarak yayma ve kültür pozitif pulmoner örneklerde testin duyarlılığı %100 olarak saptandı.

An ve ark. (91) çalışmasında tüberküloz tanılı 110 hastadan alınan 62 pulmoner örneğin 51'inde ve 48 ekstrapulmoner örneğin 26'sında (17 lenf nodu biyopsi örneğinin 13'ü, 5 beyin omurilik sıvısı örneğinin 3'ü, 5 doku örneğinin 3'ü, 4 disk biyopsi örneğinin 3'ü, 4 asit sıvısı örneğinin 1'i, 2 cilt biyopsi örneğinin 2'si, 1 perikard sıvısı örneğinin 1'i, 1 kemik iliği biyopsi örneğinin hiçbiri, 1 idrar örneğinin hiçbiri) Xpert MTB/RIF testi pozitif tespit edilmiştir. Sekiz plevral tüberkülozlu olgudan, dördünün kültürü pozitif olsa da, Xpert MTB/RIF testinde tüm plevra sıvı örnekleri negatif olarak izlenmiştir. Örnek tipi ve numunenin ekstrapulmoner olması Xpert MTB/RIF testinin etkinliğinde anlamlı bir değişikliğe sebep olmamıştır. Özellikle plevra sıvısı örneklerinde, hiçbir pozitif test sonucu elde edilememiştir. Bu çok düşük sayıda basil varlığını veya plevra sıvısı örneklerinde internal kontrol için herhangi bir etki olmaksızın *M.tuberculosis* genomunun amplifikasyonunu inhibe eden inhibitör bir maddenin varlığı nedeniyle olabileceğini bildirmişlerdir.

Tüberkülozun erken ve doğru tespiti, zamanında tedaviye başlanması ve TB bulaşının önlenmesi için kritik öneme sahiptir. Buna ek olarak, ilaç direncinin erken tespiti çoklu ilaca dirençli (ÇİD) tüberküloz hastalarında erken tedavi ile morbidite ve mortaliteyi önemli düzeyde azaltmaktadır. TB tanısında geleneksel yöntemlerin erken ve doğru tespit açısından sınırlamaları bulunmaktadır. ARB yaymaları kısa

transport ve analiz süresi ( Turn Around Time (TAT)) ve yüksek özgüllüğe rağmen [1] düşük ve değişken duyarlılığa sahiptirler[2,3].

Kwak ve ark. (104) klinik pratikte Xpert MTB / RIF testinin tanısal doğruluğu ile transport ve analiz süresini değerlendirmek için yaptıkları retrospektif çalışmada, balgamda Xpert MTB/RIF testi istenen hastaların geriye dönük tıbbi kayıtları inceleyip pulmoner tüberküloz tanısında duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer (PPD) ve negatif prediktif değer (NPD) ve rifampisin direnci tespit duyarlılığını araştırmışlardır. Bununla beraber, Xpert MTB/RIF testindeki TAT diğer testler ile karşılaştırılmıştır. Xpert MTB/RIF testi ile örnekleri incelenen toplam 681 hasta analize dahil edilmiştir. Pulmoner tüberküloz tanısında Xpert MTB/RIF testinin duyarlılık, özgüllük, PPD ve NPD 'i sırasıyla %79,5 (124/156), %100 (505/505), %100 (124/124) ve %94 (505/537) saptanmıştır. Rifampisin direnci tespitinde ise sırasıyla %57,1 (14/08), %100 (113/113), %100 (8/8) ve %94,9 (113/119) saptanmıştır. Ayakta tedavi merkezlerinde hekimler tarafından Xpert MTB/RIF testinin ortalama TAT sonuçları ve sonuçların raporlanması sırasıyla 0 (0-1) ve 6 (3-7) gün tespit edilmiştir. Hastalarda Xpert MTB/RIF testi ile ilk değerlendirme sonrasında ortalama tedaviye başlama süresi 7 (4-9) gün iken, Xpert MTB/RIF testi uygulanmayan hastalarda bu sürenin 21 (7-33,5) gün olduğu bildirilmiştir. Xpert MTB/RIF testi orta TB yükü olan alanlarda rifampisin direncinin tespiti ve pulmoner tüberküloz tanısı için kabul edilebilir duyarlılık ve mükemmel özgüllük göstermiştir. Ayrıca, test daha kısa TAT ile anti-TB ilaçların başlama süresini kısaltmıştır.

Önceki çalışmalarda Xpert MTB/RIF testinin hızlı ve yüksek duyarlılığa sahip olması nedeniyle *M.tuberculosis*'in tanısında kullanılabileceğini önermişlerdir. Ancak, bu çalışmaların çoğu sınırlı tıbbi kaynaklara sahip düşük gelirli ülkelerde yapılmıştır (94, 96).

Kwak ve ark. (105) çalışmalarını Güney Kore'de 2011 yılında tüberkülozun yıllık insidansının 100/100.000 olduğu, katı ve sıvı mikrobakteriyel kültür sistemlerinin yanı sıra bronkoskopi veya bilgisayarlı tomografi gibi tıbbi kaynaklara kolayca ulaşılabilen üçüncü basamak hastanelerde yapmışlardır. Çalışmada, akciğer tüberkülozu tanısında Xpert MTB/RIF testinin duyarlılığı, özgüllüğü, PPV ve NPV değerleri sırasıyla %79,5, %100, %100 ve %94 olarak saptanmış. RIF direnci tespitinde duyarlılık %57,1, ama özgüllük ve PPV 'nin her ikisi de %100

saptanmıştır. Xpert MTB/RIF testi TAT'ının ARB yayma, mikobakteri kültürü ve sonuçların raporlanma süresine göre daha kısa olduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak çalışmalarında Xpert MTB/RIF testinin anti-TB ilaçlara başlanması için gereken süreyi ortalama 14 gün kısalttığını saptamışlardır. Xpert MTB/RIF testi kullanılarak TB tespitindeki eşik değer örneğin koloni sayısından etkilendiğini belirtmişlerdir. (95).

Kwak ve ark. (104) tüberküloz şüphesiyle gönderilen 681 örneğin 156'sında kültür altın standart kabul edilerek pulmoner TB tanısı konmuş. Semptomlara ve radyografik bulgulara dayanarak pulmoner tüberküloz tanısı konan 59 hastada kültür negatif olarak saptanmıştır. Pulmoner tüberküloz vakalarının yaklaşık üçte biri mikobakteriyel kültür tarafından tespit edilememiş ve daha duyarlı tanı yöntemlerinin gerekli olduğu önerilmiştir. Xpert MTB/RIF testi bakteriyolojik olarak tanı konulamayan 59 tüberküloz şüpheli örneğin 20'sinde pozitif sonuç vermiştir. Yazarlar bu bulgulara dayanarak mikobakteriyel kültürlerin kullanıldığı bölgelerde Xpert MTB/RIF testinin tüberküloz tanısı için ücretsiz kullanılabileceğini önermiştir. Çalışmada, Xpert MTB/RIF testinin özgüllük ve PPV'nin herbiri %100 olarak saptanmıştır.

Çoklu ilaca direçli tüberküloz tespiti uzun bir tedavi süresi gerektiğinden önemlidir, ancak tedavi başarı oranları düşüktür. RIF direnci, çoklu ilaca direnci temsili olarak gösterdiğinden dolayı, Xpert MTB / RIF testi kullanılarak RIF direncinin tespiti çoklu ilaca direçli tüberküloz hastalarını taramak için kullanılabilir (106).

Kwak ve ark. (104) çalışmalarında konvansiyonel DST'e göre 14 hastaya ÇİD-TB tanısı konmuş ve Xpert MTB/RIF testi kullanılarak 8'inin RIF-direncine sahip olduğu gösterilmiştir. Yukarıda bahsedildiği gibi RIF direnci tespitindeki düşük duyarlılık, *M.tuberculosis*'in az yüküne bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmada örneklerin 5'inde Xpert MTB/RIF testi ile *M.tuberculosis* ve RIF direnci saptanamamıştır. Bu yüzden Xpert MTB/RIF testi ile alınan negatif sonuçların *M.tuberculosis* ve ÇİD-TB'yi ekarte etmediğini bildirmişlerdir. Matematiksel olarak, RIF direnci için Xpert MTB/RIF testinin PPV değerinin ÇİD-TB prevalansına göre değiştiğini bildirmişler ve çalışmada Güney Kore'de ÇİD-TB

prevalansına bağılı olarak RIF direnci PPV'sinin %70'ten az olduğunu açıklamışlardır (107, 108).

Xpert MTB/RIF testi yanlış pozitif sonuçlar verebileceğinden dolayı sadece Xpert MTB/RIF test sonuçlarına dayanılarak RIF dirençli tüberküloz hastalarına uygun anti-tüberküloz ilaçlarının seçiminin zor olduğunu açıklamışlardır(109).

Ancak çalışmalarında RIF direnci için Xpert MTB/RIF testinin duyarlılığı ve PPV'nin herbirinin %100 olduğunu belirtmişlerdir. Ancak gözlemlerinde Xpert MTB/RIF testi ile yanlış pozitif RIF direnci sayısının daha düşük olabileceğini, kesin bir sonuca varabilmek için daha fazla RIF dirençli hasta sayısının olduğu çalışmaları beklemek gerektiğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada beklendiği gibi MTB/RIF testinin yayma, sıvı ve katı kültürlerden transport ve analiz süresinin kısa oluşu nedeniyle, laboratuvarından sonuçların raporlanması ve klinisyene bildirilme sürelerini kısalttığı bildirilmiştir. Çalışmada Xpert MTB/RIF testinin anti-tüberküloz tedavi başlama süresini 14 gün kısalttığını bildirmişler ancak çalışmanın yapıldığı merkezde test sonuçları klinisyenler tarafından 5,5 gün gecikmeli olarak değerlendirildiğinden takip sisteminin geliştirilmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak orta düzeyde tüberküloz yükü olan ülkelerde Xpert MTB/RIF testi kabul edilebilir duyarlılık ve mükemmel özgüllüğe sahip olması nedeniyle tüberküloz tanısında ve RIF direncinin saptanmasında kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Buna ek olarak testin anti-tüberküloz tedavi başlama süresini önemli ölçüde kısalttığını bildirmişlerdir (104).

Bizim çalışmamızda MGIT 960 sistemi ile RIF direnci saptanmayan 50 örneğin hiçbirinde Xpert MTB/RIF testi ile direnç saptanmadı ve 50 kontrol örneğin hiçbirinde yanlış pozitif RIF direnci görülmedi ve bu sonuçlar MGIT 960 kültür test sonuçları ile koreleydi.

Xpert, bir yüzyılı aşkın süredir tüberküloz tanısında en heyecan verici yeniliktir. Geleneksel teşhislerin ne yazık ki yetersiz olduğu HIV ile ilişkili TB ve ÇİD-TB şüpheli iki öncelikli insan nüfusunda TB vaka tespitini anlamlı derecede artırma potansiyeli vardır. Bu önemli gruplarda 2 saat içinde tüberküloz tanısı konma olasılığı daha az ölüm ve daha az hastalık bulaşını sağlayacaktır.

Ancak, yazarlar Xpertin tüberküloz ve RIF direnci tanısında çığır açan bir buluş olmadığını; kullanılabilirliğini arttırmak için özellikle mali ve altyapıyla ilgili bazı sorunların aşılması gerektiğini bildirmektedir. Bu yeni teknolojinin tam

potansiyelini gerçekleştirmek için güçlü sağlık sistemlerinin gerekliliğine dikkat çekmişlerdir. Ayrıca, Xpert'in TB teşhisinde halen önemli bir ihtiyaç olmaya devam eden nokta analiz testi (point-of-care) olmadığını bildirmişler. Yazarlar tüberküloz ve ÇİD-TB' nin hızlı ve doğru tanısını koymak için toplumsal düzeyde, ihtiyaçları olan tüm tanı ve takip sistemlerine hastaların ulaşabildiği güçlü bir laboratuvar ağına sahip olan ve yüksek nokta analiz testi doğruluğuna sahip bir teste ihtiyaç olduğunu belirtmektedirler.

Bununla birlikte, yazarlar Xpert'in sadece bir testten daha fazlası olup tüberküloz tanısında izlenen yolu değiştirdiğini bildirmişlerdir. Ülkelerin testin yaygınlaştırılması yönünde kararlar almasını; klinisyenlerin test sonuçlarına güvenmesini; program yöneticilerinin, yeni bir teknolojinin uygulama zorluklarını benimsemesini ve politikacıların yeterli finansman ile yatırımda bulunmayı kabul etmesini önermektedir (110).

Dünyada tüberküloz ön tanısı ile takip edilen hastaların büyük çoğunluğu mutlaka mikroskopik inceleme yapılan bir merkezde değerlendirilmiştir. Bu merkezlerde tüberküloz tanısı konur, kayıt altına alınıp tedavi ve takip edilir. Mikroskopi, düşük duyarlılığı ve en büyük problemlerden biri olan teknolojiye bağlı performansı nedeniyle tüm dünyadaki tüberküloz hastalığı kötü kontrol oranlarının en önemli sorumlularından biridir. Xpert MTB/RIF testi hem tüberküloz tanısı hem de RIF direncini saptamada bu boşluğu kapatabilecek ilk teknolojik ürünü sunmuştur. Xpert MTB/RIF testi hızlı ilaç direnci tespiti için daha yaygın olarak kullanılabilir ve seçilmiş gruplarda tüberküloz tanı bulgularını daha da güçlendirebilir. Xpert MTB/RIF testinin pahalı olması kullanımını sınırlandırabilir fakat tüm dünyada artan tüberküloz tedavi masraflarından dolayı tüberkülozlu vakalarda hızlı ilaç direnci tespiti sayesinde bu olumsuzluk göz ardı edilebilir.

Tüm dünyada halen yılda ortalama 2 milyon insanın tüberküloz nedeniyle hayatını kaybettiği ve bunların bir kısmının tanısız testlerle erken tanı konarak kurtarılacağı düşünüldüğünde finansal kaygıların aşılması gereken bir problem olduğu görülmektedir. Tedavi edilebilir bir hastalık olan tüberkülozdan kaynaklanan ölümlerin büyük bir kısmı, sağlık giderlerine ayrılan yetersiz bütçe nedeniyle HIV negatif ve genelde ilaç duyarlı vakalarda görülmektedir. Dünyada Xpert MTB/RIF testinin rutinde kullanımı için belirli bir bütçe belirlenmesi lazım fakat mevcut

finansal kriz nedeniyle diğer önemli sağlık problemlerine ayrılan finansal kaynaklardan önem sırasına göre pay alabilmektedir (111).

Bu yeni teste kaynak olarak, zaten tüberkülozun morbidite ve mortalitesi üzerine önemli etki potansiyeline sahip önleyici çalışmalar ve iyi tanımlanmış tüberküloz tanı ve tedavi sistem kaynaklarından kullanılmamalıdır. TB kontrol programları ile milyonlarca hastanın ölümden kurtulduğu gösterilmiştir ama halen tüberkülozun bulaş ve insidans oranları üzerindeki etkileriyle ilgili yeterli veri bulunmamaktadır.

Global tüberküloz oranlarını TB kontrol çabalarından ziyade yoksulluk ve sosyal faktörler belirlemektedir (112, 113).

Böyle yeni Xpert MTB/RIF testi gibi araçların tüberküloz takibinde ve kontrolündeki etkinliklerinden dolayı sosyoekonomik belirleyicilerin müdahaleleri ile yeterli finansal kaynak sağlanıp yaygın kullanıma girmesi gerektiği yönünde görüş birliği bulunmaktadır (111, 114-116).

Sonuç olarak, her yıl yaklaşık 2 milyon insanın hayatını kaybetmesine neden olan tüberküloz hastalığının etkili ve doğru tedavisi için kısa sürede tanı koyabilen ve ilaç direncini saptayabilen bir teste ihtiyaç duyulmaktadır. Günümüzde tüberküloz tanısında kullandığımız yöntemlerden mikroskopi yüksek özgüllük değerlerine rağmen duyarlılığın düşük olması sebebiyle bu ihtiyacı karşılayamamaktadır. Halen altın standart olarak kullanılan kültür yöntemleri ise yüksek duyarlılık ve yüksek özgüllüğe rağmen sonuç verme süresi uzun olduğundan tanı ve tedavide gecikmelere neden olmaktadır ve bu nedenle sonuç bekleme sürecinde hasta kayıplarına neden olmaktadır. Geçtiğimiz yıllarda, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tüberküloz tanısında duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, hızlı sonuç veren, uygulaması kolay ve pahalı olmayan yöntemlerin geliştirilebilmesi amacıyla FIND (Foundation for Innovative New Diagnostics) isimli bir kuruluşun oluşumunu sağlamıştır. Bu kuruluşun bir üniversite (University of Medicine and Dentistry of New Jersey) ve bir özel şirketin (Cepheid) iş birliği sonucunda “Xpert MTB/RIF” isimli test geliştirilmiştir. Bu yöntem ile örnekte *M.tuberculosis* varlığı ve aynı zamanda rifampin direnci olup olmadığı iki saat içerisinde saptanabilmektedir Testin en belirgin olumsuz yönü pahalı bir yöntem olmasıdır. Fakat DSÖ 2010 yılı sonunda, yayımlanan çalışma sonuçlarını da dikkate alarak, bu yöntemin tüberkülozun endemik olduğu düşük

gelirli ÷lkelerde (÷zellikle Afrika ÷lkeleri) ÷çte bir fiyatına satılarak rutin t÷berk÷loz kontrol programları kapsamına alınması konusunda tavsiye niteliğinde bir karar almıştır. Xpert MTB/RIF testinin geliştirilmesi için çalışmalar tüm hızıyla devam etmektedir. İleriki yıllarda daha yüksek duyarlılık ve özgüllük değerlerine ulaşacağı öngör÷len bu testin t÷berk÷loz tanısı ve ilaç duyarlılığı tespitinde konvansiyonel yöntemlerle beraber rutin kullanıma gireceğı ve bu sayede tüm dünyada t÷berk÷loz nedenli morbidite ve mortalite oranlarında düşüş sağlanacağı düşünülmektedir.

## 5. KAYNAKLAR

1. World Health Organization website. Global tuberculosis report 2013. Available:[http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/) Accessed 2014.
2. Blumberg H, Burman W, Chaisson R, Daley C, Etkind S. American thoracic society/centers for disease control and prevention/infectious diseases society of america: treatment of tuberculosis. *Am J Resp Critical Care Med* 2003; 167: 603.
3. Snider D, Rogowski J, Zierski M, Bek E, Long M. Successful intermittent treatment of smear-positive pulmonary tuberculosis in six months: a cooperative study in Poland, 1982.
4. Wallis RS, Doherty TM, Zumla A. Biomarkers for tuberculosis disease activity, cure, and relapse—Authors'reply. *Lancet* 2010; 10: 70–71.
5. Park S, Shin J, Kim J, Park I, Choi B. The effect of diabetic control status on the clinical features of pulmonary tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol & Infec Dis* 2012; 31: 1305–1310.
6. Maciel E, Brioschi A, Peres R, Guidoni L, Ribeiro F. Smoking and 2-month culture conversion during anti-tuberculosis treatment. *Int J Tubercul Lung Dis* 2013; 17: 225–228.
7. Özkara ŞV. Tüberküloz Sempozyumu ve VI. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri. Dünyada ve Türkiye'de Tüberküloz. 18-21 Ekim. 2007; 15-21.
8. Winn W, Allen S, Janda W. *Mycobacteria. Konemans'color atlas and textbook of diagnostic microbiology* 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams and wilkins. 2006; 19: 1064-150.
9. Pfyffer G, Brown-Elliott BA, Wallace RJ. *Mycobacterium: General characteristic, isolation, and staining procedures*. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH (Eds). *Manuel of Clinical Microbiology*. 8th edition. Washington: ASM Pres, 2003; 532-560.
10. Bulut Y. Trabzon mikobakteri günleri. *Moleküler tanı yöntemleri ve yenilikler*. 2009: 16-21.
11. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry M L, Pfaller M A (eds), (Başustaoğlu A (çev. Editörü)). *Manual of Clinical Microbiology* 2009: 1-36.

12. Kocagöz T. Mycobacterium türlerinin genel özellikleri. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (editörler). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3. Baskı. İstanbul: Nobel Kitapevleri; 2008: 2277-2283.
13. Forbes B A, Sham D F, Weissfeld A S (eds). Bailey Scott's Diagnostic Microbiology. 11th edition. St. Louis, Missouri: Mosby Inc, 2002; 538-571.
14. Kıyan M. Mycobacteriaceae. Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö (editörler) Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara Güneş Kitabevi, 1999: 419-454.
15. [http://health.state.tn.us/images/TB\\_Smear.jpg](http://health.state.tn.us/images/TB_Smear.jpg).
16. Özkütük, N. Mikobakteriler. M. Altındış (ed), Hemşireler için Mikrobiyoloji, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri; 2010: 217-228.
17. Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M. Mikrobiyoloji, 4. Baskı. İzmir, Asya Tıp Kitapevleri, 2005: 220-231.
18. Thomson RM, Yew WW. When and how to treat pulmonary non-tuberculous mycobacterial diseases. *Respirology* 2009;14: 12-26.
19. Billinger ME, Prevots DR, Olivier KN, Viboud C, de Oca RM, Steiner C, Holland SM. Nontuberculous mycobacteria-associated lung disease in hospitalized persons, United States, 1998-2005. *Emerg Infect Disease* 2009; 15: 1562-1569.
20. Tabarsi P, Mansouri D, Baghaei P, Farnia P, Mansouri N, Chitsaz E, et al. Nontuberculous mycobacteria among patients who are suspected for multidrug-resistant tuberculosis-need for earlier identification of nontuberculosis mycobacteria. *Am J Med Sci* 2009; 337: 182-184.
21. Yüce A. Nontüberküloz Mikobakteri Enfeksiyonlarının Klinik Önemi. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. Samsun, 2003.
22. Piersimoni C, Scarparo C. Extrapulmonary infections associated with nontuberculous mycobacteria in immunocompetent persons. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 1351-1358.

23. Phillips MS, von Reyn CF. Nosocomial infections due to nontuberculous mycobacteria. Clin Infect Dis 2001; 33: 1363-1374.
24. Bitirgen M, Yenen OS, Tekeli E, Ekinci E, Fakı İ. Akciğer Tüberkülozlu Hastalarda Balgamda Asidorezistan Basil (ARB) Pozitifliği ve Balgam Kültürü Sonuçları. Türkiye Klinikleri Araştırma Dergisi 1988; 6: 5.
25. Çelik N, Eyüboğlu AFO. Tüberküloz Dışı Mikobakteriyel Enfeksiyonlar. Türkiye Klinikleri, Akciğer Arşivi. 2000;1: 31-41.
26. Yüce A, Şener A. Akciğer tüberkülozu. Willke. Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (editörler). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3. Baskı. İstanbul: Nobel kitapevleri; 2008: 832-850.
27. Kocabaş A. Akciğer tüberkülozu. İçinde Willke Topçu A, Söyletir G,Doğanay M, editör. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Cilt 1. 2002; 538-591.
28. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, (editör). Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. Churchill Livingstone, an imprint of elsevier 2005: 2852-2886.
29. Thomas Dormandy. A History of Tuberculosis. The White DeathThe Hambleton Press 1999 London.
30. Daniel IM. TM Captain of the Death. The story of tuberculosis. Univesity of Rochester. Press Rochester, New York 1997.
31. Seber E. Tüberkülozun Dünü. Ankem Dergisi. 2010; 24: 52-60.
32. Ligon BL. Robert K. Nobel Laureate and controversial figure in tuberculinresearch. Semin Pediatr Infect Dis 2002; 13: 289-299.
33. Barış Yİ. Dünya’da Tüberkülozun Tarihçesi. Toraks Dergisi. 2002; 3: 338-340.
34. Karlıkaya C. Tüberküloz Ders Notları. 1998;  
<http://celalkarlikaya.trakya.edu.tr/TBdernot.htm>
35. Leao SC. History in Tuberculosis 2007. Palomino JC, Leao SC, Ritacco V (Ed) Tuberculosis 2007; Brazil. 25-52.

36. Fındık S. Yetişkinlerde Tüberküloz Tedavisi. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. Samsun, 2003.
37. Iseman MD. Klinisyenler için Tüberküloz Kılavuzu. Çeviren: Ş. Özkara. (Bölüm 10: Tüberküloz kemoterapisi, doğrudan gözetimli tedavi dahil) Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2002: 271-321.
38. Fennelly, KP, Iseman MD. Health care workers and tuberculosis: the battle of a century. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3: 363-364.
39. Özkara S, Ecevit H. Aktaş Z, Özkan S. Verem Savaş Daire Başkanlığı, Dünyada Durum. Türkiye’de Tüberkülozun Kontrolü İçin Başvuru Kitabı. Ankara. 2003; 7-9.
40. World Health Organization (WHO). Accessed date: 10 January 2014.
41. Dye C, Watt CJ, Bleed DM, Hosseini SM, Raviglione MC. Evolution of Tuberculosis Control and Prospects for Reducing Tuberculosis Incidence, Prevalence, and Deaths Globally. *MD JAMA* 2005; 293: 2767-2775.
42. United Nations. The millennium development goals report 2013. New York: 2013.
43. Jassal MS, Bishai WR. Epidemiology and challenges to the elimination of global tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2010; 50: 156-64.
44. Bozkurt H, Türkkani MH, Musaonbaşıoğlu S, Yıldırım A, Baykal F. Türkiye’de Verem Savaşı 2011 Raporu, Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı; 2011.
45. European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe, 2013.
46. Moradi G, Naieni KH, Rashidian A, Vazirian P, Mirzazadeh A, Vaziri MR, et al. Evaluation of Tuberculosis Situation in Economic Cooperation Countries in 2009; Achievement and Gaps toward Millennium Development Goals. *Int J Prev Med* 2012; 3: 77-83.
47. Yıldırım Z, Türkkani MH, Bozkurt H, Islek E, Mollahaliloglu S, Erkoç Y. Effects of the health transformation programme on tuberculosis burden in Turkey. *Respir Med* 2013;107: 2029-2037.

48. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı. Stratejik Plan 2013-2017. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı, 2012.
49. Kocabaş A. Akciğer tüberkülozu, In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Eds), İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2002; ss 538-591.
50. Secko D. A gene for susceptibility to tuberculosis. Canadian Medical J (CMAJ) 2005, 172: 1436-1438.
51. Dannenberg AM. Immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis. Hosp Prac. Hospital Practice. 1993; 15: 51-58.
52. Özkuyumcu, C, Hacettepe Mikrobiyoloji Serisi-1 Klinik Bakterioloji El Kitabı. Mikobakterium. 2009;76-93.
53. Haas DW. Mycobacterial Diseases, In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia. Churchill Livingstone, 2000: 2576.
54. Hernandez-Pando R, Chacon-Salinas R, Serafin-Lopez J, Estrada I. Immunology, pathogenesis, virulence. Palominoo JC, Leao SC, Ritacco V(eds). Tuberculosis 2007 From Basic Science to Patient Care. Bourcilliercamps.com, Tuberculosis-textbook.com, 2007: 157.
55. Doherty TM, Andersen P. Vaccines for tuberculosis: Novel concepts and recent progress. Clin Microbiol Rev. 2005; 18: 687.
56. Woods GL. Susceptibility Testing for Mycobacteria. Clin Infect Dis 2000; 31: 1209-1215.
57. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları. Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi (UTTR) 2014. [tb.thsk.gov.tr/UTTR.pdf](http://tb.thsk.gov.tr/UTTR.pdf)
58. Isenberg HD (ed). Clinical Microbiology Procedures Handbook. Newyork. Second edition. Washington, DC, ASM; 2004.

59. KILİMİK Derneği Tüberküloz Çalışma Grubu. VI. Tüberküloz Sempozyumu/ IX. Tüberküloz Laboratuar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kursu Kitabı. İzmir/Manisa. 2011.
60. Washington WJ, Stephen A, William J. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6.ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2006; 1065-1124.
61. Babacan F, Hasdemir U. Mycobacterium tuberculosis kompleks. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (editörler). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3. baskı. İstanbul: Nobel kitapevleri; 2008: 2283-2302.
62. Somoskovi A, Hotaling JE, Fitzgerald M, O'Donnell D, Parsons LM, Salfinger M. Lessons from a proficiency testing event for acid-fast microscopy. Chest 2001; 120: 250-257.
63. Kent PT, Kubica GP. Public Health Mycobacteriology: a guide for the level 111 laboratory. U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta: Centers for Disease Control, 1985.
64. Dixon JMS, Cuthbert EH. Isolation of tubercül bacilli from uncentrifuged sputum on pyruvic acid medium. Am Rev Respir Dis 1967; 96: 119-122.
65. Isenberg HD, D'Amato RF, Heifets L, Murray PR, Scardamaglia M, Jacobs MC, Alperstein P, Niles A, Collaborative feasibility study of a biphasic system (Roche Septi-Chek AFB) for rapid detection and isolation of mycobacteria. J. Clin Microbiol 1991; 29: 1719-1722.
66. Pfyner GE, Cieslak C, Welscher HM, Kissling P, Rüscher-Gerdes S. Rapid detection of mycobacteria in clinical specimen by using the automated BACTEC 9000 MB System and comparison with radiometric and solid culture systems. J Clin Microbiol 1997; 35: 2229-2234.
67. Kocagöz T. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay. Mikobakterum Türlerinin Genel Özellikleri. 3. Baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri, 2008: 2277-2311.
68. KLİMİK Derneği Tüberküloz Çalışma Grubu. 21. yy da tüberküloz Sempozyumu/ II. Tüberküloz Laboratuar Tanı Yöntemleri Kursu Kitabı. Samsun, 2003.



80. Mijs W, De Vreese K, Devos A. Evaluation of a commercial line probe assay for identification of Mycobacterium species from liquid and solid culture. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 11: 794-802.
81. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis: 1998 update. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection) Tuber Lung Dis* 1998; 79: 3-29.
82. Kocagöz T. Mycobacterium tuberculosis için uygulanan fenotipik ve genotipik direnç testleri. 4. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu Kitabı 2002: 115-124.
83. Şuit C, Visser MR, Schmitz J. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microb Rev* 2001; 14: 836-871.
84. Telenti A, Persing DH. Novel strategies for the detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Res Microbiol* 1996; 147: 73-79
85. Torres MJ, Criado A, Palomares JC, Aznar J. Use of real-time PCR and şuorimetry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistanceassociated mutations in Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3194-3199.
86. Kocagöz T, Sarıbaş Z. Rapid determination of rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis by PCR and şuorescence resonance energy transfer. 2. Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi (2002, Antalya) kitabında. 2002: 16.
87. CLSI. Laboratory Detection and Identification of Mycobacteria; Approved Guideline. CLSI document M48-A. Wayne PA (ed). Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
88. Cheng VC, Yew WW, Yuen KY. Molecular diagnostics in tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24: 711-720.
89. Alp A. Tüberkülozun laboratuvar tanısında güncel durum. *Hacettepe Tıp Derg* 2011; 42: 28-33.
90. Centers for Disease Control and Prevention. Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. *Morb Mortal Wkly Rep* 2009; 58: 7-10.

91. Zeka AN, Tasbakan S, Cavusoglu C. Evaluation of the GeneXpert MTB/RIF assay for rapid diagnosis of tuberculosis and detection of rifampin resistance in pulmonary and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 4138-41
92. Köksalan OK. Günümüzde tüberküloz tanısı/güçlükleri. *ANKEM* 2010; 24: 61-63.
93. Nyendak MR, Lewinsohn DA, Lewinsohn DM. New diagnostic methods for tuberculosis. *Curr Opin Infect Dis* 2009; 22: 174-82.
94. Boehme CC, Nicol MP, Nabeta P. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralised use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multicentre implementation study. *Lancet* 2011; 377: 1495–1505
95. Helb D, Jones M, Story E. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 229–237.
96. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med* 2010; 363: 1005–1015.
97. Marlowe EM. Evaluation of the Cepheid Xpert MTB/RIF assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 1621–1623.
98. Armand SP, Vanhuls G, Delcroix R, Courcol, Lemaître N. Comparison of the Xpert MTB/RIF test with an IS6110-TaqMan real-time PCR assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 1772–1776.
99. Moure R, Munoz L, Torres M, Santin M, Martin R, Alcaide F. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and rifampin resistance in smear-negative clinical samples by use of an integrated real-time PCR method. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 1137–1139.
100. Stop TB Department WHO. Roadmap for rolling out Xpert MTB/ RIF for rapid diagnosis of TB and MDR-TB 2010.

101. Malbruny B, Le Marrec G, Courageux K, Leclercq R, Cattoir V. Rapid and efficient detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and non-respiratory samples. *Int J Tuberc Lung Dis* 2011; 15: 553–555.
102. Greco S, Girardi E, Navarra A, Saltini C. Current evidence on diagnostic accuracy of commercially based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Thorax* 2006; 61: 783–790.
103. Laraque F, Griggs A, Slopen M, Munsiff SS. Performance of nucleic acid amplification tests for diagnosis of tuberculosis in a large urban setting. *Clin Infect Dis* 2009; 49: 46–54.
104. Kwak N, Choi SM, Lee J. Diagnostic Accuracy and Turnaround Time of the Xpert MTB/RIF Assay in Routine Clinical Practice. *PLoS One* 2013; 8: 77456.
105. World Health Organization. *Global Tuberculosis Report, 2012*.
106. Watterson SA, Wilson SM, Yates MD, Drobniowski FA. Comparison of three molecular assays for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1973; 36: 1969.
107. Organization WH. *Rapid implementation of the Xpert MTB/RIF diagnostic test: technical and operational ‘How-to’; practical considerations*. Geneva: World Health Organization 2011; 1978: 4.
108. Park YS, Hong SJ, Boo YK, Hwang ES, Kim HJ. The national status of tuberculosis using nationwide medical records survey of patients with tuberculosis in Korea. *Tuberculosis and respiratory diseases* 2012; 73: 48–55.
109. Van Rie A, Mellet K, John M, Scott L, Page-Shipp L. False-positive rifampicin resistance on XpertH MTB/RIF: case report and clinical implications. *The international journal of tuberculosis and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 2012; 16: 206.
110. Piatek AS, van Cleeff M, Alexander H, Coggin WL, Rehr M. Gene expert for tuberculosis diagnosis planned and purposeful implementation. *Global Health Sci Pract*, 2013; 1: 18-23.

111. Lonnroth K, Castro KG, Chakaya JM, Chauhan LS, Floyd K. Tuberculosis control and elimination 2010–50: cure, care, and social development. *Lancet* 2010; 375: 1814–1829.
112. Dye C, Lonnroth K, Jaramillo E, Williams BG, Raviglione M. Trends in tuberculosis incidence and their determinants in 134 countries. *Bull World Health Organ* 2009; 87: 683–691.
113. Oxlade O, Schwartzman K, Behr MA, Benedetti A, Pai M. Global tuberculosis trends: a reflection of changes in tuberculosis control or in population health? *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13: 1238–1246.
114. Benatar SR, Upshur R. Tuberculosis and poverty: what could (and should) be done? *Int J Tuberc Lung Dis* 2010; 14: 1215–1221.
115. Rasanathan K, Sivasankara Kurup A, Jaramillo E, Lonnroth K. The social determinants of health: key to global tuberculosis control. *Int J Tuberc Lung Dis* 2011; 15: 30–36.
116. Creswell J, Jaramillo E, Lonnroth K, Weil D, Raviglione M. Tuberculosis and poverty: what is being done. *Int J Tuberc Lung Dis* 2011; 15: 431–432.

## 6. ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Elazığ'ın Maden ilçesinde dünyaya geldim. İlköğrenimimi Maden'de, orta ve lise öğrenimimi Elazığ Merkez'de tamamladım. 2005 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden mezun oldum. 2005-2009 yılları arasında Gaziantep Rotary Kulübü Sağlık Ocağı'nda, 2009-2011 yılları arasında ise Gaziantep Asiye Ragıp Oral Ana Çocuk Sağlığı Merkezi'nde pratisyen hekim olarak görev yaptım. 2011 yılı Haziran ayında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda ihtisas eğitimime başladım. Halen devam etmekteyim.