

**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Afyon Bölgesindeki Tüberküloz Olgularının
Löwenstein-Jensen, Bactec ve Tk Medium
Yöntemleri İle Saptanıp
Dört Major İlaça Karşı Dirençlerinin Belirlenmesi**

Bio. Murat İŞİTEZ

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Zafer ÇETİNKAYA

Tez No:

2003-AFYON

KABUL VE ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 19/02/2004

Yrd. Doç. Dr. Zafer ÇETİNKAYA
ÜYE

Yrd. Doç. Dr. Mustafa ALTINDIŞ
ÜYE

Prof. Dr. Nuri KİRAZ
ÜYE

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Murat İŞİTEZ'in "Afyon Bölgesindeki Tüberküloz Olgularının Löwenstein-Jensen, Bactec ve Tk-Medium yöntemleri ile saptanıp Dört Majör İlaça Karşı Dirençlerinin Belirlenmesi" başlıklı tezi 19/02/2004 günü saat 11:30'da Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Doç Dr. Yüksel ARIKAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Afyon bölgesindeki tüberküloz olgularının Löwenstein-Jensen, BACTEC 460TB ve TK MEDIUM yöntemleri ile saptanıp dört majör ilaca karşı dirençlerinin belirlenmesi bu tezin konusunu oluşturmaktadır. Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Laboratuvarında yukarıda belirttiğim yöntemler ile hastanemiz bünyesinde takip edilen hastalarda olası etkenler araştırılmış ve ilaç dirençleri belirlenmiştir.

Bu tezin seçiminde ve yürütülmesinde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım danışman hocam Sayın Yrd.Doç. Dr. Zafer ÇETİNKAYA'ya, çalışma boyunca bilimsel katkılarından dolayı hocam Sayın Yrd.Doç. Dr. Mustafa ALTINDİŞ'e, yetişmemde emeği olan diğer bölüm hocalarıma, örnek toplama aşamasındaki katkılarından dolayı Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalına, çalışmanın yürütülmesi sırasındaki katkılarından dolayı Lab. Engin AKBIYIK'a, Mikrobiyoloji laboratuvarındaki çalışma arkadaşlarıma ve aileme teşekkür ederim.

Bio. Murat İŞİTEZ

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
Önsöz	III
İçindekiler	IV
Simgeler ve Kısaltmalar	VI
Şekiller Dizini	VII
Tablolar Dizini	VIII
ÖZET	1
SUMMARY	2
1. GİRİŞ	3
1.1 Tarihçe	3
1.2 Sınıflandırma	6
1.3 Mikobakterilerin Genel Özellikleri ve Hücre Duvar Yapısı	9
1.4 Antijenik Yapı	11
1.5 Tüberkülin Deri Testi	12
1.6 Patogenez	14
1.7 Tüberküloz Tanısı	21
1.7.1 Mikobakterilerin Boyanma Özellikleri ve Boyama Yöntemleri	23
1.7.2 Klinik Örneklerin İşlenmesi	24
1.7.3 Mikobakterilerin Üretilmesinde Kullanılan Besiyerleri	25
1.8 Kültür	27
1.8.1 Mikobakterilerin İdentifikasyonu	27
1.8.2 Biyokimyasal Testler	30
1.8.3 Radyometrik Yöntem BACTEC TB460	34
1.8.4 Dio-TK MEDIUM Kültür Yöntemi	34
1.8.5 Diğer Tanı Yöntemleri	35
1.8.6 Antitüberküloz İlaçlara Duyarlılık Deneyleri	37
1.9 Tedavi	41
1.9.1 Antitüberküloz İlaçlar	41
1.9.1.1 Majör İlaçlar	42
1.9.1.2 Minör İlaçlar	45

1.10 Epidemiyoloji	47
1.10.1 Dünyada Durum	48
1.10.2 Türkiye’de Durum	49
2. GEREÇ ve YÖNTEM	52
2.1 Örneklerin Mikroskopik İncelenmesi	52
2.1.1 Erlich Ziehl Nieelsen Yöntemi	52
2.2 Klinik Örneklerin Dekontaminasyon,Homojenizasyon ve Nötralizasyonu	53
2.3 Löwenstein Jensen Kültürü	54
2.4 BACTEC 460TB Kültürü	54
2.4.1 NAP İdentifikasyon Deneyi	55
2.5.Dio TK MEDIUM Kültürü	56
2.6 L-J Besiyerinde Antitüberküloz İlaçlara Duyarlılık Testinin Yapılması	57
3. BULGULAR	60
4. TARTIŞMA	67
5. SONUÇ	73
KAYNAKLAR	74
EKLER	80

<u>KAVRAM</u>	<u>SİMGE</u>
Kilo Dalton	kD
Mikron	μ
Tüberküloz Ünitesi	TU
Üreme İndeksi (BACTEC 460TB)	GI

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Mikobakterilerin Hücre Duvar Tabaka Yapısı	9
Şekil 2: <i>M.tuberculosis</i> 'in Önemli Proteinleri	11
Şekil 3: Tüberküloz Patogenezi	19
Resim 1: TK MEDIUM Üreme Renk Değişimi	57
Resim 2: Löwenstein Jensen Antitüberküloz İlaçlı Besiyerleri	59

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Mikobakterilerin Sınıflandırılması	6
---	---

Tablo 2: Runyon'a Göre Mikobakterilerin Sınıflandırılması	7
Tablo 3: <i>M. tuberculosis</i> Dışındaki Mikobakteriler	8
Tablo 4: Mikobakterilerin Biyokimyasal Özellikleri	29
Tablo 5: DSÖ'nün Tavsiye Ettiği Tedavi Rejimleri	47
Tablo 6: Ülkelerin Yıllara Göre Tüberküloz İnsidans Değişimleri	49
Tablo 7: Türkiye'de Coğrafi Bölgelere Göre Tüberküloz Prevalansı	50
Tablo 8: 1991-2001 yılları Arası Tüberküloz İnsidans Oranları	51
Tablo 9: İncelenen 280 Klinik Örnek ve Bu Örneklerin Hasta Grubuna Göre Dağılımları	60
Tablo 10: Löwenstein-Jensen Kültür Yönteminde <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Örneklerinin Dağılımı	61
Tablo 11: BACTEC Kültür Yönteminde Üreyen Örnek Dağılımı	61
Tablo 12 : TK MEDIUM Kültür Yönteminde Üreyen Örnek Dağılımı	62
Tablo 13: Metodolojik Tablo	62
Tablo 14 : 280 Klinik Örneğin Ziehl-Neelsen Boyama Yöntemi ile Löwenstein Jensen Kültür Yöntemi Sonuçlarının Karşılaştırılması	63
Tablo 15 : 280 Klinik Örneğin Ziehl-Neelsen Boyama Yöntemi ile BACTEC Kültür Yöntemi Sonuçlarının Karşılaştırılması	64
Tablo 16 : 280 Klinik Örneğin Erlich Ziehl-Neelsen Boyama Yöntemi ile TK MEDIUM Kültür Yöntemi Sonuçlarının Karşılaştırılması	64
Tablo 17 : Pozitif Örneklerin EZN,L-J,BACTEC ve TK-MEDIUM Yöntemlerine Göre Dağılımı ve Duyarlılık Yüzdeleri	65
Tablo 18 : İlaç Direnç Oranları	66

ÖZET

Bu çalışmada 280 klinik örnek Erlich Ziehl Neelsen boyama yöntemi, Löwenstein-Jensen, BACTEC 460TB ve TK MEDIUM kültür yöntemleri ile incelemeye alınıp tüberküloz açısından değerlendirilmiştir.

İncelen 280 klinik örneğin 41'inden (% 14,6) çalışılan yöntemlerle pozitif sonuç alınmıştır. 41 pozitif bulunan örnekten 38 (%92,7) tanesi Erlich Ziehl Neelsen yöntemi ile 31 tanesi (%75,6) Löwenstein-Jensen, 23 tanesi (% 56,1) BACTEC 460TB ve 21 tanesi (% 51,2) TK MEDIUM kültür yöntemleri ile pozitif bulunmuştur.

Uygulanan niasin identifikasyon testi ve NAP identifikasyon testi sonrasında 41 suşun 26 (%63,4) tanesinin *M. tuberculosis* kompleks, 15 (% 36,6) tanesinin MOTT basilleri olduğu tanımlanmıştır.

İzole edilen 26 *M. tuberculosis* suşununun 13 (% 50) tanesinde ilaç direncine rastlanmazken kalan 13 suşta İzoniazid'e dirençli 1 (%7,69) suş, Etambutola dirençli 2 (%15,39) suş , Streptomisin'e dirençli 1 (%7,69) suş bulunmuştur. İki ilaca birden dirençli suş sayısı 5 (% 38,6) ve tüm ilaçlara dirençli suş sayısı 4 (% 30,77) olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler : *M. Tuberculosis*, Löwenstein-Jensen, BACTEC TB460, TK MEDIUM, Major İlaç Direnci.

SUMMARY

In this study 280 clinic specimens were investigated for assignment of tuberculosis by Erlich Ziehl Nielsen smear strain method, Löwenstein-Jensen, BACTEC 460TB ve TK MEDIUM culture methods.

Fourty one of 280 clinic specimens (%14,6) were positive by these methods. 38 (% 92,7) of these specimens found by Erlich Ziehl Nielsen smear strain method, 31 (% 75,6) by Löwenstein-Jensen, 23 by (% 56,1) BACTEC 460TB and 21 by (% 51,2) TK MEDIUM.

NAP identification and Niacin identification test was applied for Mycobacterium strains. 26 (% 63,4) of 41 isolates were identified as *M. tuberculosis* complex and 15 (%36,6) were as MOTT bacilli.

Thirteen (%50) of 26 isolated *M. tuberculosis* complex strains were not resistant to any major drug. But 13 of these isolates were resistant to the Isoiniazid, etambutol and streptomycin are 1 (% 7,69) strains, 2 (%15,39) strains and 1 (% 7,69) strains respectively. There were 5 (% 38,6) strains resistant to two of the drugs and 4 (% 30,77) strains were resistant to four of the drugs.

Key Words : *M. tuberculosis*, Löwenstein-Jensen, BACTEC TB460, TK MEDIUM, Major Drug Resistant.

1. GİRİŞ

1.1. Tarihçe :

Tüberküloz, tanı yöntemlerindeki ilerlemelere rağmen, bugün bütün dünyada, özellikle gelişmekte olan ülkelerde, yaygın olarak bulunan yaklaşık 10.000 yıldır en çok korkulan hastalıklar arasında yer almaktadır. (1,2 ,3).

Ölüm avcısı olarak düşünülen tüberküloz basili insanlık tarihinin en akıllı düşmanıdır. Tüberküloz hastalığı Dr. Robert Koch'un onu ortaya çıkardığı güne kadar genetik kalıtsal bir hastalık olarak düşünülüyordu. Kendini belli etmesi bulaşıcı bir hastalık gibi olmasına rağmen kuluçka devri diğer bulaşıcı hastalıklar kadar kısa değildir. Hastalığın belirtilerini göstermesi yaklaşık iki ay gibi bir zaman dilimine ihtiyaç gösterirken basili alan herkes hastalanmıyordu. Verem hastalığının durumu özellikle alınan bakteri sayısına, virülansına ve kişinin immün sistemine bağlıdır. İmmün sistemi zayıf olan kişilerde hızlı bir seyir göstermektedir. Verem basilinin yaptığı hastalık batı ülkelerinde Tüketim Hastalığı olarak da adlandırılmaktadır. Ülkemizde de bu hastalığa İnce Hastalık, Teverrüm, Zafiyet, Duman gibi isimler verilmiştir. Dünyada Tüberküloz epidemileri günümüzde olduğu gibi çok eski tarihlerde de çeşitli dalgalanmalar göstermiştir. Milattan Önce (M.Ö) 1500-750 yılları arasında Nil vadisinde, 50-1500 arasında Eski Yunanistan'da, 250-1500 arasında Amerika'da, 1000-2000 yılları arasında Avrupa'da yaygın olarak görülmüştür (4).

M.Ö 466-377 yılları arasında yasayan Hipokrat hastalarda sürekli zayıflama olduğunu gözlemiş ve hastalığa “phthisis” adını vermiştir. 16. yüzyıl sonlarında Silvius “tüberkül” kelimesini kullanmıştır. “Tuberculosis “ kelimesi ise 1834 yılında hastalığın tanısının sadece semptomlara ve patolojik bulgulara dayandığı dönemde kullanılmıştır. Tüberküloz üzerine en değerli çalışmalar, 1781-1826 yılları arasında yaşamış olan Rene Theophhile Hyanchinthe Laenec tarafından yapılmıştır. 1843'de Klenke tüberküloz konusunda ilk mikrobiyolojik çalışmaları başlatmış ve tüberkülozlu hastaların balgamlarını tavşanlara enjekte ederek bu hayvanlarında tüberküloza yakalandığını ispatlamıştır. Bu olay sonucunda bu hastalığın bir canlıdan başka canlılara nakledilebileceği yani bulaşıcı olduğu birkez daha kanıtlanmıştır (3,4).

Bugün tüberküloz hastalığının kliniği, patolojisi ve tanısı hakkındaki bilgilerimizi Laenec'e ait 183 olguya dayanan "Phythisier Granuleuses", 164 olgu bulunduran "Phythisier Tuberculeuses" isimli makaleleri ve "A Treatise on Diseases of the chest and on Mediate Auscultation" isimli kitabına borçluyuz. *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*)'in Verem hastalığının sebebi olduğu 1843-1910 yıllarında yaşamış olan Dr. Robert Koch tarafından gösterilmiştir. 1882 yılında tüberkülozdan ölen Heinrich Günther isimli hastanın akciğerinde bulunan lezyonlarda basili göstermiş bunu kültürde üretmeyi başarmıştır. Bulduğu basile *M. tuberculosis* adını vermiş ve araştırmalarının sonuçlarını 1882 günü Berlin Fizyoloji Derneği'nde sunmuştur. Araştırmasının sonucuna göre bakterinin ispatında üç noktayı önemli bulmuştur. Bunlar ;

- 1) Hastanın bedeninde bulunan lezyonların gösterilmesi,
- 2) Buralardan alınan örneklerin kültürde üretilebilmesi,
- 3) Kültürde üretilen bakterinin deney hayvanında da aynı hastalığı yapması.

Verem basili bulan Koch tedavisinin geliştirilecek bir aşı ile yapılabileceğini düşünüyordu. Old tüberkülin denilen sıvının tedavi amacıyla kullanılması ve bunun ilk neticeleri anlamlıydı. Kullanılan tüberkülin bugünkü dozun 12.000 katıydı ve hastada büyük yan etkiler yapmaktaydı. Nocard basili patatesli gliserinli ve safralı besiyerinde tam 20 yıl 230 pasajlama ile tamamen etkisiz denebilecek hale getirerek verem aşısının keşfetti. Bu aşıya bulucuları olan iki araştırmacının isimlerine atfen Bacille Calmette- Guarin (BCG) adı verilmiştir.

18. yüzyılda Avrupa'daki tüberküloz epidemisinden Osmanlı İmparatorluğu'da etkilenmiştir. Ancak o dönemde halk sağlığına önem veren II. Abdulhamit'in padişah olması Osmanlının daha fazla zarar görmesini önlemiştir. Şişli Etfal hastanesine Verem pavyonu açması ve Dr. Robert Koch'a ait buluşların hemen uygulanmaya başlanması bu dönemde gerçekleşmiştir. Tüberküloz basilinin balgamda boyanarak gösterilmesi 1895 yılında İstanbul'da olmuştur. Verem Savaş Derneklerinin çekirdeği olan Veremle Mücadele Osmanlı Cemiyeti kurulmuş ve hastalığın yaygınlığının saptanması amacı ile İstanbul ve İzmir'de kayıtlar tutulmaya başlanmıştır (4).

1944 yılı sonrası tedavide etkili ilaçların bulunması ile tüberküloz morbiditesi ve mortalitesinde bir düşüş görülmüştür, bu azalmanın verdiği ümitte ABD’de 2010 yılına kadar tüberkülozun yok edilmesine yönelik programlar bile hazırlanmıştır. 1985 yılında bu azalma durmuş ve HIV’in yaygınlaşması ile birlikte insidansında %12’lik bir artış oluşturmuştur.

Mortalite oranı 1945’de yüzbinde 262; 1960’da yüzbinde 55 ve 1982’de yüzbinde 8 olarak tespit edilmiştir. 1950’li yıllarda ölüm nedenleri içinde ilk sırayı tüberküloz alırken günümüzde 9. sıraya düşmüştür. Hastaların sosyo-ekonomik durumları hastalık prevalansını etkilemektedir. Bu nedenle bölgeler arası farklılıklar göstermektedir. Ege Bölgesi’nde tüberküloz prevalansı binde 1.86 olmasına karşın Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde binde 7.44’ dır (1,5,6).

Son yıllarda çoğul dirençli (Multidrug-Resistant = MDR) *M.tuberculosis* suşlarının artması tedavide önemli bir sorun oluşturmaktadır. Bu suşlar temel 4’lü ilaç tedavisinde kullanılan antitüberküloz ilaçlar olan rifampin ve isoniasid’e dirençlidir. Bu ikisine ek olarak diğer antitüberküloz ilaçlara da direnç geliştirebilir. Bu durum hastalığın kontrol altına alınması için tüberküloz olgularının hızlı bir şekilde tanımlanması ve tedaviye mümkün olduğu kadar kısa sürede başlanması gerekliliğini göstermiştir (5,7).

Tüberküloz tanısında kullanılan konvansiyonel yöntemlere ilave olarak, kısa sürede kültürlerden sonuç almayı amaçlayan yeni yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan birisi olan BACTEC TB460 sistemi ile mikobakterilerin izolasyonu, identifikasyonu ve ilaç duyarlılıkları diğer konvansiyonel yöntemlere göre iki-üç hafta daha erken yapılabilmekte ve kısa sürede uygun ve etkili tedaviye başlanabilmektedir (8).

Bu sistemlerin yanı sıra alternatif izolasyon, identifikasyon ve ilaç duyarlılıklarını saptayan sistemlerin geliştirilmesine çalışılmaktadır. Bunlardan bazıları; Myco-ESP, MB/Bact T, BACTEC 9000 MB, BACTEC Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) 960’dır. Bu sistemler tanı için geliştirilmiş ve geliştirmeye çalışılan tam otomatize kültür sistemleridir (1,2,8).

Bu çalışmada konvansiyonel olarak Afyon bölgesinde saptanan tüberküloz olgularının Löwenstein-Jensen (L-J), BACTEC TB460 ve TK MEDIUM yöntemleri

ile saptanıp dört major ilaca karşı dirençlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. İzole edilen *M. tuberculosis* kompleks suşlarının tedavide kullanılan primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılığı incelenmiştir.

1.2 - Sınıflandırma :

Actinomycetales takımına ait Mycobacteriaceae ailesinin bir cinsi olan Mycobacterium'lar (mikobakteriler), Bergey's Manual of Determinative Bacteriology-1986'da Actinomycetes ve benzeri mikroorganizmalarla birlikte gruplandırılmıştır. Mikobakteriler yüksek oranda G+C içermeleri ve bazı diğer ortak özellikleri olan *Corynebacteriae* ve *Nocardia*'lar da aynı gruba dahil edilmiştir. Mikobakterilere ait sınıflandırma aşağıda Tablo 1'deki gibidir (3,8,9).

Tablo 1: Mikobakterilerin Sınıflandırılması (9)

Alem	Prokaryot (Bakteri)
Bölüm	<i>Firmicutes</i>
Sınıf	<i>Actinobacteria</i>
Takım	<i>Actinomycetales</i>
Aile	<i>Mycobacteriaceae</i>
Genus	<i>Mycobacterium</i>
Tür	<i>M. tuberculosis</i> - <i>M.bovis</i>

İnsanlarda enfeksiyon etkeni olarak izole edilen *M. tuberculosis* ve *M. bovis* dışında saprofit olarak birçok mikobakteri türü bulunmaktadır. 1959 yılında Runyon bu iki mikobakteri dışında izole edilmiş diğer mikobakteriler için bir sınıflandırma yapmıştır.

- Grup I: Sadece ışıpta sarı-portakal rengi pigment oluşturan foto kromojenik mikobakterileri (*M.kansasii*, *M.marinum*, *M.simiae*).
- Grup II: Karanlıkta portakal rengi veya kırmızı pigment oluşturan skotokromojenik mikobakterileri. (*M.scrofulaceum*, *M.xenopi*, *M.gordoniae*).
- Grup III: Nonfotokromojenik, yavaş üreyen, S şeklinde ve krem rengi kolonileri olan mikobakterileri (*M.avium-intracellulare*).
- Grup IV: 25 veya 37 °C üremeleri için bir haftadan daha az bir süreye gereksinim duyan çabuk üreyen mikobakterileri (*M.fortuitum-chelonae*).

kompleks) içermektedir. Runyon sınıflamasının esası; pigmentasyon, koloni morfolojisi ve üreme hızına dayanmaktadır (Tablo 2) (3,8).

Tablo 2: Runyon'a göre mikobakterilerin sınıflandırılması

Mikobakteriler	Klinik Önemi	Pigmentasyon	Üreme Hızı
<u>Sınıflandırılmayan Mikobakteriler</u>			
<i>M. leprea</i>	Patojen	İn-vitro olarak üretilememiştir.	---
<i>M. tuberculosis</i>	Patojen	Pigmentsiz	Yavaş
<i>M. bovis</i>	Patojen	Pigmentsiz	Yavaş
<i>M. ulcerans</i>	Patojen	Pigmentsiz	Yavaş
<u>Runyon Grup I</u>			
<i>M. kansasii</i>	Genellikle Patojen	Fotokromojen	Yavaş
<i>M. marinum</i>	Genellikle Patojen	Fotokromojen	Orta
<i>M. simiae</i>	Genellikle Patojen	Fotokromojen	Yavaş
<u>Runyon Grup II</u>			
<i>M. scrofloceum</i>	Nadiren Patojen	Skotokromojen	Yavaş
<i>M. szulgai</i>	Patojen	Skotokromojen	Yavaş
<i>M. xenopi</i>	Nadiren Patojen	Skotokromojen	Yavaş
<i>M. gordonae</i>	Non-Patojen	Skotokromojen	Yavaş
<i>M. flavescens</i>	Non-Patojen	Skotokromojen	Orta
<u>Runyon Grup III</u>			
<i>M. avium-intracelulare</i>	Genellikle Patojen	Pigmentsiz	Yavaş
<u>Runyon Grup IV</u>			
<i>M. fortuitum</i>	Nadiren Patojen	Pigmentsiz	Çabuk
<i>M. chelonae</i>	Nadiren Patojen	Pigmentsiz	Çabuk

Runyon gruplandırmasında I, II, III ve IV. gruplar "atipik mikobakteriler" olarak adlandırılmışsa da son yıllarda bu türlerin atipik olmadıkları kabul edilmiş ve bu grup için "MOTT (Mycobacteria other than tuberculosis)" veya "non-tuberculosis mycobacteria" terimlerinin kullanılmasının uygun olacağı bildirilmiş, ancak bu

terimlerin de mikobakteri türlerini tanımlamada yetersiz kaldığı görülmüştür. Klinik açıdan önemli çeşitli mikobakteri türlerinin oluşturduğu enfeksiyonların tedavileri farklı olduğu için tüm mikobakterilerin tür adları ile belirtilmeleri gerekmektedir. Tablo 3, *M.tuberculosis* dışındaki mikobakterileri göstermektedir (8).

Tablo 3: *M.tuberculosis* dışındaki mikobakteriler (8).

Grup	Tür
İnsanlarda Patojen Olan Türler	<i>M. leprae</i>
İnsanlarda Potansiyel Patojen Olan Türler	<i>M. avium-intracellulare</i> , <i>M. Kansaii</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. scrofloceum</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M. szulgai</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>M. simiae</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. ulcerans</i> , <i>M. haemophilum</i>
<u>İnsanlarda Nadiren Hastalık Oluşturan Saprofit Mikobakteriler</u>	
Yavaş Üreyenler (>7 Gün)	<i>M. gordonea</i> , <i>M. asiaticum</i> , <i>M. gastri</i> , <i>M. nonchromogenicum</i> , <i>M. paratuberculosis</i>
Orta Sürede Üreyenler (~7-10 Gün)	<i>M. flavescens</i>
Çabuk Üreyenler (>7 Gün)	<i>M. termoresistibile</i> , <i>M. smegömatis</i> , <i>M. vaccae</i> , <i>M. parafortuitum kompleks</i> , <i>M. phlei</i>

Wayne ve Sramek ise *M.tuberculosis*'in doğada yaygın olarak bulduklarından "fırsatçı patojenler" olarak düşünülmesi gerektiğini savunmaktadırlar. Bu nedenle bu mikobakteriler için bugün geçerli olan "potansiyel patojen çevresel mikobakteriler" (PPEM) teriminin kullanılması önerilmektedir (10).

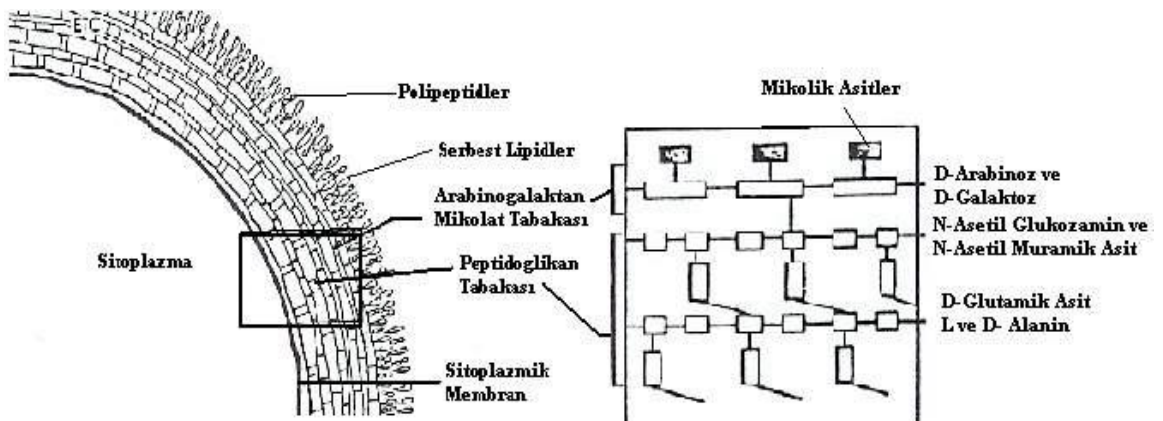
M. tuberculosis ve *M .bovis*'inde içinde bulunduğu bir başka sınıflandırma modelinde ise genellikle insanlardan izole edilen mikobakteriler dört grupta toplanmıştır.

1. Sadece insanlarda enfeksiyon oluşturan zorunlu patojenler,
2. Hayvanlarda veya çevrede bulunan, fakat insanlarda da enfeksiyon oluşturdıkları bildirilen fakültatif patojenler
3. Çevrede bulunan, fakat insanlarda da enfeksiyon oluşturdıkları bildirilen potansiyel "fırsatçı" patojenler,
4. Çevrede bulunan, fakat insanlarda enfeksiyon oluşturmeyen saprofit türler (3)

1.3 - Mikobakterilerin Genel Özellikleri Hücre ve Hücre Duvar Yapısı :

Mikobakterilerin Genel Özellikleri Hücre Yapısı : Mikobakteriler 1-14 μm boyunda, 0,3-0,6 μm eninde hareketsiz, aerob, sporsuz, kapsülsüz bazen hafif kıvrık şekilde bulunan basillerdir. Türler morfolojik olarak birbirlerinden ayrılırlar. Hücre duvarlarının fazla miktarda lipid içermesi bu basillere hidrofobik, dirençli ve dayanıklı olma özelliğini kazandırır. Mikobakteriler Gram, Giemsa gibi rutin bakteriyolojik boyalar ile boyanmazlar. Özel boyalar ve boyanma yöntemleri ile boyandıkları zaman boyayı asit alkolle yıkadıklarında bile bırakmazlar. Bu sebepten aside dirençli bakteriler denilir. Bu özelliğini hücre duvarındaki mikolik asit lipid bandı kazandırır. Bu aside dirençli olma özellikleri laboratuvar tanısında kullanılan en önemli özellikleridir (1,3,8,11,12).

Mikobakterilerin Hücre Duvarı ve Yapısı : Mikobakteriler, Gram pozitif ve gram negatif bakterilerin hücre duvar yapısından farklı bir hücre duvarına sahiptir. En içte plazma membranının üzerinde orta tabakanın koruyucu ve duvarın bel kemiği olan peptidoglikan arabinogalaktan (AGP)'in mikolik asit esterlerinden oluşan mycolylarabinogalaktan peptidogalaktan (mAGP) bulunur. Mikolik asitler haricinde çok sayıda polar ve apolar nonkovalent bağ içeren lipid ve glikolipidler hücre duvar yapısında yer alırlar. En dışta bulunan tabaka ise polisakkarit, protein ve lipid içermektedir. Ayrıca Gram negatiflerde bulunan porin proteinleri de bulunmaktadır. Bu hücre duvar yapısı aşağıda Şekil 1'de gösterilmiştir (1,9,11,13).



Şekil 1: Mikobakterilerin Hücre Duvar Tabaka Yapısı (11).

A) **Lipidler** : Mikobakteriler normal bakterilerin içerdikleri lipidlerden farklı daha spesifik ve karmaşık yapıya sahip lipidler içermektedirler. Başlıcaları mikolik asit, balmumu (waxes D), 6,6'-dimikolat- α -D trehaloz (kord faktör), fosfolipidler, glikolipidler, lipoglikan, lipoprotein ve sulfolipidlerdir.

Balmumu (Waxes D) : Peptidoglikan yapısındadır. *M. tuberculosis*'ten elde edilip verilmesi halinde yapısında bulunan N-asetil muramildipeptid nedeni ile hücrel immün yanıt oluşumu, antikor yapımında ve interferon yapımını indükleyen adjuvan etki gösteren bir maddedir (1,3,14).

Kord Faktörü (6,6'-dimikolat- α -D trehaloz): Virülen olan tüberküloz suşlarında rastlanmaktadır. Kord faktörü mikolik asitlerin trehaloz gibi şekerlere bağlanması ile oluşmaktadır. Kord faktörü konak hücrenin mitokondri membranına tutunarak solunum ve oksidatif fosforilasyon mekanizmasında hasara neden olurlar. Makrofaj stimülasyonunu, savunma sistemini harekete geçirme ve granulom oluşturma yeteneğine sahiptirler. Antitümör özelliği vardır (13,14)

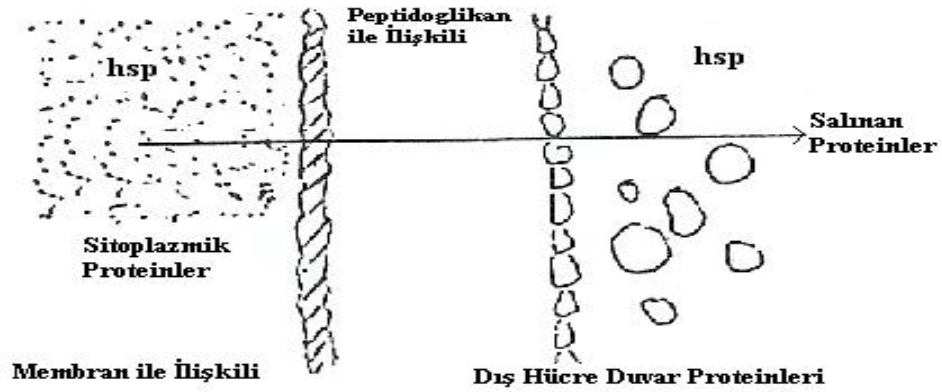
Sülfatidler : Kord faktörünün toksisitesini arttırmanın yanında Lizozom fagazom birleşmesini engelleyerek basilin konak tarafından parçalanıp yok edilmesini önlerler.

Fosfolipidler : Sitoplazmik membrana bağlı fosfatidik asit yapısında maddelerdir. Peptidoglikan ve polisakkarid sentezinde rol oynarlar.

Lipooligosakkaritler önemli birer yüzey antijenlerinin epitoplarnı oluştururken lipoglikanlar uzun zincirli yağ asitlerinin sentezlenebilmesi için lipid taşıyıcı olarak görev yaparlar (8).

B) **Proteinler** : En önemli işlevleri duvar polimerlerinin sentezinde rol almak, atık maddelerin hücre duvarından geçmesini sağlamak, porları oluşturmak ve basile antijenik özellik kazandırmaktır. Proteinler buldukları yer, görevleri, kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre başlıca 6 grupta sınıflandırılır. (Şekil 2) (3,6).

1. Membran ile İlişkili Proteinler
2. Peptidoglikan ile İlişkili Proteinler
3. Dış Hücre Duvar Proteinleri
4. Sitoplazmik Proteinler
5. Isı Şok Proteinleri (hsp)
6. Salınan Proteinler



Şekil 2 : *M. tuberculosis*'in Önemli Proteinleri (3).

C) Polisakkaritler : Erken aşırı duyarlılık reaksiyonu başlatırlar ve hasta serumu ile etkileşerek antijenik özellik gösterdikleri bildirilmiştir. Konak hücre makrofajlarından TNF- α salınımını artırırlar (3,6).

1.4- Antijenik Yapı

Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler gibi mikobakteriler'de birçok antijen ve antijenik determinanta sahiptirler. Basil yapısında bulunan protein, lipid ve polisakkarit gibi komponentlerin tümü immunojeniktir. Bu komponentler immün sistemi baskımlarken bunun yanında granulo oluşumuna yol açma, makrofajları aktive etme, konakçı toksitesi oluşturma ve adjuvan etkisi yapma gibi özellikleri de bünyelerinde bulundurmaktadırlar. Protein anahtar immunojen olarak kabul edilir (8,12).

Polisakkaritler mikobakterilerin en büyük antijenik kısımlarıdır. Arabinoz, mannoz ve galaktoz taşıyan polisakkarit I molekülleri geçikmiş tip aşırı duyarlılık oluştururken, Polisakkarit II molekülleri aşırı duyarlılık reaksiyonu oluşturmazlar

ama serolojik olarak aktif durumdadırlar. Hücre duvarı bu polisakkaritlerin temel kaynağı olarak gösterilmektedir (1,8,12).

Old Tuberkülin (OT) : İlk kez Koch tarafından elde edilmiştir. Old Tuberkülin'in enfekte kişilerde basille hiç karşılaşmamış kişilere oranla daha hızlı reaksiyon oluşturduğu gözlenmiştir. Yapısındaki karbonhidrat, protein ve üretildiği besiyerine ait maddeler nedeni ile özgül olmayan reaksiyonların da geliştiği gözlenmektedir.(1)

Safılaştırılmış Protein Türevi (Purified Protein Derivative=PPD) : Old Tuberkülin'in kollodyen membrandan süzülmesi ve amonyum sülfatla ile çöktürülmesi sonucu elde edilmiş old tuberkülin'e göre daha saf bir üründür.Yapısının daha saf ve daha uygun proteinlere sahip olması nedeniyle özgül olmayan reaksiyonlara daha az rastlanmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 0,1 ml solüsyonda 5 tuberkülin Ünitesi (TU) dozunda PPD, veya 0,0001 mgr standart (PPD-S) bulunmasını tavsiye etmektedir. Günümüzde hala tam olarak safılaştırılmamış olması ve bazı çapraz reaksiyonlara girmesine karşılık PPD immün tanısal önemini hala korumaktadır.

Safılaştırılmış Antijenler : Saf mikobakteriyel antijenler içinde en çok göz önüne gelen ve dikkat çeken 65 kD antijenidir. Yüksek oranda immünojeniktir ve ısı şok proteinleri ile bağlantılı olduğu sanılmaktadır. Konak dokularda salınınca otoimmün reaksiyona ve kazeifikasyon nekrozuna yol açtığı gösterilmiştir. Bu antijene karşı oluşmuş antikolar ile duyarlı T hücre varlığı ispatlanmıştır (1,8).

1-5 -Tuberkülin Deri Testi :

Tuberküloz hastalığına karşı gelişen aşırı duyarlık reaksiyonunun belirlenmesinde tuberkülin deri deneyi kullanılmaktadır. Bu deneyde kullanılan tuberkülin, tuberküloz bakterilerinin yoğunlaştırılmış bir kültür filtratıdır. *M.tuberculosis*, *M.bovis*'in sıvı besiyerlerinde, 37 °C'de, 6-8 hafta süre ile üretilmesi, kültürün yarım saat akım halindeki buhar ile öldürülmesi, hacminin 1/10'u kalıncaya kadar 70°C'de yoğunlaştırıldıktan sonra filtreden geçirilmesi ile elde edilir. Bu preparata eski tuberkülin (Old Tuberculin = OT) adı verilmiştir. Tuberkülinin içinde aktif tuberküloz proteinlere ilave olarak, tuberküloz bakterilerinin çeşitli komponentleri ve ürettikleri besiyerine ait maddeler de bulunur.

Robert Koch 1890'da bu ekstreyi elde ettikten sonra ilk yıllarda tedavi amacıyla kullanabileceğini ileri sürmüş, ancak daha sonraki yıllarda başarısız sonuçlar alındığından bu uygulamayı terk etmiştir. R. Koch'dan sonra 1934 yılında F.Seibert eski tuberkülini daha saf standart hale getirip PPD (Purified Protein Derivatives) olarak kullanmaya başlamıştır. 1941 yılında standart PPD (PPD-S) geliştirilmiştir ve DSÖ tarafından kullanılmaya başlanmıştır.

Tüberkülin duyarlılığının araştırılmasında bugün en çok kullanılan ve güvenilir yöntem, Mantoux testi (intrakütan test)'dir.

Deneyin Uygulanışı : Alkolle cilt temizliği yapıldıktan sonra ön kolun ön kısmına tüberkülin enjektörü ve 26-27 kalibreli platin veya çelik iğne ile 0.1 ml 5 TU PPD intradermal olarak enjekte edilir. Doğru olarak uygulanmış bir enjeksiyonda, deride 6-10 ml lik bir kabartı oluşması gerekmektedir. Bu kabartının oluşmaması tüberkülinin deri içine değil, deri altına verildiğini gösterir ve doğru bir uygulama değildir. Deney çocuklara veya oküler tutulumdan şüphelenilen hastalara uygulanırken 1 TU PPD kullanılmalıdır. 5 TU PPD ile negatif sonuç alındığında, hastaların sadece immünolojik durumlarını değerlendirmek için 250 TU'lık doz kullanılmalıdır.

Deneyin Okunması ve Değerlendirilmesi : Tüberkülin deneyinin okunması, enjeksiyondan sonraki 48. ve 72. saatlerde yapılır.Eritem önemli olmayıp, asıl önemli olan ölçümü saptanabilen endürasyonun çapıdır.

10 mm veya daha fazla endürasyon pozitif, 5 mm'den büyük, fakat 10 mm'den küçük endürasyon diğer mikobakteriyel enfeksiyonlara bağlı olabileceğinden şüpheli, endürasyon olmadan sadece eritem veya 5 mm'den küçük endürasyon negatif olarak kabul edilir.

Tüberküloz bakterileri ile hiç temas etmemiş kişilerde tüberkülin deneyleri negatif sonuç verir. Deneyin pozitif çıkması, kişinin daha önce bir tüberküloz enfeksiyonu geçirdiğini, halen tüberkülozlu olduğunu veya aşılanmış olduğunu gösterir.

Daha önce tüberküloz geçirmiş bir kişide, negatif olan tüberkülin testi, aynı kola yaklaşık 1 hafta içinde yapılan yeni bir testle pozitif bulunabilir. Buna "Booster etkisi" denir. 55 yaşın üzerindeki kişiler arasında daha sık görülür (3,15).

Mantoux testi dışında, heaf testi, tine testi ve mono-vacc testi gibi multipl ponksiyon testleri de vardır. Heaf testinin özellikle kitle taramaları için uygun olduğu bildirilmiştir. Tüberkülin deneylerinin değerlendirilmesinde üzerinde durulması gereken önemli bir nokta, yalancı negatifliğe sebep olan olaylardır, ve dört grupta toplanırlar (3).

1. Testin yapıldığı kişiye bağlı faktörler
2. Kullanılan tüberküline bağlı faktörler
3. Testin uygulama yöntemine bağlı faktörler
4. Testin okunma ve kaydına bağlı faktörler

1.6 - Patagonez :

Tüberküloz hastalığı *M. tuberculosis* basili tarafından meydana gelir. Tüberküloz hastasından hava aracılığı ile sağlam kişiye bulaşır. En bulaştırıcı hastalar balgam mikroskopisinde Aside Resistan Boyama (ARB) pozitif olan akciğer tüberkülozulardır. Hasta ile yakın ve uzun süreli teması fazla olan bireylerde bulaş riski daha fazladır (16,17). Bulaş sonrası infeksiyon oluşup oluşmaması veya hastalık meydana gelip gelmemesi konağın direnci ile bakteriyel virulans arasındaki ilişkiye bağlıdır. Aktif tüberkülozlu kişiler çevreye, içinde değişik sayılarda basil bulunan damlacık saçarlar. Sağlıklı kişiler tarafından solunan bu damlacıkların büyük olanları burun ve bronş yüzeyindeki silialar tarafından tutulurken, içinde 1-3 basil bulunan küçük partiküller kolaylıkla alveollere ulaşır ve alveoler makrofajlarca fagosite edilirler.

Mikobakteri taşıyan fagozum çoğunlukla lizozom ile birleşmez ve fagozomun pH'sı, proton-ATPaz veziküllerinin dışlanması nedeni ile daha fazla asidifiye olmaksızın 6.5 dolayında kalır. Bu mikobakterinin yaşaması için uygun pH'dır. Ayrıca mikobakterinin duvar yapısında yer alan komponentler, bakterinin, kendisini konağın immün saldırısına karşı korunmasında önemli rol oynamaktadır (18). Makrofaj aktivitesi yetersiz kalırsa basil, hücre içinde çoğalmaya başlar. İkiye bölünme süresi uzun olduğundan makrofaj içinde yavaş bir şekilde çoğalan *M.tuberculosis*, akciğerde vazodilatasyon, ödem, polimorfnüveli lökosit ve fibrinöz eksuda ile karakterize erken konak cevabına neden olur (3,16,17).

Konakta, basillerin belli bir sayıya ulaşması ve hücrel immün cevabın ortaya çıkmasına kadar 3-8 haftalık bir süre geçer. Hücrel immün cevap ile birlikte aktive olan T-Ienfositler ve makrofajlar basilleri çevreleyerek, nonspesifik konak cevabının bir göstergesi olan granülatöz inflamasyon gelişimine yol açarlar. CD4 T hücrelerinden salınan IFN γ ile lenfokinler, makrofaj ve monositleri aktive eder.

Monositlerden köken alan doku makrofajları epiteloid hücelere, bunlarda birleşerek çok nukleuslu dev hücelere dönüşür. Aktive makrofajlar fagozom içindeki basilleri superoksit anyon, radikal hidroksil ve hidrojen peroksit gibi serbest radikaller ile öldürür. Bakteri endozomal kompartımda işlenerek MHC Klas II molekülleri ile birleştikten sonra makrofajın yüzeyine yapışır (19). Mikobakteriyel hücrenel cevapta dominant olan T lenfositlerinin %90'ı α ve β zincirinden oluşan reseptörleri ile antijeni tanıyarak aktif hale geçer. Makrofajlar tarafından fagosite edilen, ancak öldürülemeyen bakteriler MHC Klas I molekülleri ile birleşip CD8 T lenfositlerine sunulur. Ancak tüberküloz basilleri ile meydana gelen infeksiyonlarda aktivite CD8 T hücelerinin rolü, henüz kesin olarak anlaşılamamıştır (1,8,18).

Hücrenel immünite ve gecikmiş tip hipersensitivite T hüceleri ile oluşur. Her ikisinde de aynı immünolojik mekanizma söz konusudur. Hücrenel immünite infeksiyon ajanını öldürmeyle ilgilidir. Gecikmiş tip hipersensitivite konak organizmanın infeksiyona verdiği immünolojik bir cevaptır. Gecikmiş tip hipersensitivite oluştuğunda lenfositlerden açığa çıkan lenfokinler sadece basilleri öldürmekle kalmaz granülomun merkezinde bulunan nekrotik dokularda pıhtılaşma mekanizmasını harekete geçirip, kan damarlarında iskemi ve tromboza neden olur. Sonuçta doku yıkımı meydana gelir. Lezyon bölgesindeki aktive makrofajlara ait proteinaz, lipaz, endonükleaz gibi enzimler granülomun ortasında bulunan kazeomu eritir ve likefaksiyona yol açar. Likefiye kazeomun bronşa açılması ile kavitasyon oluşur (3,8,20).

Primer tüberküloz, bireyin tüberküloz bakterileriyle ilk defa enfekte olmasıdır. Hafif seyirli ve asemptomatik seyrederek (3). Solunum yoluyla alınan tüberküloz basilleri genellikle alt loblarda ve plevra altında yerleşirler. İlk yerleşim yerinde toplanmakta olan makrofajlar epiteloid hücelere dönüşür. Bunlar birleşerek langhans tipi dev hüceleri oluştururlar, etratları lenfositlerle çevrilir ve granülom meydana gelir. Bu yapıya Ghon odağı denir. Bölgesel lenf bezlerine yayılan basiller burada da aynı granümatöz olaya neden olur. Akciğerdeki primer periferik lezyon ve beraberinde büyümüş lenf bezlerine "Ghon kompleksi veya primer kompleks" denir. Genellikle asemptomatiktir. Bölgesel lenf bezlerindeki basiller kan yoluyla vücuda yayılabilir ve menenjit, miliyer tüberküloz gibi hastalığın ağır şekilleri ortaya çıkabilir (8,21).

Sekonder tüberküloz (reinfeksiyon tüberkülozu, erişkin tüberkülozu), önceden primer infeksiyon geçirmiş bir kişide tüberkülozun reaktive olmasıyla oluşur. Çoğunlukla erişkinde görülmesi, başlangıç lezyonlarının üst zonlara yerleşmesi, bronş yolu ile yayılması, hiler lenfadenopatinin nadir görülmesi ve spontan iyileşmenin nadir olmasıyla primer tüberkülozdan ayrılır.

Erişkin akciğer tüberkülozu üç şekilde ortaya çıkar:

1. Endojen reinfeksiyon : Enfeksiyona karşı direncin azaldığı enfeksiyonu kolaylaştırıcı durumlar varlığında primer lezyon ve özellikle lenf bezlerinde canlı kalmış bakterilerin yayılması ile meydana gelebilir.

2. Primer tüberküloz enfeksiyonunun ilerlemesi : Primer enfeksiyonda meydana gelen lezyonlar iyileşme göstermez, bölgesel olarak ilerler, kavern meydana gelir ve sonuçta sekonder tüberküloz gelişir. Özellikle ergenlik çağından sonra primer tüberküloz olanlarda görülür. Bazı olgularda aktif primer lezyondan bronkojen, hematojen veya lenfojen yayılımlar meydana gelerek akciğer veya akciğer dışında tüberküloz hastalığı gelişebilir.

3. Eksojen reinfeksiyon : Primer tüberküloz geçirmiş bir kişi (veya primer lezyon aktif durumda iken) dışarıdan tekrar tüberküloz bakterilerini almasıyla meydana gelir (1,3,8).

Tüberküloz enfeksiyon genelde 2 tip lezyon meydana getirir.

1. Eksüdatif tip: Ödem sıvısı, polimorf nüveli lökositler, ve daha sonra tüberküloz bakterilerinin çevresinde monositlerle akut iltihabi reaksiyonu içerir. Bu tip, özellikle akciğer dokusunda görülür. Tüm eksüda absorbe olduğu için lezyon iyileşebilir, doku nekrozu oluşabilir veya ikinci tip (prodüktif) lezyon gelişebilir. Eksüdatif faz boyunca tüberkülin deri deneyi pozitifdir.

2. Prodüktif tip : Geliştiğinde husule gelen granüloma 3 bölge içerir:

- a) Tüberküloz bakterilerini içeren multinükleer dev hücreler veya Langhans hücrelerinden oluşan geniş bir merkez bölge,
- b) Genellikle radyal olarak yerleşmiş epitelooid hücrelerden oluşmuş orta bölge,
- c) Fibroblastlar, lenfositler ve monositlerden oluşmuş periferik bölge.

Lezyonun bulunduğu yerde periferik fibröz doku gelişerek merkez bölgede kazeöz nekroz oluşur. Bu tip lezyonlara "tüberkül" adı verilir. Kazeöz tüberkül bir bronş içine doğru gelişirse, içeriğini buraya boşaltır ve kavite oluşur, buna "kavern" adı verilir. Daha sonra kalsifikasyon veya fibrinleşme ile iyileşebilir (3,24).

Kavitesi bulunan tüberkülozlu bir hastanın solunum yolundan kaynaklanan damlacık çekirdeğini, solunum yoluyla alan duyarlı birey enfeksiyonun başlaması için uygun konaktır. 1-5 µm çapındaki damlacık çekirdeği üst solunum yollarının korunma etkisinden kurtularak alveollere doğru ilerler. Buradan akciğerlerin alt kısımlarına taşınır. Bu damlacık çekirdekleri 1-3 mikobakteri içerir.

Alveollere kadar ulaşan mikobakteriler burada alveol makrofajları tarafından tutulur. Tutulan bakteriler ya makrofajlar tarafından yok edilir, ya da yaklaşık üç gündü sonra yavaş olarak çoğalmaya başlar. Bu gecikmenin nedeni besin maddelerinin hücre duvarından (özellikle balmumu yapısındaki maddelerden) kolay geçememesidir. Makrofaj içinde çoğalan bakteriler, ilk tuttıkları alveolar fagositi öldürür; açığa çıkan bakteriler, diğer makrofajlar tarafından tutulur ve kan damarlarından gelen monositler de alveollerde toplanır. Bu mekanizma sonucunda iltihap oluşumu başlar. Bu olay yavaş olarak ilerler, lokal lezyon genişler ve yaklaşık iki hafta sonra bakteriler lenf kanalları yoluyla lenf nodüllerine taşınır. (lenfojen yayılım). Burada önce T-helper hücreleri yoğunur, T-helperlerin de yardımıyla immün yanıt başlar. Lenf nodüllerindeki yerleşik makrofajlar bakterileri fagosite ederler, ancak bakteriler de hücre içinde çoğalmaya devam ederler. Birkaç gün sonra bakteriler lenf nodüllerini terk ederek lenfatikler ve torasik kanal yoluyla kan dolaşımına girerler. Kan yolu ile tüm vücuda yayılırlar (hematojen yayılım), dokularda makrofajlar tarafından sindirilme ve çoğalma işi sürer, ayrıca uygun bir yerde lokalizasyon gerçekleşir. Enfeksiyondan yaklaşık 2-10 hafta sonra hücresel yanıt oluşur. Lenf nodüllerinden ve dalaktan kaynaklanan duyarlı lenfositler, enfeksiyon bölgesine göç ederler ve küçük lezyonlar oluştururlar.

Mikobakteriyel antijenlere karşı oluşan duyarlı lenfositler ve spesifik antijenlerin ilişkisi sonucunda lenfokinler salgılanır. Makrofajların ortama çekilmesiyle kazeöz nekroz oluşumu başlar. Aktive edilmiş makrofajların antijene bağlanması ve oksijensizlik etkisi ile mikobakteriler yok edilir. Ancak akciğerlerin

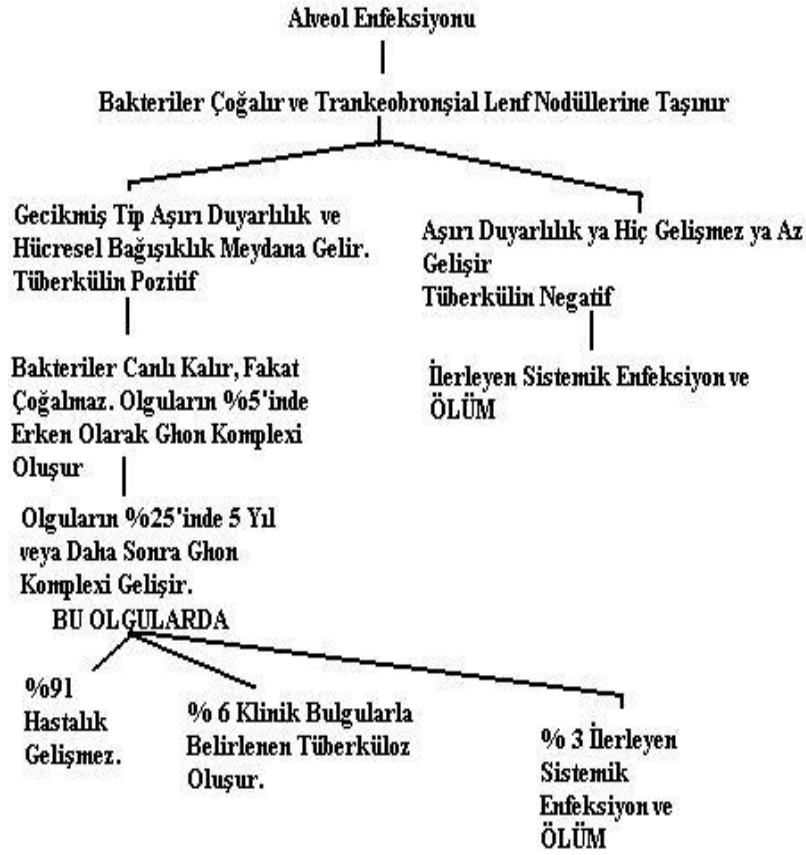
apikal veya subapikal bölgeleri, böbrekler ve uzun kemiklerin büyüyen uçları (çocuklarda) yüksek miktarda oksijen bulundurmaktadır. Tüberküloz etkeni kesin aseptik ve bu bölgelere yerleşme olanağı bulmuş mikobakteriler yavaş olarak ürerler ve dormant hale geçerler. Buraya kadar olan olaylar tüberküloz enfeksiyonunun oluşumuna aittir. Ancak semptomlar yoktur; bu nedenle tüberküloz hastalığı söz konusu değildir.

Dokuda, özellikle lenf nodüllerinde mikobakteriler küçük granülomlar içinde bulunurlar ve granülom oluşumu kord faktörüne bağlıdır. Tüberküloz enfeksiyonunun başlamasından yaklaşık 15 gün sonra tüberkülin reaksiyonunun negatiften pozitif dönüşü kalsifikasyon odağı oluşur, bu kalsifiye olmuş primer lezyonlara "primer kompleks" veya "Ghon kompleksi" denir. Akciğerlerin apikal veya subapikal bölgelerinde kalsifikasyon olsa bile radyolojik incelemede anormallikler saptanabilir. Bunlara "Simon's odağı" adı verilir.

Başka bir enfeksiyon veya başka bir hastalığın tedavisi nedeniyle hücresel bağışıklık geçici olarak baskılanır. Aktif makrofajların yapımı durur ve apikal bölgede dormant halde bulunan mikobakteriler çoğalmaya başlayarak birkaç haftada oldukça yüksek bir sayıya ulaşırlar. Daha sonra hücresel bağışıklık yanıtı tekrar başladığında, duyarlı lenfositler lezyon bölgesine taşınmaya başlar, lenfokinler salınır ve makrofajlar tekrar aktive edilir. Kazeöz nekroz yaygınlaşır, makrofajlardan çıkan proteinaz, lipaz, nükleaz gibi enzimlerin aktivasyonu sonucu lezyonda değişiklikler olur ve kazeöz yapı yumuşar. Bu mikobakteriler için oldukça uygun bir ortamdır ve çoğalma hızlanır, daha fazla lenfosit ve daha fazla lenfokin açığa çıkar, böylece lezyon genişler. Bu lezyon bir bronş içine doğru gelişirse içeriğini buraya boşaltır, hastada öksürük ve balgam çıkarma gibi belirtiler oluşur. Bu olay akciğerde bir kavite oluşumuna yol açar. Kavitenin iç yüzünde kalan mikobakteriler çoğalmaya devam eder. Buna bağlı olarak ateş, öksürük, halsizlik gibi tüberküloz hastalığının semptomları ortaya çıkar.

Makrofajların aktive edilmeleri sonucunda lizozomal enzimler, metabolik aktivite, fagositik aktivite ve membran aktivitesinin arttığı düşünülmekteyse de bu düşünce tam kesinleşmemiştir. Yine de mikobakterilerin aktive edilmiş makrofajlar içindeki intraselüler çoğalmaları, bu mekanizmalardan biri tarafından sınırlı tutul-

maktadır.



Şekil 3 : Tüberküloz patogenezi (23).

Makrofajların, mikobakterileri fagosite ettikten sonra interlökin-1 ve tümör nekroz faktörü olmak üzere iki tip madde salgıladıkları belirlenmiştir. Interlökin-1 ateş oluşumuna, tümör nekroz faktörü ise lipid metabolizmasını etkileyerek kilo kaybına yol açar (3,8,22,23,24).

Miliyer Tüberküloz : Tüberküloz basillerinin hemotojen yolla yayılımı ile vucuda dağılması ve birçok organda çok sayıda granulomlar oluşturmasıdır. Daha çok immün süpresif hastalar ve çocuklarda sık görülür. PPD genellikle negatiftir.

Plevra Tüberkülozu : Erişkin ve yaşlılarda sık rastlanır. Eksüdatif plörezin en

önemli kaynağıdır.

Perikard Tüberkülozu : *M. tuberculosis* ile enfekte mediastinal veya hiler lenf bezinin perikard aralığına rüptürü neticesinde gelişir.

Kemik ve Eklem Tüberkülozu : Genellikle hemotojen yayılım sonucunda ortaya çıkar. Vertebra tüberkülozuna, tüberküloz spondilit veya Pott hastalığı etkeni denir. İskelet tüberkülozunun en sık rastlandığı yerdir.

Böbrek Tüberkülozu : Hemotojen yayılım ile gelişir. Tüberkülozun bütün şekillerinde semptomatik olmayan renal kordital odak ortaya çıkmaktadır. İdrar da basil sayısı az olduğu için tanı da direk mikroskopi çok yardımcı olan bir yöntem değildir.

Lenf Bezi Tüberkülozu : Deri altındaki bir tüberküloz odağından kaynaklanan soğuk apse oluşumu ve bunun daha sonra deriye açılmasıyla karakterizedir. Adölesan çağda ve genç erişkinlerde sık görülür. En çok tek taraflı anterior ve posterior servikal zincir, aksiler lenf bezleri tutulur. Benzer özellikleri gösteren ve genellikle bayanlarda gözlenen Lupus vulgaris’de deri tutulumu gösterir. Lupus vulgaris’li hastaların %40’ında tüberküloz adenit %15’inde ise akciğer tüberkülozu vardır. Adenit tüberkülozu da lenf bezlerinin yangısı ile oluşabildiği gibi en çok çene altı, boyun ve akciğer hilusundaki bezler şişer. Bu belirtiler ile ortaya çıkar ve çoğunlukla çocuklarda görülür.

Barsak Tüberkülozu : Yaygın kaviter akciğer lezyonu olan ve larinks tüberkülozlu hastalarda enfekte balgamın yutulması ve hematojen yayılım sonucunda gelişir. *M. bovis*’e bağlı gastrointestinal sistem tüberkülozu iyi pastörize edilmemiş ve pişirilmemiş süt ile de bulaşabilmektedir. En sık ileum ve ileoçekal bölgesini tutar.

Tüberküloz ve HIV Enfeksiyonu İlişkisi : HIV ile enfekte kişilerde CD4 T lenfositlerin fonksiyonunda aksamalar olduğu için makrofajların aktivasyonu ve tüberküloz basilinın öldürülmesi mümkün değildir. Normal bireylerde tüberküloz basili ile karşılaşma sonrası yaşam boyu aktif tüberküloz geçirme olasılığı %10 iken, HIV pozitif bireylerde bir yıl içinde %10’dur. AIDS’li kişilerde tüberküloz diğer fırsatçı enfeksiyonlardan daha erken ortaya çıkar, akciğer dışı bölgelere yayılma olasılığı çok daha fazladır (11,12) .

1.7 - Tüberküloz Tanısı :

Tüberküloz basiline kısa sürede tanımlanması, ilaç direncinin saptanması ve enfeksiyon kaynağının belirlenmesi etkin bir tedavi için çok önemlidir. Bu nedenle klasik laboratuvar tanı metodları yanında hızlı sonuç veren, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek kolay uygulanabilir yeni kültür yöntemleri ile moleküler biyoloji teknikleri geliştirilmiştir(25). DSÖ kararına göre bir hastaya kesin tüberküloz tanısı konabilmesi için uygun şekilde alınan klinik örneğin laboratuvara gönderilmesi, hazırlanan preparatlarda mikobakterilerin görülmesi ve ekim yapılan besiyerlerinde üretilmesi ile mümkün olur (25,26).

Tüberkülozun laboratuvar tanısındaki başarı; klinik örneğin uygunluğuna bağlıdır. Hastalık çok çeşitli organ ve dokuları tuttuğu için, materyal seçimine özen gösterilmeli; normal flora üyeleri ile kontamine örnekler incelenirken, dikkatli olunmalıdır. Tüberküloz tanısı için örneklerin alınma ve laboratuvara gönderilme koşulları vardır. (1,3,8).

Balgam : Hastadan 5-10 ml kadar tükürük içermeyen sabah balgamı alınması tercih edilir. Hasta önce eğitilmeli ve nasıl balgam çıkartılacağı öğretilmelidir. Öksürük derinden gelmeli, balgam koyu ve yapışkan olmalıdır. Balgam çıkaramayanlarda ekspektoranlar verilebilir veya steril hipertonic tuzlu su inhalasyonu yaptırılır. Balgam kültürünü birbirini takip eden üç günde, üç kez tekrarlamak mikobakterilerin izolasyon şansını arttırmaktadır. Başka bakterilerle kontaminasyon riski fazla olduğundan 24 saatlik balgam tüberküloz tanısı için uygun bulunmamaktadır.

İdrar : Sabah 50 ml orta akım şeklinde alınan ilk idrar örneği yeterlidir. Birbirini takip eden üç günde kültür işleminin tekrarlanması başarıyı yükseltir. 24 saatlik idrar örneği kültür işlemi için uygun değildir.

Açlık mide suyu : Tüberküloz tanısı için uygun bir örnek değildir. Balgam çıkaramayan veya balgamını yutan hastalarda, koma nedeniyle tam öksüremeyen ve kooperasyonu tam olmayan hastalarda, balgam alımının zor olduğu küçük çocuklarda başvurulur. Bu gibi hastalarda en az 5-10 ml açlık mide suyu alınmalıdır. Uyku süresince yutulan balgamı toplayabilmek için, hasta uyanır uyanmaz herhangi

bir şey yemeden alınması önerilmektedir. Birbirini izleyen üç günde, kültür işlemini üç kez tekrarlamak izolasyonu kolaylaştırır. Açlık mide suyunun yüksek asiditesi mikobakteriler için zararlıdır. Bu nedenle vakit geçirilmeden ekim yapılmalıdır. Ekim gecikecek ise tampon çözeltilerle muamele edilmelidir (anhidroz di sodyum hidrojen fosfat).

BOS : BOS'daki basil miktarı çok az olabilir. Bu nedenle santrifüjleme ile elde edilen sedimentten ekim yapıldıktan sonra, lam üzerine bir damla konup havada kurutulur ve üzerine tekrar bir damla daha konur. Bu şekilde kat kat hazırlanan preparatlarda basillerin görülme şansı artar. Bazen, tüberküloz menenjitli hastaların BOS'u oda ısısında bekletilirse, fibrin ağı oluşur. Aside dirençli basillerin, fibrin ağında görülme olasılığı daha fazladır.

Abse materyali : Derinin alkolle temizliği yapıldıktan sonra, steril enjektörle mümkün olduğu kadar çok miktarda abse örneği alınmalıdır. Eğer yeterli miktarda alınamıyorsa, az miktarda örnek eküvyonla alınmalı ve transport besiyerinde (7H9 buyyonu) laboratuvara gönderilmelidir.

Kan : Hastadan alınan kan örneği, besiyerine ekilmeden önce ve ekildikten sonra besiyerinin ağzı % 70'lik alkolle silinmeli ve en fazla 5 ml kan BACTEC 12B besiyerine direkt olarak ekilmelidir. Sodyum polyanetal sülfonat içeren kan tüplerine 10 ml kan örneği alınması önerilmektedir. EDTA çok az miktarlarda dahi mikobakterilerin üremesini inhibe ettiği için kullanılmamalıdır.

Vücut sıvıları (plevra, perikard, periton, asit sıvısı, sinovyal sıvı, kemik iliği) : Seröz sıvılar tüberküloz tanısı için incelendiğinde büyük hacimlere gerek duyulur ve en az 10-15 ml, mümkünse 50 ml alınmalıdır. Bu tip klinik örnekler çok dilüe olduklarından aside dirençli bakterileri saptamak oldukça güçtür. Büyük hacimlerde alınan klinik örnekler santrifüj edilmeli, çökelti halindeki 10 ml örnek direkt olarak 12B besiyerine ekilmelidir.

Biyopsi : Koruyucu ve fiksatif içermeyen steril kaplarda 1 g doku örneği incelenmelidir. Steril olarak alınmalı ve vücut florası ile kontaminasyondan kaçınılmalıdır. Formalin ile gönderilmiş örnek uygun değildir.

Bronkoalveoler lavaj sıvısı : En az 5 ml örnek steril kaplara alınmalıdır. Bronşial fırçalama veya iğne aspirasyonları bovin serum albumin ve %0.5 Tween-80

ile zenginleştirilmiş yaklaşık 10 ml Middlebrook 7H9 buyyonu içeren steril tüplere alınmalıdır.

Deri lezyonu : Biyopsi örneği alınacaksa fiksatif ve koruyucu içermeyen kaplarda gönderilmeli, aspirasyon yapılacaksa enjektör kullanılmalıdır. Eğer biyopsi ve aspirasyon yapılamıyorsa eküvyonla alınacak örnek transport besiyerinde gönderilmelidir. Biyopsi örneği lezyonun periferinden alınmalıdır.

Dışkı : Son zamanlarda AIDS hastalarının dışkılarından *M.aviumin* kompleks'in sıklıkla izole edilmesi nedeniyle dışkı örneklerinin aside dirençli bakteriler yönünden incelenmesi önem kazanmıştır. Rutin olarak kullanılmayan bir örnektir. Dışkıda saprofit mikobakteriler her zaman bulunabilir. Bu nedenle, kültür; yaymada çok miktarda aside dirençli basil görüldüğünde yapılmalıdır (25,26,27).

1.7.1 - Mikobakterilerin boyanma özellikleri ve boyama yöntemleri:

Aside dirençli bakteriler hücre duvarlarında yer alan yüksek miktardaki lipidler nedeniyle zor boyanırlar. Aside dirençli bakterilerde hücre duvarı bir kez boyayı aldıktan sonra, asit-alkolle dekolorize edilse bile bırakmaz. Klinik örnekteki diğer bakteriler boyayı geri verirler. Bu nedenle aside dirençli olarak adlandırılır. Boyama yöntemlerinde aside dirençli bakteriler ilk uygulanan boyanın rengini alırken, diğer bakteriler dekolorizasyondan sonra uygulanan zıt boyanın renginde görünürler. Örnekte basilin gösterilebilmesi için mm'de 5000-50000 bakteri bulunmalıdır.

Lam üzerinde toz, kristal, elyaf veya çizik bulunması yanlış pozitif sonuçlara neden olabileceğinden, kullanılacak lamlar temiz ve çizilmemiş olmalıdır. Lamın bir ucuna hastanın adı veya protokol numarası yazılmalı ve örnek lamın üzerinde belirli bir alana yayılmalıdır.

Havada kurutulduktan sonra 3-4 kez alevden geçirilerek tespit edilmelidir. Hazırlanmış preparatlarda mikobakterileri görmek için iki tür boyama yöntemi kullanılır. Bazik fuksin (karbol fuksin) boyasının kullanıldığı Ziehl Neelsen ve Kinyonun boyama yöntemlerinde mikobakteriler mavi zemin üzerinde kırmızı çomaklar şeklinde görülürken, fluorokrom yönteminde (Auromine 0 Rhodamine B) kullanılan filtre sistemine göre sarı-portakal rengi fluoresans verirler. Bazik fuksin boyama, yöntemlerinde, hazırlanan preparatlar 100x immersiyon objektifinde, fluorokrom boyama yöntemiyle hazırlanan preparatlar ise 25x veya 40x objektif ile

incelenir. Bir preparata pozitif diyebilmek için 300 sahada en az 3 basil görmek gerekir, 1-2 basil şüphelidir. Bu durumda yeniden numune istenir. Negatif sonuç vermek için en az 10 dakika ve 250-300 alan incelenmelidir (1,3,8,28).

Mikroskopik inceleme, yeni olguların tesbiti, tedaviye cevabın izlenmesi, ilaca dirençli vakaların ortaya konması ve hastaneden çıkarma gibi birçok konuda değerli ipuçları verir. Tedavi ile önce kültür, sonra yayma negatifleşir. Tedaviye rağmen preparattaki bakteri sayısında azalma olmaması, ilaç direncini düşündürür (1).

Mikobakterilerin aside dirençli olarak boyanmaları, klinik örnek tanımlamalarında kullanılan en basit ve en hızlı yöntem olarak bildirilmekle birlikte, dikkatli olunması gereken bazı durumlar bulunmaktadır. Bazı bakteri cinsleri (*Nocardia*, *Cornebacterium*, *Rhdococcus*) kısmi olarak aside dirençli boyanabilirler. INH tedavisi gören hastalarda ölü mikobakteriler bazik fuksin boyası ile boyanma yeteneklerini kaybederken, fluorokrom boyası ile boyanabilmektedir. Bu durum yalancı pozitifliğe neden olabilmektedir. Bu olumsuzluklar nedeni ile mikobakteri infeksiyonlarının tanısında preparat ve kültür sonuçları birlikte yorumlanmalıdır. Sadece preparat sonucu ile tanı yapılmamalı klinisyen ile işbirliği içinde hastanın kliniği dikkate alınmalıdır (1,29).

1.7.2 - Klinik örneklerin işlenmesi

Klinik örneklerin işlenmesi ve bunu takip eden işlemler laboratuvar personeli ve diğer çalışanların sağlığı açısından biyolojik emniyet kabiniinde yapılmalıdır.

Mikobakterilerin araştırılması için laboratuvara gönderilen birçok klinik örnek, mikobakterilerle birlikte kontaminan bakteriler mantarlar ve vücut sıvıları, lökosit, eritrosit, doku gibi kalıntıları da içerir. Kontaminan bakteriler, mikobakterilerden daha çabuk üredikleri için kültür yapılan besiyerlerinde mikobakterilerin çoğalmasını inhibe ederler. Bu nedenle klinik örneklere, kontaminan bakteri ve mantarları ortadan kaldırmak için dekontaminasyon işlemi uygulanır.

İdeal bir dekontaminasyon-homojenizasyon solüsyonu, klinik örnekteki organik kalıntıları, kontaminan olan bütün mantar ve bakterileri yok etmeli, mikobakterilere zarar vermemelidir. Bununla birlikte en iyi koşullarda bile "dekontaminasyon" işleminden sonra klinik örnekte ancak %10-20 kadar mikobakteri canlılığını sürdürebilmektedir. Bu nedenle dekontaminasyon işleminde

mikobakterilere en az zararı verecek yöntem seçilmelidir (3,8).

Bugüne kadar çok sayıda dekontaminasyon-homojenizasyon yöntemi tarif edilmiştir:

1. N-acetyl-L-Cystein-NaOH (NALC-NaOH) yöntemi,
2. NaOH yöntemi,
3. Zefiran-trisodyum-fosfat (ZTSP) yöntemi,
4. Oksalik asit yöntemi,
5. Sefilpridinyum klorid-Sodyum klorid (CPC-NaCl) yöntemi,
6. Sülfirik asit yöntemi.

Tüm yöntemlerde incelenecek klinik örneğin bulunduğu tüplere, örneğin bir katı olacak şekilde dekontaminasyon solüsyon ilave edilir ve genellikle 15-20 dakika oda ısısında bekletilir. Bu süre içinde tüpler arasına el ile veya veorteks ile çalkalanır. Süre dolduğunda tüplere pH 6.8'de fosfat tamponu (PBS) veya distile su ilave edilerek 3000-4000 devirde santrifüjde çevrilir; Klinik örneğin *Pseudomonas* cinsinden bakterilerle kontamine olduğu düşünülüyorsa, oksalik asit yöntemi tercih edilir. İdrar örneklerinin kontaminasyonu diğer yöntemler kullanıldığında önlenemiyorsa, sülfirik asit yönteminin seçilmesinin uygun olacağı bildirilmektedir. Normalde steril olduğu düşünülen beyin-omurilik sıvısı, vücut sıvıları ve kan gibi örneklere dekontaminasyon işlemi uygulanmaz ve bu örnekler direkt olarak besiyerlerine ekilirler (3,8).

1.7.3 - Mikobakterilerin üretilmesinde kullanılan besiyerleri:

Mikobakterilerin üretildiği besiyerlerinin esası genellikle yumurta-patetes temeli veya serum agar temeline dayanmaktadır. Yumurta içeren besiyerleri gliserol, tuz ve süt gibi çeşitli maddeleri, yumurtanın tümü veya sarısını birlikte içerirler. Bu besiyerlerinin çoğuna, kontaminasyonu minimuma indirmek için malaşit yeşili veya diğer anilin boyaları katılır.

Agar temelli besiyerleri mikobakterilerin üreme süresini kısaltmak için kullanılmaktadır. Klinik örneklerin ekildiği agar temelli besiyerleri incelendiğinde birçok pozitif mikobakteri kültüründe koloniler inkubasyondan 7-10 gün sonra

görülebilmektedir. Bu tip besiyerlerinin %5-10 CO₂'li inkübasyon ortamının yumurta temelli besiyerlerindeki üremeyi de arttırdığı bilinmektedir (12,30,31).

Mikobakterileri üretmek için üç grup besiyeri kullanılmaktadır (1,3,8,12) :

1-Sentetik besiyerleri : Long, Sauton, Beck, Proskauer, Lookeman besiyerleridir. Genellikle BCG aşısı hazırlamada ve tüberkülin elde edilmesinde kullanılır.

2-Yarı-sentetik besiyerleri : Dubos, Youmans, Kirschner, Middlebrook besiyerleridir. Bol miktarda bakteri üretmek için kullanılır.

3-Organik maddeler içeren yumurtalı besiyerleri : L-J, Petragani, Trudeau, Dorset, Besredka ve American Thoracic Society besiyerleri örnektir. Klinik örneklerden ilk izolasyonda kullanılır.

Mikobakteriler ilk izolasyonda içinde yumurta-patates veya serum-agar bulunan kompleks besiyerlerine ihtiyaç duyar, daha sonraki pasajlarda basit sentetik besiyerlerinde de üreyebilir. İlk izolasyonda en sık kullanılan besiyeri L-J'dir. İçinde tam yumurta, patates unu, gliserol, çeşitli tuz-mineraller ve malaşit yeşili vardır. Malaşit yeşili, mikobakterileri etkilemeyen ancak bir çok bakterinin üremesini engelleyen bir madde olarak tüm besiyerlerinde bulunur. Yumurtasız besiyerleri içinde en sık kullanılan besiyeri Middlebrook' tur. 7H9 sıvı, 7H10, 7H11 ve 7H12 ise katıdır. Katılaşma agarla sağlanır. Bu nedenle besiyeri saydamdır. Koloniler 12-14 gün içinde mikroskopla görülür hale gelir (1,8).

1.8 - KÜLTÜR :

Mikobakteriyel enfeksiyonların tanısı için laboratuvara gönderilen klinik örnekler, dekontaminasyon işleminden sonra 3000-4500 devirde santrifüj de çevrilir, üst sıvı döküldükten sonra, dipteki çökelti kullanılan dekontaminasyon yöntemine uygun bir solüsyonla nötralize edilir.

Steril olan klinik örnekler (beyin-omurilik sıvısı, plevra sıvısı, periton sıvısı,

perikard sıvısı ve diğer vücut sıvıları, kan, doku biyopsileri) 3000-4500 devirde santrifüj edildikten sonra besiyerlerine direkt olarak ekilirler. Kültürler ekildikten sonra bir gün yatık olarak 37 °C'de bekletilir. Ertesi gün ağzı iyice kapatıldıktan sonra inkübasyona devam edilir. Mikobakteriler zorunlu aerob bir bakteridir. %5-10 CO₂ üremeyi artırır. Optimal ısı 37 °C ve pH 7'dir. Ancak pH 6.0-7,6 arasında çoğalabilir. Yumurtalı besiyerinde kolonileri 2-3 hafta sonra görülmeye başlar ve ilk görünüşleri küçük, kuru, girintili-çıkıntılı, granüler ve kirli beyaz renktedir. Birkaç hafta sonra koloniler büyür basık, çevreleri düzensiz ve karnıbahara benzeyen merkezleri olan tipik koloniler oluşmaya başlar. Klinik örneklerden izole edilen mikobakterilerin tür tanıları yapılırken üreme ısısı, koloni morfolojisi, pigmentasyon özellikleri incelenir ve çeşitli biyokimyasal deneyler uygulanır (1,3,8,26,32).

1.8.1 - Mikobakterilerin İdentifikasyonu :

Klinik örneklerden izole edilen mikobakterilerin tür tanıları yapılırken üreme ısısı, koloni morfolojisi, pigmentasyon özellikleri incelenir ve çeşitli biyokimyasal deneyler uygulanır. Biyokimyasal deneylerde niasin, TCH'a (thiophene-2-carboxylic acid hidrazide) duyarlılık, nitrat redüksiyonu, semikantitatif katalaz (>45 mm), 68 °C'de katalaz, Tween-80 hidrolizi (5 gün), tellurit redüksiyonu (3 gün), %5 NaCl toleransı, Fe (demir) alımı, arilsülfataz (3 gün), MacConkey agarda üreme, üreaz ve pirazinamidaz (4 gün) aktiviteleri gibi özellikler incelenir.

Klinik örneklerden en çok izole edilen mikobakteriler, *M.tuberculosis* kompleks (*M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.africanum*, *M.microti*) suşlarıdır.

M.tuberculosis, mikroskop incelemesinde ince, bazen uçları hafifçe kıvrık çomaklar şeklinde görülür. Balgam veya diğer klinik örneklerden yapılan preparatlarda tek, ya da ikili, üçlü gruplar halinde birbirlerine paralel veya uçlarından birbirlerine yaklaşarak X, V, L harfleri oluşturacak şekilde birarada bulunabilirler.

M.tuberculosis suşları katalaz pozitifdir, ancak 68°C'de 20 dakika ısıtıldıklarında katalaz oluşturmazlar. İzole edilen INH'e dirençli suşlar katalaz negatifdir. Bu suşlar yumurtalı besiyerinde S şeklinde koloni yaparlar. Nitrat redüksiyonu ve niasin pozitifdir. Nitrat redüksiyonu ve niasin deneyleri *M.tuberculosis* suşlarını *M.bovis* suşlarından ayırmak için kullanılan önemli deneylerdir.

M.bovis, yumurtalı besiyerlerinde, 37°C'de, 3. haftadan sonra küçük, ince,

hafifce kabarıklık, daha düzgün kenarlı, beyazımsı saydam, şeffaf ve nemli koloniler oluşturur. Besiyeri içinde gliserin bulunması süreyi uzatabilir veya üremeyi durdurur. *M.tuberculosis*'e nazaran daha geç ve güç ürediğinden *M.bovis*'e güç gelişen basillerde denir. Ayrıca mikroaerofiliktir. Niasin reaksiyonu ve nitrat redüksiyonu deneyleri negatiftir. TCH'a duyarlıdır ve bu özellikleri diğer mikobakteri türlerinden ayrılmalrı için kullanılır (1,12).

Görünüm ve boyanma özellikleri *M.tuberculosis*'e benzer. Yumurta besiyerindeki kolonileri basık mat ve R koloni görünümündedir. Besiyerlerinde sodyum piruvat bulunması üremeyi hızlandırır. Diğer özellikleri *M.tuberculosis* ile *M.bovis* arasında bir durum gösterir (3,12).

M.haemophilum, *M.marinum* veya *M.ulcerans* enfeksiyonu şüphesi varsa inkübasyon sıcaklığı 30°C olmalıdır. Ayrıca *M. haemophilum* üremesi için ortama çikolata besiyeri gibi demir bileşikleri sağlayacak bir kaynak eklenmesi gerekir.

Mikobakterilerin biyokimyasal özellikleri Tablo 4'de gösterilmiştir (3).

- **NK** : Nonkromojen
- **FK** : Fotokromojen
- **SK** : Skotokromojen
- + : Suşların % 85'i
- +/- : Suşların % 50-84'ü
- -/+ : Suşların % 16-49'u
- - : Suşların % 15'i
- **D** : Değişken

Tablo 4 : Mikobakterilerin Biyokimyasal Özellikleri (3).

Tür	Üreme Isısı			Pigmentasyon	Niasin	TCH'e Duayrılık	Nitrat Redüksiyonu	Semikantitatif	68 ⁰ Katalaz	Tween-80 Hidrolizi (5 Gün)	Tellürit Redüksiyonu	%5 NaCl Toleransı	Demir Alımı	Aril Sülfür (3 Gün)	MacConkey'de	Üreaz	Pirazinamidaz	Asit Fosfataz
	25 ⁰	37 ⁰	45 ⁰															
TB	<i>M. tuberculosis</i>	-	+	-	NK	+	-	+	-	-	-/+	-	-	-	-	+	+	-/+
	<i>M. bovis</i>	-	+	-	NK	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
I.	<i>M. marinum</i>	+	+	-	FK	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
	<i>M. kansasii</i>	+	+	-	FK	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
	<i>M. simiae</i>	+	+	-	FK	-/+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-/+	-
II	<i>M. scrofulaceum</i>	+	+	-	SK	-	-	-/+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
	<i>M. szulgai</i>	+	+	-	SK	-	-	+	+	+	-/+	-	-	-	-	+	+	+
	<i>M. goodii</i>	+	+	-	SK	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-/+
	<i>M. flavescens</i>	+	+	-	SK	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-/+
	<i>M. xenopi</i>	-	+	+	SK	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
III	<i>M. avium-Intr</i>	+	+	-/+	NK	-	-	-	-	+	-	+/-	-	-	-	-	+	-
	<i>M. gastri</i>	+	+	-	NK	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
	<i>M. malmoense</i>	+	+	-	NK	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
IV	<i>M. fortuitum</i>	+	+	-	NK	-	-	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+	-/+	+
	<i>M. chelonae</i>	+	+	-	NK	-	-	-	+	+	-	+	D	-	+	+	+	+
	<i>M. phlei</i>	+	+	+	SK	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	<i>M. smegmatis</i>	+	+	+	NK	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-

1.8.2 - Biyokimyasal Özellikler :

1) **Niasin Testi** : Bütün mikobakteriler niasin ribonükleotid üretirler. Ancak *M. tuberculosis*, *M. simiae* ve *M. chelonae*'nın bazı suşları niasini nikotinamid adenin dinükleotide (NAD) dönüştürecek enzime sahip değildirler. Besiyerlerinde biriken niasin gösterilebilir. Niasin negatif tüberküloz suşları çok azdır. Niasin testi *M. tuberculosis*'in identifiye edilmesinde tek başına kullanılmamalıdır, sonuçlar nitrat redüksiyonu ve ısıya stabil katalaz testi ile doğrulanarak sonuç verilmelidir (12,33).

2) **Nitrat Redüksiyonu Testi** : Mikobakteriler nitroredüktaz enzimi üreterek nitratları nitritlere indirgeyebilirler. Nitrat redüksiyonu testi; koloni morfolojisi, üreme hızı ve pigment üretme özellikleri birbirine benzer mikobakterileri ayırt etmede kullanılır. *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. smegmatis* ve *M. fortuitum*'da nitrat redüktaz olumludur (12,33).

3) **Katalaz Testi** : Katalaz hidrojen peroksidi su ve oksijene ayıran bir hücre içi enzimdir. Oksijenin oluşumu hava kabarcıklarının oluşumu ile ortaya çıkmaktadır. Katalaz enziminin bazı formları 68 °C'de 20 dakika ısıtılınca inaktive olur. Enzimin ısısı ile inaktivasyonu bazı mikobakteri türlerini ayırt etmede kullanılmaktadır. Mikobakteri türlerinin identifikasyonunda kullanılan hidrojen peroksit, diğer bakterilerde bulunan enzimin araştırılmasında kullanılan ayıraçtan farklıdır. Hidrofobik ve kümeli olan mikobakterilerin dağılmasını ve enzimin kolayca açığa çıkmasını sağlamak için testte %30 H₂O₂ (Superoxol) ile güçlü bir deterjan olan %10 tween 80'nin karışımı kullanılır. İki farklı yöntem kullanılır (12,33).

- Isıya Stabil Katalaz Testi
- Semikantitatif Katalaz Testi

4) **TCH'a (thiophene-2-carboxylic acid hydrazide) Duyarlık** : *M. tuberculosis* ve diğer yavaş üreyen mikobakterilerin çoğu TCH'a dirençlidir. *M. bovis* ise TCH'a duyarlıdır ve TCH'lı besiyerinde üreyemez. Bu test genellikle *M. tuberculosis* ve *M. bovis* ayırımında kullanılır (12,33).

5) **Pirazinamidaz Testi** : Pirazinamidaz enzimi pirazinamidi (PZA) pirazinoik asit ve amonyoğa hidrolize eder. Pirazinoik asit besiyerine ferröz amonyum

eklenmesi ile saptanabilir. Bu test; *M. marinum*'u *M. kansasii*'den ve *M. tuberculosis*'i *M. bovis*'ten ayırmada kullanır (12,33).

Fotokromojen grup: Bu gruptaki mikobakteriler karanlıkta üredikleri zaman kolonileri pigmentsiz oldukları halde bir süre ışığa karşı bırakıldıklarında portakal sarısı renginde bir karatenoid pigment oluştururlar.

M.kansasii, direkt boyalı preparatlarda *M.tuberculosis*'den daha uzun ve daha kalın olarak görünür. Aside dirençli boyamada bazı bölgeleri koyu, bazı bölgeleri açık şekilde boyandığından boncuk dizisini andırır biçimde görünür. Bakterinin bu farklı morfolojik görüntüsü laboratuvar tanıda önemli bir ipucudur. İçinde gliserol ve yumurta bulunan besiyerlerinde, karanlık ortamda, 37°C'de, 10-21 günlük inkübasyondan sonra krem, ortası kabarık, kenarları daha ince, ara formda (ne S, nede R) koloniler oluşturur. Koloniler uzun süre ışığa maruz kalırsa limon veya portakal sarısı renge dönüşür. Işıkla temas süresi uzarsa, renk kırmızılaşır ve hazırlanan preparatlarda basil üzerinde tipik, kırmızı β-karoten kristalleri görünür. İçinde oleik asit ve albumin bulunan besiyerlerinde meydana gelen kolonilerin kenarları daha düzgündür. İnsanlarda tüberküloza benzer nitelikte kronik bir akciğer enfeksiyonu oluşturur. Son yıllarda özellikle yüzme havuzu ile ilgili deri-yumuşak doku enfeksiyonları, artrit ve osteomyelitli olgulardan giderek artan sıklıkta izole edilmeye başlamıştır.

M.marinum: İlk izolasyonda optimal üreme ısısı 30-32°C'dir. Yumurtalı besiyerlerinde, karanlıkta 7-14 günde üstü sarımsı çizgili ve kırışık, grimsi beyaz renkli, R tipi koloniler oluşturur. Bu koloniler oda ısısında, ışıklı ortamda, portakal sarısı renge dönüşür ve zamanla kırmızılaşır. İçinde oleik asit ve albumin. bulunan besiyerlerindeki koloniler nispeten daha düzgün kenarlı ve konvekstir. *M.kansasii*'den 25°C'de daha çabuk üremesi, negatif nitrat redüksiyonu ve zayıf katalaz oluşturmasıyla ayrılır. Yüzme havuzları ve akvaryumlardan soyutlanan bu bakteri buralarda yüzen veya çalışan insanlarda deride oluşan küçük travmatik yaralardan girerek yüzme havuzu granüloması adı verilen bir hastalık oluşturur.

M.simiae: İnsanlarda çok nadir enfeksiyona neden olur. Yumurtalı besiyerlerinde, 37°C'de, 7-14 günde, düzgün kenarlı, konveks, küçük koloniler oluşturur. Deve tüyü rengindeki koloniler uzun süre ışığa maruz kaldığında hafif

sarıya döner. Klinik önemi olan mikobakteriler içinde *M.tuberculosis*'den sonra niasin üreten en önemli bakteri *M.simiae*'dir. Kuvvetli katalaz aktivitesine sahiptir. Tween 80'i geç hidroliz eder.

Skotokromojen mikobakteriler: Aydınlıkta ve özellikle karanlıkta pigment oluşturan bakteriler bulunur. Bu özelliklerini ortaya çıkarmak için kültürlerin incelenmesi sırasında uzun süre dışarıda gün ışığında kalmamasına dikkat etmek gerekir, üremeleri nisbeten fazla olup 10-28 gündür.

M.scrofulaceum: *M.tuberculosis*'den daha kalın ve uzun olan basil, sıklıkla, boncuk dizisi gibi görünür. Katı besiyerlerinde 37°C'de 10-28 gün içinde oldukça yoğun, düzgün, kubbe şeklinde, terayağı kıvamında ve S tipinde koloniler oluşturur. Karanlıkta sarımsı-portakal renginde olan koloniler ışığa maruz kalınca, tuğla kırmızısına döner. Tween hidrolizi oldukça zayıftır. Nitratları nitritlere indirgemez. Bu iki özellik skotokromojen grubu mikobakterileri diğer mikobakterilerden ayırımında kullanılır. Çocukluk çağı lenfadenitlerinden birinci dereceden sorumludur.

M.szulgai: 37°C'de skotokromojen, 25°C'de fotokromojen karakter gösterir. Yumurtalı besiyerlerinde 12-28 gün içinde portakal sarısı renkli bazıları S, bazıları R tipinde koloniler oluşturur. Nitrat redüksiyonu, katalaz ve üreaz pozitifdir. Niasin negatiftir.

M.gordonae: Katı besiyerlerinde 7-14 gün içinde koyu sarı, portakal renginde, düzgün koloniler oluşturur. Tween hidrolizi ve katalaz pozitifdir. Niasin ve üreaz negatiftir.

Kromojen olmayan mikobakteriler: Bu grup içinde yer alan mikobakteriler ışığa maruz bırakıldıklarında pigment oluşturmazlar. Kolonileri genellikle 7 günden daha sonra ortaya çıkar. Genellikle tüberküloz ilaçlarına karşı dirençli ve deney hayvanları için non-patojendir.

M.avium-intracellulare: 37°C'de en az 10 günde ürer. Polimorfizm gösterirler. Kok şekillerinden uzun çomakçıklara kadar şekilleri vardır. Yumurtalı besiyerlerinde kubbe ve piramit yada küre biçimli koloniler yaparlar. Bazı suşlar kültürün yaşlanmasıyla sarı renkli pigment oluşturabilir. Bakterinin virulansı ile koloni morfolojisi arasında ilişki vardır. Düzgün şeffaf koloni oluşturan suşların konak hücre içinde daha hızlı replike olduğu ve anti-tüberküloz ilaçlara daha dirençli

olduğu gösterilmiştir. Büyük bir çoğunluğu niasin negatiftir ve nitratı redükte etmezler. Az miktarda katalaz oluştururlar. Tween-80 hidrolizi 10 günden fazla sürer.

M.malmoense: 37°C'de 2-3 haftada, 22°C'de 7-8 haftada ürer. Kolonileri renksiz, düzgün, grimsi beyaz, opak ve yuvarlak koloniler oluşturur. Niasin reaksiyonu ve nitrat redüksiyonu negatif, Tween-80 hidrolizi ve pirazinimidaz pozitifdir.

M.haemophilum: Üremesi için, hemoglobin veya hemine ihtiyaç duyarlar. Kısa, kıvrık ve kuvvetli aside dirençli boyanma özelliği gösteren bir bakteridir. X faktörü eklenmiş Middlebrook 7H10 agar, %2 ferrik amonyum sitratlt L-J, %5 koyun kanlı Colombia agar ve çikolatamsı agar besiyerinde 28-32°C'de ürer. 2-4 haftada pigmentsiz, S veya R tipinde koloniler oluşturur. Pirazinamidaz dışında diğer biyokimyasal testleri negatiftir. Özellikle deri lezyonlarından izole edilmektedir.

Çabuk üreyen mikobakteriler: Genellikle 3-5 günde üreme gösterirler. Çoğunlukla saprofittir. Ancak özellikle *M.fortuitum* ve *M.chelonae* son yıllarda MOTT ile oluşan infeksiyonlarda, potansiyel patojen olarak sıkça izole edilmeye başlanmıştır. Difteroidlere benzeyen aside dirençli basillerdir.

M.fortuitum ve *M.chelonae*, pleomorfik bakterilerdir. Kısa veya uzun, ince veya kalın basil biçiminde olabileceği gibi, ince dallanmış flemanlar şeklinde de görülebilirler. Katı besiyerlerinde 2-4 gün içinde oluşan koloniler beyaz veya krem renginde, düzgün kenarlı ve konveksdir. *M.fortuitum*, diğer çabuk üreyen saprofit mikobakterilerden, 3 günde arilsülfataz reaksiyonunun pozitif oluşu ve MacConkey agarda 5 günde üremesiyle ayırt edilir. Nitrat redüksiyonu pozitif, penisilinaz ve trehaloz negatiftir. Ayrıca fruktozdan asit oluşturur. *M.chelonae*'den ayrılmasında bunlar kullanılır. *M.chelonae* NaCl'e olan dirençlerine göre iki alt gruba ayrılır. *M.chelonae* subsp *chelonae* NaCl'e dirençsiz, *M.chelonae* subsp *abscessus* NaCl'e dirençlidir. Genellikle deri lezyonu yaparlar.

M.smegmatis, *M.phlei* ve *M.vaccae* saprofittir. *M.smegmatis* ve *M.phlei* pigmentli koloniler oluştururlar.

M.fallax, katı besiyerinde kord faktör oluşturduğundan *M.tuberculosis*'e benzer. 30°C'de çabuk, 37°C'de yavaş ürer. Nitrat redüktaz pozitif, katalaz, arilsülfataz ve üreaz negatiftir (1,3,8,12,33).

1.8.3 - Radyometrik yöntem (BACTEC TB460) :

Son on yılda geliştirilen ve mikobakterilerin kültürünün yapılmasında en iyi tekniklerden birisi olarak kabul edilen BACTEC TB 460 sisteminde, BACTEC 12B ve BACTEC 13A olmak üzere iki tip besiyeri kullanılır. Mikobakteriler besiyerinde bulunan ^{14}C işaretli substratı (yağ asidi-palmitik asit) kullanırlar ve besiyerinin üzerindeki atmosfere $^{14}\text{CO}_2$ çıkarırlar. Besiyerlerinde üreme varsa, BACTEC 460 cihazında yapılan kontroller sırasında şişeden $^{14}\text{CO}_2$ çekilir ve radyoaktivitesi 0-999 sınırları içinde sayısal olarak belirlenir. Bu sayılar üreme indeksini gösterir (GI). Steril olmayan klinik örnekler dekontamine homojenize ve nötralize edildikten sonra 0.4 - 0.5 ml olarak BACTEC 12B besiyerine, steril olan klinik örnekler 5 - 6 ml olarak şekilde direkt olarak BACTEC 13A besiyerine ekilir. Kontamine olmuş kültürlerde mikobakterilerin izolasyon şansını arttırmak ve mix mikobakteriyel enfeksiyonlarda etken olan türleri saptamak amacıyla BACTEC besiyerleri ile birlikte en az bir adet katı besiyeri kullanılır. Ekim yapılan BACTEC besiyerleri 6 - 8 hafta süre ile 37 °C'de bekletilir ve ilk iki hafta haftada 2 kez, sonraki haftalarda haftada bir kez kontrolleri yapılır. > 10 GI gösteren besiyerleri günlük kontrole alınarak, pozitif kültürlerle, identifikasyon duyarlık deneyleri uygulanır. NAP(p-nitro-a-asetil amino- β hidroksipropiofenon) testi, *M.tuberculosis* complex ve MOTT suşlarının ayırımında kullanılan 2-5 günde sonuç veren biyokimyasal bir deneydir. *M.tuberculosis* complex suşları NAP varlığında üreme göstermezken, MOTT suşları üreme gösterir ve $^{14}\text{CO}_2$ çıkarırlar. $^{14}\text{CO}_2$ 'ün üreme indeksi (GI) sayısal olarak belirlenir. Bu yöntemle kısa sürede antibakteriyel duyarlılık incelemesi de yapılabilmektedir (2,8,30).

1.8.4 - Dio-TK MEDIUM Kültür Yöntemi :

Diomed ARGE laboratuvarında geliştirilen Dio-TK MEDIUM Besiyeri, çoklu renk ayracı kimyasından yararlanarak hazırlanmış kırmızı renkli bir besiyeridir. Ekilen örnekte mikobakteri bulunması durumunda, inkübasyon ile mikobakterilerin ürettiği metabolik ürünlere bağlı olarak besiyerinin rengi kırmızıdan sarıya döner. Bu, bakteri kolonilerinin görünür hale gelmesinden çok daha erken gerçekleştiğinden, üreme varlığı erkenden saptanmış olur. Yapılan ön çalışmalarda bu sürenin diğer hızlı kültür sistemleri ile yaklaşık aynı uzunlukta olduğu saptanmıştır. Birçok mantar ve bakteri kontaminasyonu varlığında Dio-TK MEDIUM besiyerinin rengi yeşile dönerek üremenin mikobakteri dışında bir organizmaya ait olduğunu gösterir. Böylece kontaminasyon varlığı henüz mikroskopi yapılmadan önce anlaşılabilir olur.

Dio-TK Besiyeri çeşitli antimikrobiyal maddeler (Poly-PANT) eklenerek, diğer hızlı kültür sistemleri gibi seçici olarak da hazırlanabilmektedir. Seçici Dio-TK Besiyerinde (Dio-TK SLC) kontaminasyonun çok daha az görüldüğü belirlenmiştir. Poly-PANT şu antimikrobiyal maddelerden oluşmaktadır: Polymixin B 5µg/ml, Piperacillin 50µg/ml, Amphotericin B 25µg/ml, Nalidixic acid 20µg/ml, Trimethoprim 2µg/ml. Para-nitro-benzoik asit (PNB 750µg/ml) içeren Dio-TK Besiyerinde (Dio-TK PNB), tüberküloz ve tüberküloz dışı mikobakterilerin ayrımı hızlı bir şekilde yapılabilmektedir. PNB, *M. tuberculosis* kompleks suşlarının üremesini engellerken atipik mikobakterilerin üremesine izin vermektedir (34).

1.8.5 – Diğer Tanı Yöntemleri :

Mikobakteri üremesi, ortamdaki oksijenin tüketilmesine bağlı olarak floresans veren bir madde içeren tüpte (Mycobacteria Growth Indicator Tube, MGIT), kültür yapılarak gösterilir. Tüp dibinde silikona gömülü floresan bir madde bulunur. Besiyerindeki oksijen floresansı engeller. Bakteri tarafından tüketilince floresans oluşur. Üremeye bağlı floresans 365 nm dalga boyundaki ultraviyole ışığı ile görülür. Üreme ortalama 10 günde saptanabilmektedir. Yapılan çalışmalarda duyarlılığı %76-95, özgüllüğü ise %76.9-100 olarak bildirilmiştir (25,35,36).

Haberci mikobakteriyofaj :

Haberci mikobakteriyofaj, mikobakterileri enfekte edebilen ve basıl içerisinde kolayca saptanabilen bir ürün oluşturan virüstür. Tüm mikobakterilerde ya da sadece *M.tuberculosis*'te çoğalabilen fajlar vardır. Ateş böceğinin ışık üretmesinden sorumlu lusiferaz enzim geninin bu fajlara klonlanması ile haberci fajlar elde edilmiştir. Bu enzim ATP varlığında luseferini oksitler ve bu sırada ışık oluşmasına yol açar. Klinik örneklerde bu faj ile enfekte edilen basiller lusiferin eklendiğinde ışık oluşturarak karanlık alanda kolayca görünür duruma gelirler. Bu yöntem dört saat gibi kısa bir sürede tamamlanabildiğinden mikobakterilerde ilaç direncinin çabuk belirlenmesinde en umut veren yöntemler arasına girmiştir (25,35).

Serolojik yöntemler :

Tüberküloz tanısı için kullanılmaya çalışılan en eski yöntemlerdendir.

Günümüze kadar pek çok çalışma yapılmış ve olumlu sonuçlar alınamamıştır. Kullanımını kısıtlayan etken, özgüllüklerinin düşük olmasıdır. Bunun önemli nedeni, çevrede yaygın olarak bulunan *M.tuberculosis* dışındaki mikobakterilerin çapraz tepkimeye yol açan antijenleri ile sıklıkla karşılaşılmasıdır. En sık kullanılan serolojik yöntem ELISA ile yapılmaktadır. Serolojik testlerin duyarlılığı %60-80'dir. Özgüllüğü ise hücre yüzey antijenlerine özgü monoklonal antikör yanıtı arandığında %100'e yaklaşmaktadır. Serolojik tanı teknik açıdan mümkün görünmektedir, ancak genellikle olumlu sonuçlar, hastalığın ilerlemiş devrelerinde elde edilmektedir. Bu tür olgularda klasik mikroskopi ve kültür yöntemleri çoğunlukla pozitif sonuç verdiği için, serolojik yöntemlerin tanıya ek bir katkısı olmamaktadır (8,25,35).

Adenozin deaminaz (ADA) :

Pürin metabolizmasında işlevi olan bir enzimdir. Plevra, periton, perikard ve beyin-omurilik sıvılarında, bu boşluklarda tüberküloz bulunduğu zaman ADA düzeyinin yükselmiş olduğu belirlenmiştir. Tüberküloz menenjit olgularında, ADA anlamlı ölçüde artmış bulunurken, plevral sıvı örneklerinde tüm olgularda böyle kesin ayırım yapılabilmesini sağlayacak yeterli farklılık gösterilememiştir (8,35).

Nükleik Asit Hibridizasyon Yöntemleri :

Mikobakterilerin kromozomal DNA veya ribozomal RNA'larının, bunlara özgül olarak bağlanabilen DNA veya RNA problemleri yardımı ile, tür düzeyinde belirlenmesi günümüzde mümkün hale gelmiştir. Bu yöntemlerin özgüllüklerinin çok yüksek olmasına karşın duyarlılıkları için aynı şey söylenemez. Prob olarak kullanılan moleküllerin örneğe yeterince bağlanabilmesi için örnekte önemli miktarda nükleik asit bulunması gerekir. DNA hibridizasyon tekniğinde klinik örneklerdeki 10³-10⁴ ml gibi az miktardaki mikobakteri DNA'sını araştırmak mümkündür (8,35).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) :

Klinik örneklerde proba bağlanamayacak kadar az hedef DNA bulunabilir. Prob tarafından tanımlanabilen küçük DNA'nın özgül nükleotid sıraları polimeraz enzimi kullanılarak çoğaltılır. Polimeraz enzimi uygun DNA zincirinin sentezlenmesi için ortamda bulunan nükleotidleri polimere eder. Ortamda bulunan hedef DNA parçaları üzerine tamamlayıcı zincir yapımında kullanılacak nükleotid ve araştırılacak her biri

20 nükleotidden oluşan mikobakteri türüne özgül oligonükleotid primeri koyulur. Hedef DNA'nın tek zinciri ile ilişkili olan primerler polimeraz reaksiyonun başlama noktasını oluştururlar. Bu karışım ısıtılarak önce hedef DNA'nın iki zinciri birbirinden ayrılır. Sonra ısı 50°C'ye düşürülerek primerlerin her birinin zincirde bulunan özgül sıralara tutunmaları gerçekleştirilir, 75°C'ye yükseltilerek iki primerin özgül sıralarda tutunduğu noktalar arasında kalan hedef DNA zincirinin polimeraz enzimle birleşmesi sağlanır. Bu işlem 40 kere kadar tekrarlanarak kısa sürede 100 bine yakın DNA parçasının elde edilmesi gerçekleştirilir. Bazı çalışmalarda PCR'ın duyarlılığı %94, özgüllüğü %99 olarak, bazılarında ise duyarlılık %60, özgüllük ise %80'in altında bildirilmektedir. Klinik örnekte bulunan DNA parçalarını serbest hale getirmek, mikobakterileri eritmek, radyoaktiviteyi belirlemek, reaksiyonun çok pahalıya malolması ve yalancı Pozitifliğin çok olması gibi nedenlerle uygulama alanı çok sınırlı kalmaktadır (8,35,36,37).

Gaz likid kromatografisi (GLC) :

Hızlı ve yararlı bir tekniktir. Mikobakterinin hücre duvarında bulunan yağ asitleri ekstre edildikten sonra, yaklaşık olarak iki saat içinde gaz-sıvı kromatografi analizleri yapılabilmektedir. Avantajı mikobakterilerin hücre duvarında bol miktarda mikolik asit bulunması ve bu mikolik asitlerin türe özgü olmasıdır. Çok pahalı bir sistem olduğu için rutinde kullanılmamaktadır (8).

1.8.6 - Antitüberküloz İlaçlara Duyarlılık Deneyleri :

M.tuberculosis'in ve diğer yavaş üreyen mikobakterilerin, tedavide kullanılan primer ve sekonder antitüberküloz ilaçlara duyarlılığını saptamada birçok yöntem tarif edilmiştir. Bunları gruplandırarak olursak;

A) Geleneksel Yöntemler

- 1) Absolü Konsantrasyon Yöntemi
- 2) Direnç-Oran Yöntemi
- 3) Agar-Proporsiyon Yöntemi

B) Yeni Yöntemler

- 1) Radyometrik Yöntem (BACTEC)

- 2) Mikobakteri Büyüme İndikatör Tüp (MGIT)
- 3) Kolorimetrik Yöntem
- 4) Lüsiferaz Taşıyıcı Faj Yöntemi
- 5) Biyoluminesans Yöntem
- 6) Flow Simetri Yöntemi
- 7) E-Test
- 8) Moleküler Yöntemler

Günümüzde M.tuberculosis'in duyarlılık testlerinde, çoğu laboratuvarlar standardize edilmiş ve CDC tarafından önerilen, agar proporsiyon yöntemini veya BACTEC metodunu kullanmaktadırlar.(3,8)

A1) Absolü konsantrasyon yöntemi : Örnek, ilaçların belli konsantrasyonlarını içeren besiyerleri ile ilaçsız kontrol besiyerine ekilir. Spesifik ilaç konsantrasyonunda belli sayıda koloniden fazla üreme saptanması direnç olarak değerlendirilir (8).

A2) Direnç oran yöntemi : Aynı genel prensipleri içerir. Farklı yanı, kontrol için standart bir suş olan H37RV'nin de ilaçlı ve ilaçsız besiyerlerine ekilmesidir. Dirençi bilinmeyen test suşun minimum inhibitör konsantrasyonunun, kontrol suşun MIC'e oranı olarak tanımlanır (8).

A3) Proporsiyon yöntemi : Çeşitli modifikasyonları yapılan bu yöntem NCCLS tarafından standart bir yöntem olarak önerilmektedir. Besiyeri olarak oleik asit, albumin, dekstroz ve katalaz eklenmiş Middlebrook 7H10 veya 7H11 agar, antimikrobiyal ilaç olarak referans toz ilaçlar veya emdirilmiş diskler kullanılır. İnokulum ya ARB pozitif hasta örneğinden direkt olarak veya kültürden indirekt olarak hazırlanır. İnokulumun belli dilüsyonları ilaçlı ve ilaçsız kontrol besiyerine 0.1 ml inoküle edilir. Testin geçerli olabilmesi için kontrol suşun ilaçsız besiyerinde en az 50-150 koloni oluşturması gereklidir. (8,39,40).

B1) Radyometrik yöntem (BACTEC) : Yapılan çeşitli düzenlemeler ve 10 yılı aşkın süredir klinik kullanımı bu testi hızlı ve güvenilir bir yöntem durumuna

getirmiştir. NCCLS tarafından standart bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Yöntemde duyarlılığı yapılacak her suş için, 4 antibiyotikli (SM, INH, RMP, EMB) ve bir antibiyotiksiz olmak üzere 5 adet 12B (Middlebrook 7H12) besiyeri kullanılır. Besiyerlerine her ilaçtan 0.1 ml ve denenecek suştan 0.1 ml ilave edilir. Kontrol şişesinin hazırlanması için, orijinal suş 1/100 oranında sulandırılır

(% 1 direnci saptamak için, bu şişe tüm popülasyonun sadece % 1 'ini içerir) ve bu süspansiyondan 12B besiyerine 0.1 ml ilave edilir. 37°C'de inkübe edilen besiyerleri BACTEC cihazında günlük kontrole alınarak 4-12 gün boyunca kontrol şişesinin GI'i 30 oluncaya kadar takip edilir. Kontrol GI 30 olduğunda, her şişe için bir önceki güne göre GI farkı hesaplanır ve bu fark sayısal olarak değerlendirilir(3,37,38,39,40). Buna göre;

ΔGI (kontrol) > ΔGI (ilaçlı şişe) = duyarlı

ΔGI (kontrol) < ΔGI (ilaçlı şişe) = dirençli olarak yorumlanır

B2) Mikobakteri büyüme indikatör tüp yöntemi (MGIT): Klinik örneklerden mikobakteri izolasyonunu gerçekleştiren hızlı ve duyarlı bir yöntemdir. Her MGIT tüpü 4 ml modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri ve % 0.25 gliserol içerir. Tüpün dip kısmında ise oksijene duyarlı bir floresan indikatör bulunur. Klinik örnekler, içinde belli konsantrasyonlarda ilaç içeren tüplerle birlikte ilaçsız kontrol tüplere de inoküle edilir. İlaçlı tüplerde; duyarlı bakteriler inhibe olacak, dirençli bakteriler ise üreyerek floresans vereceklerdir. Oluşan floresans derecesi antibiyotiksiz negatif kontrol ve % 0,4'lük sodyum sülfid içeren pozitif kontrol tüpleri ile karşılaştırılarak değerlendirilir (39).

B3) Kolorimetrik yöntem : Pratik ve ucuz olan bu yöntemle, bakteriyel metabolizmanın varlığı indikatör olarak kullanılan Alarnar mavisinin renginin pembeye dönüşmesiyle tespit edilir. *M.tuberculosis*'in ilaçlı ve ilaçsız 7H9 sıvı besiyerinde inkübasyonu sonrası, ortama Alamar mavisi eklenerek, kontrol ve ilaç içeren besiyerlerindeki renk değişimi kıyaslanır. Sonuçlar 7-10 gün içinde alınır (40).

B4) Lusiferaz taşıyıcı faj yöntemi : Klonlanan lusiferaz geni, mikobakteriyofajlar aracılığı ile *M.tuberculosis* hücrelerine taşınabilir.

M.tuberculosis'in ilaç duyarlılığını tespit etmek için, lusiferaz geni içeren mikobakteriler, ilaçlı ve ilaçsız ortamlarda 24 saat inkübe edilip, ortama lusiferin eklenmiştir. İlaçsız ortamda, *M.tuberculosis* aktif olarak üremediği için, lusiferaz geninin ekspresyonuna ve ATP'nin varlığına bağlı olarak ışık üretilecektir. İlaç üremeyi baskılıyorsa ışık üretilmeyecektir (8,39).

B5) Biyoluminesans yöntemi : Bu yöntemin esası, yaşayan hücrelerde ATP bulunması, ölü hücrelerde ATP bulunmaması prensibine dayanır. *M.tuberculosis*'in ilaçlı ve ilaçsız 7H9 besiyerinde 10 gün inkübasyonundan sonra ortama, ATP moniterize edici madde eklenir. Luminometre ile ilaçlı ve ilaçsız besiyerlerindeki ölçülen ışık şiddeti kıyaslanarak, ilaç duyarlılığı tespit edilir (8,39).

B6) Flow sitometri yöntemi: Yöntemin esası, *M.tuberculosis*'in floresein diasetatı serbest floreseine hidrolize etmesi ve böylece oluşan floresent mikobakterilerin flow sitometrik analiz ile tespit edilmesi esasına dayanır. Antimikrobiyal ajanlara duyarlı mikobakteriler floresein diasetat'ı önemli ölçüde daha az hidrolize ederler. Bakteri üremesi gerekmediği için 24 saat gibi kısa bir sürede sonuç alınır (8,39,40).

B7) E test : Daha çok hızlı üreyen mikobakteriler için kullanılmakta ise de son zamanlarda *M.tuberculosis* ve *M.avium-intracellulare* için de kullanılabilceği gösterilmiştir. Besiyerinde üremiş ve McFarland 3'e göre bulanıklığı ayarlanmış bakteri süspansiyonu agar yüzeyine yayılır. Üzerine, değişen oranlarda antimikobakteriyel ilaç içeren E test şeritleri konur. Plaklar 5-7 gün süre ile 37°C'de inkübe edilir. Üremenin kuvvetle inhibe olduğu çizginin E test şeridini kestiği nokta, MIG değerini verir. Uygulaması kolay, ucuz ve ümit verici bir yöntemdir (8,40,41).

B8) Moleküler yöntemler : *M.tuberculosis* suşlarında antimikobakteriyel ajanlara direnç, o ilaçların bağlandığı hedef bölgeleri kodlayan genlerde oluşan mutasyonlarla ilişkilidir. Kısa zamanda sonuç vermeleri ve ümit verici olmalarına karşın, belirli bir ilaca karşı direncin olası mekanizmalarının hepsinin tespiti ve her mekanizmanın belirlenmesi için farklı bir yöntem gerekliliği yönünden dezavantaja sahiptirler (8,39,40).

1.9 - TEDAVİ :

Antitüberküloz ilaçların keşfinden önce tüberküloz hastaları senatoryumlara

yatırılarak doğal yollardan tedavi edilmeye çalışılıyordu ancak bu şekilde tedaviden çok fazla yanıt alınamamaktaydı. İlk kez 1944 yılında para-aminosalisilik asit (PAS) bulundu ve hastalara PAS terapisi uygulandı. Daha sonra 1946 yılında Feldman tarafından streptomisin antitüberküloz ilaç olarak uygulanmaya başlandı. Ancak streptomisin terapisine kısa sürede direnç geliştiğinin gözlenmesi ve sık sık relapslara yol açınca streptomisin ve PAS kombine olarak uygulanmaya başlandı. 1953'te İzoniazid ve pirizinamid, 1964'te etambutol, 1971'de rifampisin tedavi uygulamalarına katıldı. 1980 yılında isoniazid ve rifampisin'in kombine tedavisinde tedavi süresinin 9 aya inebileceği görüldü bunlara pirizinamid eklenmesi ile 6 aylık bir sürede uygulanan tedavinin yeterli olabileceği tespit edildi (3,8).

Doğru ve yeterli tedaviye varabilmek için dört ana kritere dikkat edilmelidir. Bunlar;

- 1) Hastalığın Yeri (Pulmoner veya extrapulmoner)
- 2) Hastalığın Ağırlığı
- 3) Balgamdaki basil miktarı
- 4) Daha önce antitüberküloz tedavi alıp almama durumu ve herhangi bir ilaç veya ilaçlara karşı direnç problemi

1.9.1 - Antitüberküloz ilaçlar :

Tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlar başlıca iki gruba ayrılır (3,8,42). Bunlar;

1) Major İlaçlar : Kabul edilebilir düzeyde yan etki ile birlikte en etkili olan birinci sıra ilaçlardır. Bunlar;

- İzoniazid (INH)
- Rifampisin (RFM)
- Pirizinamid (PZA)
- Etambutol (ETM)
- Streptomisin (SM)

Etambutol harici tüm bu ilaçlar bakterisidal etkilidir.

2) Minör İlaçlar : Genellikle daha az etkili daha fazla yan etkiye sahip ikinci sıra ilaçlardır Bunlar ise;

- Para-aminosalisilik asit (PAS)
- Sikloserin
- Etionamid
- Kanamisin
- Kapreomisin
- Viomisin
- Florokinononlar
- Makrolidler
- Beta-laktam Beta-laktamaz İnhibitörleri

1.9.1.1 - Major İlaçlar :

İsoniazid : İsonikotinic asidin hidrazididir. Etki mekanizması tam olarak aydınlatılmamıştır. Ancak mikolik asitlerin sentezinin inhibasyonuna neden olduğu ve bu yolla hücre duvarının bütünlüğünü ve stabilitesini etkilediği sanılmaktadır. Aynı zamanda Koch basilinde zengin olan lipidler üzerinede ve DNA sentezini de etkilediği bilinmektedir. İn vitro deneylerde; İsoniazid dinlenme fazındaki üremeyen tüberküloz basillerine bakteriyostatik, bölünen mikroorganizmalara ise bakterisid etkilidir. İsoniazid suda çözünür ve oral yada paranteral uygulanabilir. Gastrointestinal kanaldan kolayca absorbe edilir ve 1-2 saat içinde serumda 3-5 µg/ml maksimal konsantrasyonuna ulaşır. Antasidlerle birlikte uygulandığında İsoniazidin emilimi azalır. Serum proteinine bağlanmaz ve bütün vücut sıvıları ve dokularına kolayca dağılır. Hücre içi ve hücre dışı düzeyleri birbirine yakındır. İlacın önemli bir diğer özelliği kazeöz tüberküloz lezyonlarına kolayca diffüze olmasıdır. Santral sinir sistemi ve BOS konsantrasyonu plazma düzeyinin yaklaşık 1/5'dir. İsoniazidin yan etkilerinin insidensi ve şiddeti, dozajına ve uygulama süresine bağlıdır. Nörotoksisite, hepatoksisite ve allerjik reaksiyonlar genelde gözlenmektedir. Karaciğer fonksiyon bozuklukları %10-20 oranında görülmesine karşın, klinik görülme sıklığı ancak %1 kadardır (3,42,43,44).

Rifampisin : 1937'de *Nocardia mediterranei*'in fermentasyonu ile Rifampisinler adı verilen değişik antibiyotik bileşikler elde edilmiştir. Rifampisin bileşikler içinde Rifampisin, oral yoldan iyi absorbe olan ve toksitesi az olan antibiyotiktir. Aköz asit solüsyonlarda çözünen ve lipid yapılarına çok iyi dağılan bir ilaçtır. Rifampisin, Stabil bir Rifampisin-Enzim kompleksi oluşturarak, DNA'nın transkripsiyonundan sorumlu bakteri RNA polimeraz enzimini inhibe eder. Tüm bakteriler Rifampisine direnç kazanabilmektedir. Bu direnç RNA polimerazı değiştirerek mutasyonla olmaktadır. Bu nedenle Rifampisinin diğer antibiyotiklerle kombine edilmesi önerilmektedir. Beta laktam Rifampisin yada Vankomisin-Rifampisin kombinasyonları sinerjistik etkili olduklarından tercih edilmektedir. Rifampisin Gram (+) koklara özellikle Stafilokoklar ve *Listeria monocytogenes*'e etkilidir. *Meningococcus*, *Gonococcus* ve *H. influenzae* Rifampisin'e en duyarlı Gram (-)

mikroorganizmalardır. Rifampisin, *M. tuberculosis*'e invitro çok etkilidir. Rifampisin oral yoldan tamamen absorbe edilir. Aç karına alınması önerilir, çünkü gıdalar absorpsiyonunu azaltabilmektedir. Eliminasyon yarı ömrü 2-5 saattir. Rifampisin yağda çözünür olduğundan tüm dokulara iyi penetre olur. Akciğerler, safra, safra kesesi çeperi ve idrardaki konsantrasyonu plazmaninkinden yüksektir. Kemik dokusuna iyi penetre olur. İdrarda ve göz yaşında renk değişikliği oluşturur. İlaç ateşi ve seyrek olarak eozinofili gibi belirtiler daha çok yüksek dozlarda görülür. Gastrointestinal bozukluklarda ortaya çıkabilir, karaciger ve D vitamini metabolizmasını etkiler (42,43,44).

Pirazinamid : Stabil, suda yavaşça çözünen bir nikotinamid analogudur. Oral yolla kullanılır ve gastrointestinal kanaldan absorbe edilir. Tüm dokulara dağılımı iyidir. Makrofajlar ve tüberküloz kavitelerine iyi penetre olur. Hücre dışında basillere bakterisid ve hücre içi asit ortamda dorman basillere bakteriostatik etkili olduğu kabul edilmektedir. Pirazinamid, mikrozomal enzim pirazinamid deaminaz tarafından pirozionik asit oluşturmak üzere diamine edilir. Buda hiperürisemik etki yapmaktadır. Pirazinamidle kombine tüberkülostatik tedavi programında; hergün ilaç alan tüberkülozlualarda antralji sıklığı %7 iken, haftada 3 kez pirazinamid verilenlerde %3 ve haftada iki kez alanlarda ise %1 dolaylarındadır. Gastrointestinal şikayetlerden anoreksi, bulantı, kusma ve sekonder olarak hepatit önemli yan etkiler arasındadır. Morfozinamid, pirazinamidin bir türevidir. Tüberküloz basili üzerine pirazinamid'den daha az etkili olduğu gibi daha az yan etkisi vardır (42,43,44).

Etambutol : Suda çözünebilir, ısıya dayanıklı sentetik bir bileşiktir. Bakteriostatik etkilidir. Etki mekanizması bilinmemesine karşın poliamin sentezini inhine ettiği sanılmaktadır. Oral alınan Etambutolun yaklaşık %80'i gastrointestinal kanaldan absorbe edilir. İlaç alındıktan 2-4 sat sonra serum pik değerine erişir. Serum yarı ömrü 3 saattir. Eritrositler ve tükrük başta olmak üzere birçok doku ve vücut sıvısına dağılır. Vücuttan atılımı oldukça hızlıdır. Yaklaşık %20'si feçesle, %50'si idrarla değişmemiş olarak atılır. Çabuk direnç geliştiğinden tek başına tüberküloz tedavisinde kullanılmaz. Diğer anti-tüberküloz ilaçlarla kombine kullanılır. En sık görülen yan etkisi görme bozukluğudur. Bunlar birkaç ay boyunca günde 25mg/kg dozunda kullanıldığında ortaya çıkan yan etkilerdir. Bu etkisi ilaç kesilince düzelir. Gastrointestinal bozukluklar, allerjik reaksiyonlar, ateş ve baş dönmesi seyrek rastlanan yan etkilerindedir. Etambutolün yan etkilerinin sıklığı ve ağırlık derecesi ilacın doz ve süresine bağlıdır (42,43,44).

Streptomisin : Bir aminoglikozid antibiyotik olan Streptomisin, tüberküloz tedavisinde genellikle intramüsküler, bazı durumlarda intretekal yoldan uygulanır. Tüberküloz tedavisinde kullanımı ciddi yan etkilerden dolayı kısıtlıdır. Ekstrasellüler basiller üzerine alkali ortamda etkilidir. İntrasellüler mikroorganizmaları barındıran hücrelere ilacın ancak %10'u penetre olur. Ağır seyreden tüberküloz formlarında özellikle milyer-kaviteli akciğer tüberkülozunda kullanılır. Tüberkülozda direnç gelişimini engellemek için diğer antitüberküloz ilaçlarla kombine edilerek kullanılmalıdır. Atipik mikobakterilerin çoğu Streptomisine dirençlidir. En Önemli yan etkileri ototoksisite ve nefrotoksitedir. 8. Kafa çiftine toksik etkisi nedeniyle bebekler ve 40 yaş üzeri hastalarda kullanılmaz. Seyrek olarak hipersansibilite reaksiyonu, Lupoid döküntüler, aplastik anemi ve agranülsitoz yapabilir. M. yastenia gravisli tüberkülozlualarda Streptomisin uygulananının nöromüsküler blokaja neden olduğu bildirilmektedir (42,43,44).

1.9.1.2 - Minör İlaçlar :

Para-aminosalisalik Asit : Salisik ve benzeikasit türevleri arasında tüberküloz basili üzerine en çok etkili olan Para-aminosalisik asittir. Yapısal olarak PABA ve Sülfanomidlere benzer özellik gösterir. Beyaz kristal bir toz olan Para-aminosalisik asit etkisini folik asit sentezini inhibe ederek gösterir. Gastrointestinal kanaldan emilimi hızlıdır, dokulara iyi dağılır. Kanama ve peptik ülsera neden olabilmektedir. Ateş, deri döküntüleri, kaşıntı yapabilir (43,44).

Sikloserin : *Streptomyces archidocceus* tarafından üretilen antibiyotik olup Sikloserin, yapısal olarak D-alanin analogudur. Bakteri hücre duvarı sentezi için gerekli enzimlerden olan D-alanin D-alanin sentetaz ve alanin rasemaz'ın kompetitif inhibitörüdür. Sikloserin oral yolla kullanılır. Makrofajlar ve seratrospinal sıvı dahil olmak üzere, birçok doku sıvılara penetre olurlar. İdrarda yüksek konsantrasyonda bulunması nedeniyle renal tüberküloz tedavisinde uygulanır. Sikloserin baş ağrısı, tremor, konfüzyon, psikozlara neden olmaktadır (43,44).

Etionamid : Sarı bir kristal madde olan Etionomid stabildir ve suda zor çözünür. İsonikotinic asidin troamid analogudur. Aktivitesi İsoniazidin yaklaşık 1/10'u kadardır. Diğer tüberküloz ilaçları ile birlikte kullanılırsa direnç önlenir. Yüksek oranda metabolize olur. Bulantı, kusma, ağrı ve diare en çok görülen yan etkileridir (43,44).

Kanamisin : *Streptomyces kanamyceticus*'un metabolizma ürünü olup bakterilerde oksidasyon olayını engelleyerek tüberkülostatik etki gösterir. 2-5 mg/ml serum düzeylerinden sonra bakteriyostatik etki başlar. Streptomisinle çapraz direnç gösterebilir. Tüberkülozun hücum tedavisinde kullanılır. Nefrotoksisite, ototoksisite, allerjik reaksiyonlar, baş ağrısı, baş dönmesi gibi yan etkileri vardır (43,44).

Kapreomisin : *Streptomyces capreolus*'tan elde edilen bir peptid antibiyotiktir. Kapreomisin, Viomisin ve Kanamisin arasında çapraz direnç vardır. Günlük 1 gr'lık IM enjeksiyon ile 10 mg/ml dolayında kana geçer. Nefrotoksisite ve ototoksisite en önemli yan etkileridir. Kapreomisin özellikle denge sinirlerine, Kanamisin işitme sinirlerine Viomisin ise hem işitme hemde denge sinirlerine toksik etki yapar (43,44).

Viomisin : Bazı *Streptomyces* türlerinden elde edilen Viomisin kompleks bir polipeptiddir. Haftada 2 kez 1 gr'lık IM enjeksiyon ile, tüberküloz basillerinin çoğunu öldürebilecek 1-10 mg/ml'lik kan serum düzeyine ulaşır. Toksisitesi daha fazla ve antibakteriyel aktivitesi daha düşük olmasına karşın, etki mekanizması bakımından Streptomisine benzer. Tipik ve atipik mikobakterilere etkilidir. Nefrotoksisite ve ototoksisite önemli yan etkileridir. Denge ve işitme kaybına neden olurlar (43,44).

Florokinolonlar : Tüberküloz basili ile aynı zamanda diğer atipik mikobakterilere karşı kinolon türevlerinden biri ile kombine tüberkülostatik tedavi umut verici bulunmuştur. Tek başına yada İsoniazid, Etambutol, Streptomisin ile kombine edilebilir. 53 hafta kadar uzun bir süre kullanımda; tüberkülozuların %75'inde iyileşme sağlandığı yapılan çalışmalar sonucunda bildirilmiştir. Kinolon türevleri

ilaçların yan etkileri akut santral sinir sistemi semptomları ve deri döküntüleri ile sınırlıdır (43,44).

Tüberküloz kontrolünde en çok korkulan konulardan bir tanesi direnç problemidir. Bugün dünyada 50 milyon çoklu ilaç direnci olan tüberküloz olgusunun varlığı bildirilmektedir. Bu durumdan en sorumlu faktör yetersiz ve yanlış tedavi rejimlerinin uygulanmış olmasıdır. Antimikrobiyallere direnç primer veya seconder olabilir (42,44).

M. tuberculosis'te plazmidlere bağlı direnç tarif edilmemiştir. Daha çok tek basamaklı rastgele spontan kromozomal mutasyonlar sonucu oluşmaktadır ve bakteriler arası genetik aktarım söz konusu değildir. İlaça duyarlı bakterilerin ölmesiyle varolan dirençli mutantlar belirgin hale gelir. Spontan direnç oranı sırasıyla INH, RFM, ETM VE SM için 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-6} , 10^{-5} olarak gerçekleşmektedir. Kromozomlar üzerindeki direnç bölgeleri birbirleri ile bağlantılı olmadıklarından, bakterinin iki ilaca birden direnç geliştirmesi olasılıkların çarpımına eşittir (3,8,44).

Günümüzde tüberküloz tedavisinin iki fazı bulunmaktadır. İlk iki ay bakterisidal faz olarak bilinir. Bu fazda üç-beş major ilaç verilir ve izoniazid, rifampisin ve pirazinamid daima bu ilaç grubu içinde yer alır. İki ay sonunda idame faza geçilir. İdame fazı dört –yedi ay sürer ve içinde izoniazidin bulunduğu en az iki ilaç verilir. Şu anda ülkemizde içinde bulunduğu grupta DSÖ tarafından hazırlanmış olan aşağıdaki tedavi rejim tablosu (Tablo 5) uygulanması tavsiye edilmektedir (3,8,42,43,44).

Tablo 5 : DSÖ'nün Tavsiye Ettiği Tedavi Rejimleri (3,8)

Tedavi Grubu	İlk Faz (Günlük veya Haftada Üç Gün)	İdame Fazı
I	2 Ay HRZE – HRSZ 2 Ay HRZE – HRSZ 2 Ay HRZE – HRSZ	4 Ay HR 4 Ay H ₃ R ₃ 6 Ay HE*
II	2 Ay HRZES/ 1 Ay HRZE 2 Ay HRZES/ 1 Ay HRZE	5 Ay H ₃ R ₃ E ₃ 5 ay HRE
III	2 Ay HRZ 2 Ay HRZ 2 Ay HRZ	4 Ay HR 4 Ay H ₃ R ₃ 6 Ay HE*
IV	Referans Hastanelerinde Minör İlaçları İçeren Tedaviler Uygulanır.	

* = Sadece Rifampisin tolere edilemediği zaman

H = İzoniazid

R = Rifampisin

Z = Pirazinamid

E = Etambutol

S = Streptomisin

-3-3 = Haftada 3 Gün

1.10 - Epidemiyoloji :

Bir kaynaktan tüberküloz epidemiyolojisi, “bir toplumda yalnız hastalığın dağılımı (prevalans), hastalığın gelişim oranını (insidans) ve tüberkülozdan ölüm oranını (mortalite) incelemekle kalmamalı, aynı zamanda infeksiyon insidansı ile prevalansını, enfekte olanlar arasında hastalık oranını ve bir olgu tarafından enfekte edilen ortalama birey sayısını da göstermelidir” şeklinde yorumlanmaktadır.(3)

1.10.1 - Dünyada Durum

Son 10 yılda dünyada tüberküloz konusunda önemli gelişmeler olmuştur. DSÖ öncülüğünde 1991’den bu yana yeni bir tüberküloz kontrol stratejisi hızla yayılmış ve günümüzde tüberküloz kontrolünün temel yöntemi olarak kabul görür hale gelmiştir. Bu strateji, Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisidir. (DGTS). Bugün dünya nüfusunun %32’si tüberküloz basili ile enfektedir, her yıl yaklaşık 8 milyon kişi tüberküloz hastalığına yakalanmakta ve yaklaşık 2 milyon insan ölmektedir.

DSÖ’nün Küresel Tüberküloz Kontrolü 2002 raporunda, 2000 yılında dünyada kayıtlı tüberkülozlu yeni hasta sayısının 3,671,973 bunların 1,529,806’sının yayma preparat pozitif olduğu belirtilmektedir. Tahmin edilen yeni hasta sayıları ise toplam 8,74 milyon, yeni yayma pozitif olgu sayısı 3,84 milyondur. Dünyada tüberküloz insidansı 1998 yılında 144/100.000, yayma pozitif tüberküloz insidansı ise 63/100.000’dir (27,45).

Dünya tüberküloz hastalarının %80'ini kapsayan ve en çok hastanın olduğu ülkeler hasta yükü olan ülkeler olarak ele alınmaktadır. Bugün 22 ülke dünyadaki tüberküloz hastalarının %80'ini barındırmaktadır. Bunlardan en çok hastanın bulunduğu beş ülke Hindistan, Çin, Bangladeş, Filipinler ve Güney Afrika'dır. 2000 yılında, Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi uygulanan bölgelerde yeni olguların % 62'si, uygulanmayan yerlerde ise %34'ü yayma pozitifdir. Yayma pozitif hastalarda 1999 yılında saptanan tedavi başarısı , DGTS uygulanan bölgelerde % 80,2 uygulanmayan bölgelerde % 27,6 olarak bulunmuştur (45).

İlaça dirençli tüberküloz sorunu dünya çapında önemli bir olgudur. Bu durum dünyanın bütün ülkelerinde tüberküloz tedavisini zorlaştırmaktadır.

Dünyada tüberküloz hastalarının %80'i 15-49 yaşları arasındadır. Bir yılda tüberkülozdan yaklaşık 2 milyon insan ölmektedir. Tanı konulan her 4 hastadan birisinin ölüyor olması dünyada tüberküloz hastalarının yeterli şekilde tedavi edilemediğinin açık bir belgesidir.

Tüberküloz vakalarının %80'i toplam 22 ülkededir. Bunların 9'u Afrika, 5'i Güneydoğu Asya ve geri kalanları Doğu Avrupa ve eski Sovyetler Birliği'nin bağımsız devletlerindedir. Yeni vakaların %75'i 15-49 yaş, %10'u da 15 yaşın altındadır.

DSÖ verilerine göre tüberküloz insidansı son yıllarda bazı ülkelerde azalırken, gelişmekte olan ülkelerde artmaktadır. Yıllara göre bazı ülkelerdeki tüberküloz insidansı ve değişimi Tablo 6'da gösterilmiştir. (34,46,47)

Tablo 6 : Ülkelerin yıllara Göre Tüberküloz İnsidans Değişimleri

ÜLKE	1980	1985	1990	1997
FRANSA	31.9	20.5	15.1	11.4
İSRAİL	6.4	8.7	5.0	7.3
KAZAKİSTAN	96.9	78.7	65.8	101.4
NORVEÇ	12.2	9.0	6.7	4.7
PORTEKİZ	70.4	69.6	63.0	52.1

ROMANYA	61.0	55.8	70.0	107,7
TÜRKİYE	82.6	61.5	43.6	33.1
TÜRKMENİSTAN	58.6	49.8	63.6	79.3

1.10.2 - Türkiye’de Durum

Ülkemizde bu yüzyılın başında ciddi bir epidemi yaşıyordu. Tüberküloz ölümleri, bütün ölüm nedenleri içinde birinci sırada yer alıyordu. Ülkemizde tüberkülozun durumu değerlendirildiğinde, hastalık insidansı açısından başarılı kontrol programı uygulanmış ülkeler ile, kötü programlar uygulanmış ülkeler arasında bir konumumuzun olduğu görülmektedir. Hastalık insidansı Avrupa ülkelerinin çoğunda yüz binde 20’den az iken Çin gibi ülkelere yüz binde 200’ün üzerindedir. Ülkemizde tüberküloz hastalık insidansı, 2000 yılında Verem Savaş Dispanserlerine kayıtlı hastalara göre hesaplandığında yüz binde 27’dir.

Verem Savaş Daire Başkanlığı tarafından DSÖ gönderilen ve DSÖ 1999 raporunda yer alan bilgide: Türkiye’nin 1997 yılı nüfusu 62,774,000, yıl içinde tanı konan yeni tüberküloz hastalarının sayısı 20,778, insidans yüzbinde 33,1’dir. Yine DSÖ’nün 2002 raporuna göre Türkiye nüfusu 66,668,000’dir ve tanı konulan hasta sayısı 18,038, insidans yüz binde 27’dir. Bu rakamların Türkiye’nin tüm hastalarını içermediği bilinmektedir.

Ülkemizde tüberküloz ile enfekte nüfusun oranı yüksektir; yani enfeksiyon havuzu hala büyüktür. Enfeksiyon havuzu konusunda 1953-1959 yılları ve 1980-1982 yıllarını kapsayan iki döneme ilişkin elimizde veri vardır. Bu verilere göre 1953-59’da nüfusun %56’sı 1980-82’de ise %25’i enfektedir (3,27,45,46,47).

T. C Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Dairesi Başkanlığı’nın verilerine göre 1999 yılında Türkiye genelinde tüberküloz prevalansı yüzbinde 35.18’dir. Vakaların %11’i 15 yaşın altındadır. Türkiye’deki coğrafi bölgelere göre tüberküloz prevalansı ve insidansı Tablo 7 ’de gösterilmiştir. (3)

Tablo 7 : Türkiye’de coğrafi bölgelere göre tüberküloz prevalansı

BÖLGELER	1997 NÜFUS	VAK'A SAYISI	PREVALANS
Karadeniz	7.265.779	2.831	38.96
Marmara	16.186.673	8.076	49.89
Ege	8.452.087	2.921	34.56
İç Anadolu	11.158.844	2113	18.94
Doğu Anadolu	5.614.907	1534	27.32
Güneydoğu Anadolu	6.128.973	2594	42.32
Akdeniz	8.058.311	2047	25.40
TOPLAM	62.854.574	22116	35.18

Türkiye'de Sağlık Bakanlığı verilerine göre 1991-2001 yılları arasında tüberküloz insidans oranları Tablo 8'de görülmektedir. (100.000'de olarak). (3).

Tablo 8 : 1991-2001 yılları arasında Tüberküloz insidans oranları

Yıl	İnsidans
1991	44.0
1992	42.9
1993	39.4
1994	38.6

1995	37.2
1996	34.3
1997	40,0
1998	39,0
1999	34,0
2000	27,0
2001	26,0

2. - GEREÇ VE YÖNTEM :

Tüberküloz ön tanılı hastalardan alınmış olan örnekler, mikobakteriyolojik inceleme amacı ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Ahmet Necdet Sezer Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim dalına ait laboratuvara gönderilmiştir. Gönderilen Balgam, Mide Açlık Sıvısı, Bronkoalveoler lavaj sıvısı, İdrar, BOS, Abse materyali, Kan, Vücut sıvıları (plevra, perikard, periton, asit sıvısı, sinovyal sıvı, kemik iliği) ve diğer örnekler mikroskopik incelemeye ek olarak 2 katı 1 sıvı, 3 farklı kültür vasatına ekilmiş (L-J besiyeri, BACTEC 12B besiyeri ve TK-MEDIUM kültür besiyerler) ve izole edilen *M. tuberculosis* suşları L-J besiyerinde agarproporsiyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılık testleri yapılarak ilaç dirençleri belirlenmiştir. Çalışmanın tüm aşamaları

Class II tipi güvenlik kabininde yapılmıştır.

2.1 - Örneklerin Mikroskopik İncelenmesi : Örneklerden Erlich Ziehl-Neelsen (EZN) yöntemi ile hazırlanan preperatlarda ARB varlığı araştırılmıştır.

Laboratuvara gönderilen hem steril olan hem de steril olmayan tüm örneklerden dekontaminasyon-homojenizasyon işlemi öncesi ikişer preperat steril olmayan örneklerden dekontaminasyon-homojenizasyon işlemi sonrası birer preperat hazırlanmıştır.

2.1.1 – Erlich Ziehl Neelsen Yöntemi : (3,8,28,29)

Boyanın Hazırlanması :

1. Çözelti

Bazik Fuksin0,3 g

Etil Alkol (%95)....10,0 ml

2. Çözelti

Fenol (ısıtılmış).....5 ml

Distile Su.....95 ml

1. çözelti ve 2. çözültiden 90 ml alınarak karıştırılmış ve karışım filtre kağıdından geçirilerek boya kristallerinden arındırılmıştır.

Asit Alkol

Etil Alkol ((%95)...97 ml

HCl(Konsantre).....3 ml

Metilen Mavisi

Metilen Mavisi (Klorid)..0,3 g

Distile Su.....100 ml

Preperatların Boyanması :

Klinik örneklerden preperat hazırlanırken temiz ve ilk kez kullanılacak lamalar alınır, direkt örnekten ve dekontaminasyon-homojenizasyon işlemi uygulanmış örnekten lam üzerine belli miktarda (1x2 cm'lik alan) yayılmıştır.

Klinik örneklerden bu şekilde hazırlanan preperatlar havada kurutulduktan sonra, üç kez alevden geçirelerek tespit edilmiştir.

- 1- Tespit edilen preperatlar üzerine, lamı kaplayacak şekilde bazik fuksin ilave edilmiş ve alttan hafif ateş ile 1-2 dakika kaynatmadan ısıtılmıştır. Boyada eksilme var ise üzerine tekrar boya eklenerek ısıtılmaya devam edilmiştir. Preperatın kısa bir süre soğuması beklendikten sonra üzerindeki boya

dökülmüştür.

- 2- Boya döküldükten sonra preperat su ile yıkanıp üzerindeki boyanın tümü akana kadar %3'lük asit alkol ile dekolorize edilip tekrar su ile yıkanmıştır.
- 3- Preperatların üzerindeki su akıtıldıktan sonra preperat üzerine metilen mavisi dökülüp 30-45 saniye beklenip sudan geçirilerek metilen mavisinin fazla miktarı akıtılmıştır. Preperatlar havada kurumaya bırakılmıştır. Kurutulan preperatlar İmmersiyon yağı damlatılarak immersiyon objektifinde (100X) incelenmiştir.

2.2 - Klinik Örneklerin Dekontaminasyon-Homojenizasyon ve Nötralizasyonu

Laboratuvara gönderilen örneklerin Dekontaminasyon, Homojenizasyon, Nötralizasyonunun yapılmasında hazır olarak bulunan Dio-Safeprocess (Dio-Med AŞ.) Dekontaminasyon, Homojenizasyon ve Nötralizasyonun kiti kullanılmıştır.

Dio-Safeprocess hazır Dekontaminasyon-Homojenizasyon ve Nötralizasyon kitinde bulunan örnek alma tüpünde steril cam boncuklar ve N-asetil-L-sistein bulunur. Klinik örnekler doğrudan bu tüp içerisine alınabilir veya başka kaptan toplanan örnekler bu tüpe aktarılabilir.

Alınan örneğin üzerine aynı miktarda Sodyum hidroksit - Sodyum sitrat çözeltisi eklenir. Cam boncuk ile çalkalama örneğin kolayca homojenize edilmesini sağlar. Bu işlemler sonrasında sodyum hidroksit nedeni ile pH'sı çok yükselen çözeltinin nötralize edilmesi gerekir. Bu amaçla Dio-Safeprocess kitinde bulunan fosfat tamponu kullanılır. Fosfat tamponu eklenen karışım santrifüj edilerek basiller tüpün dibine çöktürülür ve üst sıvı atılır. İkinci bir kez fosfat tamponu ile yıkanan basiller tekrar santrifüj ile çöktürülerek yoğunlaştırılır. Basillerin yoğunlaştırılmış olduğu bu çökelti, mikroskopi ve kültür yöntemleri için kullanılabilir.

Örnekleri, en fazla 10 ml olacak şekilde, cam boncuklu tüp içerisine alındıktan sonra bu tüpe Sodyum hidroksit-Sodyum sitrat çözeltisinden yaklaşık bire bir oranında eklenip tüpün kapağı sıkıca kapılmıştır. Vorteks ile çalkalayarak 10-15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Örneğin üzerine 50 ml çizgisine gelecek şekilde fosfat tamponu eklenip artan fosfat tamponu sonraki aşamalar için saklanmıştır.

Tüpler 4000 devirde 20 dk santrifüj edilmiştir. Üst sıvıyı, dezenfektan çözelti içeren bir kaba, cam boncuklar dökülmeyecek şekilde aktardıktan sonra daha önceki aşamada artan fosfat tamponu 12.5 ml hizasına kadar eklenip 4000 devirde 10 dk santrifüj edilmiştir. Üst sıvıyı, dezenfektan içeren kaba boşaltılıp Cam boncuklar arasında kalan sıvı vortekslenip süspansiyon haline getirilerek bu süspansiyondan kültür yapıldı, mikroskopi için yayma hazırlandı (30,34).

2.3 - Löwenstein-Jensen Kültürü :

Dekontaminasyon,Homojenizasyon,Nötralizasyonu yapılmış olan örneklerden 1 ml'lik steril enjektörle 0,5 ml alınıp L-J besiyerine ekim yapılmıştır. Ekim yapılan besiyerleri yaklaşık 160⁰ açılı olarak 37 ⁰C'de bir gece bekletildikten sonra yine 37 ⁰C'de 40-45 (6 hafta) günlük bir inkübasyona bırakılmıştır. Bu zaman zarfı içerisinde en az haftada bir kez kontrol edilerek üreme olup olmadığı takip edilmiştir.

2.4 - BACTEC 460TB Kültürü :

Kontaminasyonu önlemek için, BACTEC 12B şişelerine kültür işlemi uygulanmadan önce liyofilize halde bulunan PANTA, 5 ml PANTA Recostituting Flud (PRF) ile antibiyotik çözeltisi haline getirilmiştir. PANTA çözeltisi hazırlanarak steril 1 ml enjektörlere 0,1 ml çekilerek 0 derecede saklanmıştır Çeşitli antibiyotikleri [Polimiksin B (50Ünite/ml), Azlosilin (10mcg/ml), Nalidik asit (20 mcg/ml), Trimetoprim (5 mcg/ml), Amfoterisin (5 mcg/ml)] bünyesinde bulunduran bu çözelti ağızları %70'lik alkolle silinmiş BACTEC şişelerine 0,1 ml ilave edilmiştir. Bu işlem sonrasında steril 1 ml enjektörlere 0,5 ml dekontaminasyonu ve homojenizasyonu yapılmış olan klinik örneklerden alınarak BACTEC 12B şişesine ekim yapılmıştır. Kontaminasyonun önlenmesi için besiyerlerinin ağızı tekrar alkol ile temizlenmiştir.

Klinik örneklerin ekildiği BACTEC 12B besiyerleri 37 ⁰C'de 40-45 (6 hafta) gün süre ile bekletilmiş ve ilk iki hafta haftada iki kez, son dört hafta haftada bir kez BACTEC TB 460 otomasyon cihazı ile kontrol edilmiştir. Bu süre içerisinde üreme göstermeyen kültürler negatif olarak değerlendirilmiştir.

Klinik örnekler mikobakteri içeriyorsa, bu mikobakterieler 12B besiyerindeki ¹⁴C işaretli substratı (Palmitik Asit) kullanarak, besiyerinin üzerindeki atmosfere ¹⁴CO₂ çıkarırlar. BACTEC TB 460 cihazında yapılan kontroller sırasında şişeden bu

$^{14}\text{CO}_2$ çekilir ve radyoaktivitesi 0-999 sınırları arasında sayısal bir değerle belirlenir. Bu rakamlar üreme endeksini (GI) göstermektedir.

Bu sistem ile kontrol edilen 12B besiyerlerinin GI değeri ≥ 10 olduğunda bu şişeler günlük kontrole alınmış ve GI değerleri hergün kontrol edilmiştir. GI değeri $\geq 50-100$ 'e yükselen şişedeki üreme EZN yöntemi ile boyanıp incelenmiştir (3,30).

2.4.1 - NAP İdentifikasyon Deneyi :

NAP (para-nitro-asetiamino-betahidroksipropiyofenon) kloramfenikolün sentezi sırasında ortaya çıkan bir ara üründür. *M. tuberculosis* kompleks içinde yer alan türlerin (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) üremesi bu maddenin ortamda varlığında inhibe olurken, diğer mikobakteriler üremelerini sürdürmektedir.

50-100 GI arasında değer veren kültürlerle BACTEC NAP deneyi yapılmıştır. Bu amaçla, primer 12B besiyerinden 1 ml alınarak içinde $5\mu\text{g}$ NAP maddesi amdirilmiş disk bulunan şişeye aktarılmıştır. Primer kültür şişesi pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Her iki şişenin ağzı alkolle temizlendikten sonra bu şişeler 2-7 gün süre ile 37°C 'de inküne edilmiş, bu süre içinde her gün BACTEC TB460 cihazında değerleri takip edilmiştir. GI değeri >100 olan şişeler aşağıdaki oranda sulandırım yapıldıktan sonra NAP deneyi uygulanmıştır.

Primer Kültürde GI	Yeni 12B Besiyerine Aktarılan Miktar
101-200	0,8 ml
201-400	0,6 ml
401-600	0,4 ml
601-800	0,3 ml
801-999	0,2 ml
-999 (Bir Günden Fazla)	0,1 ml

Sulandırım yapılan 12B besiyerinden 1 ml alınıp NAP içeren şişeye akterılmış, sulandırım yapılan yeni 12B şişesi pozitif kontrol kabul edilmiştir.

Kontrol şişesinin günlük GI değeri artış gösterirken, NAP şişesinin GI değerinde, mikobakterinin türüne göre azalma veya artış gözlenmiştir. *M. tuberculosis* kompleks içinde yer alan türlerin üremesi NAP varlığında inhibe olurken, MOOT basilleri üremelerini sürdürmüşlerdir. NAP testinin yorumlanması ise;

M. tuberculosis Kompleks;

Yapılan günlük kontroller sırasında, 2 gün üst üste GI değerinde (%20) azalma olması

GI değerinde ilk iki gün önemsiz bir artış daha sonra azalma olması veya GI değerinde artış görülmemesi ile incelenen suş *M. tuberculosis* olarak nitelendirilmiştir.

MOTT Basilleri ;

- 4 günde GI değerinin ≥ 400 'e ulaşması
- İlk 1-3 gün GI değerinde önemsiz azalma olması veya artış olmaması, ancak birbirini takip eden iki günde, günlük GI değerinde önemli bir artış (%20) olması ile incelenen şişedeki suş MOTT basili olarak yorumlanmıştır.

2.5 - Dio-TK Medium Kültürü :

Dekontaminasyon,Homojenizasyon,Nötralizasyonu yapılmış olan örneklerden 1 ml'lik steril enjektörle 0,5 ml alınıp Dio-TK tüplerine ekim yapılmıştır. Ekim yapılan besiyerleri yaklaşık 160⁰ açılı olarak 37 ⁰C'de bir gece bekletildikten sonra yine 37 ⁰C'de 40-45 (6 hafta) günlük bir inkubasyona tabii tutulmuştur. Bu zaman zarfı içerisinde en az haftada bir kez kontrol edilerek üreme olup olmadığı takip edilmiştir. Haftada en az bir kez kontrol edilen tüplerde renk değişimi gözlenmesi ile sonuç varılmıştır. Mikobakterilerin ürettiği metabolik ürünlere bağlı olarak besiyerinin rengi kırmızıdan sarıya dönmüş ise bir üreme gerçekleşmiş demektir. Birçok mantar ve bakteri kontaminasyonu varlığında Dio-TK MEDIUM Besiyerinin rengi yeşile dönmüş ise mikobakteri dışında bir organizmaya ait olduğunu gösterir. Böylece kontaminasyon varlığı henüz mikroskopi yapılmadan önce anlaşılmış olur Renk değişimi Resim 1'de gösterilmiştir. (34).



Resim 1 : TK MEDIUM Üreme Renk Değişimi (48)

2.6 – LJ Besiyerinde Antitüberküloz İlaçlara Duyarlılık Testinin Yapılması :

L-J besiyerinde üreme görülen örneklerle duyarlılık tesiti yapılmadan önce bu suşların *M. tuberculosis* olup olmadığını saptamak için Niasin tesiti ve NAP identifikasyon testi yapılmıştır. Niasin deneyinde hazırlanmış olan % 10'luk Cyanogen bromide (CNBr) ve Anilinin alkol eriyiği hazırlandıktan sonra L-J besiyerinde üretilmiş kültürler alınıp içine 1 ml steril saf su eklendi ve daha sonra öze yardımı ile koloniler hareket ettirilerek besiyerine 1 saat süre ile suyun temas etmesi sağlanıp 36 derecelik etüvde bekletilmiştir. Bu süre sonunda pipet ile 2-3 damla kadar sıvı alınarak başka bir tüpe aktarılmıştır üzerine hazırlanan anilin-alkol eriyiğinden damlatıldıktan sonra renk oluşmadan hemen aynı oranda CNBr eklenmiştir oluşan sarı renk niasin pozitif anlamına gelmektedir. Bu iki identifikasyon deneyi sonrasında niasin pozitif olan ve NAP testi anlamlı olan suşlar antibiyogram için ayrılmışlardır. Duyarlılık saptanmasında, L-J besiyerinde agar orantı (proporsiyon) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde, kültürde üretilmiş tüberküloz basilleri, eş zamanlı olarak ilaç içermeyen ve çeşitli antitüberküloz ilaçları içeren L-J besiyerine ekilmekte, ilaçlı besiyerinde oluşan koloni sayısının, ilaçsız besiyerinde oluşan koloni sayısına oranı saptanmaktadır. Bu oran %1'in üzerinde ise, bakteri suşunun bu ilaca dirençli olduğu kabul edilmektedir. Antitüberküloz ilaçlara L-J besiyerinde duyarlılık belirlenmesinde iki noktaya dikkat edilmesi çok önem

taşımaktadır. Bunlardan birincisi, besiyerlerinin içerdiği ilaç derişiminin çok doğru olarak ayarlanmasıdır. L-J, ısıtılarak katılması sağlanan bir besiyeri olduğu için, özellikle rifampisin gibi ilaçların bir kısmı bu pişirme süreci içerisinde etkinliğini yitirmektedir. Besiyerinde kalan ilaç derişiminin istenen düzeyde olabilmesi için kültür tüplerinin eşit sürede ve eşit miktarda ısıtılarak hazırlanması gerekmektedir. Bu koşullar ancak otomatik özel sistemler içeren makinalar ile doğru olarak sağlanabilmektedir. Bu nedenle çalışma sırasında Diomed A.Ş.'de standart olarak üretilen duyarlılık test kiti Dio-Anti Tb Kit'i kullanılmıştır. Duyarlılık testi yapılırken ikinci önemli nokta ise ilaçsız ve ilaçlı besiyerinde üreyen bakteri kolonilerinin sayısının, oran çıkartılabilir miktarda olması gerekmektedir. Bu amaçla, üretilmiş kültürden yaklaşık 0.5 Mc Farland bulanıklık değerinde bir süspansiyon hazırlanması ve bunun 10^{-2} ve 10^{-4} 'lük seyreltimleri yapıldıktan sonra, ilaçlı ve ilaçsız besiyerlerine ekilmesi önerilmektedir. Bu noktada önemli bir sorun, mikobakterilerin yağlardan zengin çeperi ve bu nedenle ileri derecede hidrofobik yapıları nedeniyle, sulu ortamlarda kolayca süspansiyon haline getirilememeleri, bulanıklık değerinin kolayca ayarlanamamasıdır. Dio-Anti Tb Kit'lerde bu amaçla cam boncuk ve Tween 80 çözeltisi içeren bir süspansiyon tüpü ve yine aynı çözeltiyi içeren iki seyreltim tüpü bulunmaktadır. Sterilize edilmiş olan bu çözelti ve tüpler hem süspansiyon ve seyreltimlerin kolayca ve doğru bir şekilde yapılmasını sağlamakta, hem de en fazla bu işlem sırasında ortaya çıkan kontaminasyonu engellemektedir. Seyreltim tüpleri 10^{-2} ve 10^{-4} 'ten, hem ilaçlı hem de ilaçsız tüplere ekim yapıldığında, oluşan koloni sayısına göre genellikle okumaların 10^{-2} seyreltim tüpünden yapılan ekimlerden değerlendirilmesi uygun olmaktadır. Bu nedenle birçok araştırmacı, 10^{-2} seyreltim tüpünden ilaçsız ve ilaçlı L-J besiyerlerine ekim yaparken, 10^{-4} seyreltim tüpünden sadece ilaçsız L-J'e (kontrol besiyeri) ekim yapılmıştır. Test edilmesi önerilen antitüberküloz ilaçlar ve derişimleri; Isoniasid 0.2µg/ml, Isoniasid 1µg/ml, Rifampisin 40µg/ml, Rifampisin 20µg/ml, Streptomisin 4µg/ml, Streptomisin 8µg/ml, Etambütol 2µg/ml, Etambütol 4µg/ml'dir. Üretilmiş taze kültürden birkaç koloni öze ile alıp süspansiyon tüpündeki boncuklar arasına karıştırılıp vorteks ile iyice çalkaladıktan sonra yaklaşık 0,5 Mc Farland bulanıklık değerinde süspansiyon elde edildi. Süspansiyon tüpünden steril pipet ucu ile 100µl alarak 10^{-2} seyreltim tüpüne aktarılıp vorteksle çalkalanmıştır. 10^{-2} seyreltim

tüpünden 100µl alarak 10^{-4} seyreltim tüpüne eklenmiş ve vorteksle çalkalandıktan sonra 10^{-2} seyreltim tüpünden, ilaçsız ve ilaçlı L-J besiyerlerine 100µl ekim yapılmıştır. 10^{-4} seyreltim tüpünden ilaçsız L-J besiyerine 100µl ekim yaptıktan sonra besiyerleri normal L-J kültürü gibi inkübe edilmiş yaklaşık 30 gün sonunda üremeleri değerlendirilerek antibiyotik duyarlılıkları belirlenmiştir. Antibiyotik duyarlılıklarına ait çalışılmış L-J besiyeri resimleri aşağıda Resim 2’de sunulmuştur (34).



Resim 2: Löwenstein-Jensen Antitüberküloz İlaçlı Besiyerleri (49).

3.BULGULAR

Çalışma kapsamında alınan ve tüberküloz yönünden incelenen 280 klinik örnek, EZN mikroskopi ve L-J, BACTEC 460TB, TK Medium kültür yöntemleri ile incelenmiş, kültürü pozitif bulunan örneklerden izole edilen suşlar L-J antibiyotik duyarlılık testi ile tanımlanarak, antibiyotik duyarlılıkları saptanmıştır. Laboratuvara gönderilen klinik örneklerin dağılımı Tablo 9’da belirlenmiştir.

Tablo 9 : İncelenen 280 Klinik Örnek ve Bu Örneklerin Hasta Grubuna Göre Dağılımları

Klinik Örnek	İncelen Örnek Türü	(%)
Balgam	167	59,7
Beyin Omurilik Sıvısı	11	3,9
İdrar	31	11
Bronkolalvoel Lavaj	6	2,2
Plevral Sıvı	5	1,8
Asit Sıvı	8	2,8
Açlık Mide Sıvısı	18	6,4
Eklemler Sıvısı	14	5
Torasentez Sıvı	7	2,5
Periton Sıvısı	7	2,5
Sinoviyal Sıvı	4	1,5
Püy	2	0,7
TOPLAM	280	100

İncelenen 280 örneğin 41 (%14,7) tanesi EZN boyama yöntemi BACTEC TB460, L-J ve TK MEDIUM kültür yöntemleri ile pozitif bulunmuştur.

Mikobakteri yönünden anlamlı bulunan 41 örnekten 38 (%92,7) tanesi EZN boyama yöntemi ile pozitif bulunmuştur. Bu 38 örneğin 26'sı (% 68,4) balgam, 4'ü (%10,5) idrar, 3'ü (%7,9) bronkolalvoel lavaj, 2'si (%5,25) mide açlık suyu ve birer (%2,6) adette asit mayi, torosentez mayi ve püydendir.

İncelenen 280 örneğin L-J kültür yönteminde 31 (%75,6) tanesi üreme göstermiştir. Bu 31 örneğin türlere göre dağılımı aşağıda Tablo 10'da çıkarılmıştır.

Tablo 10 : L-Jkültür yönteminde *M. tuberculosis* örneklerinin dağılımı

Örnek Türü	Örnek Adeti	%
Balgam	24	77,6

İdrar	2	6,4
Bronkolalvoel Lavaj	2	6,4
Mide Açlık Sıvısı	2	6,4
Püy	1	3,2
TOPLAM	31	100

BACTEC TB460, hızlı tanı kültür yöntemi ile 23 (%56,1) örnek pozitif bulunmuştur, bunlarında örnek türüne göre dağılımı Tablo 11’de belirtilmiştir.

Tablo 11 : BACTEC kültür yönteminde üreyen örnek dağılımı

Örnek Türü	Örnek Adeti	%
Balgam	17	74
İdrar	2	8,7
Bronkolalvoel Lavaj	1	4,3
Mide Açlık Sıvısı	2	8,7
Püy	1	4,3
TOPLAM	23	100

Yeni bir tanı kiti olan TK MEDIUM kültür sistemiyle ise yine 21 (%51,2) örnek pozitif sonuç vermiştir. Örnek dağılımı Tablo 12’deki gibidir.

Tablo 12 : TK MEDIUM kültür yönteminde üreyen örnek dağılımı

Örnek Türü	Örnek Adeti	%
Balgam	15	71,5
İdrar	2	9,5

Bronkolalvoel Lavaj	1	4,75
Mide Açlık Sıvısı	2	9,5
Püy	1	4,75
TOPLAM	21	100

Sonuç olarak mikobakteri yönünden pozitif bulunan 41 (% 14,7) tüberküloz örneğinin 38 tanesi EZN boyama yöntemi ile 31 tanesi L-J, 23 tanesi BACTEC TB460 ve 21 tanesi TK MEDIUM kültürleri ile üretilmiştir.

Çalışma kapsamına alınan 280 örneğin incelenmesi sırasında L-J kültür yönteminde 4 (% 1,4) tane, BACTEC TB460'da 10 adet (% 3,6) ve TK-MEDIUM kültür yönteminde 8 (% 2,9) tane örnek kontamine olmuştur.

Boyama ve kültür sonuçlarının değerlendirilmesinde metodolojik araştırmalar kullanılmıştır (Tablo 13). Bu tabloya göre sonuçlar birçok farklı değerlendirmeye tabi tutulabilir, ancak en sık kullanılan değerler duyarlılık, özgüllük, gerçek pozitiflik değeri ve gerçek negatiflik değeridir. Çalışmada da sonuçlar hesaplanırken bu değerler göz önüne alınmıştır.

Tablo 13: Metodolojik Tablo

YENİ TEST	GEÇERLİ TEST	
	HASTA	SAĞLAM
HASTA	A Doğru Pozitifler	B Yanlış Pozitifler
SAĞLAM	C Yanlış Negatifler	D Doğru Negatifler
TOPLAM	A+C (Toplam Hasta)	B+D (Toplam Sağlam)

A) DUYARLILIK : Geçerliliği belirlenecek olan ölçüm yönteminin gerçekten hasta olanlardan ne kadarını hasta olarak saptayabileceğini gösterir.

$$\text{Duyarlılık} : (A/A+C) \times 100$$

B) ÖZGÜLLÜK : Geçerliliği belirlenecek olan yeni yöntemin, sağlam olanlardan ne kadarını doğru olarak (sağlam) saptayabildiğini gösterir.

$$\text{Özgüllük} : (D/B+D) \times 100$$

C) GERÇEK POZİTİFLİK : Kullanılan tanı değeri sonucu pozitif olan kişinin gerçekten hasta olma olasılığıdır ve enfeksiyonun toplumdaki prevalansı ile yakından ilgilidir.

$$\text{Gerçek Pozitiflik} : (A/A+B) \times 100$$

D) GERÇEK NEGATİFLİK : Uygulanan yeni tanı testine göre negatif sonuç veren kişilerin ne kadarının gerçekten sağlam olduğunu gösterir.

$$\text{Gerçek Negatiflik} : (D/C+D) \times 100$$

Bu sistem ile boyama-kültür sonuçları ve kültür yöntemleri birbirleri ile karşılaştırılıp sonuçlar tablolar halinde sunulmuştur.

Tablo 14 : 280 Klinik örneğin EZN boyama yöntemi ile L-J kültür yöntemi sonuçlarının karşılaştırılması

EZN (Mikroskopi)	LJ		TOPLAM
	+	-	
+	28	10	38
-	3	239	242
TOPLAM	31	249	280

Duyarlılık (%) : 90,3

Özgüllük (%) : 95,9

Gerçek + (%) : 73,6

Gerçek - (%) : 98,7

Tablo 15 : 280 Klinik örneğin EZN boyama yöntemi ile BACTEC kültür yöntemi sonuçlarının karşılaştırılması

EZN	BACTEC		TOPLAM
	+	-	
+	20	18	38
-	3	239	242
TOPLAM	23	257	280

Duyarlılık (%) : 86,9

Özgüllük (%) : 92,9

Gerçek + (%) : 52,6

Gerçek - (%) : 98,7

Tablo 16 : 280 Klinik örneğin EZN boyama yöntemi ile TK MEDIUM kültür yöntemi sonuçlarının karşılaştırılması

EZN	TK MEDIUM		TOPLAM
	+	-	
+	18	20	38
-	3	239	242
TOPLAM	21	259	280

Duyarlılık (%) : 85,7

Özgüllük (%) : 92,2

Gerçek + (%) : 47,3

Gerçek - (%) : 98,7

Yapılan 280 klinik örneklik çalışma sonucunda mikobakteri yönünden anlamlı bulunan 41 pozitif örneğin EZN, L-J, BACTEC ve TK MEDIUM yöntemleri ile elde

edilen sonuçları ve bu yöntemlere ait genel duyarlılık ve özgüllük yüzdeleri Tablo 17'de belirtilmiştir.

Tablo 17 : Pozitif örneklerin EZN, L-J, BACTEC ve TK-MEDIUM yöntemlerine göre dağılımı ve duyarlılık özgüllük yüzdeleri

	TOPLAM + ÖRNEK	EZN	L-J	BACTEC	TK -MEDIUM
+	41	38	31	23	21
-	239	242	249	257	259
TOPLAM	280	280	280	280	280
Duyarlılık (%)		92,6	75,6	56,1	51,2
Özgüllük (%)		98,7	95,6	93,0	92,3

Yapılan niasin testi ve NAP identifikasyon testi sonucunda 41 pozitif suştan 26 (%63,4) tanesinin *M. tuberculosis* olduğu saptanmıştır. Bu örneklerle L-J proporsiyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılık testi uygulanmış antibiyotik olarak major antibiyotikler olan İsoniasid (INH), Etambutol (EMB), Rifambin (RIF) ve Streptomisin (SM) kullanılmıştır.

Bu antibiyogram çalışmasına göre izole edilen *M. tuberculosis* suşunun 13 (%50) tanesinde herhangi bir ilaç direncine rastlanmaz iken diğer 13 (%50) suşta ilaç dirençleri tespit edilmiştir.

İlaç direnci olduğu tesbit edilen suşların antibiyotiklere karşı duyarlılık ve dirençlerini belirten açıklamalar Tablo 18'de açık bir şekilde sunulmuştur.

Tablo 18 : İlaç Direnç Oranları

İLACLAR İLAC KOMBİNASYONLARI	DİRENÇLİ SUŞ SAYISI	DİRENÇ YÜZDELERİ
INH Tek İlaç Direnci	1	% 7,69
EMB Tek İlaç Direnci	2	% 15,39
SM Tek İlaç Direnci	1	% 7,69
INH+SM İlaç Direnci	2	% 15,39
SM+RIF İlaç Direnci	1	% 7,69
SM+EMB İlaç Direnci	1	% 7,69
RIF+EMB İlaç Direnci	1	% 7,69
MDR Çoklu İlaç Direnci (İçinde INH+RIF Direnci olan Tüm İlaçlar)	4	% 30,77
TOPLAM	13	100

4. TARTIŞMA

Tüberkülozun tanı ve tedavisindeki gelişmelere rağmen bütün dünyada özellikle gelişimini tamamlamamış ülkelerde hala yaygın bir hastalıktır. Günümüzde immün sistemi baskılayan HIV, HCV vb. enfeksiyonların oranındaki artışla doğru orantılı tüberküloz enfeksiyonu taşıyan birey sayısında da artış görülmektedir.

Tüberküloz hastalığında tedavinin hızı ve çabukluğu oldukça önemli bir noktadır ve tedaviye başlanılabilmesi içinde tanının konulması gerekmektedir. Bunun için duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek tanı yöntemleri kullanılması gereklidir.(5,8,35).

Tüberküloz tanısında kullanılan konvensiyonel yöntemler farklı zamanlarda ve farklı bölgelerde çalışılmış ve birbiriyle karşılaştırılmıştır sonuçlar aşağıdaki gibidir.

Abe ve Ark (50), 245 balgam örneğinden 86 mikobakteri suşu (%35,1) izole etmişler ve bu suşların %93'ünün BACTEC sisteminde, %75,6'sının yumurtalı Ogawa besiyerinde ürediğini belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar BACTEC sisteminde en erken üreme süresini ortalama 13,4 gün, yumurtalı Ogawa besiyerinde 21,7 gün olarak belirlemişlerdir.

Ellner ve ark (51), L-J besiyeri, Middlebrook 7H11 agar ve BACTEC sisteminden alınan kültür sonuçlarını karşılaştırdıkları çalışmalarında, 291 mikobakteri suşunun 205'inin (%70) hem 12B besiyerinde hem de L-J besiyeri veya 7H11 agarda paralel üreme gösterdiğini, 56 suşun (%19) sadece 12B besiyerinde, 30 suşun ise (%10) sadece L-J besiyeri veya 7H11 agarda ürediğini bildirmişlerdir.

Somoskovi ve ark (52), 357 klinik örnekten 57 (%15,9) mikobakteri suşu izole etmişler ve bu suşların 53'ünü (%93) BACTEC sisteminde, 46'sını (%80,7) L-J besiyerinde izole ettiklerini bildirmişlerdir. Ortalama üreme süresini preperat pozitif örneklerde BACTEC sisteminde 13,8 gün, L-J besiyerinde 20,1 gün; preperat negatif örneklerde BACTEC sisteminde 17,7 gün L-J besiyerinde 42,2 gün olarak bulmuşlardır. BACTEC sisteminde % 2,9, L-J besiyerinde %1,2 oranında kontaminasyon tespit etmişlerdir.

Kirihara ark (53), tarafından yapılan bir çalışmada , preperatı pozitif bulunan solunum yollarına ait 56 örneğinin ortalama üreme süresi BACTEC sisteminde 8 gün , L-J besiyerinde 16 gün, preperatı negatif örneklerde 24 gün olarak bildirilmiş, preperatı pozitif bulunan örneklerin % 98'inin BACTEC sisteminde, %76'sının L-J

besiyerinde, preparatı negatif örneklerin ise % 75'inin BACTEC sisteminde, %79'unun L-J besiyerinde ürettiği belirlenmiştir. Aynı araştırmacılar 12B besiyerindeki kontaminasyon oranını %1,6 L-J besiyerinde ise %5,5 olarak bulmuşlardır.

Uzun (2), 346 klinik örnekten 36 (%10,4) mikobakteri suşu izole etmiş ve bu suşların 34'ünü (%94,4) BACTEC sisteminde, 17'sini (%47,2) L-J besiyerinde üretmiştir. BACTEC sisteminde üreme süresini preparatı pozitif örneklerde 10 gün, negatif örneklerde 15 gün, L-J besiyerinde 24 gün olarak bulmuş BACTEC sisteminde % 6 L-J besiyerinde % 7 oranında kontaminasyon tespit etmiştir.

Koç ve ark (54), 2254 klinik örnekten 102 mikobakteri suşu izole etmişler ve bunların 78 adetini (%76,5) BACTEC sisteminde 50'sini (%49) L-J besiyerinde ürettiğini görmüşlerdir. Üreme süreleri BACTEC'de 11,6 gün, L-J besiyerinde 21,7 gün olarak kabul edilmiştir. Kontaminasyon oranları ise sırası ile %8 ve %4,3 olarak tespit edilmiştir.

Yaman ve ark (55), İzole ettikleri 112 *M. tuberculosis* suşunun 100'ünü (%89,9) BACTEC sisteminde, 76'sını (%67,9) L-J besiyerinde izole etmişlerdir. BACTEC sisteminde üreme süresi 11,5 gün olarak bulunurken L-J'de 22,4 gün olarak bulunmuştur.

Özekinci (8), incelediği 340 örnekte kültür pozitif 34 örneğin % 94,1'i BACTEC kültüründe, %38,2'si L-J besiyerinde üretmiştir. Bu 340 örneklilik çalışma kontaminasyon yönünden incelence BACTEC'de %6,4 L-J besiyerinde %7,3 örnek kontamine olmuştur.

EZN, BACTEC 460, L-J ve TK-Medium yöntemleri ile yapılan 280 örneklilik çalışmamızda 41 örnek (%14,7) tüberküloz açısından anlamlı bulunmuştur.

Bu 41 pozitif örnek arasından 38 örnek (%92,7) EZN pozitif, 31 (%75,6) örnek L-J kültür pozitif, 23 (%56,1) tane BACTEC ve 21 (%51,2) tane de TK-MEDIUM yöntemi ile pozitif bulunmuştur.

L-J kültür yönteminde 4 (% 1,4) tane, BACTEC'de 10 adet (% 3,6) ve TK-MEDIUM kültür yönteminde 8 (% 2,9) tane örneğin kontamine olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda BACTEC 460TB kültür sonuçları ile diğerk araştırmacıların yaptığı çalışmalardan elde ettiği sonuçlar ile arasında farklar görülmüştür. L-J

besiyerindeki üreme göz önüne alınınca Somowski ve ark (52) yaptığı ve yine Kirihara ve ark (53) yaptığı çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur.

BACTEC 460TB sistemindeki oranın düşük bulunmasının nedeni gönderilen klinik örneklerin türüne bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Kontaminasyon oranının Somowski ve ark (52) , Kirihara ve ark (53) yaptığı çalışmadaki kontaminasyon oranlarıyla yaklaşık değerlerde bulunurken bu oranın ülkemizde yapılmış olan Uzun (2) ve Özekinci (8) yaptığı çalışmalara göre düşük çıkmasının nedeni ise dekontaminasyon ve homojenizasyon işlemlerinin daha dikkatli yapılması ve çalışma yapılan kabinin çalışma öncesinde daha dikkatli bir şekilde sterilize edilmesinden olduğu düşünülmektedir.

Tüberküloz tanısında mikroskopik incelemenin maliyetinin ucuzluğu, kolaylığı, hızlılığı ve duyarlılığı en yüksek yöntem olması tanı koyma açısından en çok tercih edilen yöntem kabul edilmesini sağlamıştır ancak mikroskopi yöntemi mutlaka diğer kültür yöntemleri ile de desteklenmelidir. Mikroskopinin kültür yöntemleri ile aynı değerlerde veya kültür sonuçlarının mikroskopi sonuçları ile anlamlı sonuçlar vermesi bu yöntemin tanıdaki geçerliliğini bir kez daha ön plana çıkarmaktadır.

Bekiroğlu ve ark (56) 220 balgam örneğinde yaptıkları EZN ve Florokrom boyama yöntemini karşılaştırdıkları çalışmada EZN boyama yöntemi için duyarlılık oranını % 68,9, özgüllüğü %100, gerçek pozitifliği % 100 ve gerçek negatiflik oranını %92,5 olarak bulmuşlardır.

Yıldıran ve ark (57) toplam 7 yıl içerisinde tamamladıkları 27,519 örneklilik çalışmalarında EZN boyama ve kültür yöntemlerini karşılaştırmışlar ve ZN boyama yönteminin duyarlılık oranını % 71,8, özgüllüğü %98,8, gerçek pozitifliği % 79,6 ve gerçek negatiflik oranını %98,2 olarak bulmuşlardır.

Özekinci (8) yaptığı çalışmada EZN boyama yöntemi ile L-J kültür yöntemi karşılaştırmasında EZN boyama yöntemi için duyarlılığı % 66, özgüllüğü %94,4, gerçek pozitifliği % 42,8 ve gerçek negatifliği % 98 olarak tespit ederken yine aynı çalışmasında EZN boyama yöntemi ile BACTEC 460TB sonuçlarını karşılaştırmış ve duyarlılık oranını %41,9 özgüllüğü ise % 99 olarak bulmuştur.

Uzun (2) çalışmasında 237 linik örnek için L-J kültür yöntemi ile EZN boyama yöntemini karşılaştırmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda duyarlılık oranını %

53, özgüllüğü %93,6, gerçek pozitifliği % 39 ve gerçek negatiflik oranını %96 olarak bulmuştur.

Ankara Gülhane Askeri Tıp Akademisinde BACTEC 460TB, Löwenstein Jensen , TK Medium ve TK SLC kültür yöntemleri ile 449 klinik örnek ile yapılan bir çalışmada sırası ile 31 (%6.9), 23 (%5.1), 18 (%4.0) and 21 (%4.7) klinik örnek mikobakteri yönünden pozitif bulunurken 356 (79,3) örnek negatif bulunmuştur. Yine Ankara Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesinde aynı yöntemlerle yapılan 500 örneklik çalışmada BACTEC 460TB, L-J, TK MEDIUM ve TK SLC kültür yöntemlerinde sırası ile 20(%4), 19 (%3,8), 19 (%3,8), 18 (%3,6) oranında bir pozitiflik saptanmış ve aynı sıra ile kontaminasyon oranları ise %0,4, %2,6, %4,4 ve %0,8'dir (58).

Çalışmamızda ise 280 örneğin EZN, BACTEC 460TB, L-J ve TK MEDIUM yöntemleri ile 41 tanesi mikobakteri yönünden olumludur. Bu 41 suşun 38'i (%92,7) EZN, 31'i (%75,6) L-J, 23'ü (%56,1) BACTEC 460TB ve 21 (%51,2) TK MEDIUM kültür sistemiyle pozitif tespit edilirken kontaminasyon oranlarının ise BACTEC 460TB'de 10(%3,6), L-J'de 4 (%1,4) ve TK-MEDIUM'da 8 (% 2,9) olduğu tespit edilmiştir

Yaptığımız çalışmamızda EZN boyama yöntemi ile L-J kültür sistemi karşılaştırılınca EZN boyama yönteminin duyarlılığı %90,3 , BACTEC 460TB kültür yöntemi ile karşılaştırılınca %86,9 TK-MEDIUM kültür yöntemi ile karşılaştırılınca % 85,7 olarak bulunurken özgüllüler ise sırası ile % 95,9 - % 92,9 ve % 92,2 olarak tespit edilmiştir.

Bulduğumuz duyarlılık oranı yukarıdaki çalışmalar ile karşılaştırıldığı zaman arada belirli farklar tespit edilmiştir bu farkların nedeni ise mikroskopi çalışması sırasında daha uzun süre inceleme yapılması ve bu incelemenin birden fazla kişi tarafından yapılmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Tüberküloz hastalığının ilerlemesinin durdurulmasında ve daha etkili ve başarılı bir tedavi yürütülebilmesinde erken tanı konulması ve ilaç duyarlılıklarının belirlenebilmesi önemli bir noktadır.

Karabay ve ark (59), 214 *M. tuberculosis* suşununun 105'ini (% 49,1) en az bir ilaca karşı dirençli bulmuşlardır. INH'e %27,1, RIF'e %21,5, SM'e %29 ve EMB'e

%10,3 toplam direnç saptamışlardır. %20,1 bir ilaca, %22,4 iki ilaca, %6,4 üç ilaca ve %0,5 dört ilaca direnç bulmuşlardır.

Balcı ve ark (60), 199 suşun 90'nını (%45,2) en az bir ilaca dirençli bulmuşlardır. INH'e %37,2, RIF'e %21,1, SM'e %9 ve EMB'e %17,5 oranında direnç saptamışlardır. Sadece tek ilaca direnç %17,6 iki ilaca birlikte direnç %15,6 üç ilaca %12 dört ilaca birden direnç gösteren suş tespit edememişlerdir.

Kısa ve ark (61), 1998-2001 tarihleri arasında GATA mikrobiyoloji laboratuvarına gelen *M. tuberculosis* pozitif 390 hastaya ait 886 izolatın her hasta için tek bir suşu değerlendirmeye almışlar. İzolatların % 14,4'ü en az bir ilaca dirençli bulunurken dört ilacın tümüne birden dirençlilik oranını % 0,5 olarak tespit etmişlerdir.

Kartaloğlu ve ark (62) yaptığı çalışmada 365 kültür pozitif akciğer tüberkülozlu olguda birinci sıra ilaçlara direnç oranları araştırılmıştır. Bir veya daha fazla ilaca karşı primer direnç 87 (% 23,8) olguda saptandı. En yüksek direnç oranına İzoniasid (%14,8) sahip olup bunu sırası ile etambutol 39 (%10,7), rifampisin 11 (%3) ve streptomisin 9 (%2,5) izlediği gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda izole edilen 26 *M. tuberculosis* suşunun 13 (%50) tanesinde herhangi bir ilaç direncine rastlanmazken İzoniazid'e dirençli 1 (%7,69) suş, Etambutola dirençli 2 (%15,39) suş , Streptomisin'e dirençli 1 (%7,69) suş bulunmuştur. Sadece rifampisine direnç gösteren suşa rastlanmamıştır. İzoniazid-streptomisin, Streptomisin-rifampisin, Streptomisin-etambutol ve rifampisin-etambutol'a birlikte direnç gösteren suş sayıları ve oranları ise sırası ile 2 (%15,39), 1 (%7,69), 1 (%7,69) ve 1 (%7,69) şeklindedir. Dört ilaca birden direnç gösteren 4 (%30,77) suşa rastlanmıştır. 13 suşun 4'ü (%30,77) bir ilaca direnç 5'i (%38,46) iki ilaca ve yine 4 suşta (30,77) 4 ilaca birden çoklu direnç gösterirken üç ilaca direnç gösteren suşa saptanmamıştır.

Ülkemizde antibiyotik duyarlılığı üzerine yapılmış olan çalışmalar incelendiği zaman en yüksek direnç oranına isoniazid'te rastlanmıştır. Bizim çalışmamızda isoniazid'e ait direnç oranı bulunan sonuçların aksine % 7,69'luk oranla en düşük direnç olarak tespit edilmiştir. Tek başına en yüksek direnç oranına % 15,39 oranıyla Etambutol sahiptir. Çalışmamızda en yüksek direnç oranına ise 4 hastayla ve %

30,77 oran ile tüm ilaçlara karşı gösterilen direnç ile çoklu ilaç direncinde rastlanmıştır.

Tüm bu çalışmalar sonucunda dikkat edilmesi gereken nokta direnç oranını arttırmamak ve çoklu direnç problemini çözmek için tedavinin ilaç direnci sonuçlarına göre yapılması gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır.

5. SONUÇLAR

- 1) 280 klinik örneğin EZN boyama, BACTEC 460TB, L-J ve TK-MEDIUM kültür yöntemleri ile incelendiği çalışmada 41 (%14,7) örnek EZN boyama yöntemi BACTEC 12B,L-J ve TK MEDIUM kültür yöntemleri ile pozitif bulunmuştur.
- 2) Dört farklı yöntemle pozitif bulunan 41 örneğin 38 (%92,7) tanesi EZN boyama yöntemi ile 31 tanesi (%75,6) L-J, 23 tanesi (% 56,1) BACTEC 460TB ve 21 tanesi (% 51,2) TK MEDIUM kültür yöntemleri ile pozitif bulunmuştur.
- 3) Çalışma kapsamına alınan 280 örnek kontaminasyon bakımından incelendiğinde L-J kültür yönteminde 4 (% 1,4) tane, BACTEC’de 10 adet (% 3,6) ve TK-MEDIUM kültür yönteminde 8 (% 2,9) tane örneğin kontamine olduğu tespit edilmiştir.
- 4) 280 klinik örnekten pozitif bulunan 41 suşun uygulanan niasin identifikasyon testi ve NAP identifikasyon testi sonrasında 26 (%63,4) tanesinin *M. tuberculosis* kompleks, 15 (% 36,6) tanesinin MOTT basilleri olduğu tanımlanmıştır.
- 5) İzole edilen 26 *M. tuberculosis* suşunun 13 (% 50) tanesinde ilaç direncine rastlanmazken kalan 13 suşta İzoniazid’e dirençli 1 (%7,69) suş, Etambutola dirençli 2 (%15,39) suş , Streptomisin’e dirençli 1 (%7,69) suş bulunmuştur. İki ilaca birden dirençli suş sayısı 5 (% 38,6) ve tüm ilaçlara dirençli suş sayısı 4 (% 30,77) olarak bulunmuştur.

- 1) Kıyan M. (1999) Mycobacteriaceae: In: Ustaçelebi Ş., (ed) *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Güneş Kitabevi, Ankara.
- 2) Saniç A., Çoban A.Y., (1999) Mikobakteriler ve Laboratuvar Tanı. Samsun.
- 3) Uzun M., (1994) Tüberküloz tanısında Erlich-Ziehl-Nielsen, Fluokrom boyama yöntemleri ile BACTEC ve Löwenstein-Jensen kültür yöntemlerinin sonuçlarının değerlendirilmesi. *İst. Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi*
- 4) Barış İ., (2003) Çağlar Boyu Tüberküloz. *21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar tanı Yöntemleri Kurs Kitabı Samsun.* 1-7.
- 5) Arıç Ö., Uzun M., (1999) Türkiye’de Tüberkülozun Son Durumu. *Klinik Derg 11(1)*, 3-5
- 6) Aşcıoğlu S.A., Hayran M., (1996) Tüberküloz. *İnfeksiyon Bülteni 1*, 5-8
- 7) Arıç Ö., Erturan Z., (1996) Tüberkülozun dönüşü ve direnç sorunu, Tüberkülozda tanı direnç, tedavi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını 26*, 17-25.
- 8) Özekinci T., (2000) Tüberküloz tanısında Erlich-Ziehl-Nielsen, Fluokrom boyama yöntemleri ile BACTEC ve Löwenstein-Jensen kültür yöntemlerinin sonuçlarının değerlendirilmesi. *Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi.*
- 9) Köksal F., Yaman A. (2003) Farklı Bir Bakteri Topluluğu Mikobakterilerde Hücre Hücre Duvar Yapısı. *21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar tanı Yöntemleri Kurs Kitabı Samsun.* 34-47.
- 10) Wayne L.G., Sramek H.A., (1996) Agents of newly recognized or infrequent encountered mycobacterial diseases. *Clin Microbiol Rev 5*, 1-25.
- 11) Tünger A., Çavuşoğlu C., Korkmaz M., (2000) Mycobacterium *Mikrobiyoloji 2000*, Asya tıp Yayıncılık . İzmir
- 12) Bilgehan H. (2000) Mycobacteriaceae. *Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakterioloji ve Bakteri Enfeksiyonları*. Barış Yayınları, İzmir

- 13) Gedikođlu S., (1997) Mycobacterium tuberculosis'in h¼cre yapısı. *İnfeksiyon Derg 11(4)*, 13-17.
- 14) Kocabaş A., (1991) Mikobakterilerin yapısal ve antijenik özellikleri: İn: Kocabaş A (ed) T¼berk¼loz Kliniği ve Kontrol¼, Emel Matbaası, Ankara.
- 15) Murray P.R., Drew W.C., Kobayashi G.S., Thompson J.H., (1990) Medical Microbiology. Wolfe Medical Publication Ltd, London.
- 16) Behr M.A., Warren S.A., Salamon H., et al. (1999) Transmission of Mycobacterium tuberculosis from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet 353*, 444-49.
- 17) Valway S.E., Sanchez M.P.C., Shinnick T.F., et al. (1998) An outbreak of tuberculosis involving extensive transmission of a virulent strain of *M. tuberculosis*. *N Engl J Med 338*, 633-39.
- 18) Kılıçturgay K., (1997) T¼berk¼lozda imm¼nopatogenez. *İnfeksiyon Derg 11(4:Ekyayın)*, 7-10.
- 19) Samuelson J., (1999) Infectious Diseases: İn: Cotran R.S., (eds).Robbins Pathologic Basis of Disease, Philadelphia.
- 20) Dannenberg AM. (1999) Pathophysiology Basic Aspects. (4 th) In : David Schlossberg (ed) Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections. WB Saunders Company, Philedelphia.
- 21) Balcı K. (1993) G¼đ¼s hastalıkları ve Plevra hastalıkları. (3. Baskı) Atlas Kitabevi, Konya.
- 22) Çoban II B: Akciğer t¼berk¼lozu patogenezi, Kocabaş (ed): T¼berk¼loz Kliniği ve Kontrol¼" kitabında, s.69, Emel Matbaası, Ankara (1991).
- 23) Spitznagel J: Mycobacteria: Tuberculosis and lepro , "M Schaechter, G Medoff, D Schlessinger (eds): Mechanisms of Mierobial Disease" kitabında, s.303, Williams and Wilkins, Baltimore, Hong Kong, London (1989).
- 24) Levinson W, Jawetz E. (1997) Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmm¼noloji (4. Baskı) Prentice Hall ve Barış Kitabevi, İstanbul.

- 25) Tekerekođlu S., Durmaz R., Özerol İ., (2000) Mycobacterium Tuberculosis'in Laboratuvar Tanısı. *Turgut Özal Tıp Merkezi Derg*7(2), 171-76.
- 26) Kasımoğlu Ö., (1996) Tüberküloz tanısında yeni gelişmeler. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No:26*, 11-15.
- 27) T.C Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı. (2003). *Türkiyede Tüberkülozun Kontrolü İçin Başvuru Kitabı*, 2003.
- 28) Gümüşlü F., Ceyhan İ., Kocagöz T., ve ark. (1998). Tüberküloz laboratuvar rehberi. *T.C Sağlık Bakanlığı Yayını*, 1-20.
- 29) Heifets L.B., (1996) Clinical mycobacteriology. Clinics in laboratory medicine. WB Saunders Co Philedelphia PA.
- 30) Siddiqi S.H., BACTEC T System. (1989). Product and Procedure Manual. Becton Dickinson.
- 31) Arıkan S., (1996) Tüberküloz tanısında direkt mikroskopik inceleme ve kültür. *İnfeksiyon Bülteni 1 (1)*, 9-12.
- 32) Konernan E.W., Allen S.O., Janda W.M., et al. (1997) Mycobacteria. Color Atlas and Textbook of Diagnostik Microbiology (5th ed). JB Lippincott Company, Philadelphia
- 33) Sürücüođlu S., (2003) Tüberküloz Basilinin İdentifikasyonu. *21 Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar tanı Yöntemleri Kurs Kitabı Samsun*.300-309.
- 34) Dio-Tk Kültür sistemi- araştırma önergesi (2002). (TTGV ve TÜBİTAK Desteli ARGE Projesi).
- 35) Kocagöz T. 2002 Tüberküloz tanısındaki yenilikler. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji 2002*,. Nobel Kitabevi.
- 36) Badak F.Z., Kiska O.L., Setterguist S., et al. (1996) Comparisian of mycobacteria growth indicator tu be with BACTEC 460 for detectian and recovery of mycobacteria from clinical specimens. *J Elin Microbiol 34*, 2236-39.

- 37) Bennedson J., Thomsen V.D., Pfyffer G.E., et al. (1996) Utility of PER in diagnosis pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 34, 1407-11.
- 38) Öztürkeri H., BACTEC Yöntemi ile Antibiyotik Duyarlılık Testi. *21 Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuar tanı Yöntemleri Kurs Kitabı Samsun*. 360-368.
- 39) Över U., (1997) Antitüberküloz duyarlılık testleri. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No:33*, 115.
- 40) Yüce A., (1997) Mikobakterilerde antibiyotik duyarlılık testleri. *İnfeksiyon Derg* 11(4:Ek yayın), 47.
- 41) Casal M., (1995) Laboratory approaches to mycobacterial susceptibility to antibiotics. *Rev Esp Quiminterap* 8(3), 184-89
- 42) Fındık S., (2003) Yetişkinlerde tüberküloz tedavisi. *21 Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuar tanı Yöntemleri Kurs Kitabı*, Samsun. 178-183.
- 43) Kiraz N., (2003) Antitüberküloz ilaçlara Direnç ve Yeni ilaçlar. *21 Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuar tanı Yöntemleri Kurs Kitabı*, Samsun. 173-177.
- 44) Çilli A., (2003) Antitüberküloz İlaçlar ve direnç Mekanizmaları. *21 Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuar tanı Yöntemleri Kurs Kitabı*, Samsun. 163-172.
- 45) Bilgiç H., (2003) Türkiyede Tüberkülozun Durumu ve Eradikasyon Programı. *21 Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuar tanı Yöntemleri Kurs Kitabı*, Samsun. 18-28.
- 46) WHO., (2002) Global Tuberculosis Control. Surveillance, Planning, Financing. *Communicable Diseases, World Health Organization, Geneva*, 295.
- 47) Stop tb: www.stoptb.org
- 48) <http://www.diomed.com.tr/tr/urunler1.asp?id1=161&genid=1&altlink=1&menuid=3>

- 49) Üreme ve antibiyogram sonrası çalışılan örneklerden çekilmiş resim.
- 50) Abe C., Hosojima S., Fukasawa Y., et al. (1992) Comparison of MB-Check , BACTEC and Egg-Based media for recoery of mycobacteriae. *J. Clin Microbiol* 30, 878.
- 51) Ellner P.D., Kiehn T.E., Cammarata R., et al. (1988) Rapid detection and identification of pathogenic mycobacteria by combining radiometric and nucleic acid probe methods. *J. Clin Microbiol* 26, 1349
- 52) Somoskövi A., Ködmon C., Lantos A., et al. (2000) Comparison of recoveries of Mycobacterium tuberculosis using the automated BATEC MGIT 960 system, the BACTEC 460 TB system and Löwenstein-Jensen medium. *J. Clin Microbio*, 38, 2395-97
- 53) Kirihara J.M., Hillier S.L., Coyle M.B., (1985) Improved detection times for Mycobacterium avium complex and Mycobacterium tuberculosis with the BACTEC radiometric system. *J. Clin Microbiol* 22, 841.
- 54) Koç A.N., Özcan M., Özbal Y., ve ark. (1996) Comperision of BACTEC TB system and conventional methods for recoveryof Mycobacterium tuberculosis from clinical specimens. *İnfeksiyon derg.* 10(1), 65-6.
- 55) Yaman A., Dündar İ.H., Aksungur P., ve ark. (1994) Comperision of BACTEC TB system and Löwenstein-Jensen medium for the isolation of Mycobacterium tuberculosis and determination of drug sensivity with BACTEC. *Bull Microbiol* 28, 189-98.
- 56) Bekiroğlu N., Baysallar M., Gün H., (1998) Mikobakterilerin mikroskopik tanısında kullanılan iki aside dirençli boyama yönteminin karşılaştırılması. *İnfeksiyon Derg* 12(1), 69-73.
- 57) Yıldıztran Ş.T., Özyurt M., Saraçlı M.A., ve ark. (1998) Yedi yıllık bir dönemde mikobakteriyolojik örneklerle ait smear ve kültür sonuçlarının değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Derg* 12(2), 151-55.
- 58) Tanıl K., Comparison Of Tk Medium With Other Mycobacterial Culture Media In The Isolation Of Mycobacteria From Clinical Samples. *A Review Of Results Obtained From Eight Centers Salubris Inc.* Acibadem Health Group,

Istanbul.

- 59) Karabay O., Otkun M., Akata F., ve ark. (1999) Trakya bölgesinde antitüberküloz ilaç direnci ve ilişkili risk faktörleri. *İnfeksiyon Dergisi* 13(1), 43-50
- 60) Balcı İ., Bayram A., Filiz A., (1999) Mycobacterium tuberculosis’de birinci seçenek ilaçlara direnç. *İnfeksiyon derg* 13(4), 521-25
- 61) Kısa Ö., Albay A., Baylan O., ve ark. (2002) Mycobacterium tuberculosis suşlarında Antitüberküloz İlaç direnç oranlarının BACTEC 460 TB kültür sistemi ile değerlendirilmesi. *Flora Derg* 7(3), 171-76
- 62) Kartaloğlu Z., Bozkanat E., Öztürkeri H., ve ark. (2002) BACTEC yöntemi kullanılarak primer antitüberküloz ilaç direnci saptana 365 tüberküloz olgusu. *Solunum Derg* 4, 443-48.