



T.C.

D CLE ÜN VERS TES

TIP FAKÜLTES TIBB M KROB YOLOJ ANAB L M DALI

**TÜBERKÜLOZ TANISINDA LED FLORESAN
M KROSKOP YÖNTEM VE ZIEHL-NEELSEN
YÖNTEM N N KAR ILA TIRILMASI**

Dr. ÜKRAN CAN

TIPTA UZMANLIK TEZ

TEZ DANI MANI

Prof. Dr. SELAHATT N ATMACA

D YARBAKIR-2013

TE EKKÜR

Asistanlı ım boyunca e itimimde ve tezimle ilgili çalı malarım sırasında her türlü deste ini ve bilgisini esirgemeyen de erli hocam, tez danı manım Prof. Dr. Selahattin Atmaca'ya ve yine asistanlı ım süresince yeti memde büyük eme i geçen ba ta Ana Bilim Dalı Ba kanı Prof. Dr. Kadri Gül hocam olmak üzere bütün hocalarıma; birlik, beraberlik ve dostluk içinde birlikte çalı tı ım sevgili asistan arkadaşlarıma; tezimin laboratuvar çalı maları sırasında her türlü yardım ve deste ini esirgemeyen sevgili Saniye Gebe 'e ve ismini sayamadı ım tüm çalı ma arkadaşlarıma sonsuz te ekkürlerimi sunarım.

Gösterdi i sonsuz sabır ve anlayı ı ile hayatımın her a amasında bana destek olan sevgili e im Dr.Murat Can'a ve beni bugünlere getirip her anımda destek olan sevgili annem ve babama sonsuz te ekkür ederim.

ÖZET

Bu çalı mada Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına direk mikroskopi ve kültür i lemleri için gönderilen 758 klinik örnek alınmı tır. Bu örnekler EZN boyama yöntemi, Auramin-O boyama yöntemi, BACTEC MGIT sıvı besiyeri kültür sistemi ve Löwenstein-Jensen katı besiyeri kültür yöntemi ile çalı ılmı ; aside dirençli basilleri saptamada bu testlerin etkinli i ara tırılmı tır. Çalı mada fluorokrom yöntem olarak tek bir aparat ile ık mikroskobuna uygulanabilen LED-FM kullanılmı tır. ncelenen 758 klinik örne in 102'si (%13.4) kültür pozitif olarak de erlendirilmi ve bunun 50'si (%49) EZN ile, 66'sı (%64.7) Auramin-O ile pozitif olarak tespit edilmi tir. EZN yöntemi ile pozitif olarak bulunan 1 örnek, Auramin-O ile pozitif bulunan 24 örnek kültür negatif olarak belirlenmi tir. Boyama yöntemlerinin kültür yöntemleri referans test alınarak yapılan karşı la tırılmada, EZN boyama yöntemi için duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif de er ve negatif prediktif de er sırasıyla %49.02, %99.85, %98.08, % 92.64 olarak saptanmı tır. Auramin-O için duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif de er ve negatif prediktif de er sırasıyla %64.7, %96.3, %73.33, % 94.6 olarak saptanmı tır. Çalı mada LED-FM yönteminin EZN yöntemine göre sensitivitesi yüksek, spesifitesi dü ük olarak de erlendirilmi tir. Sonuç olarak LED-FM, yüksek sensitivitesinden dolayı i yükü fazla olan laboratuvarlarda EZN'ye alternatif olarak kullanılabilir ve aside dirençli basil üphesi olan preparatların EZN ile do rulanması gerekir.

Anahtar sözcükler: Erlich-Ziehl-Neelsen, Auramin-O, LED-FM, MGIT, Löwenstein-Jensen.

ABSTRACT

A total of 758 clinical samples which were sent to Dicle University Faculty of Medicine, Microbiology Laboratory for direct microscopy and culture were included in this study. EZN staining method, Auramine - O staining method, MGIT broth culture system and Löwenstein -Jensen agar culture method were conducted and the activity of these tests were investigated for detection of acid-fast bacilli. LED-FM applicable to a single apparatus with the light microscope was used as a fluorochrome method in this study. Of examined 758 clinical samples, 102 (13.4%) samples were evaluated as cultures positive and of those samples 50 (49%) samples were found to be positive by EZN, 66 (64.7%) were positive by Auramine-O. One EZN positive sample and 24 Auramine-O positive sample were found to be culture negative. In comparison of both staining methods with the culture method which was taken as a reference test method, sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value for EZN staining method were found to be 49.02 %, 99.85% , 98.08%, and 92.64 %, respectively. Sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value for Auramine-O was found to be 64.7 %, 96.3 %, 73.33 %, 94.6 %, respectively. In this study sensitivity of LED - FM method was higher and specificity was lower than EZN staining method. As a result, LED-FM can be used as an alternative to EZN for its higher sensitivity in laboratory with high workload and the smears with suspicion of acid-fast bacilli should be confirmed with EZN staining method.

Key words: Erlich - Ziehl –Neelsen, Auramine -O, LED - FM, MGIT , Löwenstein - Jensen

Ç İNDEK İLER

	<u>Sayfalar</u>
Te şekkür.....	i
Özet.....	ii
İngilizce özet (Abstract).....	iii
Çindekiler.....	iv
Simgeler ve Kısaltmalar.....	vi
Tablolar ve Şekiller.....	viii
1. GİR İŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL B İLG İLER.....	4
2.1. Morfoloji.....	4
2.2. Üreme özellikleri.....	6
2.3. Klinik de ğeri olan mikobakteri türleri.....	8
2.4. Antijenik yapı.....	16
2.5. Virülans faktörleri.....	17
2.6. Patogenez.....	18
2.7. İmmün yanıt.....	20
2.8. Tüberkülozun laboratuvar tanısı.....	21
2.8.1. Klinik örneklerin alınması ve laboratuvara gönderilmesi.....	22
2.8.2. Örneklerin i lenmesi.....	24
2.8.3. Mikroskopik inceleme.....	25
2.8.4. Kültür yöntemleri.....	28
2.8.5. Besiyerleri.....	28
2.8.6. Hızlı kültür sistemleri.....	29
2.8.7. İdentifikasyon testleri.....	31
2.8.8. Moleküler yöntemler.....	33
2.8.9. Duyarlılık test yöntemleri.....	34

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	38
3.1. Yöntem.....	39
3.1.1. EZN boyama yöntemi.....	40
3.1.2. Auramin – O boyama yöntemi.....	41
3.1.3. Löwenstein-Jensen katı kültür yöntemi.....	42
3.1.4. Bactec MGIT 960 sıvı kültür yöntemi	43
3.2. Sonuçların istatistiksel analizi.....	47
4. BULGULAR.....	49
5. TARTI MA.....	59
6. SONUÇLAR.....	70
7. KAYNAKLAR.....	71

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Ph: Potansiyel hidrojen

cm: Santimetre

Mm: Mikrometre

°C: Santigrad derece

ml : Mililitre

Kisaltmalar

ARB: Aside Dirençli Bakteri

BAL: Bronkoalveolar lavaj

BCG: Bacillus-Calmette-Guerin

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

EZN: Ehrlich-Ziehl-Neelsen

LED-FM: Light Emitting Diode - Fluorescence Microscopy

L-J: Löwenstein Jensen

MGIT: Mycobacterium Growth Indicator Tube

MOTT: Mycobacterium Other Than Tuberculosis

OT: Old Tüberkülin

PPD: Purified Protein Derivative

TSE: Türk Standartları Enstitüsü

WHO: World Health Organization

TABLÖLAR

Tablo 1. M.tuberculosis dışındaki mikobakteriler.....	8
Tablo 2. ARB pozitif preparatın değerlendirilmesi.....	26
Tablo 3. Sonuçların karşılaştırılması.....	47
Tablo 4. Klinik örneklerin dağılımı.....	49
Tablo 5. İncelenen klinik örneklerin preparat sonuçları.....	51
Tablo 6. Kültür pozitifliği yönünden Bactec MGIT 960 ve L-J besiyerinden alınan sonuçların karşılaştırılması.....	53
Tablo 7. Bactec MGIT 960 ve EZN sonuçlarının karşılaştırılması.....	54
Tablo 8. Bactec MGIT 960 ve Auramin- O sonuçlarının karşılaştırılması.....	54
Tablo 9. L-J ve EZN sonuçlarının karşılaştırılması.....	55
Tablo 10. L-J ve Auramin- O sonuçlarının karşılaştırılması.....	56
Tablo 11. EZN boyama yöntemi ile kültür sonuçlarının karşılaştırılması.....	56
Tablo 12. Auramin- O boyama yöntemi ile kültür sonuçlarının karşılaştırılması.....	57
Tablo 13. EZN ve Auramin-O boyama yöntemlerinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif belirleyicilik değerleri.....	57
Tablo 14. Kültür ve boyama yöntemlerinin sonuçlarının karşılaştırılması.....	58

EKLER

ekil 1. Mikobakteri hücre duvar yapısı.....	5
ekil 2. ARB pozitif preparatın ışık mikroskobu ile görünümü.....	41
ekil 3. ARB pozitif preparatın LED-FM ile görünümü.....	42
ekil 4. L-J besiyerinde mikobakteri üremesi.....	43
ekil 5. M.tuberculosis tanımlanmasında kullanılan kard test yorumlanması.....	46
ekil 6. Tüm hastaların cinsiyete göre dağılımı.....	49

1.G R VE AMAÇ

Tüberküloz tanı ve tedavi yöntemlerindeki ilerlemelere karşın, bugün de bütün dünyada, özellikle gelişmekte olan ülkelerde, yaygın olarak bulunan insanlık tarihinin en eski ve en çok korkulan hastalıklarından biridir(1,2). Tüberküloz dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunudur. Tüberküloz kolay bulaşan ve potansiyel ölümcül bir hastalık olduğundan, çabuk tanı konması ve hızlı bir şekilde tedavi edilmesi önemlidir(3,4).

Tedavi edilebilir bir hastalık olan tüberküloz, anti-tüberküloz ilaçların kullanıma girmesinin ve BCG aşı uygulamalarının başlatılmasının üzerinden yaklaşık 50 yıl geçmi olmasına rağmen, günümüzde gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde, özellikle savaşlar ve iç siyasi karışıklıklar sebebi ile sağlık kontrol ve korunma yapılmaları zayıf olan ülkelere yeniden önem kazanan hastalıklar arasındaki yerini korumaktadır.

İnsanlık tarihi kadar eski bir tarihi olan tüberküloz ya da verem hakkında ilk bilgiler milattan 3000 yıl önce Nil nehri kenarındaki Dra Abu - El Naga isimli kasabada yaşamı olan ve kanlı balgam çıkararak ölen bir genç kızıdan örenilmiştir(5). Milattan 1000 yıl önce yaşamı olan rahip Nesperehan'ın mumyasında pott absesi denilen vertebra tüberkülozu görüldüğü ispat edilmiştir(5,6). Günümüzden 2500 yıl önce Bodrum'un karısındaki Kos adasında yaşamı olan Hippocrates'in kitabında vereme ait bilgilerin yazıldığı görülmüştür(6). Tüberküloz hastalığının özelliklerini ilk kez Fransız askeri hekimi Jean Willemin saptamıştır. Araştırıcı tüberkülozun bir mikroorganizma ile bulaşan bir hastalık olduğunu göstermiştir. 1765 yılında 'Tüberkülozun nedeni ve özellikleri ile insandan tavana bulaşması' adındaki eserinde deney sonuçlarını yayınlamıştır(5). Tüberküloz basiliyi ilk kez 1882 yılında Robert Koch isimli bir kasaba doktoru, ekinin hediye ettiği bir mikroskopla göstermiştir. Koch ayrıca 1890'da old tüberkülin ile hastalığının özel immünite ve allerjisini ortaya koymuştur. 1921 yılında Calmette ve Guerin tüberküloz aşısı olan BCG'yi (Bacillus Calmette Guerin) geliştirmişlerdir(1,2,5,7).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 1993 yılında tüberküloz konusunda acil durum ilan ederek tüm dünya ülkelerine "Doküman Gözetimli Tedavi Stratejisini" önermiştir. Bu stratejinin yaygın şekilde uygulanması ile son yıllarda tüberküloz

insidansında görülen artış durdurulmuş olmasına rağmen belirlenen hedeflere henüz ulaşamamıştır(8).

Dünya Sağlık Örgütü 2011 yılında yayınladığı tüberkülozla ilgili raporunda her yıl yaklaşık 8.7 milyon yeni vaka görüldüğünü, bunun yanı sıra 1.4 milyon kişinin de hayatını kaybettiğini ve ölen hastaların 430.000'inin aynı zamanda AIDS hastası olduklarını bildirmiştir. 2011 yılında toplam 5,8 milyon hastaya tanı konulmuş ve tedavi verilmiştir. Bu vakaların % 90'nının gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde görüldüğü belirtilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre ülkemizin de içinde yer aldığı DSÖ Avrupa Bölgesi'nde 2009 yılı tüberküloz insidansı ortalaması yüz binde 47 olarak bildirilmiştir. DSÖ tahminlerine göre Türkiye'de 2010 yılı tüberküloz insidansı yüz binde 28, tüberküloz prevalansı yüz binde 24'tür(9).

Tüberküloz tanısında altın standart tanı yöntemi mikobakterial kültürdür. Fakat kültür işlemi zaman alan pahalı bir yöntemdir. Bu nedenle sınırlı kaynaklara sahip ülkelerdeki pulmoner tüberkülozdan şüphelenen hastaların balgam yayma mikroskopisi yöntemi ile araştırılmaktadır. Örneğin direk bakışı hastalığın erken tanısı için çok önemlidir. Bu yöntemin duyarlılığı daha düşüktüğü için, alternatif yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Tüberkülozda kontrol mekanizmasının en önemli aşaması vakaların hızlı şekilde belirlenmesidir. Vaka tespitinde en önemli metod balgam preparatlarının mikroskopik incelenmesi olup, bu basillerin floresan boyama yöntemi ile boyanıp floresan mikroskop ile incelendiğinde gerçek pozitiflik artmış, zaman açısından EZN yöntemine göre daha hızlı olduğu ve artık gelişmiş ülkelerde floresan mikroskop yönteminin tercih edildiği bildirilmektedir(9).

Floresan mikroskopa alternatif olarak geliştirilen Light Emitting Diode mikroskopisi yönteminin ise, konvansiyonel mikroskopik yöntemlerle karşılaştırıldığında biraz pahalı olmasıyla beraber, karanlık oda gereksiniminin olmaması, hassasiyetinin yüksek olması nedeniyle; Dünya Sağlık Örgütü Floresan Mikroskop yerine Light Emitting Diode Floresan Mikroskopun tercih edilmesini önermektedir(9).

Tüberküloz, kolay bulaşan potansiyel ölümcül bir hastalık olduğundan çabuk tanı konması ve hızlı bir şekilde tedavi edilmesi önemlidir. LED FM ile örnek incelenmesi EZN ile incelemeye göre 4 kat daha kısa sürede tamamlanmaktadır(4).

Ayrıca LED FM'in karanlık alan gerektirmemesi ve tek bir aparat ile ışık mikroskopisine uygulanabilir olması normal floresan mikroskopisine göre avantajlı yönleridir.

Bu çalışmada tüberküloz şüphesi olan hastalarda kültür altın standart kabul edilerek; EZN ve LED FM yöntemi ile tbc basili varlığını ara tırıp, bu iki yöntemin özgüllü ünü ve duyarlılı ını karşıla tırmayı amaçladık.

2. GENEL B LG LER

Mycobacterium cinsi (genus), Eubacteria üst aleminin (superregnum), Firmicutes bölümünün (divisio), Actinomycetes sınıfının (classis), Mycobacteria takımından (ordo), Mycobacteriaceae ailesine (familia) dahil olup bu ailedeki tek cinstir. Yüksek oranda G+C (%62-70) içermeleri ile mikolik asit içeren di er bakterilere, Nocardia (%60-90), Rhodococcus (%59-69), ve Corynebacteriumlara (%51-59) benzerler(10).

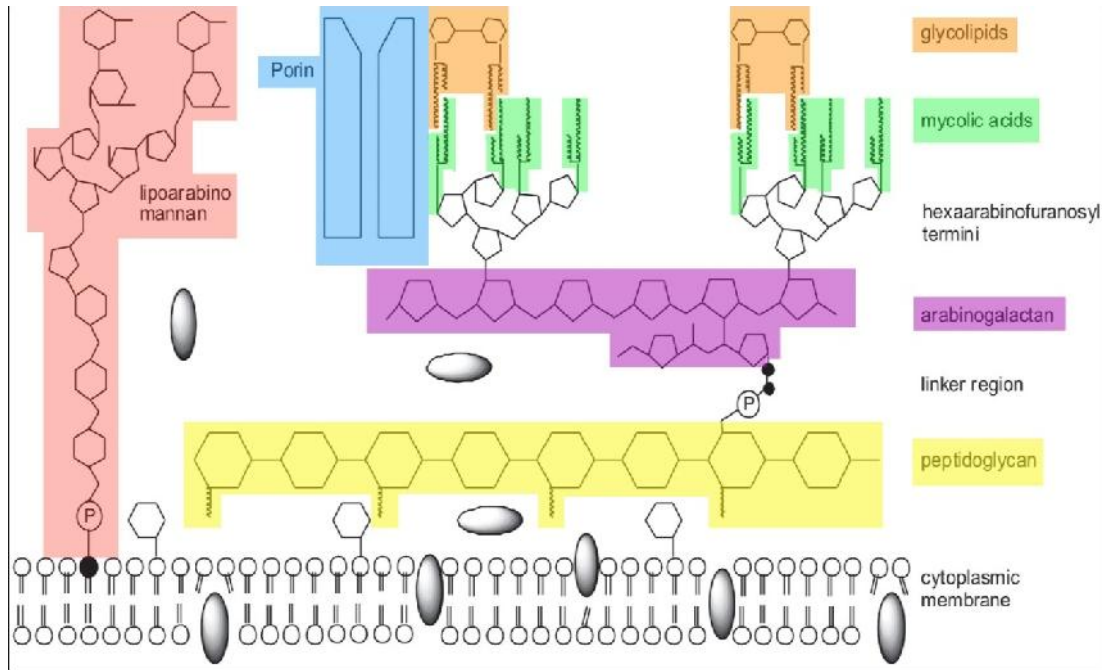
Mycobakteriumlar üreme, boyanma ve yapısal bazı özellikleri ile di er bakterilerden farklılık gösterirler. Bakteriyolojik özellikler ve DNA benzerlikleri yönünden birbirleri ile yakından ili kili olan türler 'kompleks' ba lı ı altında gruplandırılır ve tanımlanırlar (*M. tuberculosis* kompleks, *M. avium* kompleks vb.). *M. tuberculosis* kompleks içinde yer alan türler *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis*'in alttürü olan *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*'dir. Bu türler dı nda kalan mikobakteriler ise Mycobacteria other than tuberculosis (MOTT) olarak adlandırılmı tır(11,12,13,14).

2. 1. Morfoloji

Mikobakteriler hafif kıvrık veya düz çomak ekinde, 0.2-0.6 µm eninde, 1-10 µm boyunda ince basillerdir. Hareketsiz, sporsuz ve kapsülsüzdürler. Aerob ortamda üreyebilen mikroorganizmalardır. Bu cins içerisinde yer alan bakteriler morfolojik olarak birbirlerinden ayrılmazlar. Mikobakteriler, sitoplazma, plazma membranı ve bunları çevreleyen dallanmı ve uzun zincirli mikolik asitlerden olu an lipitçe zengin hücre duvarından olu mu lardır. Lipitten zengin hücre duvarları di er bakterileri boyamada kullanılan anilin boyaların geçi ine izin vermez. Anilin boyaların hücre duvarından geçebilmesi için fenol veya ısı ile birlikte fenol uygulanır. Hücre duvarına nüfuz eden boyanın uzakla tırılmasında ise sadece alkol kullanımı yetersiz olup asit-alkol uygulanır. Asit kullanımına ra men ilk boya hücre duvarında kalır. Asit alkole gösterdikleri direnç özelliklerinden dolayı aside dirençli bakteriler olarak da adlandırılırlar(11,15,16,17,18,19).

Gram yöntemi ile kolayca boyanmamalarına ra men mikobakteriler genellikle gram pozitif kabul edilirler(3). Hücre duvarının temel yapısı tipik gram pozitif bakterilerin hücre duvarına benzer, temel yapı peptidoglikandır.

M. tuberculosis bilinen bakteriler arasında en kompleks yapıya sahip hücre duvarına sahiptir. Mikobakterilerin hücre duvarı üç tabakadan oluşur. Plazma zarının üzerinde bulunan en iç tabaka peptidoglikandan (mürein) oluşur. Bu tabaka kısa peptid zincirleri, çapraz bağlarla sıkıca bağlanmış uzun polisakkarit zincirleri içerir ve hücrenin sert yapısını sağlar. Peptidoglikan tabakasının üzerinde bulunan ikinci tabaka arabinogalaktan tabakası olup hücre duvarı kitlesinin %35'ini yapar ve peptidoglikan tabakasına fosfodiester köprüleriyle bağlıdır. Arabinogalaktanların yan zincirindeki uç arabinaz birimlerine mikolik asit diye adlandırılan, uzun zincirli bir grup yağ asiti kovalent olarak bağlanır. Bu asitler hücre duvarı kalınlığından ve büyük oranda da hücrenin asit dirençli olmasından sorumludur. Mikolik asitler, trehaloz gibi bir şekerle bağlanarak kord faktörü oluşturabilirler. En dış tabaka ise bir grup heterojen peptidoglikolipid ve/veya fenolik glikolipidlerden oluşur ve mikozidler olarak adlandırılırlar. Hücre duvarında bulunan ve duvar kalınlığının %60'ını yapan lipidlerin çoğu uzun zincirli yağ asitlerinden oluşmaktadır. Bu lipidler tüberkülostearik asit, mikoserik asit ve mikolik asitleri içerirler(11,15,19). Mikobakterilerin hücre duvar yapısı Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Mikobakteri hücre duvar yapısı

Mycobacterium tuberculosis kompleksinde yer alan virülans faktörleri sıvı besiyerinde karakteristik olarak ip veya demet şeklinde yılanakavi kord oluşturarak ürerler. Kord faktörü bir glikolipittir ve mikolik asitler trehaloz gibi şekerlere

ba lanarak kord faktörü olu tururlar. *Mycobacterium tuberculosis* kompleksinde yer alan ve virülan olmayan su lar ile mycobacterium tuberculosis kompleks dı ı su ların kord faktör olu turması, üredi i besiyerlerinin içeri ine ve kültür ko ullarına ba lıdır(20).

2. 2. Üreme Özellikleri

Mikobakteriler zorunlu aerob olup en iyi 37°C'de ürerler. Bazı türler en iyi 30-34 °C'de ürerler. Optimum Ph'nın 6.4-7 arasında olması gerekmektedir. Buldukları ortamda %5-10 CO₂'ye ve %0.5 gliserole gereksinim duyarlar.

M. tuberculosis' in üremesi yava olup replikasyon süresi yaklaşık 15- 20 saattir. Mikobakteriler üreme hızlarına göre kabaca hızlı ve yava üreyenler olarak ikiye ayrılabilirler. Yava üreyenler ideal ortamlarda görünebilir koloni olu turabilmesi için yedi günden fazla süreye gereksinim duyarlar. Hızlı üreyenler için bu süre yedi günden kısadır. Yava üreyenler grubuna dahil olan türler, katı besiyerinde pigment olu turma özellikleri de erlendirilerek üç alt gruba ayrılır; pigment olu turmayanlar (nonfotokromojenler), hem karanlıkta hem de aydınlıkta pigment olu turanlar (skotokromojenler), karanlıkta üredikleri sürece pigment olu turmayıp, sadece ı ı a maruz kaldı ında pigment olu turanlar (fotokromojenler)(13). İlk kez 1959'da Ernest Runyon *M.tuberculosis* ve *bovis* dı ında, klinik örneklerden izole edilen di er mikobakteriler için bir gruplama yapmı tır. Bu sınıflamada her grup de i ik türleri içermektedir. Runyon gruplandırmasında pigmentasyon, koloni morfolojisi ve üreme hızı temel alınmı tır(21).

Grup : Sadece ı ıkta sarı-portakal rengi pigment olu turan fotokromojenik mikobakteriler (*M.kansasii*, *M.marinum*, *M.simiae*),

Grup : Karanlıkta portakal rengi veya kırmızı pigment olu turan skotokromojenik mikobakteriler (*M.scrofoleceum*, *M.xenopi*, *M.gordonae*),

Grup : Nonfotokromojenik, yava üreyen, S tipi ve krem rengi kolonileri olan mikobakteriler (*M.avium-intracellula*),

Grup V: 25 ve 37 °C'de üremeleri için bir haftadan daha az bir süreye gereksinim duyan çabuk üreyen mikobakteriler (*M.fortuitum-chelonae* kompleks) içermektedir(21).

Yıllar sonra bütün mikobakteri türlerinin Runyon gruplamasına uymadığını farkına varılmış ve bunların dışında birçok yeni tür tanımlanmıştır. Örneğin *M. avium-intracellulare*'nin bazı izolatları yüksek oranda pigment olurları ve *M. szulgai*'nin 25 °C'de fotokromojenik, 37 °C'de skotokromojenik oldukları fark edilmiştir. Bu farklılıklar nedeniyle artık bütün mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanmaları tavsiye edilmektedir ve Runyon gruplandırması laboratuvarlarda kullanılmaktadır.

Runyon gruplandırmasındaki diğer mikobakteriler 'atipik mikobakteriler' olarak adlandırılmış ve son yıllarda bu türlerin atipik olmadıkları kabul edilmiş ve bu grup için 'MOTT (Mycobacteria other than tuberculosis)' veya 'non-tuberculosis mycobacteria' terimleri kullanılmaktadır. Ancak bu terimlerin de mikobakteri türlerini tanımlamada yetersiz kaldığı görülmüştür. Klinik açıdan önemli çeşitli mikobakteri türlerinin olurları infeksiyonların tedavileri farklı olduğu için tüm mikobakterilerin tür adları ile belirtilmeleri gerekmektedir. Klinik mikrobiyoloji yönünden mikobakterilerin daha uygun sınıflandırılması Wollinski tarafından 1979 yılında yapılmış, Woods ve Washington tarafından yeniden düzenlenmiştir. Tablo 1 *M. tuberculosis* dışındaki mikobakterileri göstermektedir(1,22).

Tablo 1: M.tuberculosis dışındaki mikobakteriler(22)

GRUP	TÜR
<u>insanlarda patojen olan türler</u>	<i>M. leprae</i>
<u>insanlarda potansiyel patojen olan türler</u>	<i>M.avium-intracellulare, M. kansasii</i> <i>M. fortuitum-chelonae kompleks, M. xenopi</i>
<u>insanlarda nadiren hastalık oluşturan saprofit mikobakteriler</u>	<i>M. gordonae, M. asiaticum, M. terrae-triviale kompleks, M. gastri, M. nonchromogenicum,</i>
Yavaş üreyenler (> 7 gün)	<i>M. paratuberculosis</i> <i>M. flavescens</i>
Orta sürede üreyenler (7-10 gün)	<i>M. termoresistibile, M. smegmatis, M. vaccae</i>
Çabuk üreyenler (<7 gün)	<i>M. parafortuitum kompleks, M. phlei</i>

2. 3. Klinik Değeri Olan Mikobakteri Türleri

***M. tuberculosis* kompleks**

Bu kompleks içinde; *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis*'in alttürü olan *M. bovis* BCG, *M. africanum*, ve *M. microti* türleri yer alır. Genotipik özelliklerinin birbirlerine çok yakın olması (> %95 DNA-DNA homolojisi) , insandan izole edildiklerinde her zaman patojen kabul edilip, tedavi gerektirmeleri bu türlerin aynı kompleks içine dahil edilmelerinin sebebidir(11,12). Tedavileri hemen hemen aynı olan ve her zaman tedavi edilmesi gereken bu türlerin identifikasyonunu kompleks düzeyinde yapmak, klinik laboratuvarların işini kolaylaştırır ve hastaların tedavisine vakit kaybedilmeden geçilmesini sağlar.

M. tuberculosis pigment oluşturmeyen, sıvı besiyerinde kord faktör oluşturan, niyasin pozitif (*M. simiae*, bazı *M. bovis* türleri, *M. marinum* ve *M. chelonae* niyasin oluşturmeyebilir), nitratları nitritlere indirgeyebilen, tiyofen-2-karboksilik asid hidrazid

(TCH)'de üreyebilen, katalaz testi pozitif (INH dirençli türler dışında) ve 68 °C'de bu özelliğini yitiren, p-nitro-asetilamino-hidroksi propiyofenon (NAP) içeren sıvı besiyerinde üremesi inhibe olan mikobakteri türüdür(12,16,23).

M. bovis nitratları nitritlere indirgeyemeyen, çoğu niyasin negatif olan, pirazinamidaz üretemeyen, TCH'de üremesi inhibe olan, yumurta ve gliserin içerikli katı besiyerlerinde üremeleri güçlü bir türdür. *M. bovis* türünün oluşturma ve yayılma hızı *M. tuberculosis* türünün oluşturma ve yayılma hızından daha yüksektir. *M. tuberculosis* türünün etken olduğu enfeksiyondan ayrılamaz. Enfeksiyonun bulaşmasında sıklıkla süt ürünleri rol oynar ve bu nedenle bağırsak lezyonları akciğerden çok servikal ve intestinal lenf nodüllerinde olur. Pastörize süt kullanımı ve tüberkülin reaksiyonu gösteren sıvıların kesilmesi nedeniyle Amerika'da *M. bovis* türlerine bağlı enfeksiyonlar nadirdir(12,13,24).

M. tuberculosis zorunlu aerobik bir bakteri olduğundan iyi oksijenlenen organ ve dokulara yerleşip çoğalma ve hastalık oluşturma eğilimindedir. Bu nedenle tüberküloz en fazla akciğerlerde, daha sonra sırasıyla seröz zarlar (plevra, meninks, periton), böbrek, eklem-kemikler, lenf bezleri, larenks, genital sistem (testis, epididim, ovaryum, uterus), barsak ve diğer organlarda görülür. Parsiyel oksijen basıncı düşük olan karaciğer, dalak, mide ve pankreas gibi organlarda enfeksiyona (disseminasyon dışında) seyrek rastlanır (14,15,25,26).

Hasta akciğerlerin hapırması, öksürmesi ile havaya yayılan ve havada asılı kalan 1-5µm çapındaki damlacık çekirdekleri ile *M. tuberculosis* taşınır. Duyarlı akciğerlerin bu damlacık çekirdeklerini inhale etmesi ile enfeksiyon meydana gelir. Alveollere ulaşan damlacık çekirdekleri ile taşınan *M. tuberculosis*, konağın ilk savunma mekanizmasını yenip hayatta kalmayı başarır ise; akciğer parankiminde pnömoni odaklı (Ghon odaklı), komşu hiler lenf bezinde granümatöz inflamasyon ve bu iki oluşum arasındaki lenfanjit ile karakterize primer kompleksin (Ranke kompleksi) meydana gelmesine neden olur. Primer enfeksiyon da denilen bu süreç hücresel immün yanıt gelişimiyle durdurulur ise, hastalık oluşturma olayı sonlanır. Eğer konağın immün yanıtı yetersiz kalırsa primer odak ve ilgili lenf bezindeki inflamasyon ilerler, primer tüberküloz meydana gelir. Bakteriler immün sistem hücreleri tarafından tamamen yok edilemeyip yıllarca canlılığını koruyarak sessiz (dormant) kalırlar (11,14,15,16,23,25).

Primer infeksiyon sırasında kazeöz bir oda ın damara açılması veya erken hematojen yayılım esnasında büyük damar intimasına yerle en basillerin kana karı ması ile milier tüberküloz geli ir. Daha çok 0-4 ya arası çocuklarda, primer infeksiyonun erken komplikasyonu ekinde ortaya çıkar. Milier tüberkülozu, bir kaç hafta içinde geli en tüberküloz menenjit izleyebilir. Milier tüberküloz, ileri ya larda da ortaya çıkabilir. Eski bir tüberküloz lezyonunun aktive olup kan damarına açılması, lezyon bulunan bir organa yapılan cerrahi giri ime ba lı olarak inaktif haldeki basillerin kana karı ması gibi çok de i ik nedenlerle milier tüberküloz geli ebilir. Ancak çocuklara göre eri kinlerde milier tüberküloz daha az görülür (14,15,16,23,25).

Reinfeksiyon tüberkülozu iki ekilde ortaya çıkar: Endojen reinfeksiyon ve ekzojen reinfeksiyon. Endojen reinfeksiyon tüberkülozu, sıklıkla primer infeksiyon sırasında lenfohematojen yolla akci erin apikal-subapikal bölgelerine yerle en (Simon oda ı) ve ço almadan burada canlılı ını sürdüren dormant basillerinin, hayatın herhangi bir döneminde hücre sel immün yanıtta meydana gelen supresyon nedeniyle aktif hale geçmesi ile meydana gelir. Ekzojen reinfeksiyon ise önceden primer infeksiyon geçirmi ki inin, basil yayan aktif tüberkülozlu bir hastadan çok sayıda virülan basil alması ile meydana gelir (14,15,16,25).

***M. avium-intracellulare* kompleks (MAI)**

Yava üreyen, nonfotokromojen grubta bulunan MAI kompleksi, *M. avium* ve *M. intracellulare* türlerini ihtiva eder. MAI su ları do ada su, toprak ba ta olmak üzere di er çevresel kaynaklarda bol miktarda bulunmaktadır (12,13).

M. avium ve *M. intracellulare* türleri biyokimyasal deneylerde nispeten nonreaktif davranırlar; niasin, semikantitatif katalaz, nitrat redüktaz, Tween 80 hidrolizi, %5 NaCl toleransı ve üreaz deneyleri negatif olup ısıya dirençli katalaz deneyi ise pozitifdir. Bu kompleks içinde yer alan bu iki türü klasik fenotipik yöntemler ile ayırt etmek mümkün de ildir (12).

MAI, geli mi ülkelerde en sık hastalık etkeni olan MOTT türüdür. AIDS hastalarında bu bakterilerin çe itli ve yaygın infeksiyonları görülebilir. AIDS olmayan hastalarda *M. avium* izole edilmesinin bir infeksiyondan çok kolonizasyon olarak de erlendirilmesi gerekti i bildirilmi tir (12,17,18,24).

M. haemophilum

Yava üreyen, nonfotokromojen gruba dahildir. Biyokimyasal deneylerde nonreaktif özellik gösterir, sadece pirazinamidaz deneyi pozitif sonuç verir.

Besiyerinde üremeleri için hemin ve ferrik amonyum sitrata ihtiyaç duyarlar. Optimal üreme ısıları 30 °C olup üremeleri için 10 hafta veya daha fazla inkübasyona gereksinimleri vardır. Mikroaerofilik ortamlarda daha iyi ve hızlı üreyebilirler (11,15,25,27).

Transplant, lenfoma, AIDS hastaları gibi immün sistemi baskı altında olan kişilerde *M. haemophilum* infeksiyonları gelişebilir. En fazla görülen klinik form deri ve yumuşak doku infeksiyonlarıdır (15).

M. malmoense

İlk vaka Malmö'de tespit edildiği için *M. malmoense* ismi verilmiştir. L-J besiyerinde zayıf bir üreme gösterir, 8-12 hafta kadar inkübasyon süresine gereksinim duyar. Tween 80 hidrolizi ve pirazinamidaz deneyleri pozitifdir (11,12,27).

M. malmoense infeksiyonları genellikle, daha önceden akciğer hastalığı olan veya immün yetmezliği olan kişilerde görülür. Akciğer tutulumu en sık rastlanılan formu olmakla beraber, lenfadenit ve tenosinovit olguları da bildirilmiştir (11,12).

M. shimoidei

Yava üreyen, nonfotokromojen gruba dahil olan *M. shimoidei* türü, ilk olarak 1975 yılında bir Japon hastadan izole edilerek bildirilmiştir. Tween 80 hidrolizi ve pirazinamidaz deneyleri pozitifdir. Bildirilen az sayıda *M. shimoidei* olgusunda, klinik olarak tüberküloza benzer kaviter bir hastalık tablosundan bahsedilmektedir (27,28).

M. genavense

Yava üreyen ve nonfotokromojen gruba dahildir. Semikantitatif ve ısıya dirençli katalaz, üreaz, Tween 80 hidrolizi, pirazinamidaz deneyleri pozitifdir (11).

M. celatum

Yava üreyen, nonfotokromojen gruba dahildir. Middlebrook 7H10 agarındaki kolonileri polimorfik görünümündedir. Mikroskop altında hafifçe bükük aside dirençli bakteri, bazen kokobasil şeklinde görülür. Optimal üreme sıcaklığı 37 °C'dir. 3 günlük ve 14 günlük arilsülfataz, ısıya dirençli katalaz, pirazinamidaz ve tellürit redüktaz deneyleri pozitifdir (12,27).

M. ulcerans

M. ulcerans yava üreyen, pigment olu turmayan, biyokimyasal özellikleri kısmen nonreaktif olmakla beraber sadece ısıya dirençli katalaz deneyi pozitif olan bir türdür. Optimal üreme sıcaklığı 33 °C olup 37 °C'de üreyemezler (12,15,27). *M. ulcerans*, Afrika ve Avustralya gibi tropik iklimlerde, genellikle alt ekstremitelerde ülseröz infeksiyonlara neden olurlar (11,12,15).

***M. terrae* kompleks**

Yava üreyen, nonfotokromojen gruba dahildir. Semikantitatif ve ısıya dirençli katalaz, Tween 80 hidroliz deneyleri pozitiftir. *M. terrae*, *M. nonchromogenicum* ve *M. triviale* türleri nadiren hastalık etkeni oldukları ve fenotipik özellikleri bakımından birbirlerine benzediklerinden aynı kompleks içinde toplanmışlardır (11,27).

M. heidelbergense

İlk kez tekrarlayan servikal lenfadenitli bir çocuktan iki kez arka arkaya izole edilmiş, daha sonra balgam, mide suyu ve idrardan da üretilmiştir. Yava üreyen, nonfotokromojen gruba dahil olan bu tür, primer izolasyonu esnasında L-J besiyerinde üreyemez, sadece BACTEC 7H12 besiyerinde ürer. 25 °C'nin altında ve 45 °C'nin üstündeki sıcaklıklarda üreyemez, optimal üreme sıcaklığı olan 35°C'de 3-4 haftada üstü pürüzsüz kubbevari koloniler oluşurarak ürer. *M. heidelbergense* türünün diğer bir özelliği majör ilaçlardan streptomisin, etambutol, izoniazid, rifampisine duyarlı olmasıdır. Niasin, nitrat redüktaz, % 5 NaCl toleransı, semikantitatif katalaz, asit fosfataz, 3 günlük arilsülfataz deneyleri negatif sonuç verirken ısıya dirençli katalaz, Tween 80 hidrolizi, üreaz ve pirazinamidaz deneyleri pozitiftir (11,29).

M. branderi

22-45 °C sıcaklık arasında yava üreyen, nonfotokromojenik bir türdür. Bu türe ait olduğu saptanan on dört izolatın tümü solunum yollarından üretilmiş ve patojen kabul edilmiştir (11).

M. conspicuum

Yava üreyen, nonfotokromojen gruba dahil edilmi tir. mmün yetmezlikli hastalarda yaygın infeksiyonlara neden oldu u bildirilmi tir. L-J besiyerinde 22 °C ve 31 °C'de ürer, ancak 37 °C'de üremez. Tween 80 hidrolizi, ısıya dirençli katalaz, 14 günlük arilsülfataz deneyleri ile hidrosilamin hidroklorür ve TCH varlı ında üreme pozitifdir (11,30).

M. kansasii

Yava üreyen, fotokromojen, potansiyel patojen oldu u kabul edilen bir türdür. Bazen sularda izole edilebilmekle beraber do al rezervuarı tam olarak bilinmemektedir. *M. kansasii* nitrat redüktaz, ısıya dirençli katalaz aktivitesi yanında 3 günde Tween 80 hidroliz deneyi pozitif sonuç veren bir bakteridir (11,12,13,15,25,27).

M. kansasii ço unlukla kaviter akci er infeksiyonuna yol açmakla beraber, nadiren cilt, yumu ak doku, kas ve kemik dokusu infeksiyonlarına neden olabilir. AIDS'li hastalarda nadiren yaygın infeksiyonlara yol açabilir (11,12,13,15,17,24).

M. marinum

Yava üreyen ve fotokromojen bir türdür. *M. marinum*, zedelenen deri bölgesinin kontamine tuzlu veya tatlı su ile teması sonucu deri infeksiyonlarına yol açar (11,13,15,17,25).

M. marinum'un ilk izolasyonda optimal üreme sıcaklı ı 30-32 °C'dir. 37 °C'de çok az üreme gösterir veya göstermez. *M. marinum*'un bazı su ları niasin üretebilir. Nitratları nitritlere indirgeyemez, Tween 80 hidrolizi, üreaz, pirazinamidaz deneyleri ise pozitifdir (12,15,27).

M. simiae

Yava üreyen, fotokromojen gruba dahildir. Semikantitatif katalaz, ısıya dirençli katalaz, üreaz, pirazinamidaz, tellürit redüktaz deneyleri pozitifdir. Ayrıca su ların %63-85'i niasin pozitif sonuç vermektedir. srail'de 1975-1981 yılları arasında 287 ki iden 399 *M. simiae* su u izole edilmi , fakat bunlar hastalık etkeni olarak kabul edilmemi tir. *M. simiae*'nin daha önce akci er hastalı ı geçirmi insanların akci erlerinde geçici veya uzun süreli kolonizasyon yaptıklarına karar verilmi tir (11,15,27,31).

M. asiaticum

Fotokromojen ve 22 °C'de üreyebilen bir türdür. Semikantitatif ve ısıya dirençli katalaz, Tween 80 hidroliz deneyleri pozitifdir. *M. asiaticum* nadir görülmekle beraber, görüldü ünde ço unlukla hastalık etkenidir. *M. asiaticum*'un özellikle, önceden geçirilmi hastalıkların neden oldu u hasarlı veya drenajı bozulmu akci er dokusunda sekonder olarak yerle ti i saptanmı tır (12,17,27).

M. intermedium

M. intermedium, yava üreyen, fotokromojen gruba dahildir. Kronik obstruktif bron itli bir hastanın balgamından üç kez arka arkaya izole edilmi bir türdür. Filogenetik olarak yava üreyen ve hızlı üreyen mikobakteriler arasında bir yerde bulundu undan *M. intermedium* ismi verilmi tir. 22, 31, 37 ve 41 °C'de üreyebilir, 45 °C'de üreyemez. Tween 80 hidrolizi, üreaz, 14 günlük arilsülfataz, semikantitatif katalaz, ısıya dirençli katalaz ve -galaktozidaz pozitifdir (11,32).

M. scrofulaceum

M. scrofulaceum ismi servikal lenf bezlerinin mikobakteriyel infeksiyonu anlamına gelen scrofula'dan kaynaklanmaktadır. Yava üreyen, skotokromojen gruba dahildir. Tween 80 hidrolizi negatif, nitratları nitritlere indirgeyemezken, semikantitatif ve ısıya dirençli katalaz deneyleri pozitifdir. Genellikle 18 ay-7 ya çocuklarda lenfadenit etkeni olarak izole edilen mikobakteridir (11,12,13,15,17,27).

M. szulgai

M. szulgai'nin 25 °C'de fotokromojen, 37 °C'de skotokromojen olması tipik bir özelli idir. Di er önemli bir özelli i çok kuvvetli nitrat redüktaz pozitifli idir. *M. szulgai* klinik olarak akci er tüberkülozundan ayırt edilemeyen kronik bir tablo olu turur. Hastalar daha çok orta ya lı beyaz erkeklerdir. Ayrıca *M. szulgai*'ye ba lı bursit, tenosinovit, osteomyelit, lenfadenit olguları ve deri lezyonları bildirilmi tir (12,13,15,17,27).

M. xenopi

Yava üreyen, skotokromojen gruba dahildir. Besiyerlerinde optimal üreme sıcaklı ı 42 °C olmakla beraber 37 °C'de zayıf da olsa ürer. 42 °C'de yapılan 14 günlük arilsülfataz ve ısıya dirençli katalaz deneyleri pozitif sonuç verir. Bula kayna ı genellikle su kaynaklarıdır. Renal transplant hastaları, periton dializli hastalar, AIDS hastaları gibi immün yetmezlikli ki ilerde infeksiyon olu turur.

Ba 1 ıklık sistemi normal olan hastalarda nadiren de olsa akci er dı 1 infeksiyonlar olu turabilir (12,13,15,27).

M. triplex

Yüksek performanslı sıvı kromatografisinde (HPLC) üç tepe olu turdu undan bu türe *M. triplex* ismi verilmi tir. *M. triplex*, 25 ve 42 °C'de üremeyen, L-J ve 7H10 besiyerlerinde her zaman pigmentsiz koloniler olu turan ve mikroskopta aside dirençli boyanmı kokobasil veya kısa çomaklar ekinde görünen türdür. Niasin, Tween 80 hidrolizi, 3 günlük aril sülfataz, % 5 NaCl toleransı negatiftir. Semikantitatif katalaz, ısıya dirençli katalaz, nitrat redüktaz ve üreaz deneyleri her zaman pozitifdir.

Streptomisin, izoniazid, rifampisin, kanamisin ve kapreomisine dirençli, etambutol ve etionamide genellikle duyarlıdır (33).

M. interjectum

Filogenetik a açta hızlı ve yava üreyen mikobakteriler arasında bir yerde bulduklarından bu türe *M. interjectum* ismi verilmi tir. *M. interjectum* L-J besiyerinde 3-4 haftada skotokromojenik, 1-2 mm çapında koloniler olu turur. Sadece 31-37 °C'de ürer, 22 °C ve 41 °C'de üreyemez. Niasin, nitrat redüktaz, Tween 80 hidrolizi, -esteraz negatiftir. Pirazinamidaz, üreaz, semikantitatif ve ısıya dirençli katalaz deneyleri ise pozitifdir. *M. interjectum* diyareli bir AIDS hastasından ve kronik lenfadenitli çocuklardan elde edilmi tir (11).

***M. fortuitum-chelonae* kompleks**

Hızlı üreyen mikobakterilerdir. Bu kompleks iki gruptan olu maktadır:

a. *M. fortuitum* spp. grup

-*M. fortuitum*

-*M. peregrinum*

-*M. fortuitum* biovar III

b. *M. chelonae* spp. grup

-*M. chelonae*

-*M. abscessus*

Her iki grupta yer alan su lar da cilt, ciltaltı, kemik dokusu infeksiyonlarına yol açmakta ancak tedavide kullanılacak antibiyotiklere duyarlılıkları farklılık göstermektedir. *M. fortuitum* grubunda yer alan türler siprofloksasin ve amikasine duyarlı iken *M. chelonae* grubu dirençlidir. Ayrıca iki grup içinde yer alan türlerin de antibiyotiklere duyarlılıkları birbirinden farklıdır (12,34,35).

M. fortuitum spp. grubu su, toprak ve tozlardan izole edilmi tir. Ancak *M. chelonae* spp. grubun çevredeki da ılımı tam olarak bilinmemektedir (13).

M. leprae

Lepra (Hansen hastalığı), *M. leprae*'nin neden oldu u kronik granümatöz bir hastalıktır. Dünya Sa lık Örgütü, dünya genelinde lepralı hasta sayısının 11 milyon oldu unu tahmin etmektedir (11,13,18).

M. leprae kültürde üremez. Laboratuvar tanı, genellikle burun sürüntülerinden veya deri biyopsilerinden hazırlanan preparatlarda aside dirençli bakteri görülmesi ile konur. Burun salgıları ile hastalığın bulaşması, deri lezyonları ile direkt temasa göre daha önemlidir (11,13,18).

2. 4. Antijenik Yapı

M. tuberculosis'in yapısında bulunan protein, lipid ve polisakkaritlerin tümü immünojeniktir. Bu komponentler immünosüpresyon, makrofaj aktivasyonu, granülom oluşturma, toksisite, alternatif yoldan kompleman aktivasyonu gibi çok farklı etkilere sahiptir. Mikobakterilerin neden oldu u infeksiyonlarda esas olarak hücrel immün sistem rol oynadığından proteinler, anahtar immünojenler olarak kabul edilirler.

Old tüberkülin (OT): İlk kez Koch tarafından elde edilen OT'in infekte bireylerde, basille karşılaşmış olanlara göre daha çabuk ve belirgin reaksiyon oluşturdu u görülmü ve tüberküloz infeksiyonu tanısında intradermal olarak kullanılmaya başlanmıştır. Tüberküloz basillerinin kaba bir ekstraktı olan OT'nin, aktif tüberküloproteinlere ek olarak, besiyerine ait maddeler ve başka komponentler içermesi nedeniyle saflaştırılmasına gerek duyulmuş ve PPD geliştirilmiştir.

Saflaştırılmış protein derivatives (Purified Protein Derivative: PPD): İlk kez Seibert ve Glenn tarafından tanımlanan, sentetik besiyerinde hazırlanmış OT'nin kollodyon membranlardan süzülmesi ve amonyum sülfat ile çöktürülmesi sonucu

elde edilmi , kısmen daha saf bir üründür. Tam olarak safla tırlamamı olması ve di er mikobakteri türleri ile olu an infeksiyonlarda çapraz reaksiyonlara sık rastlanması gibi olumsuzluklara ra men PPD, immünodiagnostik önemini hala korumaktadır. PPD deneyi ki inin tüberküloz etkeni bakteriler ile kar ıla ıp kar ıla madı mı gösterir, aktif tüberkülozlu olup olmadı mı do rulamaz (15,25)

2. 5. Virülans Faktörleri

Mycobacterium tuberculosis virülansında rol oynayan kesin bir faktör imdiye kadar gösterilememi olmasına ra men kord faktör ve sülfatidler gibi bazı immünoreaktif komponentlerin virülanstı sorumlu olabilece i ortaya konabilmi tir. Bakterinin bilinen histolitik enzimler, endo veya ekzotoksinleri yoktur. Ancak hücre duvarında bulunan bazı yapıların toksik oldu u geçmi te yapılan çalı malarla gösterilebilmi tir (1).

Polisakkaritler (arabinogalaktan ve arabinomannan); duyarlı deney hayvanlarında anaflaktik tipte a ırı duyarlılık reaksiyonlarına neden olurlar. Gecikmi tip a ırı duyarlılık reaksiyonlarında rolleri yoktur. Konak hücre makrofajından TNF- salınımını arttırırlar. Nötrofillerin damardan dokuya geçmesini ve yangısal tepkimenin olu masını sa larlar (1).

Fosfatidil inositol mannosid (PIM); Lipid yapısında olup, esas itibariyle haptendir. Çapraz koruyucu immunitede rolünün olabilece i sanılmaktadır (1).

Muramil dipeptid(MDP); tek ba ına etkisi olmadı ı halde trehaloz dimikolatla birle ince immün sistemi stimule eder ve antitümör aktivite ortaya çıkar (1).

Wax D; peptidoglikolipid yapıda olup Freund's adjuvanının etkisini artırıcı özelli e sahiptir. BCG a ısının, belli tümörlerde gerileme gösteren immunoterapik etkisinde rolü vardır (1).

Kord faktör (trehaloz 6'-6'-dimikolat); tüberküloz basillerine küme olu turma kabiliyeti kazandırdı ı gibi adjuvan etkiyi de içeren çok sayıda özelli e sahiptir. Alternatif kompleman yolunu aktif eder. Polimorfonükleer (PNL) lökosit göçünü önler. Granülom olu umunda rol oynar. Anti tümör özelli i de vardır. Konak hücre membranına tutunarak solunum ve oksidatif fosforilasyonda hasara yol açar. Farelerde karakteristik bir toksisiteye sahiptir (1).

Sülfatidler (sülfolipidler); sülfür içeren glikolipidler. Makrofajlarda, fagozom-lizozom füzyonunu engeller ve bakteriyi lizozomal enzimlerin etkisinden korur. Tek başına etkili olmadığı halde, kord faktörlerle birlikte verildiğinde kord faktörün toksik etkisini artırır (1).

Fosfatidler; epitelyum hücrelerinin dev hücrelere dönüşmesine neden olur(1).

2. 6. Patogenez

Tüberküloz iki amaçlı bir hastalıktır. Birinci amaçta TB akciğerlere gelir, bunun sonucunda tüberküloz enfeksiyonu gelişirse primer tüberküloz hastalığı meydana gelir. Primer tüberküloz enfeksiyonunun genelde sessiz seyretmesi ve latent döneme girmesi veya primer tüberküloz hastalığının iyileşmesinden sonra bireyin yeniden hastalandığı ikinci amaçta da postprimer tüberküloz olarak kabul edilmektedir (36).

TB hava yolu ile konağa geçer ve alveollere ulaşır. Alveollere ulaşan TB fagositozla yok edilebilir. Böylece basillere karşı bir immün yanıt kazanılarak enfeksiyon kontrol altına alınabilir veya primer enfeksiyonu takiben çoğalan basiller primer tüberküloza neden olabilir (37).

Primer enfeksiyon sırasında dormant hale geçen basiller yıllar sonra çoğalmaya başlayabilir ve reaktivasyonla sekonder tüberküloza neden olabilir. Primer enfeksiyon, latent dönemden sonra herhangi bir yarıta aktifleşebilmekte ve en sık akciğerin üst bölgelerinde olmak üzere diğer organlarda sekonder tüberküloza neden olabilmektedir. Konağın basillere karşı oluşturduğu immünolojik yanıtlar (hücre sel immün yanıt ve gecikmiş tip 1 duyarlılık reaksiyonu) hastalığın tipini belirlemektedir. Akciğer tüberkülozunun immunopatogenezi, ilk enfeksiyondan kavite oluşumuna kadar evrelendirilmektedir (37).

Baslangıç evresi; TB'nin alveole inhalasyonu ile ilk evre başlar ve lezyon bölgesinde alveoler makrofajlar toplanarak inflamatuvar bir yanıt gelişir. Alveoler makrofajlar tarafından fagosite edilen basilin virülans özelliklerine ve alveoler makrofajların mikrobisidal gücüne bağlı olarak basiller sindirilir veya zayıf alveoler makrofajlarda basiller çoğalarak enfeksiyonu başlatır. Genetik bozukluk ve kazanılan immün yetersizlikler mikobakteriyel enfeksiyonlara duyarlılık yaratmaktadır (37).

Basillerin ço alma evresi; alveoler makrofajlar tarafından fagosite edilen ve sindirilemeyen basiller ço alarak makrofajları parçalar ve alveoler bo lu u geçerler. Makrofajlardan salınan kemotaktik faktörler dola ımdaki monositlerin lezyon bölgesine toplanmasını sa layarak granülom olu umunu ba latır. Alveoler bo lu a geçen basilleri yeni makrofajlar fagosite etseler bile henüz aktive edilmedikleri ve hücrel immün yanıt geli medi i için ço almalarına engel olamazlar ve lenfo-hematojen yolla tüm vücuda yayılarak yeni granülomlar olu tururlar (37).

Enfeksiyonun kontrol evresi; TB' nin inhalasyonundan sonraki 2-6 hafta içinde, etkene kar ı özgül hücrel immün yanıt geli ir. Lezyon bölgesinde ço alan basillerin tüberkülin benzeri proteinleri, doku hasarı yapan gecikmi tip a ırı duyarlılık reaksiyonuna yol açar. Gecikmi tip a ırı duyarlılık yanıtı, tüberkülin testi pozitifli ine ve tüberkülozda görülen kazeifikasyon, likeifikasyon ve kavitasyona neden olur. Kona ın bu yanıtı, basil içeren makrofajlar ile çevre dokuları harap ederek, inaktif makrofajlar içerisindeki basillerin ço almasını durdurur ve granülom merkezinde kazeöz nekroz dokular olu turur. Makrofaj ve polimorf nüveli lökosit kaynaklı hidrolitik enzimler ile toksik oksijen radikallerinin etkisiyle doku harabiyeti artar. Olu an kazeöz nekroz ortamında basiller, anoksik ko ullar nedeniyle ço alamazlar ve yıllarca hatta ya am boyu dormant halde kalırlar. Primer enfeksiyon ve primer odakların (Ghon oda ı) olu tu u bu evrede tüberkülin testi pozitifdir (37).

Hücrel immün yanıt ile gecikmi tip a ırı duyarlılık reaksiyonu arasındaki etkile im evresinde ise; granülomlarda kazeöz oda ın etrafında toplanan aktif makrofajlar, kazeöz odaklardan kaçan basilleri fagosite ederek hızla sindirirler. Aktif makrofajların yakaladı ı basiller ço almayı sürdürürse, gecikmi tip a ırı duyarlılık yanıtı tekrarlanarak doku harabiyeti artar. E er kazeöz odak erimezse, hücrel immün yanıt tarafından primer enfeksiyonun ilerlemesi durdurulur. Akci er ve lenfo-hematojen yolla vücudun di er bölgelerine ula an basillerin olu turdukları küçük kazeöz odaklar makrofajlar tarafından temizlenir. Büyük kazeöz odaklar ise bir fibröz kapsülle çevrilerek izole edilir (tüberküloz). mmun sistemi baskılanmı ki ilerde olu an kazeöz odaklardan kaçan basiller, inaktif veya dü ük aktivitedeki makrofajlar tarafından fagosite edilir, fakat sindirilemezler. Bu makrofajların basil ço almasını durdurabilmesi için, gecikmi tip a ırı duyarlılık yanıtının tekrarlanması gerekir. Bu yanıt tekrarlandıkça kazeöz nekrozlar geni ler ve primer tüberküloz

olu ur. Lenfo-hematojen yolla basiller akci erden vücudun di er kısımlarına yayılır ve pulmoner ven duvarında olu an kazeöz oda ın açılması ile miliyer ve dissemine tüberküloz geli ir (37).

Kavite olu um evresi; hücrel immün yanıtı primer tüberkülozu kontrol edemeyen ki ilerde, primer tüberküloz endojen reaktivasyonla veya ekzojen reinfeksiyonla ilerleyerek yıllar sonra geli en kaviter lezyonlar olu ur. Primer tüberkülozun ilerlemesi, makrofajlardan salınan hidrolitik enzimlerin protein ve lipitleri hidrolize etmesi ile granülom ortasındaki kazeumun erimesi, likeifikasyon ve kavitasyon ile sonuçlanır. Basiller, hücre dı ında erimi materyal icinde ço alarak eriyikle birlikte akci erin di er bölgelerine yayılırlar (37).

2.7. mmun yanıt

Tüberküloz, hücrel immün yanıtla kontrol edilebilen bir hücre içi infeksiyonudur. Hücrel immünite; makrofaj, dentritik hücre, sitokin ve T lenfosit ile sa lanır. Mikobakteriler do rudan alveoler makrofaj ve lenf bezi dentritik hücrelere penetre olurlar. *M.tuberculosis* hücre duvarında bulunan AraLAM (arabınan terminalinde mannoz olmayan lipoarabinomannan), makrofaj, monosit, nötrofil ve T lenfositlerin kemotaksisinde görev alan kemokinlerin (IL-8,MCP- 1) üretilmesini sa lar. Tüberkülozda hücrel immün yanıt, *M.tuberculosis*' e ait antijenlerin makrofajların veya dentritik hücrelerin MHC I-II veya CD1 molekülleri üzerinden T lenfositlere sunulmasıyla ba lar (37).

Aktive olan T hücreler di er hücreleri aktive yada suprese ederek ba ı ık yanıtı düzenlerler. En önemli korunma mekanizması, uyarılan yardımcı T hücrelerin makrofajları aktive ederek hücre içi mikobakterileri öldürme etkinli ini artırmasıdır. Sitotoksik T hücreleri içlerinde basil ta ıyan zayıf bakterisidal kapasiteli makrofajları öldürür, bu da intraselüler basillerin do rudan do ruya harap olmasına neden olur. Açık a çıkan basiller, aktive olmu ve öldürme kapasiteleri fazla makrofajlar tarafından yutulur ve öldürülür. Hedef hücrelerin a ırı öldürülmesi doku harabiyetine, hücre içi bakterilerin açık a çıkması bakterilerin hematojen ve lenfojen yolla yayılımına yol açar. Yardımcı T hücrelerden salınan lenfokinler immünoregülatör ve immünopatolojik etkilerle klinik belirtilere yol açarlar. Antijen dozunun yüksekli i T helper2 (Th2) sitokin yapımını artırırken, dü ük doz antijen

Th1 sitokinlerini uyarır. IL-2 di er T hücrelerini uyarırken IF- makrofajları uyarır. Uyarılmı makrofajların salgılamı oldu u birçok aktif molekül (reaktif oksijen metabolitleri, proteazlar, monokinler gibi) çevre dokularda harabiyete yol açabilir (38).

Aktive makrofajlar, reaktif oksijen ürünleri, lizozomal enzimler ve di er faktörleri üreten fagosite edici hücreler oldukları için tüberküldenki basilleri yok edebilirler (39).

Gecikmi tip a ırı duyarlılık reaksiyonu, kona ın antijenlere kar ı çıkardı ı inflamatuvar bir yanıt olup, yava meydana gelmekte ve uzun süre devam etmektedir. Bu reaksiyon konakçının doku hasarı yapan bir yanıtı olup, içinde tüberküloz basili ço alan inaktif makrofajları ve bu arada kom u dokuları harap eden bir süreç olarak de erlendirilebilir (37).

Konakta, infeksiyonun başlamasından sonra 2-6 hafta içinde hücresele immün yanıt ve lezyon bölgesinde aktif alveoler makrofajlar ile lenfositler (CD4+TH ve CD8+Tc) toplanarak granülom oluşur. Granülom oluşumunda, *M.tuberculosis* lipidlerinin uyarımıyla infekte makrofajlar tarafından salınan kemokinlerin (IL-8,MCP- 1) rolü vardır. Granülom oluşumu ile alveoler makrofajlar tarafından fagosite edilen ve elimine edilemeyen mikobakterilerin ço alması ve infeksiyonun ilerlemesi durdurulur. Tüberküloz infeksiyonuna kar ı geli en bu konakçı yanıtı, basilin ba langıçta ço almasını ve yayılmasını sınırlar. Kona ın bu etkinli inin ba arısı basilin virülans faktörlerine (kord faktörü) ve sayısına göre de i mektedir. Granülom içinde uzun süre canlı kalabilen basiller, hücresele immün yanıt baskılandı ı zaman aktive olmaktadır. Granülom kazeöz nekroz ile sonuçlanır (37).

Konakta oluş an hücresele immünite ve gecikmi tip a ırı duyarlılık yanıtları, tüberküloz basillerinin ço almasını e it düzeylerde inhibe ederler. Bunu hücresele immün yanıt, fagosite ettikleri basilleri öldürmeleri için makrofajları aktive ederek, gecikmi tip a ırı duyarlılık ise basil içeren aktive olmamı makrofajları ve kom u dokuları harap edip basillerin üremesi için uygun hücre içi ortamı ortadan kaldırarak sağlar (37).

2. 8. Tüberkülozun Laboratuvar Tanısı

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün kararına göre bir hastaya kesin tüberküloz tanısı konabilmesi için uygun ekilde alınan klinik örneğin laboratuvara gönderilmesi, ekim yapılan besiyerlerinde üretilmesi ve tanımlanması gerekir.

Bu amaçla laboratuvarında görevlendirilecek personel ve çevrenin güvenli i için a a ıdaki hususlara riayet edilmesi gereklidir.

Bunlar;

1. Personelin PPD deri testi bilinmeli, negatif ise BCG a ısı yapılmalıdır. Yılda bir toraks grafisi çekilmeli ve fizik muayenesi yapılmalıdır.

2. Personel tüberküloz hakkında bilgilendirilmeli

3. Canlı tüberküloz basili ile ilgili tüm i lemler Class II mikrobiyolojik emniyet kabiniinde yapılmalıdır.

4. Personel koruyucu ekipmanlarla donanımlı olarak çalı malıdır.

a. Sadece çalı ma alanında kullanabilece i koruyucu önlük giymelidir.

b. Mutlaka eldiven kullanmalıdır.

c. Hepa filtreli (N95 standartlarında) maske takarak çalı lmalıdır.

d. Olası sıçramalardan korunmak amacı ile gözlük veya yüz sperli i kullanılmalıdır.

5. Çalı ma alanı gerekti inde ve i lemler tamamlandı nda 10-50 kat sulandırılmı TSE belgesine sahip sodyum hipoklorid solüsyonu ile silinmelidir.

6. Ayrıca i lem sonrasında ortam ultraviyole ı ı ı ile dezenfekte edilmelidir.

7. Tüberküloz Laboratuvarının enfekte atıkları otoklavlanarak atılmalıdır.

8. Çalı ma esnasında odanın kapısı kapalı olmalıdır (Negatif basınçlı odalar önerilir)

9. Tüberküloz ile ilgili materyal, üzerinde tehlikeli biyolojik materyal i areti bulunan iç-içe geçmi üç kap sistemi ile gönderilmelidir.

Tüberküloz hastalılı nın tanısı klinik, histopatolojik, immünolojik ve mikrobiyolojik olarak konulmaktadır. Tüberküloz kesin tanısı ise mikrobiyolojik olarak klinik örneklerde tüberküloz basilinin gösterilmesi ile konur. Mikroskopik inceleme, kültür ve moleküler testler mikrobiyolojik tanıda kullanılan yöntemlerdir(40,41). Mikobakteriyoloji laboratuvarlarının tanı ve tedaviye katkısı; mikobakterinin saptanması ve identifikasyonu, tür tayini ve üretilen basilin ilaç duyarlılı nın saptanmasıyla olur(1). Bu süreç; incelenmesi istenen klinik örneğin hastadan uygun ekilde elde edilip, laboratuvarında homojenize ve dekontamine

edildikten sonra mikroskopik incelemesinin yapılması, kültürünün yapılarak tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması ile sonuçlanır. Centers for Disease Control (CDC) bu işlemlerin örnek laboratuvara kabul edildikten sonra 28 gün içinde sonuçlanmasını önermektedir(42).

2. 8. 1. Klinik örneklerin alınması ve laboratuvara gönderilmesi

Tüberküloz tanısı için klinik örneklerin alınma, laboratuvara gönderilme ve işlenmesinde belirli kurallar vardır. Örnekler temiz, steril, sızdırmaz, burgulu kapaklı, dayanıklı ve tek kullanımlık kaplar içine yeterli miktarda alınmalıdır. İlk örnekler antimikrobiyal tedavi başlamadan önce alınmalıdır(43). Kontaminant bakteri ve mantarların üremesinden kaçınmak için alınan örnekler olası en kısa zamanda laboratuvara gönderilmeli ve işlenmelidir(44,45).

Pulmoner örnekler içinde balgam, indüklenmiş balgam, bronkoalveoler lavaj (BAL), bronşial fırçalama, transtrakeal aspirat, açlık mide suyu örnekleri sayılabilir. Birbirini izleyen 3 ayrı günde 5-10 ml sabah balgamı alınması tercih edilir. Biriktirilmiş balgam örnekleri, yüksek kontaminasyon riski nedeniyle kabul edilmemelidir. Pulmoner tüberkülozun tanısında öksürükle çıkarılan veya indüklenmiş balgam en önemli örnektir(3). Hasta balgam çıkaramazsa indüklenmiş balgam örneği alınabilir, sulu olduğu için reddedilme riskine karşı indüklenmiş balgam olduğu istenirse belirtilmelidir. BAL invaziv bir örnektir, kullanılan bronkoskobun musluk suyu ile kontaminasyonu ve bronkoskopi yapılan daha önceki hastalardan çapraz kontaminasyonu önlemek için dikkatli olunmalıdır. Örnek en az 5 ml alınmalıdır(3,46). Açlık mide suyu, tüberküloz olduğu radyolojik olarak kanıtlanmış balgamı negatif olan hastalarda; bebek ve küçük çocuklarda; nörolojik hastalıklar, koma hali gibi durumlar nedeniyle balgam çıkaramayan ya da balgamını yutan hastalarda, başka yöntemlerle pulmoner örnek alınamıyorsa tercih edilebilir. Birbirini takip eden 3 gün boyunca, sabah aç karnına, tercihen yataından kalkmadan önce alınmalıdır(46).

Ekstrapulmoner örnekler; idrar, steril vücut sıvıları, abses örnekleri ve aspirasyon sıvıları, kan-kemik iliği ve doku örnekleridir. İdrar örnekleri birbirini izleyen en az 3 gün, sabah idrarı alınmalıdır. Örnek miktarı en az 40 ml olmalı, yirmi dört saat biriktirilen idrarlar kabul edilmemelidir. Steril vücut sıvıları;

beyin omurilik sıvısı (BOS), plevral, perikardiyal, peritoneal veya sinovyal sıvılardır ve en az 5 ml olmalıdır. Abse örnekleri ve aspirasyon sıvıları aseptik ko ulla da ve mümkün oldu u kadar çok materyal aspire edilmelidir. Kutanoz lezyonlarda optimal üreme ısısı daha dü ük olan mikobakterilerden biri (*M.haemophilum*, *M.marinum*, *M.ulcerans*) enfeksiyon ajanı olabilece inden, ikinci bir kültür seti 30°C’de inkübe edilmelidir. Doku örnekleri, steril bir kap içine e er mümkünse en az bir gram olacak ekilde alınmalıdır. Kan-kemik ili i örneklerinin, MYCO/FLYTIC i eleri (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD) veya BacT/ALERT MB kan besiyeri (bioMerieux SA, Lyon, France) gibi alternatif besiyeri kullanılarak tüberküloz kültürleri yapılabilmektedir. BACTEC 460TB sisteminde kan ve kemik ili i kültürü için standardize edilmi olan BACTEC 13A i esi günümüzde artık kullanılmamaktadır. BACTEC 460TB (12B i elerinde) sisteminde mikobakteriler için inhibitör etki gösteren polipropilen glikol komponenti bulunmaktadır. Mikobakterilerin üremesi üzerine benzer etki, Septi-Chek AFB sıvı besiyeri ve MGIT sıvı besiyerinde de bildirilmi tir. Dı kı örnekleri *M.tuberculosis* tanısında çok tercih edilen bir örnek de ildir. Sadece AIDS’li hastalarda *M.avium* kompleks tanısında yararlı olabilece i belirtilmi tir; tercih edildi inde de en az bir gram olmalıdır(3).

2. 8. 2. Örneklerin i lenmesi

Tüberküloz basillerinin izolasyonu için alınan klinik örneklerin içerebilece i lökosit, eritrosit, doku gibi organik kalıntıları sindirmek ve kontaminasyona neden olabilecek bakteri ve mantarları ortan kaldırmak amacıyla homojenizasyon / dekontaminasyon i lemi uygulanır. Daha sonra örnekteki bakteri yo unlu unu arttırmak için santrifüj edilerek konsantrasyon i lemi uygulanır(46). Dekontaminasyon i lemi, floralı bölgelerden gelen, kontamine oldu u dü ünülen balgam, BAL, MAS gibi örneklere uygulanır. Aseptik olarak alınan plevra sıvısı, BOS gibi steril vücut sıvıları veya doku örneklerinde genellikle dekontaminasyon i lemi gerekmez, sadece konsantrasyon i leminden geçirilir(3).

Yapılan kültürlerde hiç kontaminasyon olmaması veya çok dü ük (<%2) kontaminasyon oranları, ön i lem ko ulla rının çok sert oldu unu ve sadece

bakterileri de il aynı zamanda mikobakterileri de elimine etti ini gösterirken; %5'i geçen kontaminasyon oranları, a ırı kontaminasyon olarak tanımlanır(3).

Dekontaminasyon i lemlerinde en sık N-Asetil-L-Sistein (NALC) + Sodyum hidrosit (NaOH) ve %2-4'lük Sodyum hidrosit (NaOH) gibi yöntemler kullanılmakla birlikte zefiran (benzalkonyum klorid) – trisodyum fosfat yöntemi, oksalik asit yöntemi, CPC yöntemi, sülfürik asit yöntemi gibi farklı yöntemlerden de yararlanılabılır(3,40,43,45).

NALC-NaOH yönteminde NALC mukolitik, NaOH dekontaminant ve Na-sitrat klinik örnekte bulunabilecek a ır metal iyonlarını ba layarak NALC'ın inaktive olmasını önlemek amacıyla kullanılır(43). Yöntemde örnek miktarı kadar NALC-NaOH tüpe eklenir ve vortekslenir, karı ım 15-20 dakika oda ısısında bekletilir, daha uzun süren i lem, kontaminant mikroorganizmalarla beraber mikobakterileri de öldürece i için kültürde üretme ansını azaltır. Bu süreçte, karı ım bir karı tırıcıda hafif döndürülerek veya birkaç kez elle çalkalanarak homojenizasyon kolayla tırılır(3). Daha sonra karı ıma fosfat tamponu ilave edilerek dekontaminasyon i lemi durdurulur. Karı ım so utmalı santrifüjde 15-20 dakika 3000Xg'de santrifüj edilerek konsantrasyon i lemi gerçekleştirilir. Üstteki sıvı dezenfektan bulunan bir atık kabına bo altıldıktan sonra tekrar fosfat tamponu ilave edilerek sediment tekrar süspanse edilir. Tüm i lemler biyolojik emniyet kabinde yapılmalıdır. Dekontaminasyon ve konsantrasyon i lemlerinden geçirilmi örnekler daha sonra mikroskopik inceleme, kültür ve moleküler testler için kullanılabilir(3,45,47).

2. 8. 3. Mikroskopik inceleme

Tüberkülozun tanısında direkt mikroskopik inceleme hala en ucuz, hızlı ve ilk ba vurulan yöntem olmaya devam etmektedir. Mikroskopik olarak ARB saptanabilmesi için balgam örne inin 1 ml' sinde en az 5000-10000 bakteri bulunması gerekmektedir. Duyarlılı ı dü ük olmakla birlikte, bir klinik örnekte aside dirençli bakteri görülmesi, antimikobakteriyel tedaviye ba lanması için yeterli özgüllükte bir kriterdir. Mikroskopik incelemenin duyarlılı ı genelde %22-80 arasında bildirilmektedir. Duyarlılı ı etkileyen önemli faktörler arasında; laboratuvara gelen örnek miktarı, test edilen örne in tipi, yaymanın kalınlı ı, boyama

yöntemleri ve okuyucunun deneyimi gibi faktörler sayılabilir. En yüksek yayma pozitiflik oranı solunum örneklerinde saptanır. Boyama işlemi esnasında lamların çapraz kontaminasyonu ve TDM ile kontamine suyun kullanılması yanlış pozitif sonuçlara neden olur, mikroskop için kullanılan immersiyon yağından da ARB geçişi olabilir(3,43,48).

Aside dirençli boyanma özelliği, mikobakterilerle özdeşleşmiş bir özelliktir; bugüne dek tanımlanan mikobakterilerin tamamı aside dirençli boyanmaktadır. Bu özellik kullanılarak başlıca iki tip boyama tekniği geliştirilmiştir; bunlar karbol fuksin boyama ve florokrom boyama tekniğidir(49).

Erlich Ziehl- Neelsen (EZN) yöntemi ve Kinyoun yöntemi, karbol fuksin boyama tekniklerindedir. En yaygın kullanılan yöntem Erlich Ziehl- Neelsen yöntemidir (sıcak karbol fuksin boyama) Bu yöntemde karbol fuksin ile ısıtılarak boyanan preparata %3'lük asit-alkol karışımı ile dekolarizasyon işlemi uygulanır ve sonra zıt bir boya (metilen mavisi, brillant yeşili) ile ilk amaçta rengini kaybetmiş hücreler mavi renge boyanır. Boyanan preparat immersiyon objektifi (1000X büyütme) ile incelendiğinde diğer hücreler ve bakteriler mavi görünürken, mikobakteriler mavi zemin üzerinde kırmızıya boyanmış olarak ortaya çıkar. İnceleme sonunda yaymada gözlenen ARB sayısı kantitatif olarak rapor edilir (Tablo 2). Yaymanın negatif olarak rapor edilmesinden önce, en az 300 alan incelenmelidir(3,40).

Tablo 2. ARB pozitif preparatın değerlendirilmesi

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

Kinyoun boyama yöntemi; EZN yöntemine benzer, fakat kullanılan karbol fuksin ve fenol konsantrasyonu artırılarak, ısıtma işlemi gereksiz kılan modifiye bir boyama yöntemidir (soğuk karbol fuksin boyama) (50).

Florokrom boyamada (Auramin O, Auramine-rhodamine) ise ana ilke fenollü fuksin yerine floresan boyaların kullanılmasıdır. Floresan boyalar, mikobakterilerin lipitten zengin hücre duvarına bağlanarak, görünür hale gelmesini sağlar(43). Auramin O'nun yapısı da karbol fuksine benzer, mikobakteri duvarına bağlandıktan sonra asit alkol karışımı ile buradan ayrılmaz(48). ARB'ler floresan mikroskopunda sarımsı-turuncu renkte floresan verirler. Bu boyama yönteminde, daha küçük bir büyütme ile daha geniş bir alan taranarak daha hızlı ve daha duyarlı inceleme yapılabilir. Bu nedenle özellikle yükü fazla laboratuvarlarda tercih edilebilir(43). Bu yöntemin duyarlılığının yüksek olmasına karşın özgüllüğü düşüktür. Bu nedenle pozitif yaymaların, karbol fuksin boyama yöntemi ile doğrulanması önerilir(3,43).

Direk balgam örneğinden hazırlanan yaymanın konvansiyonel ışık mikroskopunda incelenmesi kısıtlı kaynakları olan laboratuvarlarda tüberküloz için en yaygın testis yöntemidir. Laboratuvarların birçoğu EZN boyalı preparatları incelemek için konvansiyonel ışık mikroskopunu kullanırlar. Bu yöntem tüberkülozun yaygın olduğu alanlarda yüksek derecede spesifiktir fakat sensitivitesi düşüktür(%20-80). Sensitivitesi extrapulmoner tüberküloz ve HIV ile enfekte tüberküloz hastalarında önemli derecede azalır. Floresan mikroskopisi konvansiyonel ZN mikroskopisinden daha duyarlıdır ve daha az zaman alır. Floresan mikroskopisi pahalı civa buharı ışık kaynakları, düzenli mikroskop bakım ihtiyacı ve karanlık oda gerektirmesinden kaynaklanan pahalılığın dolaylı olarak gereken önemi kazanamamıştır(9).

Son yıllarda LED teknoloji geliştirilmiştir ve floresan mikroskopun faydaları önemli mali harcamaları olmadan sağlanabilmektedir. LED teknolojinin ilk faydası mevcut floresan mikroskoplar LED ışık kaynağına çevrildiğinde görülmüştür. Ciddi enerji tüketimi ve gelişmeler kısıtlı kaynak durumlarında kullanılması amaçlanan ucuz, güçlü LED mikroskopları ve LED balantılarının geliştirilmesi ile sonuçlanmıştır(9).

Konvansiyonel civa buharı floresan mikroskopları ile kıyaslandığında LED mikroskopları daha ucuz, daha az enerji gücü gerektirirler, çekirdeklerinin yarı ömrü çok uzundur ve kırılıp bozulduklarında potansiyel toksik ürün salınım riskleri yoktur. LED floresan mikroskoplarının karanlık oda olmadan da iyi performans gösterdikleri rapor edilmiştir. Bu özellikler LED mikroskopunu kısıtlı kaynak durumlarında tercih

edilir kılar ve konvansiyonel floresan mikroskobunun çok ihtiyaç duyulan faydalarını (artımı duyarlılık ve efikasite) da sa lar(9).

2009'da LED mikroskobisi için kanıt tabanı DSÖ tarafından de erlendirilmi tir. Burda hem do rulu u hem de yeni tüberküloz te hislerinin hasta/toplum sa lı na etkileri uygun standartlarla de erlendirilmi tir. Sonuçlar LED mikroskobisinin uluslararası referanslarla e it do rulu unu, konvansiyonel ZN mikroskobisinden geli mi sensitivitesini ve LED mikroskobisinin hem konvansiyonel floresan hem de ZN mikroskobisine göre kalite, uygulama ve fiyat avantajlarını göstermi tir(9).

Bu bulgulara dayanarak, DSÖ konvansiyonel floresan mikroskobisinin yerini LED mikroskobisinin almasını ve LED mikroskobisinin konvansiyonel ZN mikroskobuna alternatif kullanılmasını önermi tir(9).

2. 8. 4. Kültür yöntemleri

Tüberküloz tanısında kültür yöntemleri halen altın standart olarak kabul edilmektedir. Aside dirençli basillerin kültürde üretilebilmesi için örne in her mililitresinde 10-100 canlı basil olması yeterlidir. Ancak, mikobakterilerin ikiye bölünmesi için gereken süre yakla ık 16-18 saat kadardır ve izole edilmeleri için 7-21 gün gibi uzun bir süre gerekir. Üreme olmadı na karar vermeden önce besiyeri 35-37 °C'de, 6-8 hafta inkübe edilmelidir. Kültür yöntemi geç sonuç vermesine ra men, bakterilerin canlılı ının do rudan gösterilmesine, tür düzeyinde tanımlamaya ve ilaç duyarlılık testlerinin yapılarak hastaların do ru tedavi alabilmesine olanak sa lamaktadır(44,51).

2. 8. 5. Besiyerleri

Mikobakterilerin izole edilmeleri ve çe itli özelliklerinin incelenmesi amacıyla kullanılan besiyerleri katı ve sıvı olmak üzere iki tiptir. Katı özellikteki besiyerlerini ise yumurta bazlı ve agar bazlı olmak üzere iki bölümde incelemek mümkündür. Yumurta bazlı besiyerleri arasında bugün en yaygın kullanılan Löwenstein-Jensen (LJ) besiyeridir. Ancak Petraghani ve American Trudeau Society gibi besiyerleri de farklı durumlarda tercih edilebilen yumurta bazlı besiyerlerindendir. Özellikle primer izolasyonda LJ besiyerinin tercih edilme

nedenleri arasında, tipik koloni morfolojisi olu turmaları ve ekonomik olmaları gibi nedenler sayılabilir(3).

Yumurta bazlı besiyerlerinin opak görünümlü olmasına kar ın, agar temelli besiyerleri effaftır. Bu nedenle, ekim yapılan besiyerleri 10-12 gün sonra mikroskop altında incelenirse, olu an kolonileri görmek mümkündür. Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11 en çok tercih edilen agar bazlı besiyerleridir(3).

Kontaminasyona neden olan mikroorganizmaların üremesini etkin bir ekilde engellemek amacıyla selektif besiyerleri olan, L-J Gruft, Mycobactosel LJ, Mitchison selektif 7H11 de kullanılabilir. Primer izolasyonda besiyerlerinden en az birisinin selektif olması önerilir(3).

Mikobakterilerin izolasyonunda kullanılan sıvı besiyerleri katı besiyerlerine göre belirgin olarak daha kısa sürede (7-14 gün) sonuç verirler. Ancak koloni morfolojilerinin görülememesi dezavantajlarıdır. Middlebrook 7H9 ve Dubos Tween albumin besiyerleri en sık kullanılan sıvı besiyerleridir.

Bunun yanında modifiye sıvı bazlı besiyerlerini kullanan ticari hızlı kültür sistemleri *M.tuberculosis*'in izolasyonunda, tür tayininde ve duyarlılık testlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır(3). Mikobakterilerin izolasyon ansını arttırmak için, primer izolasyonda sıvı besiyerlerine ilave olarak bir de katı besiyeri kullanılması önerilmektedir(52).

2. 8. 6. Hızlı kültür sistemleri

Günümüzde birçok laboratuvarıda, konvansiyonel besiyerlerinin yanısıra tüberküloz basillerinin izolasyon süresinin çok daha kısa ve izolasyon oranının çok daha yüksek oldu u hızlı kültür sistemleri rutin inceleme amacıyla kullanılmaktadır. Ço unda sıvı besiyeri kullanılmakla birlikte, bifazik ve katı besiyerlerinin kullanıldı ı sistemler de mevcuttur ve bu sistemlerde gaz basıncındaki de i iklikler, CO2 olu umu ve oksijen kullanımı fluorometrik veya kolorimetrik olarak ölçülür. BACTEC 460 TB (Becton Dickinson, Sparks, MD), BACTEC MGIT 960 (BD Biosciences, Sparks, MD), VersaTREK (ESP Culture System) (Trek Diagnostics, Inc., Ohio), BacT/ALERT 3D (bioMerieux, Lyon, France) mikobakterilerin tanısı için geli tirilmi ticari, otomatize kültür sistemlerinden bazılarıdır(44,45).

BACTEC 460 TB (Becton Dickinson, Diagnostic Instruments,

Sparks, MD) sistemi

BACTEC 460 TB sistemi hızlı kültür sistemleri içinde yer alan uzun yıllardır başarı ile kullanılan yarı otomatize, radyometrik, sıvı bazlı ticari bir kültür sistemidir; sistemde izolasyonun yanısıra, *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi (MTBC) ile tüberküloz dışı mikobakterilerin (TDM) ayrımı yapılabilmekte ve MTBC su larının antitüberküloz ilaçlara duyarlılığı test edilebilmektedir. BACTEC 12B (Middlebrook 7H12) ve Bactec 13A (Middlebrook 7H13) olmak üzere iki tip besiyeri içeren bu sistem; besiyerlerinde bulunan C14 izotoplu palmitik asitin kullanılması ve metabolize edilmesi sonucu oluşan $^{14}\text{CO}_2$ nin 0-999 sayısal değerleri arasında üreme indeksi (GI) olarak ölçülmesi prensibi ile çalışmaktadır. Ekim işleminden önce kontaminasyonu engellemek amacıyla besiyerlerine polimiksin B, azlosilin, nalidiksik asit, trimetoprim ve amfoterisin B (PANTA) içeren antibiyotik karışımı ilave edilmelidir. Ekim yapılan 12B besiyerlerinin inkübasyonları etüvlerde gerçekleştirilir. Ekim yapıldıktan sonra ilk iki hafta, haftada üç kez; sonraki altı hafta boyunca haftada bir kez olacak şekilde etüvden çıkarılıp BACTEC 460 cihazına yerleştirilerek GI değerleri ölçülür. Cihazda bulunan okuma ünitesi her besiyerin kauçuk kapakından içeri girip oluşan $^{14}\text{CO}_2$ 'nin ölçümünü yapar ve besiyerinden çıktuktan sonra kor derecesine kadar gelip soğur ve sonra ikinci besiyeri içeri girer. Sistem başarı ile kullanılmakla beraber; bu okuma sırasında çapraz kontaminasyon riski vardır. Besiyerlerinin radyoaktif madde içermesi ve bunların ortadan kaldırılmasında yaşanan sıkıntılar, ekim sırasında enjektör kullanılması gerektiği için potansiyel enfeksiyon riski ve yarı otomatize olması sistemin diğer dezavantajlarıdır (44,45,53).

BACTEC Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) 960

(BD, Sparks, MD)

BACTEC MGIT 960 sistemi, kültür tüplerinin inkübasyonunun cihaz içinde gerçekleştirilmesi ve üreme kontrolünün otomatik olarak yapıldığı, radyometrik olmayan tam otomatize bir ticari hızlı kültür sistemidir (3).

BACTEC MGIT 960 sisteminde kullanılan tüplerde (BBL MGIT 7ml tüp), Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri ve dip kısımlarında oksijene duyarlı rutenyum metal kompleksi içeren silikon bulunur. Klinik örnekler ekilmeden önce besiyerlerine OADC ve PANTA ilave edilir. Kullanılan besiyerlerinde herhangi bir üreme

olmadı ında oksijen varlı ına ba lı olarak silikon tabakaya gönderilen UV ı mına kar ı floresans olu mazken; mikobakteri veya di er mikroorganizmalar üredi inde oksijenin kullanılması sonucunda UV ı mına kar ı floresans olu makta ve olu an floresans miktarı üreme birimi (growth unit) olarak de erlendirilmektedir. Sistemin olmadı ı durumlarda manuel kullanıma uygun, UV ı ı ı altında makroskobik olarak de erlendirme yapılabilen BBL MGIT 4ml tüp besiyerleri mevcuttur. Kan dı ındaki di er tüm klinik örnekler için kullanılabilir. Fazla sayıda örne i aynı anda kontrol edebilen BACTEC MGIT 960 (960 örnek), genellikle yüksek kapasite ile çalı an laboratuvarlarda tercih edilmekle birlikte; daha dü ük kapasiteli laboratuvarlarda manuel besiyerleri önerilmektedir(3,54).

VersaTREK (ESP Culture System) (Trek Diagnostics, Inc., Ohio)

VersaTREK, selüloz sünger ve Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içeren bir sistemdir. Sistemde mikroorganizmaların üremesi sonucu olu an gaz basıncındaki de i iklikler ölçülerek de erlendirme yapılır. Bilgisayar destekli bir sistemdir ve besiyerinde olu an gaz basıncındaki de i iklik grafiksel olarak görüntülenir. Besiyerlerine ekim yapılmadan önce, mikobakterilerin üremesini destekleyen OADC ve kontaminasyonu engellemek amacıyla antibiyotik karı ımı ilave edilir(45).

BacT/ALERT 3D (bioMerieux, Lyon, France)

MB/Bac T, besiyerinin dip kısmında kolorimetrik bir sensor içeren ve olu an CO2 düzeyini ölçerek üremeyi de erlendiren bir sistemdir. Bilgisayar deste i bulunan sistemde besiyerleri sürekli kontrol altındadır(45).

Bactec 9000 MB (BD, Sparks, MD)

Bactec 9000 MB serisi, besiyerlerindeki oksijen kullanımının floresans ile belirlendi i bir kan kültür sistemidir. Modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyerlerine ekimden önce PANTA ilave edilir. Sistemde balgam ve di er solunum yolu örnekleri için Myco/F sputa, kan ve di er steril vücut bölgelerinden alınan örnekler için MycoF/lytic besiyeri kullanılır(44).

2.8.7. identifikasyon testleri

Kültür i lemleri sonucunda izole edilen mikobakterilerin tür düzeyine kadar tanımlanabilmesi, halk sa lı ı ve hastaların do ru antimikobakteriyel tedavileri için gerekli olmaktadır.

Mikobakterilerin tanımlanması konvansiyonel biyokimyasal yöntemler, BACTEC NAP testi, moleküler yöntemler veya kromatografik analiz yöntemleri ile yapılabilir.

Mycobacterium tuberculosis'in sıvı besiyerinde ço unlukla “serpentin cord” olu turması ayırımında yararlanılabilen bir özelliktir.

Üreme özelliklerinin incelenmesi

Mycobacterium tuberculosis; LJ besiyerinde veya Middlebrook agarda 37 °C’de 14-28 günlük inkübasyondan sonra pigmentsiz, düzensiz, kuru, krem renkli koloniler olu turur. Middlebrook 7H10 veya 7H11 agarda 5-10 günlük inkübasyondan sonra olu an mikrokoloniler mikroskop altında incelendi inde “yılankavi kordon” görünümü izlenir. Tüberküloz basilleri yava üreyen, nonkromojen koloniler yapar(43).

Konvansiyonel biyokimyasal yöntemler

Niasin testi: Bütün mikobakteriler niasin ribonükleotid üretir. Ancak *M.tuberculosis* niasini nikotinamid adenin dinükleotide (NAD) dönü türecek enzime sahip de ildir. Besiyerinde biriken niasin bu test ile gösterilir.

Nitrat redüksiyonu testi: *Mycobacterium tuberculosis* gibi bazı mikobakteriler nitroredüktaz enzimi üreterek nitratları nitritlere indirgeyebilirler. Bu test nitroredüktaz enziminin varlı nı ara tırır.

Katalaz testi: Bazı mikobakterilerde bulunan katalaz, hidrojen peroksidi (H₂O₂) su ve oksijene ayrı tıran hücre içi bir enzimdir. Semikantitatif katalaz test ile olu an hava kabarcıklarının yüksekli i ölçülerek katalaz enzimi miktarı hakkında fikir edinilebilir. Hava kabarcı nın olmaması negatif sonuç olarak de erlendirilir. *Mycobacterium tuberculosis* ve bazı di er mikobakterilerdeki katalaz enzimleri ise 68°C’de 20 dakika ısıtıldı nda inaktive olur. Isıya stabil katalaz testi bu özelli i ara tıran bir testtir.

TCH (Thiophene-2-Carboxylic Acid Hydrazide; T2H) le Üremenin nhibe Edilmesi: *Mycobacterium tuberculosis* ve di er yava üreyen mikobakterilerin ço u 10 µg/ml TCH konsantrasyonuna dirençlidir. Bu test özellikle *M.bovis* ile *M.tuberculosis*'in ayırımında yardımcıdır.

Pirazinamidaz Testi: Pirazinamidaz enzimi pirazinamidi (PZA)pirazinoik asit ve amonya a hidrolize eder. Pirazinoik asit, pirazinamidin aktif formudur.

Mycobacterium tuberculosis'in prazinamidaz testinin pozitif olması bu türü *M.bovis*'ten ayırır. PZA direnci olan *M.tuberculosis* su larında ise test sonucu negatiftir(3,43).

BACTEC NAP testi

M. tuberculosis kompleks su larını inhibe eden, ancak MOTT türlerini inhibe etmeyen, böylelikle sınırlı bir identifikasyon sağlayan bazı kimyasal maddeler kullanılmaktadır; p-nitrobenzoat, hidroksilamin hidroklorür, 8-azaguanin, nitroksolin ve NAP bunlardan bazılarıdır. NAP, kloramfenikol sentezinde bir ara üründür ve kloramfenikole göre *M. tuberculosis* kökenine dört kat daha etkilidir. BACTEC 460TB sisteminde kullanılan bu yöntem ile identifikasyon 3-5 gün içinde sağlanmaktadır (12,13,23,27).

TBc ID testi (BD MGIT TBc Identification Test; Becton Dickinson, Diagnostic Systems, Sparks, MD):

TBc ID testi, yayma sonuçları pozitif kültürlerin MGIT tüplerinden alınan MTBC'nin kalitatif tespiti için kullanılan kromatografik immüno hızlı bir testtir (TB Ag MPT64 Hızlı Testi). Bu test *M.tuberculosis* kompleks'e özgü mikobakteriyel bir antijen olan MPT64'ü tespit eder. Pozitif sıvı besiyerinden test cihazına 100 µL eklendiğinde, MPT64 antijeni, test stripindeki partiküllere konjuge olmuş MPT64 antikolarına bağlanır. Antijen-konjugat kompleksi, test stripi üzerinden reaksiyon alanına ilerler ve membrana uygulanmış ikinci bir özel MPT64 antikoruna tarafından yakalanır. Uygulanan sıvı besiyerinde MPT64 antijeni varsa, etiketli koloidal altın partikülleri tarafından bir renk reaksiyonu gerçekleşir ve pembe-kırmızı renkte ikinci bir çizgi olarak görülür(52,55,56).



2.8.8. Moleküler yöntemler

Kültürde üreyen mikobakterilerin kısa sürede tür düzeyinde tanımlanmasını sağlamak amacıyla çeşitli moleküler tanı sistemleri geliştirilmiştir. 16S rRNA, 23S rRNA, hsp65, 16S-23S rRNA ara bölgesi, IS 6110 gibi gen bölgeleri amplifikasyon yöntemleri ile çoğaltıldıktan sonra; prob hibridizasyon, DNA dizi analizi, DNA Microarray, RFLP, spoligotyping yöntemleri ile mikobakteriler cins ve tür düzeyinde tanımlanabilmektedir. Ayrıca bazı ticari moleküler sistemler ile tür düzeyinde tanımlama ile birlikte antimikobakteriyel ilaç direnci de saptanabilmektedir (11,12,15,27).

2.8.9. Duyarlılık Test Yöntemleri

Mycobacterium tuberculosis kompleks'in antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılığını belirlemede en güvenilir ve en hızlı yöntemi bulmak amacıyla çok sayıda duyarlılık test yöntemi geliştirilmiştir. Bunlar arasında proporsiyon yöntemi temel alan, kültüre dayalı klasik testler en yaygın kullanılan testlerdir. Proporsiyon yönteminde katı besiyeri olarak sıklıkla yumurta bazlı besiyerlerinden LJ, agar bazlı besiyerlerinden Middlebrook 7H10 kullanılmaktadır. Modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyerinin kullanıldığı antimikobakteriyel duyarlılık test yöntemlerinden BACTEC 460TB ve BACTEC MGIT 960 gibi hızlı ticari sistemler de yaygın olarak kullanılmaktadır. Middlebrook 7H10'un kullanıldığı agar proporsiyon yöntemi ile BACTEC 460TB ve BACTEC MGIT 960 yöntemleri CLSI tarafından önerilen yöntemlerdir. LJ'nin kullanıldığı proporsiyon yöntemi ise ekonomik olması nedeniyle DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından önerilmektedir(43,57,58).

Tüberküloz basillerinin duyarlılık testi direkt veya indirekt yöntemle yapılabilir. Direkt testte, yayma pozitif lenmiş hasta örneği direkt olarak antibiyotikli ve antibiyotiksiz besiyerlerine ekilir. indirekt testte ise, primer izolasyon besiyerinde üreyen mikroorganizmanın saf kültürü test edilir. indirekt test, standardizasyonun daha yapılabilirliği nedeniyle önerilen yöntemdir(43,57).

Mikobakterilerin duyarlılık testi için CLSI her hastadan izole edilen ilk *M.tuberculosis* izolatının primer antitüberküloz ilaçlara (Rifampisin [R F], izoniyazid [INH], etambutol [EMB], pirazinamid [PZA], streptomisin [SM]) karşı duyarlılığının test edilmesi gerektiğini belirtmektedir. Üç aylık tedavi sonrasında

kültür negatifli i sa lanamaması durumunda veya tedaviye yanıt alınamadı na dair klinik kanıt bulunması durumunda, duyarlılık testi tekrarlanmalıdır(3).

Agar proporsiyon yöntemi ile duyarlılık testi

Yava üreyen mikobakterilerin duyarlılık testi için agar proporsiyon yöntemi 1960'ların ba nda G. Canetti tarafından geli tirilmi tir. Yöntem A.B.D.'de modifiye ve standardize edilmi tir ve yıllardan beri hem A.B.D.'de hem de birçok Avrupa ülkesinde *M.tuberculosis* kompleksinin pirazinamid dı ndaki tüm ilaçlara kar ı duyarlılık testinde standart yöntem olarak kullanılmaktadır. Pirazinamid (PZA) duyarlılık testi için referans yöntem BACTEC 460TB yöntemidir(3,45,57).

Proporsiyon yönteminde prensip; belli bir ilaç konsantrasyonunda (Kritik Konsantrasyon) dirençli olan organizmaların oranının belirlenmesini sa lar. Test edilecek bakteri su u ilaçlı ve ilaçsız katı besiyerlerine ekim yapılarak inkübe edilir. İlaçlı besiyerinde üreyen kolonilerin sayısı, kontrol besiyerindeki kolonilerin sayısı ile kar ıla tırılır. Belli ilaca dirençli basillerin oranı hesaplanıp, test edilen popülasyona yüzdesi olarak belirtilir. Bu oran %1'e (Kritik Proporsiyon) e it veya daha yüksek ise test edilen su ilaca kar ı dirençli olarak rapor edilir. CLSI, katı besiyeri olarak Middlebrook 7H10 besiyerinin kullanıldı ı proporsiyon test yöntemini (Agar Proporsiyon Yöntemi) referans yöntem olarak kabul etmektedir (57).

BACTEC 460TB sistemi ile duyarlılık testi

BACTEC 460TB sistemi tüm primer ve ço u sekonder ilaçların test edilmesi için kullanılabilir. Primer ilaçlar BACTEC 460TB cihazında 12B besiyerinde kullanılmak üzere geli tirilmi BACTEC SIRE kitinde liyofilize toz halinde mevcuttur (3,45,53).

Mikobakteriler 14C palmitik asit içeren BACTEC 12B besiyerinde kolaylıkla ürerler. Bu bile i in metabolize edilmesi sonucunda 14CO₂ olu ur. Böylece üreme veya üremenin önlenmesi, üremeye ba ımlı CO₂ üretimindeki de i ikliklerin ölçülmesi ile anla ılır(3,45,53).

ndirekt duyarlılık test yönteminde inokulum hazırlanırken örnek olarak BACTEC 12B besiyeri, di er sıvı besiyerleri veya bir katı besiyerinde üremi saf kültür kullanılabilir. Test edilecek olan kültürler, antibiyotik (S,I,R,E) içeren ve içermeyen (kontrol) BACTEC 12B (Middlebrook 7H12) i elerine ekilir ve

37°C'de inkübe edilir. Kontrol i esine ekilen mikroorganizma sayısı ilaç içeren i eye göre 100 kat azdır. Kontrol ve ilaçlı i elerin günlük GI farkları kar ıla tırılarak yorumlanır(43,45,53). Yöntemde, laboratuvarın kapasitesi ve çalı ma ekline göre günlük (haftanın 7 günü) veya hafta içi (hafta sonu dahil olmayan iki ayrı program vardır. Günlük programda i eler hergün yaklaşık aynı saatte (± 2 saat) ve en az 4 gün okutulur. Hafta sonu dahil olmayan programda test Cuma günü yapılır, pazartesi den itibaren hergün yaklaşık aynı saatte (± 2 saat) ve en az 3 gün okutulur. Kontrol i esinin GI de eri pazartesi okumasında 30'u geçmi ise muhtemelen inokulum çok yo un olmu tur; test tekrar edilmelidir. Salı günü kontrol i esinin GI de eri 30'u geçmi ise, çar amba günü de okutulduktan sonra sonuçlar yorumlanır; pazartesi gününe ait GI de eri hafta sonu birikmi olan de eri ifade etti i için dikkate alınmaz. Her iki programda da kontrol i esinin GI de eri 14 gün içinde 30'a ula maz ise test tekrar edilmelidir(43,45,53).

Kontrol i esinin GI de eri 30'u a tı nda, kontrol ve antibiyotik içeren i elerin bir gün önceki GI de eri ile farkları (GI) hesap edilerek sonuçlar yorumlanır. Kontrol i esinin GI'i, antibiyotikli i enin GI'den büyük ise test edilen su o antibiyoti e duyarlı; küçük ise dirençlidir. Antibiyotik içeren i enin GI de eri 500'ü geçer ve bir sonraki gün de 500'ün üzerinde kalırsa, kontaminasyon olmadı ndan emin olunduktan sonra, GI de erine bakmaksızın o antibiyoti e dirençli olarak yorumlanır(43,45,53).

BACTEC MGIT 960 sistemi ile duyarlılık testi

MGIT 1995'te mikobakterilerin klinik örneklerden saptanması amacıyla kullanıma girmi tir. Her MGIT tüpü modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içerir ve tabanında floresans absorbe edici bir oksijen sensörü (rutenyum pentahidrat emdirilmi silikon kauçuk) bulunur. Floresans bile ik, besiyerinde çözünen oksijen varlı ma duyarlıdır. ndikatörün floresansı oksijen varlı nda absorbe edilir, fakat aktif olarak solunum yapan mikroorganizmalar çözünmü oksijeni kullandıkça floresans artar. Floresans bir 365 nm UV transiluminatör kullanılarak saptanır. BACTEC MGIT 960 Sisteminde primer ve sekonder ilaç duyarlılıkları test edilebilir(3,45,54).

BACTEC MGIT 960 SIRE kiti kültürde izole edilen *M.tuberculosis*'i test etmek için 4-13 günde sonlanan nonradyometrik bir duyarlılık testidir. Kullanılan

besiyerleri BBL MGIT 7 ml MGIT tp mikobakterilerin üremesini ve saptanmasını sa layan modifiye Middlebrook 7H9 besiyerini içerir. Katı besiyerinde veya MGIT tüpünde üremi saf kültürden inokulum hazırlanabilir.

Dört adet antibiyotikli (S,I,R,E) ve bir adet kontrol tüpü hazırlanır. Üretici firma önerilerine göre test yapıldıktan sonra AST (antibiyotik duyarlılık testi) set ta ıyıcısına uygun sırayla (K, S, I, R, E) yerle tirilir. Bundan sonra artık inkübasyon da, üreme kontrolü de cihaz tarafından otomatik olarak gerçekle tirilir. Kontaminasyon kontrolü için de kanlı agara ekim yapılır (3,43,45,54). Antibiyotik içeren tüpün floresansı kontrol tüpünün floresansı ile kar ıla tırılır. Antibiyotik içeren tp ve üreme kontrol tüpü arasındaki relatif üreme oranı, bilgisayar yazılım algoritmaları tarafından yorumlanır; sonuçlar veri rapor formlarında otomatik olarak listelenir (3,43,45,54).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalı mamızda tüberküloz ön tanılı, her biri farklı hastadan alınan çe itli klinik örnekler, mikobakteriyolojik inceleme amacıyla, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilmi tir. Çalı maya 758 hasta örne i dahil edilmi tir. Gönderilen klinik örnekler rutin i lemlerden geçirilerek çe itli mikroskop ve kültür yöntemleri ile incelenmi ve anti tüberküloid ilaçlara duyarlılık deneyleri uygulanmı tir.

Temiz, steril, sızdırmaz burgulu kapaklı, dayanıklı ve tek kullanımlık kaplar içinde yeterli miktarlarda gönderilen klinik örnekler laboratuvarımızca çalı ılmak üzere kabul edilmi tir. Kapların üzerine örne in kimden, ne zaman alındı ı ve örne in tipi yazılmı olmalıdır. İlk örnekler antimikrobiyal tedavi ba lanmadan önce alınmı olmalı ve en kısa zamanda laboratuvara ula tırılmalıdır. ayet örnek bekleyecekse 2-8 °C'de 3 gün bekletilmelidir.

Laboratuvarımıza balgam, BAL, post bronkoskopik balgam, mide açlık sıvısı, ekstrapulmoner örneklerden ise; idrar,abse içeri i, steril vücut sıvıları (plevral, perikardiyal, peritoneal sıvılar ve beyin omurilik sıvısı) ve doku gibi çe itli örnekler gönderilmi tir.

Tüberküloz etkeni bakterilerin izolasyonu için klinik örneklere lökosit, eritrosit, vücut sıvıları ve doku gibi organik kalıntılardan arındırmak amacı ile homojenizasyon/dekontaminasyon ve örnekteki bakteri yo unlu unu artırmak için konsantrasyon i lemi uygulanmı tir. Homojenizasyon-dekontaminasyon- i leminde NaOH (%3-4) yöntemi uygulanmı tir.

Klinik örneklerin homojenizasyon ve dekontaminasyonunda kullanılan %4'lük NaOH ve nötralizasyonda kullanılan fosfat tamponu aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır (59,60).

%4'lük NaOH solüsyonu

NaOH	40 g
Distile su	1000 ml

Fosfat tamponu (pH 6.8, 0.067 M stok solüsyon)

Çözelti 1- Na ₂ HPO ₄ (anhidroz)	9.47 g
Distile su	1000 ml
Çözelti 2- KH ₂ PO ₄	9.07 g
Distile su	1000 ml

Bir ve iki no'lu çözeltilerden karıştırılarak, kullanılacak fosfat tamponu hazırlanmıştır. pH dikkatlice kontrol edilmiş, düşük pH de eri elde edildi inde 1 no'lu çözeltiden, yüksek pH de eri elde edildi inde 2 no'lu çözeltiden ilave edilerek, pH 6.8'e ayarlanmıştır. Hazırlanan fosfat tamponu 121 °C'de otoklavda 15 dk steril edilmiştir.

3.1. Yöntem:

- Klinik örnek 50 ml'lik polipropilen, dibi konik, burgulu kapaklı steril tüplere (Falkon tüpü) aktarılması ve üzerine klinik örneğin miktarı kadar NaOH solüsyonu ilave edildi. Örnek 10 ml'den fazla ise en pürülan, mukoid ve kanlı kısmından 10 ml alındı. Mukoid olmayan örnekler santrifüjde çevrildikten sonra elde edilen sediment dekontamine edildi.

- Örnek + NaOH karışımını içeren tüpler 30 saniyeyi geçmeyecek şekilde vortekslendi. Tüpler oda ısısında ara sıra elle çalkanarak 15 dakika bekletildi, bu süre ağırlamadı.

- Dekontaminasyon işlemi takiben yapılacak her işlemde asepsi-antisepsi kurallarına uyuldu.

- Süre tamamlandı ında nötralizasyon amacı ile Falkon tüpünün 50 ml – i aretine kadar 0,067 M fosfat tamponu (pH 6.8) ilave edilip, karı ım el yardımı ile alt-üst edildi ve dekontaminasyon i lemi durduruldu.

- Fosfat tamponu ilave edilmi tüpler, bakteri yo unlu unu artırmak için 3000 x g'de 15-20 dakika santrifüj edildi.

- Homojenizasyon-dekontaminasyon-konsantrasyon i leminden sonra elde edilen süspansiyondan bir öze dolusu alınarak temiz bir lam üzerine 1-2×2-3 cm çapında bir alana sürekli dairesel hareketlerle yayıldı. Direk mikroskopik inceleme için her örnekten 2 ayrı lam üzerine yayma i lemi yapılarak preperatlar hazırlanıp, lamlar oda ısısında kurumaya bırakıldı.

- Süpernatant, içinde 1/10-1/50 dilüe edilmi sodyum hipoklorid bulunan bir kaba bo altıldı.

- Sedimente 1-2 ml steril fosfat tamponu (pH 6.8) ilave edilip, resüspanse i lemi uygulandı ve kullanılan kültür yöntemine uygun olarak besiyerine ekildi.

- Normalde steril oldu u dü ünülen BOS ve vücut sıvıları gibi örneklere dekontaminasyon i lemi uygulanmadı ından. bu örnekler santrifüj edildikten sonra besiyerlerine ekimleri yapıldı. Ancak örnek alımı ve transportu esnasında asepsi antisepsi kurallarına uyulmamı ise bu örneklere de dekontaminasyon i lemi uygulandı.

3.1.1. Erlich - Ziehl – Neelsen boyama yöntemi

Bizim çalı mamızda hazır EZN boyama seti kullanıldı. Set içeri i ;

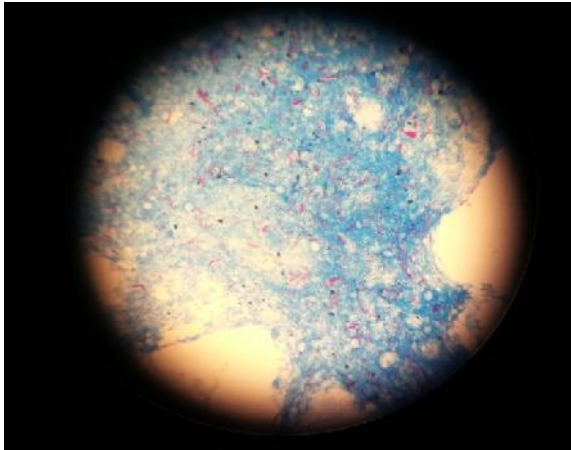
- Ziehl-Neelsen Karbol Fuksin çözeltisi
- Asit-Alkol karı ımı
- Metilen mavisi çözeltisi 'nden olu maktadır.

Çalı ma prosedürü;

- Önceden hazırlanmı olan yayma preparat üç kez ate ten geçirilerek fikse edildi.
- Tüm lam yüzeyi karbol fuksin ile kaplandı.
- Lamın altından ate tutarak boyayı kaynatmadan buharı çıkana dek 5 dakika boyunca ısıtıldı. Boya kenarlarından akıp veya kuruyarak eksildi inde boyama süresince boya eklendi.

- Daha sonra lam so umaya bırakıldı ve ardından dü ük debili su ile yıkandı.
- Yaymanın üzeri % 3'lük asit-alkol çözeltisi ile tamamen kaplandı ve lam yüzeyindeki renk giderilinceye kadar en fazla 3 dakika olacak ekilde beklendi.
- Lam su ile iyice yıkandı ve üzerinde kalan fazla su lamdan akıtıldı.
- Lam üzeri zıt boya olan metilen mavisi ile kaplandı ve 1 dakika beklendi.
- Lamlar üzerinde boya kalmayacak ekilde tekrar su ile yıkandı ve üzerinde kalan fazla su akıtıldı.
- Lamlar havada kurutuldu.

Lamlar 100'lük immersiyon objektifi ile incelendi. EZN boyası ile boyanmış yaymalarda mikobakteriler parlak pembe, diğer mikroorganizmalar mavi olarak boyandılar. Parlak pembe olarak boyanan basillerin görüldü ü örnek için sonuç 'ARB (+)' olarak verildi. Bir örne in 'ARB (-)'oldu unu söyleyebilmek için en az 300 objektif alanı tarandı ve basillerin görülmemesi halinde negatif olarak raporlandı. Sonuçlar tablo 2'ye göre de erlendirildi.



ekil 2. ARB basillerinin 1 ık mikroskobu ile görünümü

3.1.2. Auramin O floresan boyama yöntemi

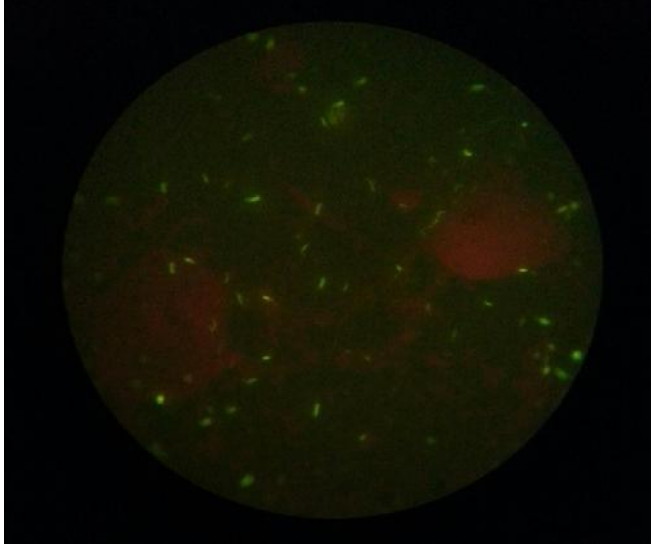
Bizim alı mamızda hazır ticari QBC F.A.S.T.TM Auramin O boya kiti kullanıldı.

Kit içeri i unlardan olu maktadır;

- Auramin O boyası (<% 10 Fenol ve Auramin-O)
- Boya giderici (%99 etanol ve <%0.5 hidroklorik asit)

Çalı ma prosedürü;

- Önceden hazırlanmı olan yayma preparat üç kez ate ten geçirilerek fikse edildi.
- 15-25 °C’de saklanmı olan boyalar iyice çalkalandı.
- Tüm lam yüzeyi Auramin O boyası ile kaplandı ve 1 dakika beklendi.
- Ardından distile su ile yıkandı.
- Yıkama sonrası üzerine hazır asit alkol solüsyonu dökülerek 1 dakika beklendi.
- Distile su ile bütün preparatlar iyice yıkandı ve üzerlerinde kalan fazla su giderildi.
- Tüm preparatlar oda ısısında kendili inden kurumaya bırakıldı.
- Kuruyan preparatlar 40× ve 100× lük objektif ile QBS ParaLens LED floresan mikroskop ile incelendi. Auramin-O ile boyanan preparatlar LED floresan mikroskobunda 40× büyütme ile incelenerek alan taraması yapıldı.
- Bu ekilde bulunan bakteriler immersiyonlu objektif ile incelendi.
- Karanlık zemin üzerinde parlak ye il-sarı renkte görülen basiller ARB olarak kabul edildi.
- Tablo 2’ye göre de erlendirme yapıldı.



ekil 3. ARB basillerinin LED-FM ile görünümü

3.1.3. Löwenstein- Jensen katı kültür yöntemi

Çalı mamızda BBL™ Löwenstein-Jensen hazır katı besiyeri kullanıldı. Homojenizasyon – dekontaminasyon – konsantrasyon i lemi sonunda elde edilen süspansiyondan 0.5 ml alınarak Löwenstein-Jensen besiyerine ekimi yapıldı. Ekim yapılan besiyerleri 37°C’de kapa ı kapalı ekilde bir gece yatık bırakıldıktan sonra ertesı gün kapa ı gev etilerek 24 saat boyunca dik olarak bekletildi.daha sonra kapa ı sıkıca kapatıldı ve sekiz hafta boyunca besiyerleri haftada bir kez kontrol edilerek üremenin olup olmadı ı incelendi.



ekil 4. L-J besiyerinde mycobacterium üremesi

3.1.4. BACTEC MGIT 960 sıvı kültür sistemi

Bu çalışmada Modifiye Middlebrook 7H9 ve floresan indikatörü başlanımı silikon içeren hazır MGIT tüpleri (BBL™MGIT™) kullanıldı.

MGIT 960 tüpü, 7.0 ml modifiye 7H9 sıvısı (broth) başını içerir. 1000 ml saf tırlı su başına yakla ık formül başındakileri içerir:

- Modifiye Middlebrook 7H9 sıvısı başını 5.9 g
- Kasein pepton 1.25 g

Tüpün altına, silikon içine yerleştirilmi floresan bir sensör mevcuttur. Besiyerine herhangi bir ekleme yapmaya hazır hale gelinceye kadar, kapakları kapalı tutuldu. Kapak mümkün oldu unca kısa bir süre açık bırakmaya özen gösterildi. Bu besiyeri OADC (oleic asid-albumin-dextroz-katalaz) ile zenginleştirilmi tir.

Antimikrobiyal olarak PANTA kullanılmı tir.

BBL MGIT PANTA i esi, antimikrobiyal ajanların liyofilize karışımını içerir.

Liyofilize **PANTA** i esi için Yakla ık Formülü:

Polimiksin B	6,000 ünite
Trimethoprim	600 µg
Amfoterisin B	600 µg
Azlosilin	600 µg
Nalidiksik asit	2,400 µg

PANTA'nın sıvıla tırılması;

MGIT PANTA, 15.0 ml MGIT ço altma deste i ile sıvıla tırılıp, tamamen çözüninceye kadar karıştırdı. Her bir MGIT tüpüne bu zenginleştirilmeden 0.8 ml eklendi. Sıvıla tırılan PANTA'yı içeren zenginleştirilme, örne in ekiminden önce MGIT besiyerine eklendi. PANTA/zenginleştirilme karışımı, örne in ekiminden sonra eklenmemelidir.

MGIT besiyerinin ekilmesi

- MGIT tüpleri örnek numarası ile etiketlendi.
- Her bir MGIT tüpüne 0.8 ml MGIT ço altma deste i/PANTA aseptik olarak eklendi (Ayarlanabilir bir pipetörün kullanılması önerilir).
- Bir steril pipet veya bir transfer pipeti kullanarak iyi karıştırlı , i lemeden geçirilmi /konsantre edilmi örne in 0.5 ml'ye kadar miktarı uygun ekilde

etiketlenmi MGIT tüpüne eklendi. Her bir örnek için ayrı bir pipet veya pipet ucu kullanıldı.

- Tüpün kapa ı hemen tekrar sıkıca kapatıldı ve tüp birkaç kez ters çevrilerek karı tırıldı.
- Tüpler ve kapakları mikobakterisid dezenfektanla silindi.
- Tüm bu i lemler biyogüvenlik kabininde çalı ıldı.

nkübasyon

nkübasyon Sıcaklı ı:

Etiketlenen bütün MGIT (7 ml) tüpleri, her bir tüp tarandıktan sonra BACTEC MGIT 960 cihazına girildi. nkübasyon sırasında kapa ın sıkıca kapalı tutulması ve tüpün çalkalanmaması önemlidir. Bu, besiyerindeki oksijen gradyanının muhafaza edilmesine yardımcı olacaktır. Cihaz $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklı ı muhafaza eder. *M.tuberculosis* için optimum ço alma sıcaklı ı 37°C oldu undan, sıcaklı ın 37°C 'ye yakın olması sa landı.

nkübasyon uzunlu u:

MGIT tüpleri, cihazın bunları pozitif olarak göstermesine kadar inkübe edildi. Maksimum altı (6) hafta sonunda, ço alma olmaması halinde cihaz tüpleri negatif olarak i aretledi inden bunlar negatif olarak rapor edildi.

Pozitif kültürlerin de erlendirilmesi

Bir MGIT tüpü pozitif olarak belirlendikten sonra, yayma hazırlandı ve karbol fuksin boyası ile boyandı.

- Temiz bir lam kullanıldı.
- Pozitif örnek tüpü vorteks uygulanarak karı tırıldı ve ardından steril bir pipet kullanılarak lam üzerine 1-2 damla koyuldu ve küçük bir alana yayıldı (yaklaşık $1\frac{1}{2} \times 1$ cm).
- Yayma havada kendili inden kurumak üzere bekletildi.
- Birkaç kez alev üzerinden geçirerek yayma sabitlendi.
- Yayma Ziehl-Neelsen boyama yöntemi ile boyandı. Yayma havada kendili inden kurumak üzere bekletildi.
- Boyanmış ve tamamen kurutulmuş yaymayı dü ük büyütme objektif altında inceleyerek boyalı bakteriler görülmeye çalı ıldı. Ayrıntılı inceleme için immersiyon objektifine geçildi.

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

Kard test:

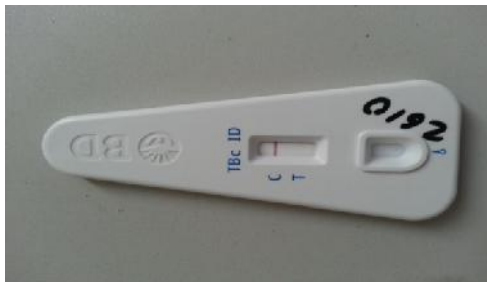
Her bir örnek için tek kullanımlık hazır stripler halinde bulunur. Test, mikobakteri türüne kar 1 antikor içeren kontrol çizgisinden (C) ve MPT64 antijenine kar 1 spesifik monoklonal antikor içeren çizgiden (T) olu maktadır.

- +4 °C’de saklanan test sribi kullanımdan önce buzdolabından çıkarıldı ve oda sıcaklı ına getirildi.
- Oda sıcaklı ına gelen strip kullanmadan hemen önce açıldı ve düz bir zemine yerle tirildi.
- Pozitif MGIT tüpü 10-15 sn vortexlendi ve 100 µl alınıp steril bir pipetle düzgünce örnek kuyucu una yerle tirildi.
- 15 dk bekletildi (maksimum 60 dakika).
- Daha sonra ekil 5’teki gibi de erlendirildi.

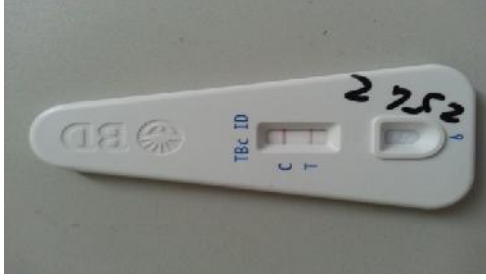
M.tuberculosis tanımlanması için tek kullanımlık hazır strip



M.tuberculosis negatif /MOTT pozitif



M.tuberculosis pozitif



ekil 5. M.tuberculosis tanımlanmasında kullanılan kard test yorumlanması

ekil 5'te görüldü ü gibi sadece kontrol çizgisinin belirginleşmesi bu bakterinin M.tuberculosis olmadığını, MOTT basili olduğunu düşündürdü. Sadece T çizgisinin belirginleşmesi ise kard testin çalışmadığını gösterdi, geçersiz olarak değerlendirildi.

Kontaminasyonun saptanması:

Kontamine edici bakterilerin çoğalması pozitif floresanlıkla sonuçlandı. İndan bütün floresan pozitif MGIT tüpleri görsel olarak türbidite açısından incelendi ve bir ARB yayması hazırlandı.

Kontaminasyonun varlığını aşağıdaki yöntemle teyit edildi:

- Bir yayma hazırlandı ve Ziehl-Neelsen boyası ile boyandı. Yayma üzerinde aside dirençli olmayan diğer bakterilerin veya mantar elemanlarının varlığını bize kontaminasyonu düşündürdü.
- Kanlı agara pasaj yapıldı. Kültürler $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edildi ve 24-48 saat sonunda incelendi. Kontamine edici çoğalma görüldüğünde, yine gram ve ZN boyası ile doğrulandı.
- Kontaminasyon, besleme sıvısından negatif ARB yayması ile doğrulandı. İnda, örnek kontamine olarak değerlendirildi.

Kontamine MGIT Tüplerinin Yeniden İlenmesi: Kontamine MGIT tüpleri, tekrar dekontamine ve konsantre edilip yeni MGIT tüplerine ekimleri yapılarak cihaza yerleştirildi.

3.2. Sonuçların istatistiksel Analizi

Çalışmamızda elde edilen veriler metodolojik araştırma yöntemleri ile değerlendirilmi olup duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer, negatif prediktif

de er, yanlış pozitiflik oranı, yanlış negatiflik oranı ve doğruluk oranı analizleri yapılmıştır.

Tablo 3. Sonuçların karşılaştırılması

Tarama testi	Altın standart test pozitif	Altın standart test negatif	Toplam
Pozitif	X	Y	X+Y
Negatif	Z	W	Z+W
Toplam	X+Z	Y+W	X+Y+Z+W

A) **Sensitivite (Duyarlılık):** Bir testin uygulandığı toplulukta gerçekten hasta olanları saptayabilme gücüdür(61).

$$\text{Duyarlılık} = X/(X+Z)$$

B) **Spesifite (Özgüllük):** Testin tarama yapılan toplulukta incelenen hastalık açısından sağlam kişileri saptayabilme gücüdür(61)

$$\text{Özgüllük} = W/(Y+W)$$

C) **Pozitif prediktif değer (Gerçek pozitiflik):** Testin uygulandığı toplulukta pozitif sonucu olanların gerçekte hasta olma olasılığıdır(62)

$$\text{Pozitif prediktif değer} = X/(X+Y)$$

D) **Negatif prediktif değer (Gerçek negatiflik):** Testin uygulandığı toplulukta negatif sonucu olanların gerçekte hasta olmama olasılığıdır(62)

$$\text{Negatif prediktif değer} = W/(Z+W)$$

E) **Yanlış pozitiflik oranı:** Testin gerçek sağlam kişilerden hatalı olarak hasta dediği olgulardır (62).

$$\text{Yanlış pozitiflik oranı} = 1-[W/(Y+W)]$$

F) **Yanlı negatiflik oranı:** Testin gerçek hastalar içinden hatalı olarak sa lam dedi i olgulardır (62).

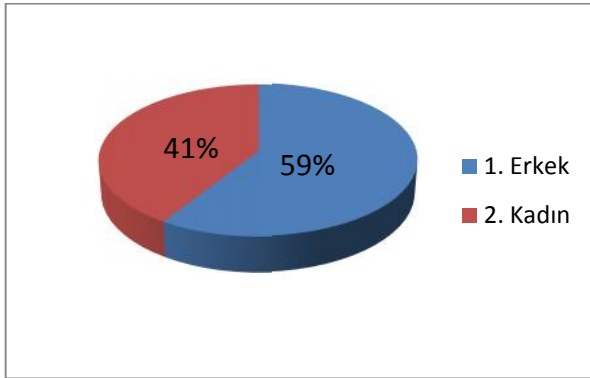
$$\text{Yanlı negatiflik hızı} = 1 - [X/(X+Z)]$$

G) **Do ruluk:** Gerçekte testin hasta ve sa lam olarak toplam do ru tanı oranına denir (62).

$$\text{Do ruluk} = (X+W)/(X+Y+Z+W)$$

4. BULGULAR

Bu çalı maya Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına tüberküloz yönünden incelenmesi için gönderilen 758 çe itli hasta örnekleri dahil edildi. Gönderilen klinik örnekler direk mikroskopi (EZN ve Auramin O) ve kültür (Löwenstein-Jensen ve Bactec MGIT) yönünden kar ıla tırmalı olarak incelendi. Çalı maya dahil edilen 758 hastanın 308'i (%41) kadın, 450'si (%59) erkekti.



ekil 6. Tüm hastaların cinsiyete göre da ılımı

Çalı mada; 9'u mide açlık sıvısı (MAS), 10'u doku materyali, 23'ü abse, 9'u beyin omurilik sıvısı (BOS), 36'sı idrar, 5'i peritoneal lavaj sıvısı, 29'u plevral mayi, 35'i postbronkoskopik balgam, 69'u bronkoalveolar lavaj ve 533'ü balgam olmak üzere toplam 758 hasta örne i de erlendirildi(Tablo 4).

Tablo 4. Klinik örneklerin da ılımı

Klinik örnek	ncelenen örnek sayısı
Balgam	533
Bronkoalveolar lavaj	69
Postbronkoskopik balgam	35
Doku	10
Beyinomurilik sıvısı	9
Abse	23
Mide açlık sıvısı	9
drar	36
Plevra	29
Peritoneal lavaj sıvısı	5

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen 758 hasta örneğinin incelenmesi sonucunda 758 örnekten 51'i (%6.7) EZN boyama yöntemi ile, 90'ı (%11.8) Auramin O boyama yöntemi ile, 96'sı (%12.6) BACTEC MGIT 960 sıvı kültür sistemi ile ve 87 tanesi de (%11.4) Löwenstein –Jensen katı besiyeri kültür sisteminde ARB açısından pozitif bulundu.

ncelenen 533 balgam örneklerinin tümü EZN ve Auramin-O boyama yöntemi ile boyanmış olup; 43'ü (%8) EZN boyama yöntemi ile, 75'i (%14) Auramin-O boyama yöntemi ile; 69 BAL örneğinin 3'ü (%4.3) EZN boyama yöntemi, 6'sı (%8.6) Auramin-O boyama yöntemi ile; 35 postbronkoskopik balgam örneğinin 1'i (%2.8) EZN boyama yöntemi, 1'i (%2.8) Auramin-O boyama yöntemi ile; 9 mide açlık sıvısı örneğinin 1'i (%11) sadece EZN boyama yöntemi ile; 10 doku örneğinin 1'i (%10) sadece Auramin-O boyama yöntemi ile; 23 abse örneğinin 1'i (%4.3) EZN boyama yöntemi, 2'si (%8.6) Auramin-O boyama yöntemi ile; 36 idrar örneğinin 3'ü (%8.3) sadece Auramin-O boyama yöntemi ile ve 29 plevra örneğinin 2'si (%6.8) EZN boyama yöntemi, 2'si (%6.8) Auramin-O boyama yöntemi ile aside dirençli bakteriler açısından pozitif bulunmuştur. Beyin omurilik sıvısı ve periton örneklerinde ise her iki yöntemle ayrı boyanan preparatlarda aside dirençli bakteri görülmemiştir.

Bütün klinik örnekler göz önüne alındığında 758 örneğin, EZN boyama yöntemi ile 51'i (%6.7), Auramin-O boyama yöntemi ile 90'ı (%11.8) aside dirençli

bakteriler yönünden pozitif bulunmu tur. Preparat sonuçları ile ilgili bulgular Tablo 5'te belirtilmi tir.

Tablo 5. ncelenen klinik örneklerin preparat sonuçları

Klinik örnek		EZN(+)		Auramin-O(+)	
		Sayı	%	Sayı	%
Balgam	n = 533	43	8	75	14
Postbronkoskopik balgam	n =35	1	2.8	1	2.8
Bronkoalveolar lavaj	n =69	3	4.3	6	8.6
Mide açlık sıvısı	n =9	1	11	-	-
Doku	n =10	-	-	1	10
Abse	n = 23	1	4.3	2	8.6
BOS	n =9	-	-	-	-
drar	n =36	-	-	3	8.3
Periton	n =5	-	-	-	-
Plevra	n =29	2	6.8	2	6.8
Toplam	758	51	6.7	90	11.8

Mikobakteriyolojik inceleme amacıyla laboratuvara gönderilen klinik örneklerin Löwenstein-Jensen ve Bactec MGIT 960 besiyerinde kültürü yapılmı tur.

Gönderilen örneklerden; 533 balgam örneğinin 77'sinin (%14.4) mikobakteriyolojik kültürü pozitif bulunmuştur. Kültürü pozitif 77 balgam örneğinin 13'ü (%2.4) sadece Bactec MGIT besiyerinde, 3'ü (%0.5) sadece Löwenstein-Jensen besiyerinde, 61'i (%11.4) hem Bactec MGIT 960 besiyerinde, hem de Löwenstein-Jensen besiyerinde üretilmiştir.

69 bronkoalveolar lavaj örneğinin 9'u (%13) kültürde üreme göstermiştir. Bu örneklerin 1'i (%1.4) sadece Löwenstein-Jensen besiyerinde, 8'i (%11.5) hem Bactec MGIT 960 besiyerinde hem Löwenstein-Jensen besiyerinde üretilmiştir. Sadece Bactec MGIT 960 besiyerinde üreme gösteren örnek belirlenmemiştir.

35 postbronkoskopik balgam örneğinin 7'si (%20) kültürde üreme göstermiştir. Bu örneklerin 1'i (%2.8) sadece Bactec MGIT 960 besiyerinde, 6'sı (%17.1) hem Bactec MGIT 960 besiyerinde hem Löwenstein-Jensen besiyerinde üretilmiştir. Sadece Löwenstein-Jensen besiyerinde üreme gösteren örnek belirlenmemiştir.

9 mide açlık sıvısı örneğinin 1'inde (%11.1) üreme belirlenmiş ve bu örnek hem Bactec MGIT 960 besiyerinde hem Löwenstein-Jensen besiyerinde üremiştir.

23 abses örneğinin 3'ünde (%13) üreme belirlenmiş ve bu örnekler hem Bactec MGIT 960 besiyerinde hem Löwenstein-Jensen besiyerinde üreme göstermiştir.

36 idrar örneğinden 2'si (%5.5) Löwenstein-Jensen besiyerinde üremiştir.

10 doku örneğinin 1'i (%10) Bactec MGIT 960 besiyerinde üremiştir.

29 plevral mayi örneğinin 2'sinde (%6.8) üreme gözlenmiştir, bu örneklerin hem Bactec MGIT 960 besiyerinde hem Löwenstein-Jensen besiyerinde üremesi olmuştur.

Sonuç olarak 102 kültür (+) örneğinin 15'i (%14) sadece Bactec MGIT 960 besiyerinde, 6'sı (%5.8) sadece Löwenstein-Jensen besiyerinde, 81'i (%79.4) ise hem Bactec MGIT 960 besiyerinde hem de Löwenstein-Jensen besiyerinde üreme göstermiştir (Tablo 6).

758 klinik örnekten kültür pozitif olarak tanımlanan 102 mikobakteri suuna kard test uygulanmış ve bu örnekler *M.tuberculosis* kompleks ve MOTT basilleri olarak tanımlanmıştır. 102 mikobakteri suununun 91'i (%89.2) *M.tuberculosis* kompleks, 11'i (%10.7) MOTT basili olarak tanımlanmıştır. MOTT basillerinin 8'i sadece

MGIT besiyerinde, 3'ü de sadece LJ besiyerinde üreme göstermi tir. Kültür pozitif MOTT olarak de erlendirilen 11 örnekten 3'ü sadece Auramin-O ile, 2'si hem Auramin-O ile hem de EZN yöntemi ile pozitif olarak bulunmu tur. Di er 6 örnek ise herhangi bir mikroskopi yöntemi ile saptanamamı tır.

Tablo 6. Kültür pozitifli i yönünden Bactec MGIT 960 ve Löwenstein-Jensen besiyerinden alınan sonuçların karşılaştırılması

	Sadece Bactec MGIT 960	Sadece L-J	Bactec MGIT 960+ L-J	Toplam
Balgam	13	3	61	77
Bronkoalveolar lavaj	-	1	8	9
Postbronkoskopik balgam	1	-	6	7
Mide açlık sıvısı	-	-	1	1
Abse	-	-	3	3
drar	-	2	-	2
Doku	1	-	-	1
Plevral mayi	-	-	2	2
Toplam	15(%14)	6(%5.8)	81(%79.4)	102

EZN ve Auramin O boyama yöntemleri, preparatların boyanma süreleri ve mikroskopta incelenme süreleri bakımından karşılaştırıldı ve bir seferde 10 preparat boyandı nda EZN için boyama süresi ortalama 10 dakika, Auramin O boyama yöntemi için ise ortalama 3 dakika olarak hesaplandı. EZN ile boyanan preparatlar

1 ık mikroskobunda ortalama 3.8 dakikada incelenirken, Auramin O ile boyanan preparatlar LED floresan mikroskop ile ortalama 1.7 dakikada incelendi.

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çalı ılan 758 hasta örne inden BACTEC MGIT 960 sıvı kültür sisteminde tespit edilen 96 (%12.6) pozitif kültürün 49'u (%6.4) EZN boyama yöntemi ile pozitif bulundu. EZN boyama yöntemi ile pozitif saptanan 2 klinik örne in ise BACTEC MGIT 960 sıvı kültür sisteminde üremedi i tespit edildi. 660 hasta örne i ise her iki yöntemde de negatif bulundu (Tablo 7).

Tablo 7. BACTEC MGIT 960 ve EZN sonuçlarının karşılaştırılması

	BACTECMGIT 960 (+)	BACTECMGIT 960 (-)	Toplam
EZN (+)	49	2	51
EZN (-)	47	660	707
Toplam	96	662	758

Duyarlılık : %51.04

Özgüllük : %99.7

Pozitif prediktif de er : %96.08

Negatif prediktif de er : %93.35

Yanlı pozitiflik hızı: %0.3

Yanlı negatiflik hızı: %49

Do ruluk: %93

Laboratuvarımızda çalı ılan 758 hasta örne inden BACTEC MGIT 960 sıvı kültür sisteminde tespit edilen 96 (%12.6) pozitif kültürün 65'i (%8.5) Auramin-O boyama yöntemi ile pozitif bulundu. Auramin-O boyama yöntemi ile pozitif saptanan 24 klinik örne in ise BACTEC MGIT 960 sıvı kültür sisteminde üremedi i tespit edildi. 637 hasta örne i ise her iki yöntemde de negatif bulundu (Tablo 8).

Tablo 8. BACTEC MGIT 960 ve Auramin-O sonuçlarının karşılaştırılması

	BACTECMGIT 960 (+)	BACTECMGIT 960 (-)	Toplam
Auramin-O (+)	65	35	90
Auramin-O (-)	31	637	668
Toplam	96	662	758

Duyarlılık : %67.71

Yanlı pozitiflik hızı: %3.7

Özgüllük : %94.79

Yanlı negatiflik hızı: %32.2

Pozitif prediktif de er : %65

Do ruluk: %92.61

Negatif prediktif de er : %95.36

Laboratuvarımızda çalı ilan 758 hasta örne inden Löwenstein-Jensen katı besiyeri kültür sisteminde üremesi tespit edilen 87(%11.4) kültürün 47'si (%6.2) EZN boyama yöntemi ile pozitif bulundu. EZN boyama yöntemi ile pozitif saptanan 4 örne in ise Löwenstein-Jensen katı besiyeri kültür sisteminde üremedi i tespit edildi. 667 hasta örne i ise her iki yöntemde de negatif bulundu (Tablo 9).

Tablo 9. L-J ve EZN sonuçlarının kar ıla tırılması

	Löwenstein Jensen (+)	- Löwenstein Jensen (-)	- Toplam
EZN (+)	47	4	51
EZN (-)	40	667	707
Toplam	87	671	758

Duyarlılık : %54.02

Yanlı pozitiflik hızı: %5

Özgüllük : %99.4

Yanlı negatiflik hızı: %45.9

Pozitif prediktif de er : %92.16
Negatif prediktif de er : %94.34

Do ruluk: %94.1

Çalı ılan 758 hasta örne inden Löwenstein-Jensen katı besiyeri kültür sisteminde tespit edilen 87 (%11.4) pozitif kültürün 59'u (%7.7) Auramin-O boyama yöntemi ile pozitif bulundu. Auramin-O boyama yöntemi ile pozitif saptanan 31 klinik örne in ise Löwenstein-Jensen katı besiyeri kültür sisteminde üremedi i tespit edildi. 640 hasta örne i ise her iki yöntemde de negatif bulundu (Tablo 10).

Tablo 10. L-J ve Auramin-O sonuçlarının karşılaştırılması

	Löwenstein Jensen (+)	- Löwenstein Jensen (-)	- Toplam
Auramin-O (+)	59	31	90
Auramin-O (-)	28	640	668
Toplam	87	671	758

Duyarlılık : %67.82

Yanlış pozitiflik hızı: %4.6

Özgüllük : %95.38

Yanlış negatiflik hızı: %32.1

Pozitif prediktif de er : %65.56

Do ruluk: %92.2

Negatif prediktif de er : %95.81

Sonuç olarak çalı mamızda incelenen 758 örne in 102'sinde kültür pozitifli i saptanmıştır. EZN boyama yöntemi ile, kültür pozitif 102 örne in 50'sinde (%49), kültür negatif 656 örne in ise 1'inde (%0.1) ARB görülmü tür (Tablo 11).

Tablo 11. EZN boyama yöntemiyle kültür sonuçlarının karşılaştırılması

Kültür (+)		Kültür (-)		Toplam	
n	%	n	%	n	%

EZN (+)	50	(%49)	1	(%0.1)	51	(%6.7)
EZN (-)	52	(%51)	655	(%99.9)	707	(%93.3)
Toplam	102	(%100)	656	(%100)	758	(%100)

Auramin-O boyama yöntemiyle, kültür pozitif örneklerin % 64.7'sinde (66/102), kültür negatif örneklerin ise %3.6'sında (24/656) ARB saptanmıştır (Tablo 12).

Tablo 12. Auramin-O boyama yöntemiyle kültür sonuçlarının karşılaştırılması

	Kültür (+)		Kültür (-)		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
Auramin-O (+)	66	(%64.7)	24	(%3.7)	90	(%11.9)
Auramin-O (-)	36	(%35.3)	632	(%96.3)	668	(%88.1)
Toplam	102	(%100)	656	(%100)	758	(%100)

İncelenen tüm örneklerde her iki boyama yöntemine ait sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerler, yanlış pozitiflik ve yanlış negatiflik değerleri Tablo 13'te gösterilmiştir.

Tablo 13. EZN ve Auramin-O boyama yöntemlerinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif belirleyicilik değerleri

	EZN(%)	Auramin-O(%)
Duyarlılık	49	64.71
Özgüllük	99.85	96.34
Pozitif prediktif değer	98.04	73.33
Negatif prediktif değeri	92.64	94.61

Yanlı pozitiflik hızı	0.1	3.6
Yanlı negatiflik hızı	50.9	35.2
Do ruluk	93	92

Boyama yöntemlerinin ortak sonuçları ile kültür yöntemlerinin ortak sonuçları de erlendirildi inde kültürde üremesi saptanan 102 örne in 70 tanesi boyama yöntemlerinin herhangi birisi ile de pozitif olarak saptandı. Boyama yöntemleri ile pozitif saptanan 25 örne in ise kültürde üremedi i belirlendi. 631 klinik örnek ise her iki yöntemde de negatif olarak belirlendi(Tablo 14).

Tablo 14. Kültür ve boyama yöntemlerinin ortak sonuçlarının kar ıla tırılması

	Kültür (+)	Kültür (-)	Toplam
Direk mikroskopi(+)	70	25	95
Direk mikroskopi (-)	32	631	663
Toplam	102	656	758
Duyarlılık	: 68.63		Yanlı pozitiflik hızı : 3.8
Özgüllük	: 96.19		Yanlı negatiflik hızı: 31.3
Pozitif prediktif de er :	73.68		Do ruluk : 92.4
Negatif prediktif de er:	95.17		

5. TARTI MA

Akci er tüberkülozunun tanısı bakteriyolojiktir; bazı durumlarda tanı histopatolojik yöntemlerle de konulabilir. Hastalı ın tanısında asido rezistan bakterilere yönelik özel boyama yöntemleri sensitivite tartı malarına ra men, 120 yılı a kın süreden beri bugün hala en hızlı ve en ekonomik yöntem olarak kullanılmaktadır. Tanıda çı ır açaca ı umudu ile 1990'lı yılların ba ından itibaren rutin kullanılmaya ba lanan moleküler teknikler beklentileri kar ılayamamı , klasik kültür yöntemleri altın standart olarak yerini korumaya devam etmi tir. Tanıda kullanılan moleküler biyolojik tekniklerin pahalılı ı bir dezavantajdır.

Tüberkülozun tanısında moleküler yöntemler oldukça hızlı olmaları ve tanımlama aralı ının geni li i ile, kullanım alanı bulmu tur. Etkenin saptanması, üretilen bakteri türünün tiplendirilmesi, antimikrobiyal ilaçlara dirençli olup olmadıklarının ara tırılması PCR yöntemi ile mümkün olabilir. Fakat PCR'ın; yalancı pozitif ve negatiflik gösterebilmesi, deneyimli personel, hassas çalı ma, uzun süre, özel laboratuvar alt yapısı, ekipman ve yüksek maliyet gerektirmesi, i yo unlu unun fazla olması, sonuçların deneyimli ki iler tarafından yorumlanmasını gerektirmesinden dolayı rutinde pek kullanımı yoktur. Tüberküloz tanısında EZN boyama ile direk mikroskopik inceleme ve geleneksel kültür yöntemleri (Lövenstein-Jensen, Middle brook 7H9, 7H10, 7H11, 7H12) hala en sık tercih edilen yöntemlerdir.

Direk mikroskopik inceleme, klinik örneklerde aside dirençli basil saptanması amacıyla kullanılan en basit, ucuz ve hızlı yöntemdir. Çalı mayı yapan kiinin tecrübesi, materyalin türü ve yayma kalınlı ı gibi faktörler mikroskopik inceleme sonuçlarını etkileyebilmektedir. Klinik örneklerde aside dirençli bakteri görülmesi örne in mililitresinde en az 5000 basil oldu u anlamına gelmektedir(63).

Tüberküloz etkeni mikroorganizmaların etrafında balmumu tabakası bulunması, bunların normal boyama yöntemleriyle boyanma olana ını ortadan kaldırmaktadır. Bu nedenle tüberküloz etkenleri karbol fuksin boyama yöntemleri ile boyanmaktadır. Boya içerisine fenol konur, alttan hafifçe ısıtılarak balmumu tabakası yumu atılır. Böylece boyayı kolayca alır, asit alkolle kar ıla tı ında boyayı bırakmaz. Bu preparatlar ı ık mikroskopunda kolayca incelenirken, bu boyama yöntemlerine alternatif fluorokrom (auramin O, auramine rhodamine) boyama yöntemleri de kullanılmaya ba lanmı tır. Fluorokrom boyama yöntemiyle hazırlanan preparatlar floresan mikroskopunda incelenebilmektedir.

Fluorokrom boyamada ana ilke fenollü fuksin yerine floresans boyaların kullanılmasıdır. Bu boyama yöntemlerinde, daha küçük bir büyütme ile daha geni bir alan taranabilir ve preperatın taranması için gereken zaman azalır. Bu nedenle özellikle zaman problemi olan ve fazla sayıda hasta örne inin i lendi i laboratuvarlarda fluorokrom boyama yöntemleri tercih edilmektedir.

Son 10 yıldır balgam örnekleri EZN boyama yanında floresan mikroskop tekni i ile de incelenmektedir. Floresan mikroskop tekni i EZN ile kar ıla tırıldı ında daha duyarlı oldu u ve zaman açısından da daha kazançlı oldu u belirtilmektedir. Vakaların görüldü ü ülkelerin az geli mi li i göz önüne alındı ında, kompleks mikroskop ve lamba ı ı ı gibi sistemlerin kullanılması, özel karanlık oda gerektirmesi gibi maliyetli harcamalar ve zorluklar, engel te kil etmektedir(4).

Konvansiyonel ı ık mikroskopları hızlı ve spesifik olmasına ra men sensitivitenin dü ük olması, FM tekni inin ı ık mikroskopuna yakın spesifikli i, buna ra men preparat taramada yüksek sensitivite göstermesi bir avantaj olarak görülebilir.

Tüberküloz basilinın varlı ının belirlenmesine yönelik bir çok laboratuvar testi mevcut olup bu testlerin etkinlikleri kar ıla tırmalı olarak ara tırılmakta ve en

do ru sonucu en kısa sürede verebilecek testler belirlenmeye çalı ılmaktadır. Bu amaç do rultusunda bilim insanlarının yaptıkları bazı çalı malarla elde ettikleri bir takım bilgiler a a ıda verilmi tir.

Tarhan ve ark. (64) yaptıkları çalı mada 311 balgam örne inden 103'ünün (%33.1) kültürde üreme gösterdi ini belirtmi ler, kültür pozitif 89 (%86.4) örne i EZN boyama yöntemi ile de pozitif bulduklarını ifade etmi lerdir. Kültür pozitifli i tespit edilen 14 (%13.6) balgam örne ini ise EZN yöntemi ile negatif bulmu lar. EZN yöntemiyle tespit ettikleri 8 (%3.8) pozitif balgam örne inin ise kültürde üreme göstermedi ini belirtmi lerdir. 200 (%64.3) balgam örne inin ise kültür ve EZN yöntemlerinin her ikisinde de negatif oldu unu ifade etmi lerdir. Bu sonuçlar do rultusunda kültür testini referans aldıklarında EZN için spesifite %96.2, sensitivite %86.4 olarak bulunmu tur. Aynı çalı mada Auramine-Rhodamine boyama yöntemini de kullanmı lar ve kültürde üreme gösteren 103 örnekten sadece 77'sinde (%74.8) pozitiflik tespit ettiklerini, 26'sının (%25.2) negatif oldu unu saptamı lardır. Kültürde üreme saptanmayan 24 (%11.5) örne in ise Auramine-Rhodamine boyama yönteminde pozitif görüldü ünü, 184 (%59.1) örne in ise her iki yöntemde de negatif oldu unu belirtmi lerdir. Bu sonuçlara göre kültürü referans test kabul ederek Auramine-Rhodamine boyama yöntemi için spesifiteyi %88.5, sensitiviteyi ise %74.8 olarak bulmu lardır.

Yıldıran ve ark. (65) 27519 klinik örne in yayma ve kültür sonuçlarını de erlendirmi ler ve 1702 (% 6.2) örne i kültür açısından pozitif bulmu lardır. Kültür pozitif 1221 (% 71.8) örne in yayma preparatlarının da pozitif oldu unu belirtmi lerdir. Kültürü referans yöntem olarak EZN boyama yöntemi için duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif de er ve negatif prediktif de eri sırasıyla % 71.8, % 98.8, % 79.6 ve % 98.2 olarak bildirilmi tir.

Uzun ve Kasımo lu (66) yaptıkları çalı mada 346 klinik örne i; EZN, Auramine-Rhodamine ve kültür yönünden kar ıla tırmı lar ve çalı malarına dahil ettikleri 346 klinik örnekten 48 (%13.8) tanesinin kültürünü pozitif bulmu lar. EZN boyama yöntemiyle 24 (%6.9) pozitiflik, fluorokrom boyama yöntemiyle ise 26 (%67.5) pozitiflik tespit ettiklerini bildirmi lerdir. Fluorokrom boyama yöntemi için sensitiviteyi %50, spesifiteyi %99.3, pozitif prediktif de eri %92.3, negatif prediktif de eri %92.5, EZN boyama yöntemi için ise sensitiviteyi %41.6, spesifiteyi %98.9,

pozitif prediktif de eri %86.9, negatif prediktif de eri %91.3 olarak bulmu lardır.

Özekinci (67) 340 klinik örnekle yaptı ı ara tırmada kültürü referans yöntem olarak sensitiviteyi; EZN boyama yöntemi için % 38.2, Fluorokrom boyama yöntemi için % 52.9, spesifiteyi; EZN boyama yöntemi için % 99, Fluorokrom boyama yöntemi için % 100, pozitif prediktif de eri; EZN boyama yöntemi için % 81, Fluorokrom boyama yöntemi için % 100, negatif prediktif de eri EZN boyama yöntemi için % 93.5, Fluorokrom boyama yöntemi için % 95 olarak bildirmi tir. 340 klinik örnekten izole edilen 34(% 10) mikobakteri su unun 2'sini (%5.9) MOTT basili olarak, 32'sini de (%94.1) M.tuberculosis kompleks olarak tanımlamı tır.

Demirel (68) 291 örnekle yaptı ı çalı mada kültür yöntemini referans olarak Auramin-Rhodamine için sensitiviteyi%94.7, spesifiteyi %98, pozitif prediktif de eri %78.2, negatif prediktif de eri %99.6 olarak bulmu tur. EZN boyama yöntemi için ise sensitiviteyi %68.4, spesifiteyi %99.6, pozitif prediktif de eri %92.8, negatif prediktif de eri %97.7 olarak bulmu tur. Kültürde üreme oranını %6.5 olarak tespit etmi tir.

Durupınar ve ark. (69) 383 klinik örnek dahil ettikleri çalı mada, kültür referans yöntem olmak üzere sensitiviteyi EZN boyama yöntemi için % 57.1, Fluorokrom boyama yöntemi için % 73.6, spesifiteyi; EZN boyama yöntemi için % 99.6, Fluorokrom boyama yöntemi için % 97.6 olarak bildirmi lerdir.

Githui ve ark. (70) 1480 klinik örnek dahil ettikleri çalı malarında kültürü altın standart olarak de erlendirmi ler ve özgüllü ü Fluorokrom boyama için % 97, EZN boyama için ise % 96 olarak bulmu lar, sensitiviteyi ise Fluorokrom boyama için % 80, EZN boyama için ise % 65 olarak bulmu lardır.

Ndugga ve ark. (71) çalı malarına dahil ettikleri 993 klinik örne in 554' ünün (% 56) kültüründe pozitiflik belirlediklerini, 332 (% 59.9) örnekte EZN boyama yöntemiyle pozitiflik saptadıklarını ve 440 (% 77.6) örnekte de floresan yöntem kullanarak pozitiflik tespit ettiklerini belirtmi lerdir. Sonuç olarak EZN boyama yöntemi için spesifiteyi % 98.2, Fluorokrom boyama yöntemi için ise % 98.4 olarak belirlemi lerdir.

Cuevas ve ark. (4) 4 az geli mi ÷ lükede 2445 hasta materyalini EZN ve LED-FM ile de erlendirerek sensitivite ve spesifitesini saptamı lar, her hasta için 1, 2 veya 3 balgam örne i almı lar ve aynı zamanda mikobakteriyel kültürlerini de

yapılmı lar. 2445 materyalin 529'u (%21.6) kültür pozitif, 1826'sı (%74.6) kültür negatif olarak de erlendirilirken, 90'ının (%3.7) kültür sonucu geçersiz sayılmı tır. 2 preparat de erlendirildi inde sensitiviteyi LED-FM yöntemi ve EZN yöntemi için sırasıyla; %72.8 ve %65.8, spesifiteyi; %90.9 ve %98 olarak bulmu lardır. 3 preparat de erlendirildi inde ise sensitiviteyi LED-FM yöntemi ve EZN yöntemi için sırasıyla; %77 ve %70.5, spesifiteyi; %88.1 ve %96.5 olarak bulmu lardır. Tüberküloz preparatlarının incelenmesinde LED-FM yönteminin sensitivitesini EZN yöntemine göre yüksek olarak bulmalarına ra men spesifitesini daha dü ük bulmu lardır.

Uganda'da Albert ve ark. (72) tarafından yapılan bir çalı mada tüberküloz tanısında EZN boyama yönteminin yanı sıra 3 farklı irket tarafından üretilen LED FM'in tüberküloz tanısındaki performansları kar ıla tırlımı tır. Bu çalı mada özellikle 3 farklı firma tarafından üretilen (Primostar™, Frean AFTER®, Lumin™) LED FM mikroskoplarının EZN ve rutin FM ile tüberküloz tanısında sensitivitesi ve spesifitesi kar ıla tırlımı tır. Toplam 193 örnek incelenmi olup bunların 53'ü kültür pozitif, 127'si kültür negatif olarak bulunmu ve 13 örnekte ise MOTT basilleri izole edilmi tir. Özellikle non tüberküloz olarak tanımlanan 13 örne in 2'sinde LED FM mikroskobu ile pozitif etkenler tesbit edilirken, EZN yöntemi ile bu l'e dü mü tür. LED FM metodu ile tüberküloz tanısında %5.6-%9.4 arasında (3 mikroskop için) sensitivitesinin EZN'ye göre daha yüksek bulundu u çalı mada bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamı tır. Üç LED floresan mikroskop yöntemi arasında sensitivite açısından anlamlı bir fark görülmemi tir. Yine aynı çalı mada harcanan zaman açısından EZN yönteminin LED-FM yöntemine göre 2 kat daha uzun zaman aldı ı belirtilmi tir.

Minion ve ark. (73) LED-FM'i tüberküloz belirlenmesinde özel bir ortama gereksinim duymaması, dü ük maliyeti, uzun lamba ömrü, toksik komponentlerinin olmaması açısından konvansiyonel FM'e göre daha kullanı lı oldu u sonucuna varmı lardır. Ayrıca okumadaki do ru sonucu bulmadaki hassasiyet üstünlü ünü LED-FM'in laboratuvara kazandırdı ı ayrı bir pozitiflik olarak de erlendirmi lerdir.

Bonnet ve ark. (74) yaptıkları bir çalı mada 497 hastadan topladıkları 1394 örnek üzerinde çalı mı lardır. NaOCl ile muamele edilen yaymalar LED-FM (%24.9) ile incelenmi , direk LED-FM (%20.6) ve direk EZN (%20.3) ile bulunan

pozitifli e göre anlamlı derecede yüksek bulunmu tur. Sensitiviteyi NaOCl ile muamele edilmi yaymalarda LED-FM ile %78.5, direk LED-FM ile %73.2, direk EZN ile %72 olarak bulmu lar. Spesifiteyi NaOCl ile muamele edilmi yaymalarda LED-FM ile %87.8, direk LED-FM ile %96.7, direk EZN ile %95.9 olarak bulmu lardır.

Lehman ve ark. (75) çalı maya 300 örnek dahil etmi ler. EZN ile negatif bulunan 17 örne i, LED floresan mikroskop ile pozitif bulmu lar ve kültür pozitifli i ile do rulamı lar. LED floresan mikroskop ile 100 (%33.3) örnek, EZN ile 83 (%27.7) örne i pozitif olarak bulmu lardır. LED-FM'in sensitivitesini EZN yöntemine göre daha yüksek olarak de erlendirmi lerdir.

Shenai ve ark. (76) yaptıkları bir çalı mada LED-FM ve EZN mikroskopi yöntemini kar ıla tırımı lar ve referans standart olarak mycobacterial kültürü kullanmı lardır. Çalı maya 1358 pulmoner ve 917 extrapulmoner örnek dahil edilmi tir. Pulmoner örnekler için LED floresan mikroskopinin sensitivitesi %78.3, spesifitesi %92; extrapulmoner örnekler için sensitivitesi %34, spesifitesi %88.8 olarak bulunmu tur. Her bir yayma incelenmesi için gereken süreyi EZN mikroskopi ile 2.48 dakika, LED-FM ile 1.41 dakika olarak hesaplamı lardır. Ayrıca Auramin-O ile boyanma süresini yakla ık 20 dakika olarak hesaplamı lardır. LED-FM'in EZN'ye göre anlamlı faydalarının olmasına ra men uygulama ve kurulum güçlüklerinin performansının geli mesini engelledi ini savunmu lardır.

Verweij ve ark. (77) Zambia'da yaptıkları bir çalı mada 100 hastadan 271 hasta örne i topladı lar. Referans metod olarak MGIT kültür sistemini ele almı lardır. Tüm hastalar ele alındı nda sensitivite Auramin-O için %57.1, EZN için %28.6 olarak bulunmu tur. Kültür pozitif 30 hastanın 17'si (%56.7) *M.tuberculosis* kompleks, 11'i (%36.7) MOTT basili olarak saptanmı tur. Kültür pozitif MOTT olarak de erlendirilen 11 hastadan 3'ü sadece Auramin-O ile, 1'i hem EZN, hem de Auramin-O yöntemi ile pozitif olarak bulunmu tur.

Trusov ve ark. (78) Rusya ve Makedonyada olmak üzere 2 ayrı yerde çalı ma yapmı lar. LED-FM yöntemini EZN ve konvansiyonel floresan mikroskop yöntemi ile kar ıla tırımı lar. Löwenstein-Jensen besiyerini altın standart olarak kullanmı lardır. Makedonya'daki çalı mada sensitiviteyi LED-FM ve konvansiyonel floresan mikroskop için %87.8, EZN için %78 olarak bulmu lardır. Her iki yöntem

için spesifiteyi %100 olarak bulmu lardır. Rusya'daki çalı mada ise sensitiviteyi LED-FM, konvansiyonel floresan mikroskop ve EZN için sırasıyla; %72.8, %52.5 ve %55.6 olarak bulmu lardır. Her iki çalı mada da LED-FM'in sensitivitesini EZN yöntemine göre anlamlı derecede yüksek bulmu lardır.

Xia ve ark. (79) Çin'de yaptıkları bir çalı mada LED-FM ve EZN mikroskopi yönteminin performansını kar ıla tırmı lardır. 11 276 örne in yayma pozitiflik oranlarını LED-FM için %11.2, EZN yöntemi için %8.6 olarak bulmu lardır. LED-FM pozitiflik oranını, EZN yöntemine göre %2.6 oranında daha yüksek bulmu lardır. Her bir yaymanın inceleme zamanını LED-FM ile 120 ± 38.9 saniye, EZN yöntemi ile 206.3 ± 75.9 saniye olarak bulmu lardır.

Marais ve ark. (80) 221 örnek için LED-FM, civalı floresan mikroskop ve EZN yöntemini kar ıla tırmı lar. MGIT ve LJ kültür sistemleri altın standart olarak de erlendirmi ler. Yöntemlerin sensitivitesini LED-FM, civalı floresan mikroskop ve EZN yöntemi için sırasıyla; % 84.7, % 73.6, % 61.1 olarak bulmu lardır. Yöntemlerin spesifitesini ise LED-FM, civalı floresan mikroskop ve EZN yöntemi için sırasıyla; % 98.9, % 99.8, % 98.9 olarak bulmu lardır. Yayma inceleme zamanını her bir yayma için LED-FM ile 1.4 dakika, EZN ile 3.6 dakika olarak hesaplamı lar ve floresan mikroskop yönteminin %61 zaman kazancı sa ladı nı belirtmi lerdir.

Das ve ark. (81) yaptıkları bir çalı mada LED-FM yönteminin EZN yönteminin yerine geçip geçemeyece ini ara tırmı lar. Konvansiyonel floresan mikroskobun karanlık oda gerektirmesi ve pahalılı ından dolayı periferdeki laboratuvarlarda tercih edilmedi ini ve buna alternatif olarak LED-FM yönteminin kullanılabilce ini savunmu lardır. LED-FM yönteminin en önemli avantajının $40\times$ ve $20\times$ objektiflerle incelenmesi oldu unu savunmu lardır. Ayrıca tedavi alan hastaların yaymalarının Auramin ile karbol fuksinden daha iyi boyandı nı belirtmi lerdir. LED-FM ile pozitif bulunan örneklerin EZN ile do rulanması gerekti ini belirtmi lerdir.

WHO 2010 raporuna (82) göre; kültür referans standart olarak alındı nda LED-FM'nin duyarlılı ını %84 (%76-89), özgüllü ünü %98 (%85-97) olarak belirlemi tir. LED-FM, EZN mikroskobisi ile kıyaslandı nda ; özgüllükte herhangi bir azalma olmadan duyarlılı ında % 6'lık (% 0.1-13) bir artı görülmü tür. Ayrıca

LED-FM ile EZN'ye göre %50 daha kısa sürede preperat incelendi ini belirtmi lerdir.

Çalı mamızda 758 klinik örnek için kültür referans alınarak yapılan de erlendirmede; Auramin-O için duyarlılık %64.7, özgüllük %96.3, pozitif prediktif de er %73.33, negatif prediktif de er % 94.6 olarak bulunmu tur.

Çalı mamızda kullanılan fluorokrom yönteminin duyarlılı ı Uzun ve Kasımo lu'nun, Özekinci'nin buldukları de erden yüksek, fakat Demiro l'un, buldu u de erden daha dü ük olarak saptanmı tır. Tarhan ve ark., Durupınar ve ark., Verweij yaptıkları çalı mada fluorokrom yönteminin duyarlılı nı sırasıyla %74.8, %73.6 ve %57 olarak bulmu lar ve bu sonuçlar bizim çalı mamıza en yakın de erler olarak belirlenmi tir. Fluorokrom yönteminin özgüllü ü ise Trusov ve ark'nın, Özekinci'nin yaptıkları çalı mada %100 olarak de erlendirilirken, bizim çalı mamızda %96.3 olarak de erlendirilmi tir. Tarhan ve ark.'nın yaptıkları çalı maya göre bizim de erler yüksek bulunmu tur. Bizim de erlerimiz Durupınar ve ark.'nın, Githui ve ark.'nın yaptıkları çalı mayla büyük ölçüde uyumlu bulunmu tur.

Çalı mamızda 758 örnek için kültür referans alınarak yapılan de erlendirmede EZN yöntemi için duyarlılık %49.02, özgüllük %99.85, pozitif prediktif de er %98.08, negatif prediktif de er % 92.64 olarak bulunmu tur. Çalı mamızda belirlenen EZN yönteminin duyarlılı ı Özekinci, Verweij, Uzun ve Kasımolu'nun yaptıkları çalı maya göre yüksek, Tarhan ve ark.'nın, Demiro l'un çalı malarına ve yapılan birçok çalı maya göre dü ük bulunmu tur. EZN yönteminin özgüllü ü ise yapılan çalı malarla oldukça uyumlu bulunmu tur.

Yapılan çalı malarda duyarlılık de erleri aralı nın çok fazla oldu u (FK için %50-%94.7-EZN için %28.6-%86.4), özgüllük de erlerinin ise birbirine çok yakın oldu u görülmektedir. Duyarlılık de erlerindeki aralı n çok fazla olması; incelenen örne in cinsi, dekontaminasyon-konsantrasyon i lemlerindeki aksaklıklar, boyama sırasındaki aksaklıklar, yayma kalınlı ı, örnekteki basil sayısı ve de erlendiren ki inin tecrübesi gibi faktörlerden kaynaklanabilir.

Çalı mamızda EZN ve LED-FM yöntemi arasında sensitivitede önemli derecede fark saptanmı tır. Çalı mamızda LED-FM'in sensitivitesi % 64.7 olarak hesaplanırken, EZN yönteminin sensitivitesi % 49.02 olarak hesaplanmı tır. LED-

FM yönteminin duyarlılığı %15.5 farkla daha yüksek olarak değerlendirilmiştir. Bu değer yapılan birçok çalışmaya göre yüksek bir değerdir. Fakat Marais ve ark. %23.6 farkla daha yüksek bir değer bulmuşlardır. Çalışmamızda EZN yöntemi LED-FM yöntemine göre daha spesifik bir yöntem olarak bulunmuştur. Yapılan birçok çalışma maya paralel olarak bizim çalışmamızda da LED-FM yönteminin sensitivitesi EZN yöntemine göre önemli bir artış göstermiştir. LED-FM yönteminin EZN yöntemine göre sensitivitesindeki artış Cuevas ve ark.; %6.5, Albert ve ark.; %5.6-9.4, Xia ve ark.%2.6 oranında bulunmuşlardır. WHO 2010 raporunda ise bu oran %6 (%0.1-13) olarak belirlenmiştir.

Çalışmaya LED-FM açısından da ilde, sadece flurokrom yöntem açısından bakılırsa; Tarhan ve ark. yapılan birçok çalışma zıt olarak fluorokrom yönteminin sensitivitesini (%74.8), EZN yöntemine göre (%86.4) daha düşük olarak bulmuşlardır. Bu farklılığın, değerlendiren kişinin tecrübesine, dekolorizasyon aşamasındaki aksaklık ve preparatın hazırlanma aşamasında kontaminasyon ihtimaline bağlı olabileceğini düşündük.

Çalışmamızda kültüründe üreme olan toplam 102 örneğin 36'sında Auramin-O yöntemi ile, 52'sinde EZN yöntemi ile aside dirençli basil görülmemiştir. Bu durumun örneğin hazırlanırken homojenizasyon-dekontaminasyon basamaklarındaki aksaklıklardan, preparatı inceleyen kişinin tecrübesinden kaynaklanabileceğini düşünülmüştür. Ayrıca az sayıda mikobakteri içeren ve preparatı (-) bulunan örneklerin (+) sonuç vermesi kültür sistemi duyarlılığının yüksek olmasına bağlıdır.

Biz çalışmamızda her bir yayma için inceleme zamanını LED-FM ile 1.7 dakika, EZN ile 3.8 dakika olarak hesapladık. Marais ve ark. inceleme zamanını bizim bulduğumuz sürelerle paralel olarak LED-FM ile 1.4 dakika, EZN ile 3.6 dakika olarak hesaplarken; Xia ve ark. ise preparatları inceleme zamanını LED-FM ile 120 ± 38.9 saniye, EZN ile 206.3 ± 75.9 saniye olarak bizden daha uzun bir sürede değerlendirmişlerdir. Burada önemli olan bir preparatın LED-FM ile EZN'den daha kısa sürede incelenmesidir. Cuevas ve ark.'da bir preparatın LED-FM yöntemi ile EZN'ye göre 4 kat daha kısa sürede incelenebildiğini savunmuşlardır(4). Yapılan çalışmaların tümünde LED-FM ile inceleme süresi daha kısa olarak bulunmuştur. Bunun nedeni preparatın LED-FM ile $\times 20$ 'lik ve $\times 40$ 'lik objektiflerle incelenip, daha

kısa sürede daha çok alanın taranabilmesindedir.

Çalı mamızda 758 örnek için kültürde üreme oranı %13.4 (102/758) olarak bulunmu tur. Bu oranı Uzun ve Kasımo lu %13.8, Özekinci %10 olarak bulmu lardır. Bu oranlar bizim buldu umuz orana yakındır. Ancak Tarhan ve ark.'nın %33.1, Ndugga ve ark.'nın %56 olarak buldukları üreme oranları bizim çalı mamıza ve di er çalı malara göre çok yüksek bulunmu tur. Bunun seçilen hasta gruplarının klinik özelliklerinden veya örneklerin hazırlanma a masındaki (homojenizasyon - dekontaminasyon) aksaklıklardan kaynaklanabilece i dü ünülmektedir.

Çalı mamızda Auramin-O ile boyama süresini 3 dk olarak hesapladık. Shenai ve ark. Auramin-O ile boyama süresini 20 dakika olarak hesaplamı lardır. Bu sürelerin farklılı ı, kullanılan ticari boya kitinin farklılı ından kaynaklanmaktadır.

Çalı mamızda kültür pozitif olarak de erlendirilen 102 mikobakteri su undan 91'i (%89.2) M.tuberculosis olarak, 11'i (%10.7) MOTT basili olarak tanımlanmı tır. MOTT basillerinin 3'ü Auramin-O ile, 2'si hem EZN hem Auramin-O ile saptanmı tır. Özekinci 34 mikobakteri su unun 2'sini (%5.9) MOTT basili olarak tanımlamı ve bu oran bizim buldu umuz MOTT basil oranımıza göre dü ük bulunmu tur. Verweij ve ark. ise kültür (+) 30 hastadan 11'ini (%36.7) MOTT basili olarak tanımlayarak bizim MOTT basil oranımıza göre daha yüksek bir de er bulmu lardır. Verweij ve ark. bizim çalı mamıza paralel olarak, MOTT olarak de erlendirdikleri 11 hastanın 3'ünü sadece Auramin-O yöntemi ile, 1'ini ise hem Auramin-O yöntemi, hem EZN yöntemi ile saptamı lardır. Sonuçlarda da görüldü ü gibi MOTT basillerini saptamada LED-FM yönteminin duyarlılı ı EZN yöntemine göre daha yüksek olarak de erlendirilmi tir. Bu sonuçlar; boyama sırasındaki aksaklıklardan, incelemeyi yapan ki inin deneyiminden kaynaklanabilece i gibi, LED-FM ile daha küçük büyütme ile daha fazla alanın taranmasından ve böylece az olan basili saptama olasılı ının artmasından da kaynaklanabilece i dü ünülmektedir.

Das ve ark. yaptıkları çalı ma do rultusunda; LED FM ile pozitif buldukları örneklerin EZN ile do rulanması gerekti ini savunmu lardır. Bizde bunun özellikle üpheli olgularda gerekli oldu unu dü ünmekteyiz.

Elde edilen tüm bu sonuçlara göre; LED-FM, EZN'ye göre daha yüksek sensitiviteye sahiptir, fakat spesifitesi daha dü üktür. LED-FM'in daha iyi sonuçları

için uygun eğitim olmalıdır(4). LED-FM ile daha fazla tüberküloz hastası tanımlenebilir. Yanlış pozitiflik hızı LED-FM ile %3.6 olarak hesaplanırken, EZN ile %0.2 olarak hesaplanmıştır. Yanlış pozitiflik, hastaya yanlış tedavi koymaya ve gereksiz yere hastanın tedavisi olmasına sebep olacaktır. Bu nedenle özellikle yükü fazla olan laboratuvarlarda kullanılabilirlikle beraber, LED-FM ile incelenen üpheli preparatlar, hasta klinisi de tüberküloz ile uyumlu değilse EZN ile doğrulanmalıdır. Altın standart test mycobacterial kültürdür, fakat bu test pahalı olduğundan hala bazı ülkelerde mikroskopi ile tanı konmaktadır(4). EZN yöntemi ile tüberküloz tanısı daha uzun süre alır ve geniş bir laboratuvar çalışması gerektirir. LED-FM ile bu yükü azaltılabilir.

Ayrıca çalışmamızda kullandığımız, tek bir aparat ile ışık mikroskopuna uygulanabilen LED-FM yönteminin, konvansiyonel floresan mikroskopuna göre bazı avantajları mevcuttur. Floresan mikroskop laboratuvar yükünü azaltabilmesine rağmen(83), yüksek maliyeti, cıvalı buhar lamba sistemi, karanlık oda ihtiyacı ve UV ışın maruziyeti ile ilişkili alınan sağlık risklerinden dolayı, düşük ve orta gelirli ülkelerde pek uygulanmamaktadır(84). Bu anlamda son yıllarda LED teknoloji geliştirilmiştir. LED floresan mikroskopları daha ucuz, daha az ışık gücü gerektirirler, çekirdeklerinin yarı ömrü oldukça uzundur, kırılıp bozulduklarında potansiyel toksik ürün salınım riskleri yoktur ve karanlık oda gerektirmezler(85).

Ayrıca LED-FM'in olası engelleri floresan mikroskopisine atina olmayan personelin eğitimi ve stabil olmayan fluorokrom boyanın kaybolmasıdır(85). LED-FM, EZN'ye alternatif olarak kullanılabilir(85).

6. SONUÇLAR

Çalı mamız genel olarak de erlendirildi inde ;

1. Preperatların boyanması ve incelenmesi için gereken süre Auramin-O boyama yöntemi ile daha kısa bulunmu tur.
2. Auramin-O boyama yönteminin yanlı pozitiflik oranının yüksek oldu u, EZN boyama yönteminin ise yanlı negatiflik oranının yüksek oldu u bulunmu tur.
3. EZN boyama yönteminin, Auramin-O boyama yöntemine göre daha spesifik oldu u ancak Auramin-O boyama yönteminin, EZN boyama yöntemine göre daha sensitiv oldu u belirlenmi tir.
4. 758 klinik örnekte yapılan de erlendirmeye göre kültürde üreme oranı %13.4 (102/758) olarak bulunmu tur.
5. 758 klinik örnekle yapılan çalı mada BACTEC MGIT sıvı besiyeri kültür sisteminin Löwenstein-Jensen katı besiyerine göre daha fazla pozitiflik saptadı ı belirlenmi tir.

7.KAYNAKLAR

1. Kıyan M. Mycobacteriaceae. Ustaçelebi , ed. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güne Kitabevi, 1999 : 419-437.
2. Saniç A, Çoban AY. Mikobakteriler ve Laboratuvar Tanı. Samsun, 1999 : 1-2.
3. Murray P R, Baron E J, Jorgensen J H , Landry M L,. Pfaller M A (eds), [Baustao lu A (çev. editörü)]. Klinik Mikrobiyoloji (Manual of Clinical Microbiology). 2009, Cilt 1,36, [543-601].
4. Cuevas LE, Al-Sonboli N, Lawson L, Yassin MA, Arbide I, et al.(2011) LED Fluorescence Microscopy for the diagnosis of Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: A Multi-Country Cross-Sectional Evaluation. PLoSMed8(7): e1001057.doi: 10.1371/journal.pmed.1001057
5. Thomas Dormandy. A History of Tuberculosis. The White DeathThe Hambleton Press 1999 London.
6. Daniel im. TM Captain of the Death.The story of tuberculosis.University of Rochester.Press Rochester,New York 1997.
7. Eraksoy H. Tüberküloz, Geçmi ten Günümüze. nfeksiyon Bülteni 1996; 1(1) : 38-40.

8. Kılıçaslan Z (2007). Dünyada ve Türkiye’ de Tüberküloz. ANKEM Derg, 21(Ek2), 76-80.
9. Global tuberculosis control: WHO report 2011. Geneva, World Health Organization, 2011 (WHO/HTM/TB/2011.16).
10. Gümü lü F, Ceyhan , Kocagöz T, Sönmez N. Tüberküloz Laboratuvar Rehberi. Ankara: T.C Sağlık Bakanlığı , 1998 : 1-20.
11. Pfyffer GE, Brown-Elliott BA; Wallace RJ, Vincent V, Jost KC. Mycobacterium. çinde Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RC, editör. Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. ASM Press, Washington. 2003; 532-585.
12. Winn WC, Allen SD , Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods HL, editör. Mycobacteria. Koneman’s Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6 th ed. Lippincott Company, Philadelphia. 2006: 1065-1126.
13. Hall GS ve Howard BJ. Mycobacteria. çinde Keiser JF, Smith TF, Weissfeld AS, Tilton RC, editör. Clinical and Pathogenic Microbiology. 2 nd ed. St. Louis. 1994; 503-529.
14. Kocaba A. Akci er tüberkülozu. çinde Willke Topçu A, Söyletir G, Do anay M, editör. nfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Cilt 1. 2002; 538-591.
15. Babacan F, Över U. Mikobakterilerin genel özellikleri ve Mycobacterium tuberculosis complex. Rota S. Tüberküloz dı ı mikobakteriler ve Mycobacterium leprae. çinde Willke Topçu A, Söyletir G, Do anay M, editör. nfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Cilt 2. 2002; 1675-1698.
16. Mandell GL, Bennett JE, and Dolin R, editör. Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. Churchill Livingstone, an imprint of elsevier 2005: 2852-2886.
17. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, editör. Mycobacteria. Bailey&Scott’s Diagnostic Microbiyology. 12th ed. St. Louis, Mosby, 2007; 478-510.
18. Maza LM, Pezzlo MT, Shigei JT ve Peterson EM. Color atlas of medical bacteriology. ASM Press, Washington, DC. 2004; 64-83.

19. <http://www.scielo.br/img/revistas/mioc/v101n7/v101n7a01f01.gif> Eri mi tarihi: 01.10.2007.
20. Uzun M, Erturan Z ve An O (2000). Mycobacterium tuberculosis kompleksi su larının erken tanısında kord olu umunun de eri. Klimik Derg, 13(1), 27-29.
21. Ya cı A. ESAT-6/CFP-10 Bazlı Elipsot Tekni inin Tüberküloz Tanısındaki Yeri, IV. Tüberküloz Sempozyumu 08.12.2005 Malatya Sempozyum Kitabı S:91-97.
22. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Mycobacteria. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1997: 703.
23. Uzun O, Ünal S, editör. Güncel Bilgiler I ı nda nfeksiyon Hastalıkları II. Bilimsel tıp yayınevi, Ankara. 2002; 821-903.
24. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Fakülteler Kitabevi Barı Yayınları, zmir. 3.Baskı, 2002; 571-595.
25. Cengiz AT. Mycobacteriaceae. çinde Ustaçelebi , editör. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güne Kitabevi; Ankara. 1999: 419-455.
26. Korkmaz G, Balcı , Bayram A, Karlıgil T. Mycobacterium tuberculosis kompleks kökenlerinin birinci seçenek antitüberküloz ilaçlara duyarlılı mın saptanmasında BACTEC ve agar proporsiyon yöntemlerinin kar ıla tırılması. nfeksiyon Derg 2006; 20: 7-14.
27. Della-Latta P. Mycobacteriology and antimycobacterial susceptibility testing. çinde Isenberg HD, editör. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. ASM Press, Washington, DC. 2004; section 7.
28. Kahkola PK, Paulin L, Brander E, Jantzen E, Eho-Remes M, Katila ML. Characterisation of a new isolate of Mycobacterium shimoidei from Finland. J Med Microbiol 2000; 49: 937-940.
29. Haas WH, Butler WR, Kirschner P, Plikaytis BB, Coyle MB, Amthor B ve ark. A new agent of mycobacterial lymphadenitis in children: Mycobacterium heidelbergense. Journal of Clinical Microbiology 1997; 35: 3203-3209.
30. Springer B, Tortoli E, Richter I, Grünwald R, Rüsç-Gerdes S, Uschmann K ve ark. Mycobacterium conspicuum, a new species isolated from patients

- with disseminated infections. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; 33: 2805-2811.
31. Lavy A, Yoshpe-Purer Y. Isolation of *Mycobacterium simiae* from clinical specimens in Israel. *Tubercle* 1982; 63: 279-285.
 32. Meier A, Kirschner P, Schröder KH, Wolters J, Kroppenstedt RM, Böttger EC. *Mycobacterium intermedium*. *Int J Syst Bacteriol* 1993; 43: 204-209.
 33. Floyd MM, Guthertz LS, Silcox VA, Duffey PS, Jang Y, Desmond EP ve ark. Characterization of an SAV organism and proposal of *Mycobacterium triplex*. *Journal of Clinical Microbiology* 1996; 34: 2963-2967.
 34. Silcox VA, Good RC, Floyd MM. Identification of clinically significant *Mycobacterium fortuitum* complex isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 1981; 14: 686-691.
 35. Steele LC, Wallace RC. Ability of ciprofloxacin but not pipemidic acid to differentiate all three biovariants of *Mycobacterium fortuitum* from *Mycobacterium chelonae*. *Journal of Clinical Microbiology* 1987; 25: 456-457.
 36. Yaman M (1999). Eri kin ve Çocukta Tüberküloz Sempozyumu. .Ü. Cerrahpa a Tıp Fakültesi Sürekli Tıp E itimi Etkinlikleri. Nisan 1999. stanbul, 15-20.
 37. Özbal Y (2006). Tüberküloz immünolojisi. *Erciyes Tıp Derg*, 28 (1), 025-034.
 38. Güzel A (2005). Tüberkülozla ili kili tartı kaybında leptin, insülin, c-reaktif protein, ve lipid profilinin yeri. Sa lık Bakanlığı 1 Yedikule Gö us Hasalıkları ve Gö üs Cerrahisi Anabilim Dalı. Uzmanlık tezi. stanbul.
 39. Ye en A (2004). Aktif akci er tüberkülozu ve sekel akci er tüberkülozu ayırımında neopterinin yeri. Sa lık Bakanlığı 1 Yedikule Gö üs Hasalıkları ve Gö üs Cerrahisi Anabilim Dalı. stanbul. Uzmanlık tezi. stanbul.
 40. Özkütük, N. Mikobakteriler. In: M. Altındı (ed), *Hem ireler için Mikrobiyoloji*, stanbul, Nobel Tıp Kitapevleri; 2010: 217-228.
 41. Yüce A, ener A. Akci er tüberkülozu. Willke. Topçu A, Söyletir G, Do anay M (editörler). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 3. baskı. stanbul: Nobel kitapevleri; 2008: 832-850.

42. Woods GL. Susceptibility Testing for Mycobacteria. Clin Infect Dis. 2000; 31: 1209-15.
43. Klimik Derne i Tüberküloz Çalı ma Grubu. VI.Tüberküloz Sempozyumu/ IX.Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kursu Kitabı. zmir/Manisa. 2011.
44. Klimik Derne i Tüberküloz Çalı ma Grubu. 21. yy da tüberküloz Sempozyumu/ II.Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu Kitabı. Samsun. 2003.
45. Isenberg HD (ed). Clinical Microbiology Procedures Handbook. Newyork. Second edition. Washington,D.C. ASM; 2004.
46. Özkara , Kılıçaslan Z (editörler). Tüberküloz. stanbul, Toraks Kitapları 2010: 48-61.
47. Washington WJ. Stephen A, William J, at all. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6.ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2006; 1065-1124.
48. Babacan F, Hasdemir U. Mycobacterium tuberculosis kompleks. Willke Topçu A, Söyletir G, Do anay M (editörler). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3. baskı. stanbul:Nobel kitapevleri; 2008: 2283-302.
49. Kocagöz T. Mycobacterium türlerinin genel özellikleri. Willke Topçu A, Söyletir G, Do anay M (editörler). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3. baskı. stanbul:Nobel kitapevleri; 2008: 2277-283.
50. Forbes B A, Sham D F, Weissfeld A S (eds). Bailey Scott's Diagnostic Micribiology. 11th edition. St. Louis, Missouri: Mosby Inc., 2002; 538-571.
51. Baylan O. Tüberkülozun kültüre dayalı tanı yöntemleri Mikrobiyol Bul. 2005;39:107-124.
52. CLSI. Laboratory Detection and Identification of Mycobacteria; Approved Guideline. CLSI document M48-A, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
53. Siddiqi SH. BACTEC 460TB System Product and Procedure Manual. Becton Dickinson and Company Maryland,USA, 1996.
54. BACTEC MGIT 960 System, User's Manuel. Becton Dickinson. Sparks, Maryland, USA 2004.

55. Martin A, Bombeeck D, Fissette K, et al. Evaluation of the BD MGIT TBc Identification Test (TBc ID), a rapid chromatographic immunoassay for the detection of Mycobacterium tuberculosis complex from liquid culture. *Journal of Microbiological Methods*. 2011; 84: 255–257.
56. BD MGIT TBc Identification Test, User's Manuel. BD and Company, Sparks, Maryland, USA 2009.
57. CLSI, Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standart. CLSI document M24-A, Pennsylvania, 2003.
58. WHO. Guidelines for drug susceptibility testing for secondline antituberculosis drugs for DOTS-PLUS. WHO/CDS/ TB/2001. 288; World Healty Organization,2001.
59. Sıddıqı SH. Bactec TB System, Product and Procedure Manual. Becton Dickinson, 1989.
60. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı: Mycobacteriumlar. 2. Baskı. zmir: Barı Yayınları, 1995:567-584.
61. Çakır B (2005). Tıbbi ara tırma teknikleri: temel özellikler, yarar ve kısıtlılılar, olası hata kaynakları. <http://www.toraks.org.tr/kisokulu3-ppt-pdf/>
62. Dirican A (2001). Evaluation of the diagnostic test's performance and their comparisons. *Cerrahpa a J Med*, 32 (1), 25-30.
63. Alp A (2005). Tüberküloz Laboratuvarında Standardizasyon. IV. Tüberküloz laboratuvar tanı yöntemleri uygulamalı kursu. 9-11 Aralık 2005. Malatya, 65-74.
64. Tarhan G, Ordulu L, Gümu lü F, Ceyhan I ve Cesur S (2003). Comparison of auramin rhodamine and Erlich-Ziehl-Neelsen staining methods fort he diagnosis of tuberculosis. *Mikrobiyol Bul*, 37(2-3), 131-136.
65. Yıldırın ST, Özyurt M, Saraçlı MA ve Gün H (1998). Yedi yıllık bir dönemde mikobakteriyolojik örneklere ait smear ve kültür sonuçlarının de erlendirilmesi. *nfeksiyon Derg*, 12(2), 151-155.
66. Uzun M ve Kasımo lu O (1997). Tüberküloz tanısında Erlich-Ziehl-Neelsen ve Flokrom boyama yöntemlerinin Bactec ve Löwenstein-Jensen kültür yöntemlerinin sonuçlarının de erlendirilmesi. *Klimik Derg*, 10(1), 36-40.

67. Özekinci T (2000). Tüberküloz Tanısında Erlich-Ziehl-Neelsen, flokrom boyama yöntemleri ile Bactec ve Löwenstein-Jensen kültür yöntemlerinin sonuçlarının değerlendirilmesi. Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi. Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Uzmanlık tezi.
68. Demirel M (2010). Tüberküloz Tanısında Ehrlich-Ziehl-Neelsen ve Auramine-Rhodamine Boyama Yöntemlerinin Karşılaştırılması. Yüzüncü Yıl Üniversitesi. Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi.
69. Durupınar B, Birinci A, Günaydın M ve Saniç A (1997). Tüberküloz tanısında Auramine-Rhodamine boyama yönteminin güvenilirliği. Mikrobiyol Bül, 31, 369-374.
70. Githui W, Kitui F, Juma ES, Obwana DO, Mwai J and Kwamanga D (1993). A comparative study on the reliability of the fluorescence microscopy and Ziehl-Neelsen method in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. East Afr Med, 70 (5), 263-6.
71. Ndugga LEAK, Cleeff van MRA, Githui WA, Nganga LW, Kibuga DK, Odhiambo JA and Klatser PR (2003). A comprehensive comparison of Ziehl-Neelsen and Fluorescence microscopy for the diagnosis of tuberculosis in a resource-poor urban setting. Int Tuberc Lung Dis, 7(12), 1163-1171.
72. Albert H, Manabe Y, Lukyamuzi G, Ademun P, Mukkada S, et al. Performance of three LED-based fluorescence microscopy systems for detection of tuberculosis in Uganda. PLoS ONE. 2010;5:e15206.
73. Minion J, Pai M, Ramsay A, et al. Comparison of LED and Conventional Fluorescence Microscopy for Detection of Acid Fast Bacilli in a Low-Incidence Setting. PLoS ONE. 2011; 6(7): e22495.
74. Bonnet M, Gagnidze L, Githui W, et al. Performance of LEDbased fluorescence microscopy to diagnose tuberculosis in a peripheral health centre in Nairobi. PLoS ONE 2011; 6: e17214.
75. Lehman LG, Ngapmen Yamadji AL, Ngo Sack F, Bilong Bilong CF. The CyScope(R) fluorescence microscope, a reliable tool for tuberculosis diagnosis in resource-limited settings. Am J Trop Med Hyg. 2010;83:906–908.

76. Shenai S, Minion J, Vadwai V, Tipnis T, Shetty S, et al. Evaluation of light emitting diode-based fluorescence microscopy for the detection of mycobacteria in a tuberculosis-endemic region. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2011;15:483–488.
77. K. E. Verweij, A. R. Kamerik, J. van Ingen, et al. Application of modern microbiological diagnostic method for tuberculosis in Macha, Zambia. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2010;14(9):1127–1131.
78. Trusov A, Bumgarner R, Valijev R, Chestnova R, Talevski S, et al. Comparison of Lumin LED fluorescent attachment, fluorescent microscopy and Ziehl-Neelsen for AFB diagnosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2009;13:836–841.
79. H. Xia, Y-Y. Song, B. Zhao, K-M. Kam, et al. Multicentre evaluation of Ziehl-Neelsen and light-emitting diode fluorescence microscopy in China. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2013; 17(1):107–112.
80. Marais BJ, Brittle W, Painczyk K, Hesselning AC, Beyers N, et al. Use of light-emitting diode fluorescence microscopy to detect acid-fast bacilli in sputum. *Clin Infect Dis.* 2008;47:203–207.
81. Das D, Selvakumar N. Can LED fluorescence microscopy replace Ziehl-Neelsen microscopy in tuberculosis detection? *Int J Tuberc Lung Dis.* 2012; 16(5):1558–1562.
82. World Health Organization. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2010. *Global Tuberculosis Control.*
83. Ramsay A, Cuevas LE, Mundy CJ, Nathanson CM, Chirambo P, et al. New policies, new technologies: modelling the potential for improved smear microscopy services in Malawi. *PLoS ONE.* 2009;4:e7760. doi: 10.1371/journal.pone.0007760.
84. Hanscheid T. The future looks bright: low-cost fluorescent microscopes for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Coccidia*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008;102:520–521.
85. World Health Organization. Fluorescent light emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis: policy statement. 2010.

