

*Mycobacterium tuberculosis* KOMPLEKS İZOLATLARININ BİRİNCİ  
SEÇENEK ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA DUYARLILIĞININ SAPTANMASINDA  
BACTEC VE AGAR PROPORSİYON YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

TIP FAKÜLTESİ  
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ

GÜLHAN KORKMAZ  
Şubat 2004

## ÖZ

### ***Mycobacterium tuberculosis* KOMPLEKS İZOLATLARININ BİRİNCİ SEÇENEK ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA DUYARLILIĞININ SAPTANMASINDA BACTEC VE AGAR PROPORSİYON YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

KORKMAZ Gülhan

Uzmanlık Tezi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İclal Balcı

Şubat 2004, 72 sayfa

Bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden Bactec yöntemi ile soyutlanan 104 adet *Mycobacterium tuberculosis* kompleks kökeninin ilk dört seçenek antitüberküloz ilaca (izoniazid, rifampisin, etambutol, streptomisin) karşı duyarlılıkları Bactec yöntemi ve agar proporsiyon yöntemi ile karşılaştırmalı olarak incelendi.

Yüz dört klinik örnekten yapılan aside dirençli basil araştırması sonucunda %36.54 oranında pozitiflik saptanmıştır.

Bactec yöntemi ile, toplam 59 kökenin (%56.73) en az bir ilaca dirençli olduğu, 26 kökenin (%25) izoniazide, 11 kökenin (%10.58) rifampisine, 19 kökenin (%18.27) etambutole, 3 kökenin (%2.89) streptomisine dirençli olduğu saptandı. Toplam 6 kökenin (%5.76) iki ilaca, 4 kökenin (%3.84) üç ilaca dirençli olduğu saptandı.

Agar proporsiyon yöntemi ile toplam 66 kökenin (%63.46) en az bir ilaca dirençli olduğu, 25 kökenin (%24.04) izoniazide, 11 kökenin (%10.58) rifampisine, 27 kökenin (%25.96) etambutole, 3 kökenin (%2.89) streptomisine dirençli olduğu saptandı. Toplam 7 kökenin (%6.72) iki ilaca, 5 kökenin (%4.81) üç ilaca dirençli olduğu saptanmıştır. Her iki yöntemde de dört ilaca birden dirençli kökene rastlanmamıştır.

İki yöntem izoniazid için karşılaştırıldığında, uyum %99 olarak saptandı. Kappa değeri 0.974 ( $P < 0.0001$ ), sensitivite %100, spesitivite %98.7 olarak saptandı.

İki yöntem rifampisin için karşılaştırıldığında, yöntemler arası genel uyum %100 olarak saptandı. Kappa değeri 1.00 ( $P<0.0001$ ), sensitivite %100, spesitivite %100 olarak bulundu.

İki yöntem etambutol için karşılaştırıldığında, yöntemler arası genel uyum %92.3 olarak saptandı. Kappa değeri 0.779 ( $P<0.0001$ ). sensitivite: %70.4, spesitivite: %100 olarak saptandı.

İki yöntem streptomisin için karşılaştırıldığında, yöntemler arası genel uyum %100 olarak saptandı. Kappa değeri 1.00 ( $P<0.0001$ ). Sensitivite: %100, Spesitivite: %100 olarak saptandı.

Anahtar kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis*, Bactec yöntemi, agar proporsiyon yöntemi, izoniazid, rifampisin, etambutol, streptomisin

**COMPARISON OF THE BACTEC AND AGAR PROPORTION  
METHODS IN ANTITUBERCULOSIS DRUG SUSCEPTIBILITY  
TESTING OF *Mycobacterium tuberculosis* COMPLEX STRAINS**

KORKMAZ Gülhan

Residency thesis, Department in Microbiology and Clinical Microbiology

Supervisor: Prof. Dr. İclal Balcı

February 2004, 72 pages

**ABSTRACT**

In this study, susceptibilities of 104 *Mycobacterium tuberculosis* complex strains isolated from various clinical specimens with Bactec method were determined comparatively with Bactec and agar proportion methods to four major antituberculous drugs (isoniazid, rifampicin, ethambutol, streptomycin).

The positivity of acido-resistant bacilli among 104 concentrated clinical specimens was 36.54%. With the Bactec method, 59 (56.73%) of 104 strains were resistant to at least one drug; being 26 (25%) of them resistant to isoniazid, 11 (10.58%) to rifampicin, 19 (18.27%) to ethambutol and 3 (2.89%) to streptomycin. Six (5.76%) strains were resistant to two and four (3.84%) strains were resistant to three drugs.

With agar proportion method, 66 (63.46%) of 104 strains were resistant to at least one drug; being 25 (24.04%) of them resistant to isoniazid, 11 (10.58%) to rifampicin, 27 (25.96%) to ethambutol and 3 (2.89%) to streptomycin. Seven (6.72%) strains were resistant to two and five (4.81%) strains were resistant to three drugs. There were no strain resistant to all of the four drugs with both methods.

The overall agreement between the results obtained by the two methods was 97.8% (isoniazid 99%, rifampicin 100%, ethambutol 92.3% and streptomycin 100%).

The Kappa values were as follows: isoniazid 1.00, rifampicin 1.00, ethambutol 0.779, streptomycin 1.00 ( $P < 0.0001$ ). For isoniazid the sensitivity and specificity were 100% and 98.7%, respectively. For rifampicin and streptomycin both sensitivity and specificity were 100%. For ethambutol the sensitivity was 70.4% and the specificity was 100%.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, Bactec method, agar proportion method, isoniazid, rifampicin, ethambutol, streptomycin

## ÖNSÖZ

Asistanlığım süresince en iyi şekilde yetişmemde emeği geçen hocalarım, Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. İclal BALCI, Yrd. Doç. Dr. Tekin KARSLIĞIL, Yrd. Doç. Dr. Ayşen BAYRAM'a, tezimin hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Birgül ÖZÇIRPICI'ya ve katkılarını esirgemeyen mesai arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Gülhan KORKMAZ

## KISALTMALAR

ADA	:Adenozin Deaminaz
AMS	:Açlık Mide Suyu
ARB	:Aside Dirençli Basil
ATP	:Adenozin Trifosfat
BAL	:Bronkoalveolar Lavaj
BCG	:Bacillus Calmette Guerin
BOS	:Beyin Omurilik Sıvısı
CDC	:Centers for Disease Control and Prevention
DF	:Dilüsyon Sıvısı
DGTS	:Doğrudan Gözetimli Tedavi stratejisi
DSÖ	:Dünya Sağlık Örgütü
EMB	:Etambutol
EZN	:Erich-Ziehl-Neelsen boyama yöntemi
FDA	:Fluoresein Diasetat
GAD	:Gecikmiş tip aşırı duyarlılık
Bİ	:Büyüme İndeksi
HI	:Hücrel immünite
INH	:İzoniazid
LAM	:Lipoarabinomannan
L-J	:Löwenstein Jensen
LM	:Lipomannan
MDR-tb	:Multidrug Resistant Tuberculosis
MGIT	:Mycobacterium Growth Indicator Tube
MOTT	:Mycobacteria Other Than Tuberculosis
MİK	:Minimal İnhibitor Konsantrasyon
MTB	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NAP	:P-nitro-alfa-asetil-amino-beta-hidroksipropionat

- NCCLS :The National Committe for Clinical Laboratory Standart
- OADC :Oleik asit, Albumin, Dekstroz, Katalaz
- PANTA :Polimiksin B, Azlosilin, Nalidiksik asit, Trimetoprim ve Amfoterisin-B
- PZR :Polimeraz Zincir Reaksiyonu
- PPD :Purifiye Protein Türevleri
- RFLP :Restriction Fragment Length Polymorphism
- RIF :Rifampisin
- SSCP :Single-Stranded Conformation Polymorphism
- SSKH :Sosyal Sigortalar Kurumu Hastaneleri
- STM :Streptomisin
- TB kompleks:*Mycobacterium tuberculosis* kompleks



## TABLO LİSTESİ

	SAYFA
Tablo 1: M. tuberculosis dışındaki mikobakteriler.....	10
Tablo 2: Agar proporsiyon direkt test yönteminde örneğin inokülasyon dilüsyonu.....	21
Tablo 3: Birinci seçenek antitüberküloz ilaçların farklı besiyerlerindeki eşdeğer son ilaç konsantrasyonları.....	22
Tablo 4: Duyarlılık testine alınan primer ilaçlar ve son konsantrasyonları....	31
Tablo 5: Bactec yöntemi ilaç duyarlılık test sonuçlarından örnekler.....	33
Tablo 6: Middlebrook 7H10 besiyerine eklenmek üzere hazırlanan birinci seçenek dört antitüberküloz ilacın dilüsyonları, besiyerine eklenen miktarları ve besiyeri içindeki son konsantrasyonları.....	37
Tablo 7: Agar proporsiyon yönteminde inokülasyon için konsantre edilen bakterilerin dilüsyonları ve inokülasyon miktarı.....	38
Tablo 8: Örneklerin gönderildiği kliniklere göre dağılımı.....	42
Tablo 9: Örneklerin türlere göre dağılımı.....	43
Tablo 10: Örneklerin ARB sonuçları.....	43
Tablo 11: Agar proporsiyon yönteminde saptanan dört antitüberküloz ilacın duyarlı ve dirençli kökenlere etkinliği.....	44
Tablo 12: Bactec yönteminde saptanan dört antitüberküloz ilacın duyarlı ve dirençli kökenlere etkinliği.....	44
Tablo 13: Agar proporsiyon yönteminde saptanan çoklu direnç gösteren kökenlerin ilaç kombinasyonlarına göre dağılımı.....	45
Tablo 14: Bactec yönteminde saptanan çoklu direnç gösteren kökenlerin ilaç kombinasyonlarına göre dağılımı.....	45
Tablo 15: İlaç duyarlılık sonuçlarının karşılaştırılması.....	46
Tablo 16: İzoniazidin Bactec ve agar proporsiyon yöntemlerinde kökenler üzerindeki etkinliği.....	47
Tablo 17: Rifampisin Bactec ve agar proporsiyon yöntemlerinde kökenler üzerindeki etkinliği.....	47
Tablo 18: Etambutolun Bactec ve agar proporsiyon yöntemlerinde kökenler üzerindeki etkinliği.....	48
Tablo 19: Streptomisin Bactec ve agar proporsiyon yöntemlerinde kökenler üzerindeki etkinliği.....	48
Tablo 20: Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda saptanan birinci seçenek ilaçların direnç durumu.....	50

Tablo 21: Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Bactec yöntemi ile saptanan birinci seçenek ilaçların direnç durumu.....	51
Tablo 22: Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Bactec yöntemi ile saptanan çoklu ilaç direnç durumu.....	51

## ŞEKİL LİSTESİ

	SAYFA
Şekil 1: Mikobakterilerin hücre duvarı.....	11

## RESİM LİSTESİ

Resim 1: Agar proporsiyon yönteminde kontrol besiyerinde üreyen kolonilerin görünümü.....	49
Resim 2: Agar proporsiyon yönteminde ilaçlı besiyerinde üreyen kolonilerin görünümü.....	49

## İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ.....	v
KISALTMALAR.....	vi
TABLO LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ.....	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. TÜBERKÜLOZUN TARİHÇESİ.....	3
2.2. DÜNYADA DURUM.....	4
2.3. TÜRKİYE'DE DURUM .....	4
2.4. EPİDEMİYOLOJİK MODELLER.....	5
2.5. BULAŞMA.....	6
2.6. PATOGENEZ.....	7
2.7. MİKOBAKTERİLERİN MİKROBİYOLOJİSİ.....	8
2.7.1. TAKSONOMİ.....	8
2.7.2. MORFOLOJİ.....	10
2.7.3. İNCE YAPI.....	10
2.8. TANI.....	12
2.8.1. MİKOBAKTERİLERİN BOYANMASI.....	13
2.8.2. KLİNİK ÖRNEKLERİN İŞLENMESİ.....	14
2.8.3. MİKOBAKTERİLERİN ÜRETİLMESİNDE KULLANILAN BESİYERLERİ.....	15
2.8.4. HIZLI TANI YÖNTEMLERİ.....	16
2.9. TEDAVİ VE ANTİTÜBERKÜLOZ DUYARLILIK DENEYLERİ.....	18
2.9.1. ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA DİRENÇ MEKANİZMALARI.....	19
2.9.2. ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA KARŞI DUYARLILIK TESTLERİNİN AMACI.....	20

2.9.3. KLASİK ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TEST YÖNTEMLERİ.....	20
2.9.4. HIZLI ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ.....	22
2.9.5. İLAÇ DUYARLILIK TESTLERİNİN GELİŞTİRİLMESİNDE BAZ ALINAN KRİTERLER.....	27
3. MATERYAL VE METOD.....	28
4. BULGULAR.....	42
5. TARTIŞMA.....	52
6. SONUÇLAR .....	64
7. KAYNAKLAR.....	66

## GİRİŞ VE AMAÇ

İnsanoğlunun en eski hastalıklarından olan tüberküloz, *Mycobacterium tuberculosis* kompleks olarak tanımlanan bir grup mikobakteri (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* ve *M. microti*) tarafından oluşturulan, çok değişik klinik görünümlere sahip, kronik nekrotizan bakteriyel infeksiyondur. Hastalığın önde gelen etkeni *M. tuberculosis*'dir (MTB). Hastalık tüm organları tutabilir, ancak ilk yerleştiği organ (%85) akciğerler olup diğer organlar sekonder olarak tutulur (1).

Bugün dünya nüfusunun %32'sinin tüberküloz basili ile infekte olduğu, her yıl yaklaşık 8 milyon kişinin tüberküloz hastalığına yakalandığı ve yaklaşık 2 milyon insanın öldüğü bilinmektedir (2). Gelişmiş ve gelişmekte olan tüm ülkeleri ilgilendiren en önemli infeksiyon hastalıklarından biri olmasına rağmen infekte kişilerin büyük çoğunluğu gelişmekte olan ülkelerde bulunmaktadır (2,3).

Önlem alınmazsa 2004'de yıllık ölüm rakamları yılda 4 milyonu aşacaktır (4). Son yıllarda, tüm dünyada, özellikle HIV pozitif ve bağışıklığı baskılanmış diğer hastaların artışına bağlı olarak tüberküloz olgu sayısında da artışlar olmuştur (1-4). Tüberküloz insidansının artmasıyla birlikte, ikinci sorun olarak çoklu dirençli tüberküloz (MDR-tb) ortaya çıkmıştır (5).

Çok ilaca dirençli kökenlerle oluşan tüberküloz olgularının artması, hatta bunların hastane salgınlarına neden olması, tüberküloz tanısında duyarlı ve hızlı yöntemlere olduğu gibi, mikobakterilerin tür ve direnç tayininde de daha hızlı ve güvenli sonuçlar veren testlere duyulan gereksinimi arttırmıştır (4).

Nitekim Centers for Disease Control and Prevention (CDC) materyal laboratuvara kabul edildikten sonra ortalama 28-30 günde *Mycobacterium tuberculosis* kompleks için duyarlılık testlerinin sonuçlanmasını önermektedir (6).

Tüberküloz sağaltımında başarı özellikle iki kuralın yerine getirilmesi ile olasıdır. Bu kurallardan ilki, tüm hastalardan elde edilen ilk örneklerden antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması, ikincisi ise hastalık etkeni olan MTB'in spontan mutasyonlar sonucu ortaya çıkan ilaca dirençli kökenlerinin oluşmasını önlemek amacı ile sağaltımda mutlaka en az iki ilacın birlikte kullanma zorunluluğudur (5). Sağaltımda kullanılacak uygun ilaç kombinasyonlarının seçimi için standardize edilmiş, hızlı

sonuç verebilen, doğru yorumlama kriterlerine sahip *invitro* duyarlılık yöntemlerine gereksinim vardır. Bu amaçla bütün dünyada yaygın olarak kullanılan iki yöntem şunlardır (7);

1. Proporsiyon yöntemi, (Middlebrook veya Löwenstein Jensen (L-J) besiyeri kullanılarak yapılır). The National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS)'in altın standart olarak kabul ettiği yöntemdir (7).

2. Bactec 460 TB sisteminin kullanıldığı modifiye proporsiyon yöntemidir.

Biz de laboratuvarımızda *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (TB kompleks) izolatlarının identifikasyon ve antibiyotik duyarlılığını saptamakta kullandığımız Bactec 460 TB sistemini antibiyotik duyarlılığını, sistemin hızı, uygulama kolaylığı, iş yükü ve güvenilirliği yönünden altın standart olarak kabul edilen 7H10 agar proporsiyon yöntemi ile karşılaştırmayı amaçladık.

## GENEL BİLGİLER

### 2.1. TÜBERKÜLOZUN TARİHÇESİ:

Yaşı yaklaşık 300 milyon yıl olan tüberkülozun Kuzey Afrika'da ilk insan topluluklarında sığır türü olan *M. bovis* ile verem hastalığına neden olduğu bilinmektedir. İlk insan infeksiyonlarının çoğunlukla infekte et yenilmesi ve kontamine süt içilmesi ile oluştuğu bilinmektedir (8). Ayrıca, bazı neolitik ve erken dönem Mısır buluntularında, insan iskeletlerinde ve duvar resimlerindeki insan figürlerinde, Spinal Pott hastalığının yol açtığı deformiteleri andıran değişikliklerin olması ve aside dirençli basillere (ARB) rastlanması ilk çağlarda var olduğuna yönelik önemli göstergelerdir (8,9). Değişik zamanlarda dünyada epidemiler görülmektedir. M.Ö 1500-750 yılları arasında Nil Vadisinde, M.Ö 1500-50 yıllarında Eski Yunan'da, M.Ö 1500-250 yıllarında Amerika'da, 1000-200 arasında da Avrupa'da epidemiler yapmıştır (9). M.O 466-377 yılları arasında yaşayan Hipokrat ve o dönemdeki Yunanlılar, hastaların giderek zayıfladığını görerek hastalığa "phthisis" adını vermişlerdir. 16. yüzyılın sonunda Sylvius, "tüberkül" kelimesini kullanmış ve phthisis'in tüberküllerin erimesi sonucu oluştuğunu savunmuştur. "Tuberculosis" kelimesi 1934'te hastalığın tanısının sadece semptomlara ve patolojik bulgulara dayandığı dönemde kullanılmıştır (9). Tüberküloz üzerine ilk çalışmalar 1781-1826 yılları arasında yaşamış Laennec tarafından yapılmıştır (8).

Robert Koch 1882 yılında bakteriyi mikroskopta göstermiş, 1884'de klinik örneklerde izole ettikten sonra saf kültürünü yapmış, deneysel olarak hayvanlarda hastalık oluşturmuştur. Bütün bu gelişmeleri, Koch'un 1890'da old tüberkülin ile hastalığın özel immünite ve allerjisini ortaya koyması, 1921 yılında Calmette ve Guerin'in tüberküloz aşısı Bacillus Calmette Guerin (BCG)'i geliştirmesi ve tüberküloza karşı etkin bir ilaç olan streptomisinin 1944 yılında Waksman tarafından keşfi izlemiştir (8,9).

1970'li yılların ortalarından itibaren tüberküloz tedavisi 18-24 aydan, 6-9 aya kadar azaltılmış, son 20 yılda da özellikle moleküler biyoloji ve genetik mühendisliği yöntemleri ile hastalığın immunopatogenezi aydınlatılmış, yeni tanı yöntemleri ve yeni etkili ilaçların gelişimi konusunda önemli ümit verici gelişmeler sağlanmıştır (9).



## 2.2. DÜNYADA DURUM:

Streptomisin ve aynı yüzyılın ikinci yarısında tedavide etkili yeni ilaçların bulunması ile sanayileşmiş ülkelerde tüberkülozun morbidite ve mortalitesinde önemli bir düşüş olmuştur. Ancak 21. yüzyılın başında hala tüm dünyanın en önemli sağlık problemlerinden biri olmaya devam etmektedir. Dünya nüfusunun %32'sini oluşturan yaklaşık 2 milyar kişinin tüberküloz basili ile infekte olduğu ve bunların büyük çoğunluğunun gelişmekte olan ülkelerde bulunduğu bildirilmiştir. Gelişmiş ülkelerde infekte bireylerin %80'i 50 yaş ve üzerinde yaş gruplarında iken, gelişmekte olan ülkelerde infekte bireylerin %77'si 50 yaş altındaki gruplardadır (9,10).

1993 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) dünyanın bir çok bölgesinde tüberkülozun kontrol dışında olduğunu ve önemli derecede ihmal edildiğini ortaya koyarak ve tüberküloz kontrolü konusunda acil durum ilan ederek Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisini (DGTS) başlatmıştır. Ancak tüberküloz insidansında kayda değer bir azalma olmamış, dirençli vaka sayısında artış olmuştur (2,9,10). Tüberküloz sorunu büyük oranda yetersiz kontrol, küresel programların uygulandığı Güneydoğu Asya, Sahra altı Afrika, Doğu Afrika, Doğu Avrupa ve tüberküloz ile HIV'in birlikte bulunduğu ülkelere kaynaklanmaktadır. HIV ile infeksiyon, tüberküloz prevalansının yüksek olduğu bölgelerden göç, sosyoekonomik koşulları kötü olan, alkol ve uyuşturucu kullanan insanların çoğalması tüberküloz hastalığındaki artışın nedenleri olarak sayılabilir (2,10-12).

Tüberküloz insidansının 1990'da yüzbinde 143 iken 2000 yılında yüzbinde 163 olacağı tahmin edilmekteydi (13). Nitekim dünyada her yıl 8 milyon insan bu hastalığa yakalanırken, 2 milyon kişi de bu hastalıktan dolayı ölmektedir. 1.7 milyar insanın oluşturduğu infeksiyon havuzuna, her yıl 100-200 milyon kişinin eklendiği tahmin edilmektedir (14).

## 2.3. TÜRKİYEDE DURUM:

Türkiye'de tüberküloz endemik bir hastalıktır. 50 yıldır uygulanan kontrol programının etkinliğini değerlendirmede karşılaşılan en büyük engel yeterli ve güvenilir verilerin bulunmamasıdır. DSÖ'nün 1999 raporunda yer alan bilgide: Türkiye'nin 1997 yılı nüfusu 62.774.000, yıl içinde tanı konan yeni tüberküloz hastalarının sayısı 20.778, insidansı yüzbinde 33,1'dir. Yine DSÖ'nün 2002 yılı raporuna göre Türkiye nüfusu 66.668.000 tanı konulan hasta sayısı 18.038, insidansı yüzbinde 27'dir. Bu rakamlar gerçeği yansıtmamaktadır. Nitekim Türkiye, DGTS

uygulanmayan bir ülke olarak listelenmekte ve tedavi sonucu veremeyen, yani değerlendirilemeyen bir ülke olarak kayıtlara geçmektedir (2).

BCG aşılarının çalışmalarından dolayı infeksiyon havuzunu saptamak zordur ancak yüksek olduğu tahmin edilmektedir. Sosyal Sigortalar Kurumu Hastaneleri (SSKH), üniversiteler ve devlet hastaneleri hastalığın tanısının konduğu ve tedavinin başlandığı yerlerdir. Hasta tedaviye Verem Savaş Dispanserleri'nin gözetiminde devam etmektedir. Ülkemizde tüberkülozlu hastaların tedaviye uyumu konusunda ciddi sorunlar yaşanmaktadır. Ülke çapında ilaç direncini gösterecek bir çalışma yapılmamıştır. Ancak 2001 yılında farklı yedi bölge bildirim yapılmıştır. Buna göre tek ilaca direnç %13.5 iki, üç ve dört ilaca direnç sırasıyla %3.26, 6.25, 2.89 olarak saptanmıştır (15). Yapılan çalışmalar sonucunda tüberkülozlu hastalar arasında primer direnç (%14-29.4) ve sekonder direnç ise (%37-66) oldukça yüksek düzeyde olduğu bildirilmiştir (1,2).

#### **2.4. EPİDEMİYOLOJİK MODELLER:**

MTB ile infekte olan insanların çok az bir kısmında klinik olarak hastalık gelişir. MTB'nin konakçısı ile beraber çok uzun süreli evrim dönemi yaşayabilmesi, basilin bu süre boyunca konakçı hücrelerinde latent kalarak canlılığını sürdürüp ilk infeksiyondan yıllar sonra, uygun şartlar olduğunda yeniden canlanabilme yeteneğine bağlıdır. Bunun sonucunda basil özellikle insan topluluklarında uzun süre varlığını koruyabilmekte ve toplumda eradikasyonunda başarısızlığa yol açmaktadır.

Tüberkülozun gerçekleşmesinde bazı faktörler rol oynar.

1. Bulaşıcı nitelikteki bir akciğer tüberkülozlu, yayma pozitif hasta ile karşılaşan, Purifiye Protein Türevleri (PPD) negatif temaslıların yaklaşık %30'unda tüberküloz infeksiyonu oluşur ve bu kişilerde klinik/radyolojik hiçbir belirti olmaksızın tüberkülin deri testi pozitifleşir, bu primer infeksiyondur.

2. Infekte kişilerin %5'inde infeksiyonu izleyen ilk 5 yıl içinde hastalık gelişerek, primer tüberküloz diye adlandırılan erken hastalık gelişebilir.

3. Primer infeksiyonu izleyen uzun bir döneminden sonra, en az 5 yıl sonra infekte kişilerin %5'inde vücutta latent kalmış basillerin endojen veya ekzojen herhangi bir nedenle yeniden aktive olmasına bağlı olarak sekonder tüberküloz diye adlandırılan geç hastalık gelişebilir (1,12,16-19).

Tüberkülozun primer infeksiyonu genellikle, ekzojen reinfeksiyon veya endojen reaktivasyon şeklinde gelişir. Ekzojen reinfeksiyon, başka bir infekte kişiden yeni bir

basilin alınmasıdır. Endojen reaktivasyon ise, kişide latent kalmış basillerin canlanarak infeksiyon kaynağı olmalarıdır. Doğumdan sonra herhangi bir zamanda MTB ile primer infeksiyon gerçekleşebilir. Primer infeksiyon, genellikle aktif pulmoner infeksiyonu olan bir kişinin öksürme, aksırma veya konuşma gibi bir eylem sırasında ortama yaymış olduğu basillerin inhalasyonu ile gerçekleşir. Bugünün gelişmiş toplumlarında primer infeksiyon ile tanışmadan yaşlanan bireyleri bulmak olası iken, gelişmekte olan topluluklarda erken çocukluk ve okul çağı dönemleri, primer infeksiyon odağının olduğu dönemlerdir. Primer infeksiyonu izleyen dönemde, %5-10 sıklıkta progressif primer hastalık gelişir. Çoğu insanda primer infeksiyona karşı etkin bir bağışık yanıt gelişerek basil çoğalması sınırlanır ve uzun süreli kısmi bir bağışıklık kazanılır. Yaş ilerledikçe, kazanılan bu bağışıklık giderek zayıflar, etkinliği azalır, ekzojen reinfeksiyon veya endojen reaktivasyona bağlı olarak tüberküloz gelişme riski ortaya çıkar (19).

Tüberküloz prevalansının yüksek olduğu toplumlarda, yetişkinlerdeki yeni infeksiyonların çoğu ekzojen reinfeksiyonlardır (19). Prevalansın düşük olduğu toplumlarda ise, endojen reaktivasyon daha sık görülür (19). Erişkin tüberkülozları kaynağı ne olursa olsun, %50 sıklıkta ARB olumlu seyrederek; yani balgam örneklerinde tüberküloz basili görülür. İnfeksiyonlar için başlıca kaynağı oluşturan bu olguların saptanması, izolasyonu ve tam olarak sağaltılması, tüberküloz basili yayılmasının kontrolünde önemlidir. ARB olumlu olan hastaların tanı konulduktan sonra %50'sinin 5 yıl içinde öldükleri, %30'nun kendi kendilerine iyileştikleri, %20'sinin ise hasta olarak yaşamlarına devam ettikleri bildirilmiştir (17,19,20).

## **2.5. BULAŞMA:**

MTB infeksiyonlarının hemen hepsi, kişiden kişiye basil taşıyan infekte damlacıkların inhalasyonu ile geçer. Tüberküloz, hava yolu ile geçen infeksiyonlarının klasik örneğidir. Diğer geçiş yolları da (GIS, Deri vb.) bildirilmiştir, fakat oldukça seyrek (1,18). Hemen hemen tüm örneklerde tüberküloz infeksiyonu, içinde canlı tüberküloz basili içeren ve havada asılı halde bulunan, yeterince küçük (1-5  $\mu$ m), içlerinde 1-3 canlı basil bulunduran, damlacıkların solunum yolu ile alınması ve bunların alveole yerleşmesi ile gerçekleşir (1,21). Bir hastanın bulaşıcı olabilmesi için basilin havaya verilmesi ve burada aerosollerde asılı kalması gerekir. O nedenle akciğer ve larinks tüberkülozlu hastalar bulaştırıcı olarak kabul edilirler (1).

Çok sayıda basil içeren daha büyük bir partiküle göre, tek bir basil içeren küçük bir damlacık çekirdeği (0.5-3  $\mu$ ) daha bulaştırıcıdır (1) çünkü, büyük partiküller infeksiyonun gerçekleştiği yer olan alveollere ulaşamazlar. Mikrondan daha büyük olanlar örneğin, 5-10  $\mu$  büyüklüğündekiler büyük hava yollarında tutulurlar. Mukosilier sistemle dışarıya atılırlar. 0.5  $\mu$ 'dan küçük partiküller ise ölçülemezler, hava akımı ile yer değiştirirler. Hava yolu dışındaki bulaşma biçimleri MTB için seyrek. *M. bovis* infeksiyonları, infekte inek sütünün içilmesi ile oluşabilirler. Ancak süt ve süt ürünlerinin pastörize edilerek kullanılmasının yaygınlaşması sonucunda bu bulaş yolu da giderek azalmıştır (1,22).

## 2.6. PATOGENEZ:

MTB'in önemli bir özelliği fakültatif ve hücre içi bir bakteri olmasıdır. Virülansını belirleyen başlıca özellik, monosit ve makrofajlar içinde üreyebilmesidir. Tüberkülozda en önemli bulaş yolu inhalasyondur. Bulaş sonrası infeksiyon oluşup oluşmaması veya hastalık meydana gelip gelmemesi konağın direnci ile bakteriyel virülansın arasındaki dengeye bağlıdır. Akciğer tüberkülozunun patogenezi beş aşamalı bir model ile anlatılabilir (1).

**1. Başlangıç Evresi:** MTB'nin alveole inhalasyonu ile başlar. Böylece alveolde fibrin, az sayıda polimorfonükleer lökosit ve makrofajdan oluşan inflamatuvar reaksiyon oluşur (21). Alveollere ulaşan herhangi bir partikül gibi, basil taşıyan damlacıklar da öncelikle bölgesel makrofajlar tarafından alınırlar. Bu makrofajlar nonspesifik aktivasyon halindedirler, herhangi bir bağışık yanıt olmaksızın infeksiyon partiküllerini yok edebilirler. Ancak, infeksiyöz partiküllerin sayısı çok fazla ve virülansları da yüksek olursa, makrofajlar parçalanabilirler. Bu aşamada, hava yoluna giren basiller makrofajlar tarafından alınıp yok edildiklerinde, konakçı organizması infekte olmamış, bağışık yanıt mekanizmaları da uyarılmamış olur. Eğer basilin çoğalmak için zamanı olursa, bu noktayı "önlenemeyen çoğalma fazı" izler. Bu evre birinci haftayı kapsar (1).

**2. Basillerin Logaritmik Çoğalma Evresi:** İkinci ve üçüncü haftaları kapsar. Makrofaj içindeki basiller günler veya haftalar içinde, makrofajlar parçalanana kadar çoğalırlar. Makrofajlar parçalanırken salınan basiller, hücresel debris ve konaktan salınan birçok kemotaktik faktör dolaşımdaki inaktive monositleri lezyon bölgesine çeker. Kandan gelen bu yeni makrofajlar basillerin etrafında toplanarak granülom

oluşumunu başlatacaktır. Basil yüklü makrofajlar lenfatiklerle lenf bezlerine taşınırlar. Eğer kontrol sağlanamazsa lenfohematojen yayılım gerçekleşir (1).

**3. İmmun Yanıtın Gelişimi ve İnfeksiyon Kontrolü Evresi:** Üçüncü haftadan sonra başlar. Basilin solunmasından 2-3 hafta sonra, konakta hem hücresel immünite (HI) hem de gecikmiş aşırı duyarlılık (GAD) gelişir. Bu mekanizmaların desteği ile aktive olan makrofajlarda basillerin üremesi kontrol altına alınabilir. Bu evrede lezyon bölgesindeki basil sayısı HI ile yok edilemeyecek kadar fazladır. GAD, basil yüklü makrofajları ve bu arada çevre dokuları da harap ederek aktive olmamış makrofajlar içindeki basillerin logaritmik üremesini engeller (1). CD4 ve CD8 lenfositleri ile aktive olmamış makrofajlar ortadan kaldırıldıkça, basillerin uzun süre canlı olarak uykuda kalabilecekleri kazeöz nekroz alanları ortaya çıkar. Mikobakterilerle CD8 lenfositler arasındaki etkileşim, reaksiyonun yoğunluğuna göre koruyucu veya yıkıcı olabilir (23). Eğer bu aşamada infeksiyon engellenirse primer infeksiyon dönemi bitmiş olur. Bu dönemde PPD pozitifleşir (1).

**4. HI ve GAD arasındaki karşılıklı etkileşim evresi:** İmmun sistemleri yeterli kişilerde, granülomların ortasında oluşan kazeöz odaklardan kaçan basiller, bu odağı çevreleyen aktive edilmiş makrofajlarca tutulacak ve yok edilecektir. Sonuçta, çok az veya hiçbir doku hasarı olmadan basil çoğalması durdurulabilecektir. Eğer çevredeki makrofajlarca fagosite edilen basiller bu hücrelerin içinde çoğalmaya devam edebilirlerse, GAD yanıtı tekrarlanacak ve makrofajlar öldürmeye devam edebilecektir. GAD yanıtı immün sistemi zayıf kişilerde daha yüksek aktivitededir, kazeöz nekroz ön plandadır (1).

**5. Likefaksiyon ve Kavite Oluşumu Evresi:** HI ile primer infeksiyon engellenemez ise, kazeöz nekroz alanlarının likefaksiyonu primer infeksiyon fazının hemen arakasından gerçekleşir, bu evre "progressif primer tüberküloz" adını alır. Kaviter lezyonların ortaya çıkışı ile karakterize olan tüberküloz patogenezinin bu son aşaması, genellikle primer infeksiyondan veya hastalıktan yıllar sonra endojen reaktivasyonla veya ekzojen reinfeksiyonla gelişen sekonder tüberkülozda görülmektedir (1).

## **2.7. MİKOBAKTERİLERİN MİKROBİYOLOJİSİ:**

**2.7.1. TAKSONOMİ:** Mikobakteriler asit üretme, benzer guanozin ve sitozin (G+C) oranına sahip olma gibi özellikleri nedeniyle *Corynebacterium*, *Nocardia* ve *Mycobacterium*lar aynı grupta anılsalar da, sistematik Bergey's sınıflamasına göre

Mycobacteriaceae ailesinin tek cinsidir (24,25). Mikobakterilerin tür özellikleri DNA/DNA homolojileri ve sayısal taksonomiye göre değerlendirildiğinde, MTB ve buna yakınlık gösteren *M. bovis*, *M. africanum*, *M. ulcerans* ve *M. microti* ile birlikte “*Mycobacterium tuberculosis* kompleksini” oluştururlar (1,26).

*Bovis* 1986 yılında saptanan sığır tüberkülozu etkenidir, sıklıkla (%75-80) akciğer dışı organ tüberkülozuna neden olur (24). Pastörizasyon işleminin yaygın kullanılması sonrasında, infeksiyon etkeni olarak görülme sıklığı oldukça azalmıştır. Attenuated *M. bovis* suşu, aşılama sonrasında yaygın sistemik infeksiyon veya soğuk abse gibi bir komplikasyon geliştiğinde çeşitli örneklerden izole edilebilir, ancak virülan *M. bovis* gibi bulaşıcı değildir. *M. africanum*, MTB ve *M. bovis* türleri arasında ikisine de benzerlikler gösteren bir bakteridir. Afrika'nın tropikal bölgelerinde insan infeksiyonlarına rastlanmaktadır. *M. ulcerans* da özellikle Afrika ve Avustralya'da rastlanabilen en çok alt ekstremiteleri tutan ülseratif infeksiyonlar yapar (26).

MTB ve *M. lepra* dışındaki mikobakteriler insanlarda bulaşıcı infeksiyonlar oluşturmazlar. Bunlar genel olarak “Fakültatif, Non-tüberküloz, Fırsatçı veya Atipik” mikobakteriler olarak adlandırılırlar ve hastalık etkeni olmaksızın alt ve üst solunum yollarında kolonize olabildiklerinden ayrımlarının yapılması zordur (26,27).

Bugüne kadar mikobakteri genusunun standart karakterine uyan 71 mikobakteri türü vardır (22,24). Arnest Runyan, mikobakteri üreme hızları ve katı besiyerinde oluşturdukları koloni özelliklerine göre 4 ana grupta toplamıştır. Bu sınıflamada *M. tuberculosis* ve *M. bovis* dışında, klinik örneklerden izole edilen diğer mikobakteriler yer almıştır (26,28-30).

**Grup I:** Sadece ışıkta sarı-portakal rengi pigment oluşturan fotokromojenik mikobakteriler (*M. kansasii*, *M. marinum*, *M. simiae*).

**Grup II:** Karanlıkta portakal rengi veya kırmızı pigment oluşturan skotokromojenik mikobakteriler (*M. scrofaeaceum*, *M. xenopi*, *M. goodii*).

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

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

Runyan sınıflamasındaki mikobakteriler “Atipik mikobakteriler” olarak adlandırılmışlarsa da son yıllarda bu türlerin atipik olmadığı kabul edilmiş ve bu grup için Mycobacteria Other Than Tuberculosis (MOTT) veya (non-tuberculosis mycobacteria) terimleri kullanılmıştır. Ancak bu terimlerin de mikobakteri türlerini

tanımlamada yetersiz kaldığı görülmüştür. Klinik açıdan önemli çeşitli mikobakteri türlerinin oluşturduğu 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 (24,26).

Tablo 1'de *M. tuberculosis* dışındaki mikobakteriler görülmektedir.

Tablo 1. *M. tuberculosis* dışındaki mikobakteriler (26)

GRUP	TÜR
İnsanlarda patojen olan türler	<i>M. lepra</i>
İnsanlarda potansiyel patojen olan türler	<i>M.avium-intracellulare</i> , <i>M.kansasii</i> , <i>M.fortuitum-chelonae</i> kompleks, <i>M. xenopi</i>
İnsanlarda nadir hastalık oluşturan saprofit mikobakteriler:	
1 - Yavaş üreyenler (>7 gün)	1- <i>M. gordonae</i> , <i>M. asiaticum</i> , <i>M. terrae-triviale</i> kompleks, <i>M. gastri</i> , <i>M. nonchromogenicum</i> , <i>M. paratuberculosis</i>
2- Orta sürede üreyenler (7-10 gün)	2- <i>M. flavescens</i>
3- Çabuk üreyenler (<7 gün)	3- <i>M. termoresistibile</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. vaccae</i> , <i>M. parafortuitum</i> kompleks, <i>M. phlei</i> .

### 2.7.2. MORFOLOJİ:

MTB silindir şeklinde, uçları yuvarlak, 0.3-0.6  $\mu\text{m}$  eninde ve 1-4  $\mu\text{m}$  boyunda, düz veya hafif kıvrık ince basillerdir (24,31-33). Hareketsiz, sporsuz ve kapsülsüzdür. Klinik örneklerden hazırlanan preparatlarda tek tek, kısa zincirler yapacak şekilde uca uca veya dallanma göstererek durabilirler. Middlebrook 7H9 gibi özel sıvı besiyerinde üreyenlerinden yapılan preparatlarda ise gruplar şeklinde görülürler. İçerdikleri polimetafosfat granüllerine bağlı olarak basil, kendisinden daha koyu boyanmış boncuklu veya ince bantlar şeklinde de görülebilir (24,26,27).

### 2.7.3. İNCE YAPI:

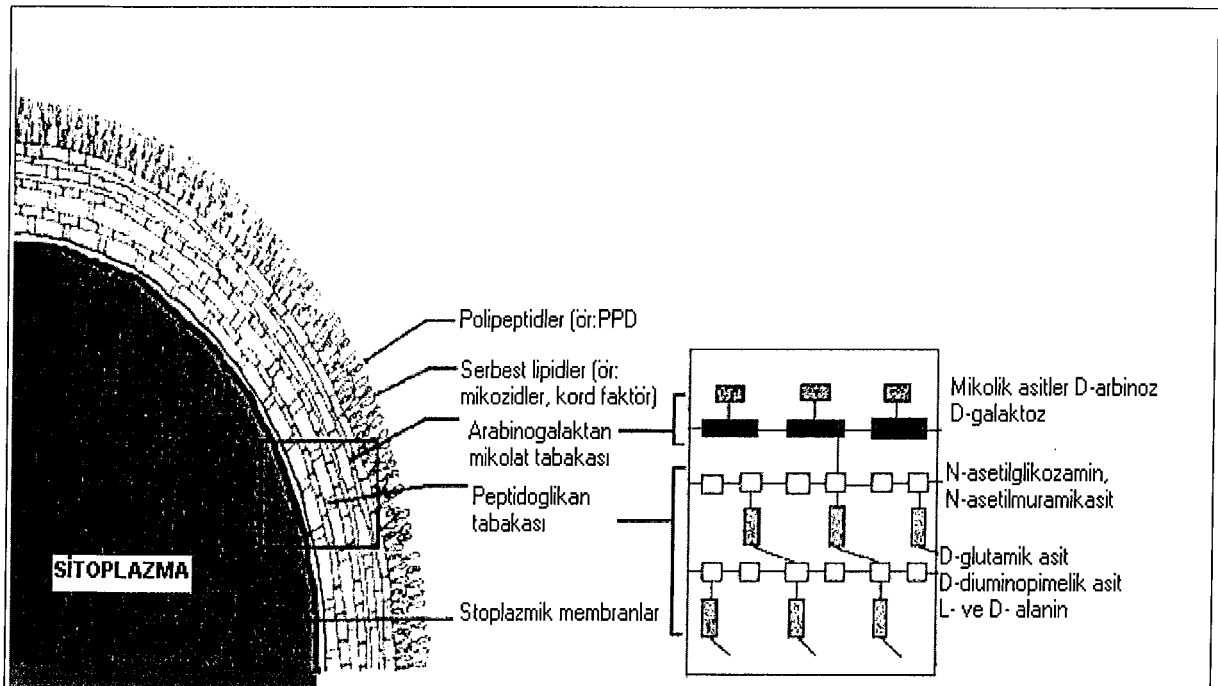
Mikobakterilerin hücre duvarı yapısı Gram negatif yada Gram pozitif bakterilerin hücre duvarlarından oldukça farklı kompleks yapıdadır. Bu kompleksde en iç tabaka diğer bakterilerde de görülen plazma membranıdır. Plazma membranı tipik olarak protein ve fosfolipidlerden oluşan çift katmanlı bir yapıdadır (34).

Duvarın orta tabakası peptidoglikan, arabinogalaktan (AG), mikolik asitler, açiltrehalozlar, oligosakkakrit içeren lipidler ve fosfatidilinozitolün glikozil derivatları yer almaktadır. Bu yapılara antijenik özelliğe sahip glikoproteinler ile porin yapılarda katılmaktadırlar (34).

Hücre duvarının en dışında ağırlıklı olarak polisakkarit ve proteinler az miktarda da lipidleri içeren kapsül yer almaktadır. Bu yapılar içerisinde alfa-1,4 glukan, lipomannan (LM), lipoarabinomannan (LAM) çok önemlidir (34). Hücre duvarının %60'nı oluşturan lipidler başlıca mikolik asitler, mumsu madde, fosfolipidler, açillenmiş trehalozlardır (25).

Çözünmez nitelikteki üç makromolekül olan peptidoglikan, arabinogalaktan ve mikolat, mikobakterilerde hücre duvarının iskeletini oluştururlar. Bu iskelet yapı ile ilişkili olan çok sayıda lipid ve glikolipid dışında proteinler de vardır. Bunlar, mikobakteri türleri veya grupları arasında farklılık gösterir ve ultrastrüktürel görünüşleri de oldukça özeldir (35).

Hücre duvar yapılarından pek çoğu, basilin virülansında ve patogeneğinde önemli rol oynar. Bu yapılar arasında mikolil-arabinogalaktan-peptidoglikan kompleksi (MAGP), LAM, LM, fosfatidilinositol mannosid (PIM), sülfatidler, trehaloz 6,6, dimikolat (kord faktörü) ve diğer açillenmiş trehalozlar, fenolik glikolipidler, lipooligosakkaridler sayılabilir (35). Mikobakterilerin hücre duvarı Şekil 1'de görülmektedir (36).



Şekil 1. Mikobakterilerin hücre duvarı (36)



Kord faktör, mikolik asidin glikolipid derivesi olup MTB'nin dış yüzeyinde bulunur. Adjuvan etkiye sahiptir ve granülom oluşumunda rol alır (24). Sülfatidler glikolipid yapısında olup mikobakterilerin dış yüzeyinde bulunur. Bu maddeler fagolizozomların oluşumunu ve fagolizozomların içine Adenozin trifosfatın (ATP) girişini engelleyerek fagolizozom içindeki pH değerinin 6.0'dan daha aşağıya düşmesinin önler. Bu sayede makrofaj içine fagosite edilen mikobakterinin makrofaj içinde canlı kalması sağlanır. Mikobakterilerin sahip olduğu çözünebilir bir ekzotoksin ve endotoksin gösterilememiştir (26).

Peptidoglikolipidler (Wax-D), Freund adjuvanının etkisini artırıcı özelliğe sahiptir (24).

En ünlü tüberküloz antijeni tüberkülin dir. Tüberkülin testinin, tüberküloz tanısında kullanılabileceği ileri sürülmüş ancak yeterince saf olmaması nedeniyle, uygulandığında istenmeyen çeşitli reaksiyonlara neden olması, Robert Koch'un bulduğu "old tüberkülin" in saflaştırılmış türevini PPD'yi bulmalarına neden olmuştur (24).

Başlıca sitoplazmik proteinler ısı şok proteinleri, Pho S, L-alanin dehidrogenaz elongasyon faktörleridir. İmmünojen nitelikteki bu protein tüm virülan tüberküloz basili suşlarında saptanmıştır. "Antijen 85 kompleksi" olarak tanımlanan, mikobakterilerin salgıladığı başlıca proteinlerin, bakteri yüzeyi ile de ilişkili olabildiği bildirilmiştir. Hücre dışına salgılanan önemli bir diğer protein süperoksid dismutaz, aktif makrofajlar tarafından salgılanan süperoksid radikallerini etkisizleştirerek konakçı yanıtını zayıflatır (37). Antijen 5, antijen 6, antijen 60, antijen 65 kD saflaştırılmış diğer mikobakteriyel antijenlerdir (24).

## **2.8. TANI:**

Tüberküloz hastalarının erken tanı ve tedavisi bu hastalıktan toplumun korunmasında en etkili yoldur. Bu nedenle tüberküloza yakalandığı düşünülen hastaların tanılarını kanıtlayacak, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, hızlı sonuç veren, uygulaması kolay ve pahalı olmayan laboratuvar yöntemlerinin günlük kullanıma girmesi önemli bir gereksinimdir (38). DSÖ'nün kararına göre bir hastaya kesin tüberküloz tanısı konabilmesi için uygun şekilde alınan klinik örnekte MTB'in üretilmesi ile mümkün olur (39).

Tüberkülozun laboratuvar tanısındaki başarı; klinik örneğin uygunluğuna bağlıdır. Hastalık çok çeşitli organ ve dokuları tuttuğu için, materyal seçimine özen

gösterilmeli; normal flora üyeleri ile kontamine örnekler incelenirken, dikkatli olunmalıdır. Tüberküloz tanısı için örneklerin alınma ve laboratuvara gönderilmesi koşulları vardır (22,26,40-42).

**Balgam:** Hastadan 5-10 ml kadar tükürük içermeyen sabah balgamı alınması tercih edilir. Hasta eğitilmeli ve eğer balgam çıkaramıyorsa ekspektoranlarla yardımcı olunmalıdır. Birbirini takip eden üç günde üç kez tekrarlamak izolasyon şansını artırır.

**İdrar:** 50 ml sabah alınan orta idrar yeterlidir. Üç günlük tekrar izolasyon şansını artırır. 24 saatlik idrar örneği kültür işlemi için uygun değildir.

**Açlık Mide suyu (AMS):** Tüberküloz tanısı için uygun bir örnek değildir. Balgam çıkaramayan, çocuk hastalarda, iletişim kurulamayan hastalarda ve balgamını yutan hastalarda tercih edilir. Sabah alınmalıdır üç kez tekrarlama izolasyon şansını artırır. 4 saat içinde laboratuvarda incelemeye alınmalı ya da %10 sodyum bikarbonatla nötralize edilmelidir (27).

**Abse materyali:** Derinin alkolle temizliği yapıldıktan sonra steril enjektörle materyal alınır, 7H9 sıvı besiyeri içinde laboratuvara gönderilir.

**Kan:** 5 ml kan Bactec 13A besiyerine direkt olarak ekilebilir. Sodyum polyanetal sülfonat (SPS) içeren kan tüplerine 10 ml kan örneği alınması önerilmektedir. EDTA çok az miktarda dahi mikobakterilerin üremesini inhibe ettiği için kullanılmaz.

**Biyopsi:** Koruyucu ve fiksatif içermeyen steril kaplarda 1 g doku örneği incelenmelidir.

**Bronkoalveoler Lavaj Sıvısı (BAL):** En az 5 ml örnek steril kaplara alınmalıdır.

**Deri lezyonu:** Biyopsi örneği lezyonun periferinden alınmalıdır.

**Gaita:** AIDS'li hastalarda önem kazanır. Temiz bir kapalı kapta gönderilmelidir.

**Beyin Omurilik Sıvısı (BOS):** En az 2 ml steril tüplere alıp gönderilmelidir.

**2.8.1. MİKOBAKTERİLERİN BOYANMASI:** Mikobakterilerin boyanması oldukça zordur. Hücre duvarındaki uzun zincirli yağ asitlerinin (mikolik asitler) oluşturduğu yoğun lipid içerik, bakteriyolojide yaygın kullanılan gram boyasına karşı geçirgenliği sınırlar (35). Gram boyamada genellikle silik boyanmış, boncuklu gram olumlu basiller şeklinde görünürler. Bu silik boyanmaları nedeniyle mikobakterileri "hayalet hücre" olarak tanımlayan araştırmacılar da olmuştur (27).

Hücre duvarındaki mikolik asit rezidüleri, fuksin veya auramin O gibi anilin metan boyalarla stabil bileşikler yaparlar ve asit-alkol veya güçlü minarel asitler ile karşılaştıktan sonra dahi boyayı bırakmazlar. Dekolorizasyon direnci şeklinde açıklanan bu özellikleri nedeniyle, mikobakteriler, "aside dirençli bakteriler" olarak

tanımlanmaktadır (27). Genellikle iki ayrı boyama yöntemi kullanılır. Bunlardan biri “fuksinli boyama”, diğeri “floresan boyama” yöntemidir (24,26,31,33).

**A. Karbol fuksinli boyama:** Asidorezistan boyanın uygulanışına göre ikiye ayrılır.

a. Erlich-Ziehl-Neelsen (EZN) yöntemi: Bu yöntem sıcak boyama yöntemidir. Boyanın ısıtılması ile bakteriye penetrasyonu sağlanır.

b.Kinyoun yöntemi: Bu yöntem soğuk boyama yöntemidir. EZN boyamasına göre boyanın konsantrasyonu arttırılmıştır. Bu yöntemde boyanın penetrasyonu için ısıtma işlemi gerekmez.

**B. Auramine-Rhodamine boyaması:** Bu boyama yönteminde auramine O boyası kullanılır. Auramine O boyası fiziksel ve kimyasal yoldan doğrudan lipidten zengin hücre duvarına bağlanarak organizmayı görünür hale getirir. Karbol fuksinli boyama yönteminde mikobakterilerin mavi zemin üzerinde kırmızı çomaklar şeklinde görülürken, fluokrom yönteminde kullanılan filtre sistemine göre sarı-portakal rengi floresans verirler. Boyalı preparatta basil saptanabilmesi için mililitrede 5.000-10.000 basil bulunması gerekir. İncelemede 100x ile 300 saha taranmalıdır. Bu yaklaşık 15 dakika sürmektedir. Fluokrom boyamada inceleme floresan mikroskop ile yapılır, aynı gün incelenmelidir ve inceleme süresi kısalmıştır (42).

**2.8.2 KLİNİK ÖRNEKLERİN İŞLENMESİ:** Mikobakteriyel infeksiyonların tanısı için laboratuvara uygun şartlarda gönderilen klinik örnekler, laboratuvar personeli ve diğeri çalışanların sağlığı açısından biyolojik emniyet kabinlerinde çalışılır.

**Homojenizasyon ve Dekontaminasyon:** Kontamine, katı yada yarı katı materyaller bu işleme tabii tutulur. Bu işlemde örnekteki organik kalıntılar kontaminan bakteri ve mantarlar yok edilir ancak mikobakteriler zarar görmemelidir. Ancak bu işlem sırasında %10-20 kadar mikobakteri canlılığını sürdürebilmektedir. Bu yüzden en az zararı verecek yöntem seçilmelidir. Bir çok yöntem olsa da en çok N-asetil-L-sistein-NaOH yöntemi tercih edilir. Tüm yöntemlerde incelenecek örneğin bulunduğu tüplere, örneğin bir katı olacak şekilde dekontaminasyon solüsyonu ilave edilir. 15-20 dakika oda ısısında bekletilir. Bu süre içinde tüpler ara sıra el ile veya vorteks ile çalkalanır. Süre dolduğunda tüplere pH 6.8’de fosfat tamponu ilave edilerek >3000 devirde santrifüj edilir. Klinik örneğin pseudomonas cinsinden bakteri ile kontamine olduğu düşünülüyorsa, oksalik asit tercih edilir. Normalde steril olduğu düşünülen Beyin-omurilik sıvısı, vücut sıvıları ve kan gibi sıvılara dekontaminasyon uygulanmaz (40,42).

### 2.8.3. MİKOBAKTERİLERİN ÜRETİLMESİNDE KULLANILAN BESİYERLERİ:

Mikobakterilerin ikiye bölünmesi için gerekli süre 16-18 saat kadardır ve izole edilmeleri için besiyerlerinin uzun süre inkübe edilmesi gerekir. 35°C karanlıkta %5-10 CO<sub>2</sub> li ortam mikobakteri üremesini stimüle eder (27). Optimal pH 6,8 olan kültür ortamında en iyi ürer. Uygun sıvı ve katı besiyerlerinde 7-21 gün gibi uzun sürede ürerler .

Mikobakterilerin üretildiği besi yerlerinin esası genellikle “yumurta-patates” temeli veya “serum agar” temeline dayanmaktadır. Yumurta içeren besiyerleri gliserol, tuz, patates unu, süt gibi çeşitli maddeleri, yumurtanın tümü veya sarısı ile birlikte içerirler. Bu besiyerlerinin çoğuna kontaminasyonu minimuma indirmek için “Malaşit Yeşili” veya diğer anilin boyaları katılır (22,28).

#### **Mikobakterileri Üretmek İçin Üç Grup Besiyeri Kullanılmaktadır:**

1. **Sentetik Besiyerleri:** Long, Sauton ve Beck, Lookeman besiyerleridir. Genellikle BCG aşısı hazırlamada ve tüberkülin elde edilmesinde kullanılır.

2. **Yarı Sentetik Besiyerleri:** Dubos, Youmans, Kirschner ve Middlebrook besiyerleridir. Bol miktarda bakteri üretmek için kullanılır.

3. **Organik Maddeler İçeren Yumurtalı Besiyerleri:** Löwenstein-Jensen, Petragnani, Trudeau, Dorset, Besredka ve American Thorasic Society besiyerleri örnektir. Klinik örneklerde ilk izolasyonda kullanılır (31-33).

Tam yumurta yada yumurta sarısı içeren yumurta temelli besiyerleri arasında bugün en yaygın kullanılanı L-J besiyeridir. Tipik koloni morfolojisi oluşturmaları ve daha bol üremeleri nedeniyle özellikle primer izolasyonda L-J besiyerlerinin kullanılması önerilir. Yumurta temelli besiyerlerinin opak görünümlü olmasına karşın, agar temelli besiyerleri şeffaftır. Bu nedenle, ekim yapılan besiyerleri 10-12 gün sonra mikroskop altında incelenirse, oluşan kolonileri görmek mümkündür. Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11 en çok tercih edilen agar temelli besiyerleridir. Bunun yanı sıra kontaminasyona neden olan mikroorganizmaların üremesini etkin bir şekilde engellemek amacıyla selektif besiyerleri olan, L-J Gruft, Mycobactosel L-J, Mitchison selektif 7H11 de kullanılabilir (26,43).

Sıvı besiyerleri içinde yer alan Middlebrook 7H9 ve Dubos tween albumin, mikobakterilerin stok suşlarının subkültürlerinin yapılması, duyarlılık deneyleri ve diğer *in vitro* deneylerde inokulum hazırlanması amacıyla kullanılır. Ayrıca bakteri sayısının az olduğu steril bölgelerden alınan klinik örneklerde, bakteriyi çoğaltmak ve

dolayısıyla izolasyon şansını artırmak amacıyla da kullanılabilir. Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri, çoğu hızlı kültür sisteminde temel besiyeri olarak kullanılmaktadır (27).

**2.8.4. HIZLI TANI YÖNTEMLERİ:** Günümüzde birçok laboratuvarında, konvansiyonel besiyelerinin yanı sıra tüberküloz basilinin izolasyon süresinin çok daha kısa ve izolasyon oranının çok daha yüksek olduğu hızlı kültür sistemleri rutin inceleme amacıyla kullanılmaktadır. Çoğunda sıvı besiyeleri kullanılmakla birlikte, bifazik ve katı besiyelerinin kullanıldığı sistemler de mevcuttur ve bu sistemlerde gaz basıncındaki değişiklikler, CO<sub>2</sub> oluşumu ve oksijen kullanımı florometrik veya kolorimetrik olarak ölçülür. Primer izolasyonda sıvı besiyelerine ilave olarak bir de katı besiyeleri kullanılması CDC tarafından önerilmiştir ve bu kombinasyonla mikobakterilerin izolasyon şansının arttığı bilinmektedir (44).

**Bactec 460 TB sistemi:** İzolasyon, idantifikasyon ve duyarlılık deneylerinin uygulandığı bir sistem olarak uzun yıllardır başarı ile kullanılmaktadır. Sistemde izolasyonun yanı sıra, TB kompleksi ile MOTT ayırımı yapılabilen ve TB kompleksi kökenlerinin primer tüberküloz ilaçlara duyarlılığı denenmektedir. Bactec 12B (Middlebrook 7H12) ve Bactec 13A (Middlebrook 7H13) olmak üzere iki tip besiyeri içeren bu sistem; besiyerinde bulunan C<sup>14</sup> işaretli palmitik asitin kullanılması ve metabolizma sonucu oluşan <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> nin 0-999 sayısal değeri arasında Büyüme indeksi (Bİ) olarak ölçülmesi prensibi ile çalışmaktadır (44,45).

Bu yöntemde P-nitro-alfa-asetil-amino-beta-hidroksipropionat (NAP) testi ile TB komplekse ait mikobakterileri, inhibe edip, diğer mikobakterileri hafif veya hiç inhibisyon göstermeyen özelliğinden yaralanarak TB kompleksi identifiye edebiliriz. NAP'dan etkilenenler <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> oluşumunu etkiler ve Bİ değerinde hiçbir artış görülmez veya bir azalma şeklinde görülür. Bİ'deki bu etki identifikasyon için iyi bir araçtır (40).

**Myco-ESP II:** Selüloz sünger ve Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içeren bir sistemdir. Sistemde mikroorganizmaların üremesi sonucu oluşan gaz basıncındaki değişiklikler ölçülerek değerlendirme yapılır (44).

**MB/Bac T:** Besiyerinin dip kısmında kolorimetrik bir sensör içeren ve oluşan CO<sub>2</sub> düzeyini ölçerek üremeyi değerlendiren bir sistemdir (44).

**Bactec 9000 MB:** Besiyerlerindeki oksijen kullanımının floresans ile belirlendiği bir sistemdir (44).

**Bactec MGIT 960:** Sisteminde kullanılan tüplerde, Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri ve dip kısımlarında oksijene duyarlı rutenyum metal kompleksi içeren silikon bulunur. Klinik örnekler ekilmeden önce besiyelerine oleik asit, albumin, dekstroz, katalaz

(OADC) ve polimiksin B, azlosilin, nalidiksik asit, trimetoprim ve amfoterisin-B (PANTA) ilave edilir. Kullanılan besiyerlerinde herhangi bir üreme olduğunda oksijenin kullanımına bağlı olarak silikon tabakaya gönderilen UV ışınına karşı fluoresans oluşmakta ve oluşan fluoresans üreme indeksi olarak değerlendirilmektedir (44,45).

**Septi-Check AFB:** Sıvı (Middlebrook 7H9) ve üç tip katı (L-J, Middlebrook 7H11, Çukulatamsı agar) besiyerinin kullanıldığı bifazik bir kültür sistemidir. Çukulatamsı agar kontaminasyonu belirlemek amacıyla kullanılır (44,45).

**MB Redoks:** Cihaz gerektirmeyen bir sistemdir. Mikobakterilerin izolasyonu amacıyla antibiyotik karışımı ve renksiz tetrazolium tuzu içeren modifiye Kirchner besiyeri kullanılır (44).

**Moleküler Yöntemler:** İnfeksiyon etkenleri, klasik yöntemlerle saptanamayacak kadar az olduğu zaman bunların gösterilmesinde en etkili yollardan biri de sadece belirlenmek istenen etkende bulunan bir nükleik asit dizisini, saptanması mümkün bir düzeye ulaşana dek çoğaltmaktır. Bu yöntemlerden polimeraz zincir tepkimesi (PZR), zincir ayırma çoğaltması (SDA), transkripsiyona bağlı çoğaltma (TMA), ligaz zincirleme tepkimesi (LCR) tüberküloz tanısında kullanılmaya başlamıştır (22).

**Haberci Mikobakteriyofaj Yöntemi:** Haberci mikobakteriyofaj, mikobakterileri infekte edebilen ve basil içerisinde kolayca saptanabilen bir ürün oluşturan virüstür. Tüm mikobakterilerde ya da sadece MTB'de çoğalabilen fajlar vardır. Ateş böceğinin ışık üretmesinden sorumlu lusiferaz enzim geninin bu fajlara klonlanması ile infekte edebilen basiller lusiferin eklendiğinde ışık oluşturarak karanlık alanda kolayca görünür duruma gelirler (44,38). Örnekte 500-5000 kadar bakteri bulunması tanı için yeterli olur (38).

**Gaz Sıvı Kromatografisi:** Hızlı ve yararlı bir tekniktir. Tüberkülostearik asiti saptamada kullanılır. Tek sakıncası tüberkülostearik asitin sadece MTB de değil, tüberküloz dışı mikobakterilerde olmasıdır. Çok pahalı sistem olduğundan rutinde kullanılmamaktadır (22).

**Serolojik Testler:** Klinik örneklerde mikobakteri antijenlerinin immünolojik yöntemlerle; Radioimmunoassay ve Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) ile saptanmasıdır. Çalışmalarda olumlu sonuçlar alınamamıştır. Kullanımı kısıtlayan etken, özgüllüklerinin düşük olmasıdır. Bunun önemli nedeni ise, çevrede yaygın olarak bulunan MTB dışındaki mikobakterilerin çapraz tepkimeye yol açan antijenleri ile sıklıkla karşılaşılmasıdır. Serolojik tanı, teknik açıdan mümkün görünmektedir,

ancak genellikle olumlu sonuçlar, hastalığın ileri döneminde elde edilmektedir. ELISA'nın akciğer dışı organ tüberkülozlu ve balgam çıkarmayan tüberkülozlu hastalarda yararlı olabileceği düşünülmektedir (22,38).

**Adenozin Deaminaz (ADA):** Pürin metabolizmasında işlevi olan bir enzimdir. Plevra, periton, perikard ve beyin-omurilik sıvılarında tüberküloz bulunduğu zaman ADA düzeyinin yükselmiş olduğu belirlenmiştir. Tüberküloz menenjit olgularında, ADA anlamlı ölçüde artmış bulunurken, plevral sıvı örneklerinde tüm olgularda böyle kesin ayırım yapılabilmesini sağlayan yeterli farklılık gösterilememiştir (38).

Tip tayinleri için üreme hızı, koloni morfolojisi, pigment ve biyokimyasal testler gibi geleneksel yöntemlerle, Bactec NAP, DNA prob, DNA hibridizasyon, mikolik asit kalıpları gibi hızlı yöntemler kullanılmaktadır (24). Biyokimyasal testler daha çok MTB'den başka diğer mikobakterilerin tespiti için kullanılmaktadır. Bunlar; Niasin, nitrat redüksiyon, katalaz, Tween-80'nin hidrolizi, tellüritin redüksiyonu, %5 NaCl'e tolerans, demir bağlama, arilsulfataz, üreaz, Mac Conkey agarında üreme ve pyrazinamidaz testleridir (22).

## 2.9. TEDAVİ VE ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA DUYARLILIK DENEYLERİ:

Tüberküloza etkili bulunan ilaçlar sayesinde, tüberküloz hastalığı yeni olgularda başarıyla tedavi edilebilir hale gelmiştir. Tedavide iki temel amaç vardır; Birincisi, hastanın sağlığına kavuşturulması, ikincisi ise balgamda tüberküloz basilinin çıkarılmasının sonlandırılarak bulaşıcılığı önlemek ve böylece toplumu korumaktır (5). Tüberküloz tedavisinde en az iki ilaç kullanılmalıdır (5). Tedavide önemli bir nokta da hastalığın klinik olarak düzelmesinden sonra yeterli bir süre tedavinin devamıdır (5). Böylece metabolik olarak inaktif olan persistan tüberküloz basillerinin yok edilmesi mümkün olur. Tüberküloz ilaçları iki grup altında incelenmektedir (5,46).

**1. Primer İlaçlar:** İzoniazid (INH), rifampisin (RIF), pirazinamid, etambutol (EMB) ve streptomisin (STM) dir. Etambutol dışındakiler bakterisittir.

**2. Sekonder İlaçlar:** Sikloserin, ethionamid, kapreomisin, paraaminosalisilikasit, aminoglikozidler, kinolonlar, klofazimin ve betalaktam antibiyotiklerdir.

Antimikrobiyal ilaçlara direnç primer veya sekonder olabilir. Primer direnç, daha önce antimikrobiyal tedavi almayan hastalarda ortaya çıkar. Sekonder ilaç direnci, geçmişte tüberküloz tedavisi uygulanmış hastalarda ortaya çıkar. Bu iki şekildeki direncin yaygınlığı büyük oranda, tüberküloz tedavisinin uygunsuzluğuna bağlıdır. Yetersiz tedavi programları dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkmasını sağlayarak, tedavi edilmiş hastalarda sekonder direnç oluşturur. Bu bakteriler sonra diğer

insanlara aktarılır ve hastalık ortaya çıkarsa infekte kişide primer dirençli basil ortaya çıkar (5).

Tüberkülozun etkin bir şekilde tedavisi, uygun kemoterapi modellerinin seçimi ve uygun kombinasyonların yeterli süre kullanımına bağlıdır. Uygun ilaçların seçimi ise standardize edilmiş, hızlı ve doğru yorumlama yöntemlerine sahip invitro duyarlılık yöntemlerine dayanır. Diğer bakteriler için kullanılan disk diffüzyon teknikleri, bu yavaş üreyen bakteriler için uygun değildir.

Tedaviye başlamadan önce dirençli tüberküloza sahip bir hasta ile temas öyküsü bulunanlar, HIV infekte olup kaviter lezyonu olanlar, düşük sosyoekonomik koşullarda yaşayanlar, yüksek ilaç direnci bulunan (primer isoniazid direnci %4'den fazla) bölgelerde olanlar mutlaka direnç varlığı yönünden incelenmelidir (1).

Ayrıca CDC; kültüründe MTB izole edilen her hastaya, üç aylık bir tedaviden sonra yayma ve kültür pozitifliği devam eden veya tedaviye klinik yanıtızsızlık olan bütün hastalara direnç testi yapılmasını önermektedir (6). Bu amaçla çok sayıda duyarlılık testi yöntemi geliştirilmiştir.

**2.9.1. ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA DİRENÇ MEKANİZMALARI:** MTB'de plazmidlere bağlı direnç tarif edilmemiştir. Daha ziyade tek basamaklı, rastgele, spontan kromozomal mutasyonlar sonucu direnç oluşmaktadır. Bakteriler arası genetik aktarım sözkonusu değildir. İlaça duyarlı bakterilerin ölmesiyle varolan dirençli mutantlar belirgin hale gelir. Spontan direnç oranları sırasıyla INH, RIF, EMB ve STM için sırasıyla  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-6}$  ve  $10^{-5}$  olarak gerçekleşmektedir. Kromozomlar üzerindeki direnç bölgeleri birbiriyle bağlantılı olmadıklarından, bakterinin iki ilaca birden spontan direnç geliştirmesi, olasılıkların çarpımına eşittir. Örneğin INH+RIF için  $10^{-14}$  dür. Diğer taraftan ilerlemiş kaviteli olgularda dahi toplam bakteri sayısı ender olarak bu sayıya erişir. Tüberküloz tedavisinde multipl ilaçların kullanılması, direnç mutasyonlarına çok az sıklıkla rastlanması ve duyarlı bakterilere nakledilmemesi temeline dayanır. Dolayısıyla birden fazla ilaç kullanılması direnci önleyici en önemli faktörlerden birisidir (46). INH için mikobakteriyel direnç genleri KatG, inhA, ahpC, RIF için *rpoB* geni nokta mutasyonu, EMB için embB mutasyonu, STM için *rrs*, *rpsL*'i kodlayan gende mutasyon, pirazinamid için *pncA* geni tespit edilmiştir (22,46).



## 2.9.2. ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA KARŞI DUYARLILIK TESTLERİNİN AMACI:

1. Kullanılacak antibiyotiğin, mikroorganizmaya karşı etkisini ortaya çıkarmaktır.
2. Mikobakteri popülasyonu içinde herhangi bir ilaca karşı, ilaçla hiç karşılaşmadığı halde doğal (mutasyonel) dirençli olan bakteri sayısını ortaya çıkarmaktır (6).

## 2.9.3. KLASİK ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ:

**1. Mutlak konsantrasyon yöntemi:** Antibiyotikli ve antibiyotiksiz besiyerlerine,  $2 \times 10^3$ - $1 \times 10^4$  Colony Forming Unit (CFU)/ml mikobakteri içeren inokulum ekilir. (İnokulum miktarı olarak mililitrede 100.000 basili geçmemelidir). İlaçlı besiyerinde 20 koloniden fazla olması o ilaca bakterinin dirençli olduğunu gösterir. Ekim örneğinin bu kadar hassas bir şekilde hazırlanması en önemli zorluğudur (6,47).

**2. Direnç oranı yöntemi:** İlaçlı besiyeri içeren tüplerin bir sırasına da antitüberküloz ilaçlarının hepsine duyarlı olduğu bilinen standart köken *M. tuberculosis* H37Rv ile inokule edilir. Bu yöntemle  $10^5$  CFU/ml'lik inokulum kullanılır (6,38,47). Farklı dilüsyonlarda ilaç içeren besiyerlerine ekilen bakteriler için ilaçların Minimal İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) saptanabilmektedir. Test edilen kökenin, MİK değeri, *M. tuberculosis* H37Rv'nin MİK değerinden 8 kat veya daha fazla yüksekse o ilaca dirençli olduğu kabul edilir. Yeterli metodolojik çalışmalar yapılmadığında hata oranı yüksektir (6,47).

**3. Disk metodu:** 100mm çaplı dört kadranlı plaklara OADC eklenmiş 7H10 Middlebrook agar besiyeri 5ml olacak şekilde eklenir ve içerisine ilaç içeren disk eklenir. Kontrolü ise ilaçsız besiyerine ekim ile yapılır. Standart bir yöntemdir (47).

**4. Proporsiyon yöntemi:** Antitüberküloz ilaçlara karşı dirençte %1 direnç düzeyi kriter olarak kabul edilir. İlaçlı besiyerinde üreyen kolonilerin sayısı kontrol besiyerindeki, kolonilerin sayısı ile karşılaştırılır. Belli bir ilaca dirençli basillerin oranı hesaplanıp, test edilen popülasyona yüzde olarak belirtilir. Bu test için koagulasyondan önce ilaç eklenmiş L-J besiyeri, Middlebrook 7H10 veya 7H11 agar kullanılabilir (47).

Agar proporsiyon yöntemi yavaş üreyen mikobakterilerin ilaç duyarlılıklarını saptamak için geliştirilen ve 1960'dan beri kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem klasik agar dilüsyon yönteminin modifiye şeklidir. Agar proporsiyon yöntemi mikobakterilerin ilaç duyarlılıklarının saptanmasında kullanılan yöntemler arasında CDC tarafından altın standart olarak kabul edilen bir yöntemdir (48).

MTB'in ilaç duyarlılığını saptamak için çeşitli konsantrasyonlarda, INH, RIF, EMB ve STM içeren Middlebrook 7H10 ve 7H11 agar besiyerleri hazırlanır ve beşer mililitrelik hacimlerde 4'e bölünmüş plastik steril plakların (Felsen plakları) her bir bölmesine dökülür. Uzun yıllar test edilmiş, metodolojik çalışmalar yapılmış, uluslararası komitelerce onaylanmıştır (48). Mutant bakteri proporsiyonunun kantitatif olarak hesap edilmesini sağladığından değerli bir yöntemdir. Agar proporsiyon yöntemi direkt ve indirekt olmak üzere iki şekilde yapılır (47-49).

**Direkt test:** Dekontamine ve homojenize edilmiş ve asidorezistan boyama sonrası basil saptanan klinik örnekler kullanılarak yapılır. Klinik örnek dilüsyonlarının hazırlanması aşağıda Tablo 2'de görülmektedir.

Tablo 2. Agar Proporsiyon Direkt Test Yönteminde Örneğin İnokülasyon Dilüsyonu (47)

Örneğin Mikroskopi Bulgusu	Örneğin İnokülasyon Dilüsyonu
< 1 ARB/ her saha	Dilüe edilmemiş veya $10^{-2}$ dilüsyonu
1-10 ARB/ her saha	$10^{-1}$ dilüsyonu veya $10^{-3}$ dilüsyonu
> 10 ARB/ her saha	$10^{-2}$ dilüsyonu veya $10^{-4}$ dilüsyonu

### İndirekt Test:

Kültürde üremiş kökenlerden yapılır. İndirekt testin yapıldığı durumlar şunlardır:

- Dekontamine edilmiş klinik örneklerden hazırlanan preparatların asidorezistan boya sonrası basilin saptanmadığı, ancak kültürde üreme olduğu durumlarda,
- Direkt testin üreme kontrolünde yeterince üreme (50-100 koloni) olmadığı durumlarda,
- Referans kökenlerin duyarlılık testlerinin yapılmasında bu testler kullanılır.

Primer izolasyon kültürde üretilmiş bakteriden steril distile su ile 1.0 McFarland bulanıklığında süspansiyon hazırlanır yada 7H9 sıvı besiyerinde üretilip bulanıklığı 1 McFarlanda ayarlanır. Hazırlanmış süspansiyondan  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  veya  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  dilüsyonlar hazırlanır. Bu dilüsyonlardan ilaçsız kontrol besiyerine ve ilaçlı besiyerine ekim yapılır. Ekim yapılmış plaklar %5-10 CO<sub>2</sub>'li ortamda 35-37°C de inkübe edilerek 3-4 hafta sonra değerlendirilir. Değerlendirme şöyle yapılır:

% direnç=ilaçlı bölmedeki koloni sayısı/kontrol bölmesindeki koloni sayısı x 100.

Bu formüle göre %1 ve üzeri çıkan değerler o köken için direçli olarak değerlendirmeye neden olur (47-49).

Kontrol kökeni olarak kullanılan standart *M. tuberculosis* H37Rv kökeni de yine örneklerle aynı dilüsyona getirilerek bir başka antibiyotikli plağa ekilir (47).

Bu yöntemde sonuçlar üç hafta sonra elde edilir. Eğer üç haftadan önce kontrol çeyreğinde koloniler tam olgunlaşmış ve antibiyotikli bölgelerde bakteriler direnç göstermiş ise bu plaklar üç haftanın bitmesi beklenmeden rapor edilebilir (49).

İnkübasyon süresi sonunda üreme olmamış çeyreklerin kesin rapor edilebilmesi için 30X, 60X büyütmelemler ile koloni mikroskobu kullanılarak incelenmesi gerekir (47). Testin geçerli olabilmesi için plaklardaki herhangi bir kontrol çeyreğindeki mikroorganizmanın en az 50-100 koloni kadar üremesi gerekir. Eğer 3 hafta sonunda kontrol bölmesinde 50'den az koloni varsa test tekrar edilmelidir (47-49). Tablo 3'de NCCLS'in önerdiği primer antitüberküloz ilaçların farklı besiyerindeki eşdeğer son ilaç konsantrasyonları görülmektedir .

Tablo 3: Primer antitüberküloz ilaçların farklı besiyerlerindeki eşdeğer son ilaç konsantrasyonları ( $\mu\text{g/ml}$ ) (6)

ANTİBİYOTİK	BACTEC 12B	Löwenstein-Jensen	M7H10
Streptomisin	2.0	4.0	2.0
	6.0	-	10.0
Rifampisin	2.0	40.0	1.0
İzoniazid	0.1	0.2	0.2
	0.4	1.0	1.0
Etambutol	2.5	2.0	5.0
	7.5	6.0	10.0

#### 2.9.4. HIZLI ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ:

**1. Radyometrik kültür sistemi (Bactec 460 TB):** Homojenizasyon ve dekontaminasyon işlemlerinden geçirilen klinik örneklerden veya kültür pozitif örnekler, zenginleştirilmiş  $^{14}\text{C}$  işaretli palmitik asit içeren Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri bulunan şişelere (Middlebrook 7H12) ekim yapılır (6,40). Yağ asidi kullanınca  $^{14}\text{CO}_2$  ortaya çıkar ve şişeler periyodik olarak BACTEC 460 TB cihazına yerleştirilerek  $^{14}\text{CO}_2$  saptanmaya çalışılır. Oluşan  $^{14}\text{CO}_2$  miktarı Bİ olarak cihaz tarafından saptanır. Bir antitüberküloz ilaç besiyerine eklendiğinde organizma duyarlı ise üreme baskı altına alınır. Bu kontrole kıyasla günlük Bİ de azalma veya çok küçük artış şeklinde saptanabilir. Organizma dirençli ise çok az veya hiç baskılanma görülmez. Direncin %1 oranını tayin etmek için kontrol şişesinde kullanılan bakteri

miktarı ilaçlı şişedekinden 100 defa daha azdır. Birinci seçenek antitüberküloz ilaçların (INH, RIF, EMB, STM, pirazinamid) yanı sıra bazı sekonder antitüberküloz ilaç duyarlılık testleri de yapılabilmektedir (6,47).

Günlük iş yükü fazlalığı ve radyoaktivite içeren atıkların olması dezavantajdır. Geleneksel yöntemlerle 21 günde sonuç alınırken, bu sistemde sonuçlar 5-7 günde çıkmaktadır (6).

Tüberküloz basillerinin duyarlılık testi direkt veya indirekt yöntemle yapılabilir (40,50).

**Direkt test:** Yayma pozitif işlenmiş hasta örneği direkt olarak antibiyotikli ve antibiyotiksiz besiyerlerine inoküle edilir ve inkübasyona alınır. Mikobakteriler kontrolde üreyecek fakat duyarlı olan ilaç bulunduğu inhibe olacaktır. İlaç duyarlılık testi ile beraber primer izolasyon şişesi pozitif olunca NAP ayırım testi yapılır. Böylece identifikasyon ve duyarlılık test sonuçları genelde aynı zamanda hazır olur. Öncelikle PANTA ilave edilmiş bir 12B şişesine işlemlerden sonra konsantre örnek ekilir. INH, RIF, EMB ve STM ihtiva eden dört 12B şişesi ile birlikte kontrol için bir 12B şişesi set halinde hazırlanıp ilaç duyarlılık testi yapılır. PANTA ilavesi ilaç testlerini etkilemez. Her ilaç şişesine 0.1ml ve kontrol şişesine 1:100 dilüsyon yerine 1:10 dilüsyon kullanılır (0.9 ml dilüsyon sıvısına 0.1 ml), çünkü örnekte genellikle düşük sayıda ARB bulunur. Bütün ekim yapılmış şişeler  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  de inkübe edilir. Bu şişeler 1-3 günde bir okunabilir. Yüksek derecede yayma pozitif örneklerde her gün okuma tavsiye edilir. Direkt ilaç duyarlılık sonuçları maksimum 3 hafta süre ile test edilmelidir. Bazı durumlarda primer izolasyon şişesi üreme gösterirken ilaç kontrol şişesi üreme göstermez. Kontrolde üreme olmadığı için indirekt duyarlılık testi yapılmalıdır. NAP testi Bİ 50 ye vardıktan sonra yapılmalıdır. NAP sonuçları hazır olduğunda ilaç duyarlılık test sonucu rapor edilir (40).

Sonuçların yorumu:

Kontrol şişesi  $\Delta B\bar{I} >$  ilaçlı şişenin  $\Delta B\bar{I} =$  Duyarlı

Kontrol şişesi  $\Delta B\bar{I} <$  ilaçlı şişenin  $\Delta B\bar{I} =$  Dirençli

Kontrol şişesi  $\Delta B\bar{I} =$  ilaçlı şişenin  $\Delta B\bar{I} =$  Dirençli (22)

**İndirekt test:** Primer izolasyon besiyerine üreyen mikroorganizmaların saf kültürü test edilir (40,47,50,51).

Agar bazlı (Middlebrook 7H10 veya 7H11) veya yumurta bazlı katı besiyerinde (üreme saptandıktan sonra 4 haftadan uzun süre geçmemiş kültürler), Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri (1-4 hafta arasında üremiş) ve Bactec 12B besiyerinde ( $B\bar{I} > 500$ ) üremiş bakteriler kullanılır. Katı besiyerinde üreyen kolonilerin Dilüsyon sıvısı (DF) ile bulanıklığı, hafta sonu dahil olmayan program için McFarland 0.5'e, günlük program için McFarland 1.0'e ayarlanır. Kontrol şişesi için ise standardize edilmiş inokulum süspansiyonu DF ile 1:100 oranında dilüe edilir. INH, RIF, EMB ve STM ihtiva eden dört 12B şişesi ile birlikte kontrol için bir 12B şişesi set halinde hazırlanıp ilaç duyarlılık testi yapılır. Testler 35-37°C'de inkübe edilir (40,47,51).

Sonuçlar günlük programda bir gün sonra başlamak kaydıyla her gün aynı saatte okutulur en az 5 günlük inkübasyon gerekir. Kontrol şişesinin  $B\bar{I}$  değeri  $\geq 30$  olduğunda sonuçlar yorumlanır. İkinci günde  $B\bar{I}$  30'u geçerse inokulum yoğundur test tekrar edilir. Kontrol şişesi 14 günlük inkübasyon sonunda 30'a ulaşmazsa test tekrar edilir (51,48).

Sonuçlar kontrol ile ilaçlı besiyerindeki  $\Delta B\bar{I}$  değerleri karşılaştırılarak verilir. Yorumlama:

Kontrol şişesi  $\Delta B\bar{I} >$  ilaçlı şişenin  $\Delta B\bar{I}$  = Duyarlı

Kontrol şişesi  $\Delta B\bar{I} <$  ilaçlı şişenin  $\Delta B\bar{I}$  = Dirençli

Kontrol şişesi  $\Delta B\bar{I} =$  ilaçlı şişenin  $\Delta B\bar{I}$  = Sınırdadır (test tekrarlanmalıdır) (22, 47)

**2. Floresan kültür sistemi (BACTEC MGİT- 960):** Middlebrook 7H9 içeren dip kısmı Ruthenium kompleksi bulunan silikon bir tabaka ile kaplı tüpler kullanılmaktadır. Tüp içinde bulunan oksijen yoğunluğunun fazla olması nedeniyle tüp dibine gönderilen UV ışınına karşı floresan ışımaya oluşmazken, oksijenin mikobakteri veya kontamine mikroorganizmalar tarafından kullanılarak tüketilmesi ve CO<sub>2</sub> birikmesi sonrası tüp dibine gönderilen UV ışını ruthenium kompleksindeki değişiklik nedeniyle floresan vermektedir. Saptanan floresan miktarı üreme indeksi olarak ele alınmakta ve kültür pozitifliği açısından değerlendirilmektedir (6). MTB'nin ilaç duyarlılığı bu yöntemle ortalama 5 (3-14) günde tespit edilebilmektedir (48).

Duyarlılık testleri için ilaçlı ve ilaçsız tüplere eşit miktarda bakteri ekimi yapıp bu tüplerdeki üreme karşılaştırılır. İlaçsız tüpte üreme saptandıktan sonra, 48 saat içerisinde ilaçlı bir tüpte üreme olursa, bakterinin o ilaca dirençli olduğu kabul edilir.

Sürekli monitörizasyon ile 960 tüpün aynı anda takibini sağlaması ve bilgisayar verileri vermesi nedeniyle iş yükü azdır. Kontaminasyon oranları yüksektir (6).

### 3. Kolorimetrik kültür sistemi:

**A. MB/BacT/ALERT MB:** Kolorimetrik olarak besiyerinde oluşan CO<sub>2</sub> düzeyini ölçerek mikobakteri üremesini değerlendirir. Radyoizotop içermez. Tam otomatiktir, bilgisayar desteği mevcuttur. Duyarlılık testi yapılabilmektedir. Testlerin sonuçlanma süresi BACTEC 460'dan daha uzundur. Etambutol için duyarlılığı düşüktür (6).

**B. Alamar Mavisi Oksidasyon-Redüksiyon İndikatörü:** Bakteri ilaçlı ve ilaçsız Middlebrook besiyerine ekilerek 10-14 gün inkübe edilir. Kontrol tüpüne Alamar Mavisi eklenip, 50°C'de 2 saat bekletilir (6). Rengin maviden pembeye dönmesi üreme olduğunu gösterir. MTB'in ilaçlı ve ilaçsız 7H9 sıvı besiyerinde inokülasyonu sonrası, ortama alamar mavisi eklenerek kontrol ve ilaç içeren besiyerlerindeki renk değişimi kıyaslanır. Sonuçlar 7-10 gün içinde elde edilir (48). Üremenin ne zaman olacağı tam olarak tahmin edilemediğinden birden fazla kontrol tüpü hazırlanması ve belli aralıklarla bu tüplerde üreme araştırılması gerekmektedir (6).

**4. Karbondioksit oluşumunu saptayan sistem; ESP kültür sistemi II:** Modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içeren şişelerde mikobakterilerin oluşturduğu gaz ve oluşan basıncı ölçerek üreme değerlendirilmesi yapan tam otomatik, radyoaktif olmayan, bilgisayar destekli bir sistemdir. Primer antitüberküloz ilaçlar test edilebilmektedir (6).

**5. E-Test:** Primer antitüberküloz ilaçlara karşı MIK değerlerini belirlemek için kolay bir yöntemdir. Açık sistem olduğundan uygulama ve okunması sırasında dikkatli olunması gerekmektedir (6). Besiyerinde üremiş ve McFarland 3'e göre bulanıklığı ayarlanmış bakteri süspansiyonu agar yüzeyine yayılır. Üzerine değişen oralarda antimikobakteriyel ilaç içeren E test şeritleri konur. Plaklar 5-7 gün süre ile 37°C de inkübe edilir. Üremenin kuvvetle inhibe olduğu çizginin E test şeridini kestiği nokta, MIK değerini verir (22).

**6. Lusiferaz taşıyıcı faj yöntemi:** Ateşböceği lusiferazı, lusiferin ve ATP arasındaki reaksiyonu katalizleyerek foton oluşturmasını sağlar. Klonlanan lusiferaz geni, mikobakteriyofajlar aracılığı ile MTB hücrelerine taşınabilir. MTB' nin ilaç duyarlılığını tespit etmek için, lusiferaz geni içeren mikobakteriler, ilaçlı ve ilaçsız ortamlarda 24 saat inkübe edilip, ortama lusiferin ilave edilmiştir. İlaçsız ortamda, MTB aktif olarak ürettiği için, lusiferaz geninin ekspresyonuna ve ATP' nin varlığına bağlı olarak ışık üretecektir. İlaç üremeyi baskılıyorsa ışık üretilmeyecektir (48).

**7. Biyoluminesans yöntemi (Hücresel ATP ölçümü):** Bu yöntemin esası, yaşayan hücrelerde ATP bulunması, ölü hücrelerde ATP bulunmaması prensibine dayanır. MTB'in ilaçlı ve ilaçsız 7H9 sıvı besiyerinde 10 gün inkübasyonundan sonra ortama ATP moniterize edici madde eklenir. Luminometre ile ilaçlı ve ilaçsız besiyerindeki ölçülen ışık şiddeti kıyaslanarak, ilaç duyarlılığı tespit edilir (48).

**8. Moleküler yöntemler:** PZR, Restriction fragment length polymorphism (RFLP), Single-strand conformation polymorphism (SSCP), Heterodupleks analiz, dideoksi fingerprinting (DDF), otomatize DNA dizi analizi ve Solid faz hibridizasyon gibi yöntemlerledirenç saptanabilir (22).

PZR; DNA dizilerinin, diziyeye özgü öncüller (primer) ve ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz enzimi kullanılarak çoğaltılması yöntemidir. İlaç direncinden sorumlu gen bölgesi PZR ile çoğaltıldıktan sonra direkt dizi analizi yapılarak mutasyonlar saptanmaktadır. Nested PZR, multipleks PZR gibi şekilleri var (22).

RFLP; bu yöntemde pürifiye edilmiş DNA, bir restriksiyon enzimi ile kesilir ve oluşan parçaların büyüklük ve sayısı karşılaştırılır. Band dizilerindeki değişiklikler RFLP olarak bilinir. RFLP; DNA'nın delesyonu, insersiyonu, yeni dizi düzenlenmesi veya bazların yer değiştirmesinden oluşur. Genetik farklılıklar kolayca saptanabilir (22).

SSCP; bir DNA iplikçğinde oluşan tek bir baz değişikliği, bu iplikçğin elektroforetik hareketini ve yapısını değiştirebilir. Bu yöntem 100-600 baz çiftinden oluşan tek zincir DNA'nın sekonder yapısında, tek bir baz değişikliği veya kaybı ile oluşan konformasyonel değişikliklerin nondenatüre jel elektroforezi ile saptanması temeline dayanır (22).

Heterodupleks analizi; kontrol bir DNA ile normal tip DNA karşılaştırılarak, bir gende mutasyon olup olmadığını gösteren hızlı bir yöntemdir. *M. tuberculosis* suşu ile dirençli olduğu düşünülen test suşunun DNA'ları denatüre edildikten sonra bu ürünler yeni bir tüpte renatüre edilebilir. Birbirine uygunluk gösteren DNA dizileri yeniden bir araya gelerek homodupleks meydana getirirken, mutasyonların bulunduğu DNA dizilerinde tam olarak düzgün bir şekilde birleşme olmayacağı için heterodupleks oluşacaktır (22).

Otomatize DNA dizi analizi; bakteri türlerinin direkt genomik DNA baz dizilerinin karşılaştırılması, iki suşun benzer mi yoksa farklı mı olduğunu kantitatif olarak saptayan en iyi yoldur (22).

**9. Flovsitometri yöntemi:** Flovsitometri, bir sıvı akımı içinde tek tek geçmekte olan hücreler veya biyolojik partiküllerin, fizik ve kimyasal özelliklerini sensörler aracılığı ile ölçebilen bir yöntemdir. *M. tuberculosis*'in fluoresein diasetat (FDA)'ı hidrolize etmesi ve oluşan floresan işaretli mikobakteriler flovsitometrik analiz ile tespit edilir. Çeşitli konsantrasyonlarda antitüberküloz ilaç içeren ve kontrol olarak ilaç içermeyen Middlebrook 7H9 sıvı besiyerinde 24-48 saat inkübe edilen bakteri kültürüne FDA eklenir ve canlı mikobakterilerin FDA'ı hidrolize etmesi sonucu floresan işaretli mikobakteriler flovsitometri ile saptanır. Antimikobakteriyel ajanlara duyarlı mikobakteriler FDA'ı daha az hidrolize eder. Bakteri üremesi gerekmediği için 24 saat gibi kısa bir sürede sonuç alınır (52,48).

#### **2.9.5. İLAÇ DUYARLILIK TESTLERİNİN GELİŞTİRİLMESİNDE BAZ ALINAN KRİTERLER:**

**İlacın kritik konsantrasyonu:** Bir ilacın farklı konsantrasyonlarının tüberküloz basillerini *invitro* ortamda inhibe etme aktivitesiyle, hastaların (*in vivo*) bu ilaçla yapılan kemoterapiye cevapları arasındaki paralellik baz alınarak belirlenir (48).

**İlaca mutant bakterilerin kritik proporsiyonu:** Klinik ve bakteriyolojik çalışmalar sonunda bir antitüberküloz ilaca dirençli bir basilin direncini belirleyen oran, basil popülasyonunun %1'i olarak belirlenmiştir. Bir ilacın kritik konsantrasyonuna dirençli basil oranı, kullanılan basil popülasyonunun %1'ine eşit veya %1'inden fazla ise bu hastanın bu ilaçla kemoterapiye cevap vermeyeceği şeklinde yorumlanır. Bir ilacın kritik konsantrasyonu duyarlılık testinin yapılacağı besiyerinin çeşidine ve yöntemine göre farklılık gösterir. Bunun nedeni şu şekilde sıralanabilir (48).

- Besiyeri içinde ilacın farklı şekilde absorpsiyonu
- İlacın bazı besiyeri komponentlerine bağlanması
- Besiyeri hazırlanması sırasında ilacın inaktivasyonu
- İnkübasyon süresi içinde antibiyotiğin etkinliğini yitirmesi
- Besiyerinin Tween 80 içermesi

**İlaç potensi:** İlacın total ağırlığı içindeki aktif ilacın mikrogram olarak miktarına o ilacın gerçek potensi denir.



## MATERYAL VE METOD

Deney kökenleri; 2002-2003 yılları arasında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'na gönderilen materyallerden elde edildi. Tüberküloz ön tanılı hastaların balgam, BOS, AMS, BAL, idrar, abse, plevra mayii, perikard mayii gibi klinik örneklerinden, Bactec sistemi ile soyutlanan 104 kökenin antibiyotik duyarlılık testi için Bactec sistemi (Becton Dickonson Microbiology Systems, ABD.) ve NCCLS'in altın standart olarak kabul ettiği proporsiyon (Middlebrook 7H10 agar besiyeri kullanılarak) yöntemi ile saptanıp iki yöntem bulguları karşılaştırıldı. Standart köken olarak *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) ve *M. tuberculosis* ATCC 35838 kullanıldı.

### BACTEC YÖNTEMİ:

#### Materyaller:

#### A-Besiyeri ve çözeltiler:

1. Bactec 12B besiyeri (20 ml'lik cam şişede 4 ml sıvı besiyeri) (22-25°C). Not: Her şişe Bactec 460-TB cihazında okutularak Bİ 20 ye kadar olan indeks kontaminasyon yok olarak kabul edilip test çalışmasına alındı. Bu indeks üzerindeki şişeler kontamine kabul edilerek kullanılmadı.

2. Bactec dilüsyon sıvısı (DF) (22-25°C)

3. Antibiyotikler (EMB, INH, RIF ve STM'ni liyofilize formda içeren Bactec SİRE kiti) (2-8°C)

4. Kanlı agar plağı

#### B-Rutin Laboratuar malzemeleri

1. %70'lik alkol

2. Pamuk

3. İnsülin enjektörü

#### C-Cihazlar

1. Bactec 460 cihazı

2. CO<sub>2</sub> tankı

3. Vorteks karıştırıcı

4. 37±1°C etüv

## 5. Güvenlik kabini

### **Bactec 12B mediumdan pozitif kültür elde edilmesi:**

**Örneğin işlenmesi:** Her örnek 50 ml santrifüj tüpüne alındı ve eşit miktarda %4'lük NaOH ve %2.9'luk Na Sitratın eşit hacimde karışımından ilave edilerek 15-20 dakikada eritildi ve dekontamine edildi. Çok mukopürülan örnekler N-Asetil-L-Sistein (NALC) 50-100 µg ilave edildi. 50 ml'e kadar pH 6.8 olan fosfat tampon ilave edilip karıştırıldı, 15-20 dk rpm 2000-3000 devirde santrifüj edildi. Üst kısım dökülüp, sedimente 1-2ml fosfat tampon eklenip, vorteksenerek süspansiyon haline getirildi.

**Örneğin inokülasyonu:** Çalışma öncesi test edilmiş 12B şişesine 0.1 ml PANTA ilave edildi. Sonra sabit iğneli tüberkülin enjektörü ile işlenmiş örnek 0.1-0.4 ml 12B şişesine ilave edildi. Steril örnekler dekontamine edilmeden direkt olarak 12B şişesine inoküle edildi. Kan, BOS, kemik iliği gibi materyaller steril kabul edilip 13A besiyerine direkt inoküle edildi. Üreme durumunda 12B besiyerine subkültür yapılarak antibiyotik duyarlılık testine alındı.

**Aside dirençli basilin saptanması:** İşlenen örneğin Bactec ekimi yapıldığı esnada bir lam üzerine yayılarak kurumaya beklenip alevde tespiti yapıldı. EZN yöntemi ile boyanarak preparatın kuruması beklendi. Preparat üzerine immersiyon damlatılarak mikroskopta 100x büyütme ile incelendi. ARB açısından pozitif yada negatif olarak rapor edildi.

**İnkübasyon ve üremenin saptanması:** Örnekler 37±1°C'de inkübe edilerek bir gün ara ile test edildi. Bİ değerleri takip edildi. Bİ ≥10 olanlar pozitif olarak kabul edildi ve günlük takibe alındı. Ani Bİ artışları (genellikle 999) kontaminasyon olabileceği ihtimali ile %5 kanlı agar besiyerine ekildi. Eğer kontaminasyon var ise dekontaminasyona tabi tutuldu. Aynı şekilde 0.1 ml PANTA eklenen 12B şişesine 0.1-0.4 ml şeklinde inoküle edildi. Bİ ≥100 olduğunda EZN boyama yöntemi ile ARB aramak için lamlar üzerine bir miktar insan serumu ile bir miktar tüberkülin enjektörü ile 12B şişesinden çekilen örnek karıştırılıp kurumaya bırakıldı. Alevde tespitten sonra boyama yapıldı. Hazırlanan preparat, immersiyon yağı damlatılarak 100x objektifle incelendi. Preparat basil morfolojisi açısından MOTT basillerinin *M. tuberculosis*'ten ayırımında yardımcı olabilir. Nitekim *M. tuberculosis* (*M. bovis*, *M. kansasii*) yılanvari şeritler ve kümeler oluşturmuş olarak gözlenirken, diğer mikobakterilerin gevşek kümeler veya tek hücre halinde görülürler

**NAP testi:** TB komplekse ait mikobakterileri MOTT basillerinden ayırt etmek için NAP testi kullanıldı. NAP, TB komplekse ait bakterileri inhibe ederek üremelerini

engeller. Bactec sisteminde, NAP testi için içerisinde 5 µg/ml olan bir disk olan özel bir şişe vardır. Günlük Bİ 50-100 bulunduğunda, kültür aşağıdaki şekilde sonlandırılarak 1 ml alınıp NAP şişesine inoküle edildi. Diğer Bİ değerleri için NAP testine alınırken dilüsyon uygulandı.

50-100	dilüsyon yapılmadı.		
101-201	0.8 ml	taze	12B şişesine
201-400	0.6 ml	taze	12B şişesine
401-600	0.4 ml	taze	12B şişesine
601-800	0.3 ml	taze	12B şişesine
801-900	0.2 ml	taze	12B şişesine
999'dan>	0.1 ml	taze	12B şişesine alındı.

Dilüsyon yapılan şişe kontrol şişesi olarak kabul edildi. NAP testinin takibinde aşağıdaki kriterler göz önüne alındı.

**TB kompleks için;** Ekimden sonra Bİ'de arka arkaya iki azalma. İlk iki günde hafif, fakat belirgin artma olmaması ve sonra Bİ'da artma olmaması veya azalma.

**MOTT basilleri için;** 4 gün içinde 400'ün üzerinde günlük Bİ artışı, hafif azalma veya hiç artış olmaması (ilk 1-3 günde), sonra birbirini takip eden iki günde belirgin artış olması.

NAP testi ile TB kompleks olarak değerlendirilen örnekler duyarlılık testine alındı.

#### **Bactec Duyarlılık testi:**

##### **Çalışma prosedürü:**

**A. Antibiyotik solüsyonunun hazırlanması:** Bactec SİRE kitinden INH, RIF, EMB ve STM stok solüsyonları hazırlandı. (Çalışmada kullanılan ilaç konsantrasyonları NCCLS'in önerdiği konsantrasyonlardır.)

**Izoniazid solüsyonu hazırlama:** Liyofilize antibiyotik şişesi alkollü pamukla silindikten sonra 5 ml steril deiyonize su eklenip tamamen çözününceye kadar karıştırıldı. Stok solüsyonlar insülin enjektörlerine 0.1 ml çekilerek -20°C'de maksimum 3 ay kadar saklandı. 12B şişesine eklendiğinde 0.1 µg/ml son konsantrasyon sağlandı.

**Rifampisin solüsyonu hazırlama:** Liyofilize antibiyotik şişesi alkollü pamukla silindikten sonra 5 ml steril deiyonize su eklenip tamamen çözününceye kadar karıştırıldı. Stok solüsyonlar insülin enjektörlerine 0.1 ml çekilerek -20°C'de

maksimum 3 ay kadar saklandı. 12B şişesine eklendiğinde 2 µg/ml son konsantrasyon sağlandı.

**Etambutol solüsyonu hazırlama:** Liyofilize antibiyotik şişesi alkollü pamukla silindikten sonra 5 ml steril deiyonize su eklenip tamamen çözününceye kadar karıştırıldı. Sonradan 10 ml steril deiyonize su eklenerek 1/3 dilüsyonu yapıldı. Stok solüsyonlar insülin enjektörlerine 0.1 ml çekilerek -20°C'de maksimum 3 ay kadar saklandı. 12B şişesine eklendiğinde 2.5 µg/ml son konsantrasyon sağlandı.

**Streptomisin solüsyonu hazırlama:** Liyofilize antibiyotik şişesi alkollü pamukla silindikten sonra 5 ml steril deiyonize su eklenip tamamen çözününceye kadar karıştırıldı. Sonradan 10 ml steril deiyonize su eklenerek 1/3 dilüsyonu yapıldı. Stok solüsyonlar insülin enjektörlerine 0.1 ml çekilerek -20°C'de maksimum 3 ay kadar saklandı. 12B şişesine eklendiğinde 2 µg/ml son konsantrasyon sağlandı.

Antibiyotik solüsyonları oda ısısında eritildikten sonra kullanıldı. Tekrar dondurup kullanmak potens kaybına neden olacağından bu uygulamadan kaçınıldı.

Duyarlılık testine alınan primer ilaçlar ve son konsantrasyonları Tablo 4'de görülmektedir.

Tablo 4: Duyarlılık testine alınan primer ilaçlar ve son konsantrasyonları

İLAÇLAR	STOK	SON
İzoniazid	4 µg/ml	0.1 µg/ml besiyeri
Rifampin	80 µg/ml	2.0 µg/ml besiyeri
Etambutol	300 µg/ml	2.5 µg/ml besiyeri
Streptomisin	240 µg/ml	2 µg/ml besiyeri

#### **B. Bactec 12B şişelerinin etiketlenmesi:**

1. Her bir antibiyotik duyarlılık testi için beş adet 12B şişesi ve bir adet dilüsyon sıvısı şişesi hazırlandı.
2. Tüm şişelerin üzerine hasta protokol numarası yazıldı.
3. Beş adet 12B şişesinin birine kontrol, dördüne ise çalışılacak dört antibiyotiğin ismi yazıldı.

#### **C. Antibiyotik içeren besiyerlerinin hazırlanması:**

Dört antibiyotiğin her birinden 0.1 ml tüberkülin enjektörüyle, her birinin üzerinde antibiyotiğin ismi yazan dört ayrı Bactec 12B şişesine eklendi.

#### **D. İnokulum hazırlanması:**

1. Primer izolasyon şişesi yada NAP kontrolü olarak kullanılan şişeler inokulum olarak alındı
2. 500-800'e kadar yükselen Bİ'e sahip pozitif şişeler ilaç duyarlılık testi için direkt kullanıldı.
3. Bİ 800'den fazla ise, 1 ml pozitif kültüre 1 ml DF sıvısı ilave edilerek kültür 1/2 oranında sulandırıldı. İyice vorteksle karıştırıldıktan sonra duyarlılık testi için kullanıldı.

#### **E. İnokülasyon ve inkübasyon:**

1. Test edilerek %5 CO<sub>2</sub>'li ortam sağlanmış dört adet antibiyotikli ve bir adet antibiyotiksiz kontrol besiyeri sıralandı.
2. Şişeler %70 alkollü pamukla silinerek dezenfekte edildi.
3. İnokulum süspansiyonu (Bİ>500 12B şişesi) iyice vortekslenip karıştırıldıktan sonra bir tüberkülin enjektörü ile 0.1 ml dilüe edilmemiş süspansiyonu ilaç içeren dört adet 12B şişesine inokule edildi.
4. DF ile 1:100 oranda dilüe edilmiş süspansiyondan 0.1 ml'yi kontrol şişesine inokule edildi.
5. Alkollü pamukla dezenfekte edildi.
6. Şişeler 35±1°C de karanlıkta inkübe edildi

#### **F. Sonuçların okunması:**

1. Pazartesi antibiyotik duyarlılığı çalışılan örneklere günlük okuma programı uygulandı.
2. Her gün yaklaşık olarak aynı saatlerde okutuldu.
3. En az 4 gün okutuldu (5 gün inkübasyon)
4. Kontrol şişesi Bİ ≥30 oluncaya kadar takip edildi.
5. Kontrol şişesinin Bİ değeri dört günden önce ≥30 olursa, sonuçları yorumlamadan önce bir gün daha inkübe edildi.
6. Kontrol şişesinin Bİ değeri 14 günlük inkübasyondan sonra 30'a ulaşmazsa test tekrar edildi.

#### **G. Yorumlama:**

1. Kontrol ve ilaç içeren şişelerin, bir gün önceyle karşılaştırılarak Bİ farkları ( $\Delta Bİ$ ) hesap edildi.
2. Sonuçların yorumu:

Kontrol şişesi  $\Delta B\dot{I} >$  ilaçlı şişenin  $\Delta B\dot{I} =$  Duyarlı

Kontrol şişesi  $\Delta B\dot{I} <$  ilaçlı şişenin  $\Delta B\dot{I} =$  Dirençli

Kontrol şişesi  $\Delta B\dot{I} =$  ilaçlı şişenin  $\Delta B\dot{I} =$  Sınırdaki veya kısmi direnç (Sınırdaki sonuçlar söz konusu olduğunda, şişeleri ek olarak 2-3 gün daha okutarak, ek okumalarla duyarlı veya dirençli yönünde bir trendin yakalanması sağlandı.)

**İlaç duyarlılık test sonuçlarından örnekler:** İlaç duyarlılık test sonuçları Tablo 5'de görülmektedir.

Tablo 5. ilaç Duyarlılık Test Sonuçları

	GÜN/Bİ					Sonuçlar
	1	2	3	4	$\Delta B\dot{I}$	
Kontrol	3	10	23	46	+23	
Streptomisin	52	82	79	76	-3	S
İzoniazid	41	92	215	581	+266	R
Rifampisin	29	78	181	476	+295	R
Etambutol	75	82	68	72	+4	S

**Bactec 460 TB cihazının kalite kontrolü:** Standart olarak hazırlanmış radyoaktif  $^{14}\text{C}$  çözeltisinden (20 ml bikarbonat çözeltisi içinde  $1\mu\text{Ci } ^{14}\text{C}$  içerir) 0.2 ml alınarak, 10 ml 2N HCl içeren asit şişesine aktarılmıştır. Miktarı bilinen  $^{14}\text{CO}_2$ 'in serbest kalması için, asit şişesi yaklaşık 10 saniye çalkalanmış ve bu süre sonunda Bactec cihazında  $^{14}\text{CO}_2$  miktarı kontrol edilmiştir.  $B\dot{I}=50-60$  değeri elde edildiğinde 12B besiyerinin kontrol işlemi gerçekleştirilmiştir.  $B\dot{I}=50-60$  değeri elde edilmediğinde yukarıdaki işlem tekrarlanmıştır.

### PROPORSİYON YÖNTEMİ:

#### Materyaller:

#### Besiyerleri ve çözeltiler:

1. Middlebrook 7H10 agar besiyeri toz halinde(25°C).
2. Oleik asit, albumin, dekstroz, katalaz (OADC) supplementi (2-8°C).
3. Albumin,dekstroz, katalaz (ADC) supplementi (2-8°C).
4. Gliserol (25°C).
5. Antibiyotik stok solusyonları (Etambutol, izoniazid, rifampisin,streptomisin) (-20°C).

6. 7H9 Middlebrook besiyeri (2-8°C).
7. Dimetil sülfoksit (Rifampisin için çözücü 25°C).
8. Steril distile su (25°C).

**Rutin laboratuvar yöntemleri:**

1. Dört kadranlı steril plastik petri.
2. McFarland 1.0 bulanıklık standardı.
3. Farklı hacimlerde erlen, mezür ve steril serolojik pipetler.
4. Standart hacim damlatan dereceli steril plastik pastör pipetleri.

**Cihazlar:**

1. Otomatik pipetleme cihazı.
2. Bek ve ısı yayıcı tabla.
3. Benmari.
4. Vorteks karıştırıcı.
5. %5-10 CO<sub>2</sub> 35-37°C etüv.
6. Güvenlik kabini.
7. Miknatıslı karıştırıcı.

**Agar proporsiyon yönteminde kullanılan ilaç dilüsyonlarının hazırlanması:**

Bu çalışmada TB kompleks kökenlerinin INH, RIF, EMB ve STM'e karşı duyarlılıkları test edildi.(Çalışmaya alınan ilaç konsantrasyonları NCCLS'in önerdiği konsantrasyonlardır.) Sigma firması tarafından üretilen ve liyofilize toz halinde ambalajlanmış ilaçlar kullanıldı (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Almanya). İlaçların ambalajı açıldıktan sonra geriye kalan toz ışık almayacak şekilde ve oda sıcaklığında vakumlu desikatör içinde saklandı. Bu yöntemde besiyeri olarak 7H10 agar besiyeri kullanıldı. Hazırlanan besiyeri dört eşit bölmeye ayrılmış 90 mm çaplı steril plastik plaklara (Felsen plakları) döküldü. Stok antibiyotik solüsyonu hazırlanırken; gereken miktarın biraz fazlası toz antibiyotik tartıp, istenen antibiyotik konsantrasyonu elde etmek için gereken hacim hesaplanması önerilmektedir.

$$\text{Hacim (ml)} = \text{Ağırlık (mg)} \times \text{Potens } (\mu\text{g/g}) / \text{İstenilen konsantrasyon } (\mu\text{g/g}).$$

**Stok antibiyotik solüsyonlarının saklama koşulları:** 10.000  $\mu\text{g/ml}$  şekilde hazırlanan ilaç solüsyonları hacmi 2 ml olan steril ağzı kapaklı plastik eppendorf tüplerine bölünerek üzeri etiketlenip -80°C'de maksimum 6 ay boyunca saklandı.

Çalışmadan önce ilaçlar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'den alınıp oda sıcaklığında çözünür çözülmez kullanıldı. Çalışmadan artan çözünmüş ilaçlar tekrar kullanılmadı.

**1. İzoniazid solüsyonunun hazırlanması:** Potensi  $1000\ \mu\text{g/g}$   $100\ \text{mg}$  ( $100.000\ \mu\text{g}$ ) İNH  $10\ \text{ml}$  steril distile su içinde eritildi. Böylece mililitresinde  $10.000\ \mu\text{g}$  İNH olan solüsyon elde edildi. Solüsyon  $0.22\ \mu\text{m}$ 'lik membran filtresinden geçirilerek sterilize edildi. Mililitresinde  $10.000\ \mu\text{g}$  İNH olan solüsyondan  $1\ \text{ml}$  alınarak  $9\ \text{ml}$  steril distile su içinde eritilerek mililitresinde  $1000\ \mu\text{g}$  İNH olan solüsyon elde edildi. Mililitresinde  $1000\ \text{mg}$  İNH olan solüsyondan  $1\ \text{ml}$  alınarak  $9\ \text{ml}$  steril distile su içinde eritildi. Böylece mililitresinde  $100\ \mu\text{g}$  İNH olan solüsyon elde edilmiş oldu.

$100\ \mu\text{g/ml}$  solüsyonundan  $0.4\ \text{ml}$  alınarak  $55^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulmuş  $200\ \text{ml}$  Middlebrook 7H10 agar besiyerine eklenip mililitresinde  $0.2\ \mu\text{g}$  İNH olan besiyeri elde edildi.

**2. Rifampisin solüsyonunun hazırlanması:** Potensi  $1000\ \mu\text{g/g}$

$100\ \text{mg}$  ( $100.000\ \mu\text{g}$ ) RIF  $10\ \text{ml}$  steril dimethyl sulfokside (DMSO) içinde eritildi. Böylece mililitresinde  $10.000\ \mu\text{g}$  RIF olan solüsyon elde edildi. Solüsyon  $0.22\ \mu\text{m}$ 'lik membran filtresinden geçirilerek sterilize edildi. Mililitresinde  $10.000\ \mu\text{g}$  RIF solüsyondan  $1\ \text{ml}$  alınarak  $9\ \text{ml}$  steril distile su içinde eritilerek mililitrede  $1000\ \mu\text{g}$  RIF olan solüsyon elde edildi.

Bu solüsyondan  $0.2\ \text{ml}$  alınarak  $55^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulmuş  $200\ \text{ml}$  besiyerine eklendi. Böylece mililitresinde  $1\ \mu\text{g}$  RIF olan besiyeri elde edilmiş oldu.

**3. Etambutol solüsyonunun hazırlanması:** Potensi  $1000\ \mu\text{g/g}$

$100\ \text{mg}$  ( $100.000\ \mu\text{g}$ ) EMB  $10\ \text{ml}$  steril distile su içinde eritildi. Böylece mililitrede  $10.000\ \mu\text{g}$  EMB olan solüsyon elde edildi. Solüsyon  $0.22\ \mu\text{m}$ 'lik membran filtresinden geçirilerek sterilize edildi. Mililitresinde  $10.000\ \mu\text{g}$  EMB olan solüsyondan  $1\ \text{ml}$  alınarak  $9\ \text{ml}$  distile steril su içinde eritildi ve ml'sinde  $1000\ \mu\text{g}$  EMB olan solüsyon elde edildi.

Bu solüsyondan  $1\ \text{ml}$  alınarak  $55^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulmuş  $200\ \text{ml}$  besiyerine eklendi. Böylece mililitresinde  $5\ \mu\text{g}$  EMB olan besiyeri elde edilmiş oldu.

**3. Streptomisin solüsyonu hazırlanması:** Potensi= $800\ \mu\text{g/g}$

$125\ \text{mg}$  dihidrostreptomisin-sülfat  $10\ \text{ml}$  steril distile su içinde eritildi. Böylece  $10.000\ \mu\text{g/ml}$  olan solüsyon elde edildi. Solüsyon  $0.22\ \mu\text{m}$ 'lik membran filtresinden geçirilerek sterilize edildi  $10.000\ \mu\text{g/ml}$ 'lik bu solüsyondan  $1\ \text{ml}$  alınarak  $9\ \text{ml}$  steril distile su üzerine eklendi ve  $1000\ \mu\text{g/ml}$  olan solüsyon elde edildi.  $1000\ \mu\text{g/ml}$ 'lik bu



solüsyondan 0.4 ml alınarak 55°C'ye kadar soğutulmuş 200 ml besiyerine eklendi. Böylece mililitresinde 2 µg streptomisin olan besiyeri elde edildi.

**Agar proporsiyon yönteminde kullanılan besiyerlerinin hazırlanması:**

**Üreme kontrolü besiyerlerinin hazırlanması:** Agar proporsiyon yönteminde besiyeri olarak dehidrate Middlebrook 7H10 agar kullanıldı (Difco, Becton Dickinson Microbiology Systems, ABD). 900 ml distile suya 19 gr dehidrate Middlebrook 7H10 agar besiyeri ve 5 ml gliserol eklenerek eritildi. Cam balon içine bir adet mıknatıs çubuğu atıldı. Otoklavda 121°C'de 15 dakika bekletilerek sterilize edildi. Soğumaya bırakılan besiyerinin sıcaklığı 50-55°C'ye geldiğinde içine 100 ml steril Bacto Middlebrook OADC (Difco) sıvısından eklendi. Mıknatıslı karıştırıcıda 2-3 dakika karıştırıldı. Böylece antitüberküloz içermeyen Middlebrook 7H10 besiyeri elde edilmiş oldu. Üreme kontrolü amacıyla ekim yapılacak Felsen plaklarına bu besiyerinden 5'er ml döküldü. Besiyeri dökülmüş plaklar ışık geçirmeyen poşet içine konularak 2-8°C'de en fazla 1 ay süreyle saklandı.

**Antibiyotik içeren besiyerlerinin hazırlanması:** Agar proporsiyon yönteminde besiyeri olarak dehidrate Middlebrook 7H10 agar kullanıldı. 900 ml distile suya 19 g dehidrate Middlebrook 7H10 agar besiyeri ve 5 ml gliserol eklenerek eritildi. 180'er mililitrelik hacimlerde mezür yardımıyla 5 ayrı erlenmayere dağıtıldı. Cam balonların içine bir adet mıknatıs çubuğu atıldı. Otoklavda 121°C'de 15 dakika bekletilerek sterilize edildi. Soğumaya bırakılan besiyerinin sıcaklığı 50-55°C'ye geldiğinde her erlenmayere 20 ml steril Bacto Middlebrook OADC sıvısından ve Tablo 6'da gösterilen dilüsyonu hazırlanmış ilaçlardan yine Tablo 6'da belirtilen miktarlarda eklendi. Mıknatıslı karıştırıcıda 2-3 dakika karışım sağlandı. Böylece çeşitli konsantrasyonlarda antitüberküloz ilaç içeren Middlebrook 7H10 agar besiyeri elde edilmiş oldu. Bu besiyerlerinden Felsen plaklarının her bir bölmesine 5'er ml olacak şekilde dispenser yardımıyla dağıtıldı. Besiyeri dökülmüş plaklar ışık geçirmeyen poşet içine konup 2-8°C'de en fazla 1 ay süre ile saklandı.

Tablo 6. Middlebrook 7H10 besiyerine eklenmek üzere hazırlanan birinci seçenek dört antitüberküloz ilacın dilüsyonları, besiyerine eklenen miktarları ve besiyeri içindeki son konsantrasyonları

İLAÇLAR	İlaç konsantrasyonları (µg/ml)	200ml 7H10 agar besiyerine eklenecek ilaç (ml)	Besiyerindeki son ilaç konsantrasyonları (µg/ml)
Izoniazid	100	0.4	0.2
Rifampisin	1000	0.2	1
Etambutol	1000	1	5
Streptomisin	1000	0.4	2

**İnokülüm hazırlanması;** Toz halde bulunan Middlebrook 7H9 brothdan (Difco) 4.7 g tartılıp cam balon içerisine konup, 2 ml gliserol eklendi ve 900 ml distile su ilave edilip karıştırılarak erimesi sağlandı. pH'ı  $6.8 \pm 0.2$ 'e ayarlanıp  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika otoklavlandı.  $45^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğuması beklenip içine Bacto Midlebrook ADC (Difco) sıvısından 100 ml eklendi. Miknatıslı karıştırıcıda iyice karışması sağlanarak dispenser yardımıyla ağız vida kapaklı tüplere 10 ml olacak şekilde dağıtıldı. Kullanılincaya kadar  $8^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi. Bactec 460 TB sisteminde Bİ 999 okuyan her örnek steril şartlarda  $500 \mu\text{l}$  alınarak, tüp içinde bulunan 10 ml 7H9 broth içine inoküle edildi. Sonra  $37^{\circ}\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda inkübe edildi. Her gün, günde iki defa olmak üzere vortekslenerek partikül oluşumunun engellenmesi sağlandı. Yaklaşık 20-25 günde 1 McFarland standardı sağlandı.

**Agar proporsiyon yöntemi inokülasyonu:** McFarland No:1 ( $10^7$ ) bulanıklığına sahip bakteri süspansiyonu kullanılarak steril distile su ile steril ağız vida kapaklı 50 mililitrelik tüplerde  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  dilüsyonları hazırlandı. Üreme kontrolü olarak kullanılmak üzere hazırlanan antitüberküloz ilaç eklenmemiş Middlebrook 7H10 agar besiyeri içeren ve 4 bölümlü Felsen plaklarına dökülmüş besiyerlerinin bir çeyreğine  $10^{-2}$  bakteri dilüsyonundan diğer çeyreğine  $10^{-4}$  bakteri dilüsyonundan doppler yöntemi ile 3'er damla (0.1 ml) bakteri süspansiyonu ekildi. Aynı şekilde hazırlanmış ancak duyarlılık testinde kullanılacak antitüberküloz ilaçlardan herhangi birini içeren Middlebrook 7H10 agar besiyeri içeren plaklara da aynı yöntemle ekim yapıldı. Sonuç

olarak bir tüberküloz kökeni için  $10^{-2}$  ve  $10^{-4}$  dilüsyonlarından ayrı ayrı birer adet ilaçsız üreme kontrol çeyreği 4'er adet ilaçlı çeyreğe ekim yapılmış oldu (Tablo 7)

Tablo 7: Agar proporsiyon yönteminde inokülasyon için konsantre edilen bakterilerin dilüsyonları ve inokülasyon miktarı

	Kontrol çeyreği	İlaçlı çeyrek
McF: No:1'in $10^{-2}$ dilüsyonu	0.1 ml	0.1 ml
McF: No:1'in $10^{-4}$ dilüsyonu	0.1 ml	0.1 ml

Yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan plakların üzerine örneklerin protokol numaraları, inokülasyon yapıldığı tarih, ilacın adı ve konsantrasyonu yazıldıktan sonra plakların etrafı parafilmle kapatılıp, karanlıkta  $37^{\circ}\text{C}$ 'de ve %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda 21 gün inkübe edildi.

#### **Agar proporsiyon yönteminde test sonuçlarının okunması:**

Haftada bir kez (Pazartesi) olmak üzere üç hafta plaklar gözlemlendi ve gerekli olduğu durumlarda koloni mikroskopu ile kontrol edildi. İlaçsız kontrol bölmesinde üreyen bakterinin koloni sayısı 50-150 koloni miktarına ulaştığında 21 günlük sürenin dolması beklenmeden test değerlendirildi. Eğer 21 günün sonunda kontrol çeyreğinde üreyen bakterinin koloni sayısı 50 koloniden az ise test geçersiz kabul edilerek tekrarlandı

**Agar proporsiyon yönteminde değerlendirme:** İlaçsız ve ilaçlı çeyreklerde üremiş koloniler sayılıp aşağıda belirtilen formül kullanılarak test edilen kökenin kullanılan ilaca karşı olan duyarlılığı saptandı.

Direnç = Antibiyotikli çeyrekteki koloni sayısı / Kontrol çeyreğindeki koloni sayısı x 100. Eğer bu oran %1 veya %1'in üzerinde ise test edilen antitüberküloz ilaca karşı dirençli olarak kabul edildi.

#### **ÇALIŞMADA KULLANILAN MATERYALLERİN İÇERİKLERİ:**

##### **PANTA:**

Polimiksin B = 50 ü/ml

Amfoterisin B = 5 µg/ml

Nalidiksik Asit = 20 µg/ml

Trimetoprim = 5 µg/ml

Azlosilin = 10 µg/ml

PANTA liyofilize halde bulunmaktadır. 2-8°C'de saklanır, 5 ml çözücü sıvı ile çözüldükten sonra 0.1 ml insülin enjektörlerine çekilip -20°C'de saklandı.

**%4'lük NaOH:**

4 g toz haldeki NaOH 100 ml distile suda eritilip 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

**%2.9'lük Na Sitrata:**

2,9 g toz haldeki Na sitrat 100 ml distile suda eritilip 121°C de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

**Fosfat tampon solüsyonu:**

pH 6.8 olacak şekilde steril şartlarda disodyum fosfat ve monopotasyum fosfat solüsyonu eşit miktarda karıştırılarak kullanıldı.

**Disodyum fosfat:**

Toz haldeki 9.47 g disodyum fosfat 1000 ml distile suda eritilip 121°C de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi.

**Monopotasyum fosfat:**

Toz haldeki 9.07 g monopotasyum fosfat 1000 ml distile suda 121°C de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

**7H12 besiyeri içeriği:**

7H9 Broth base	%0.47
Kazein hidrolizat	%0.10
Bovin serum albumin	%0.5
Katalaz	192 ünite
<sup>14</sup> C-substrat	4 uci
Deiyonize su	4 ml
Son pH	6.8±0.2

**13A besiyeri:**

7H9 Broth base	%0.47
Kazein hidrolizat	%0.1
Polisorbat 80	%0.02
Sodyum polianethole sulfonat	%0.025
C-substrat	1440 ünite
Deiyonize su	30 ml

13 A besiyeri zenginleştiricisi: İnek serum albumin	%15.0
Deiyonize su	10 ml

**Dilüsyon Sıvısı (DF):**

%0.2 yağ asidi bovin serum albumini ve %0.02 polisorbitat 80'in distile veya deiyonize suda eritilerek pH'sı  $6.8 \pm 0.2$ 'ye ayarlanarak hazırlanır. Bu sıvı  $0.22 \mu\text{m}$  filtre kullanılarak sterilize edilir.

**Middlebrook 7H 9 sıvı besiyerinin içeriği:**

L-glutamik asitin sodyum tuzu	0.5 g
Amonyum sülfat	0.5 g
Sodyum sitrat	0.1 g
Pridoksin	1 mg
Biotin	1 mg
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	2.5 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 g
Ferik amonyum sitrat	0.04 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.5 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1 mg
Distile su	900 ml
ADC	100 ml
Gliserol	2 ml

**Middlebrook 7H10 agar besiyeri içeriği:**

Amonyum sülfat	0.5 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.5 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1.5 g
Sodyum Sitrat	1 g
Magnezyum sülfat	0.025 g
$\text{CaCl}_2$	0.0005 g
$\text{ZnSO}_4$	0.001 g
$\text{CuSO}_4$	0.001 g

L-Glutamik asit	0.5 g
Ferik amonyum sitrat	0.04 g
Piridoksin	0.001 g
Biotin	0.0005 g
Malaşit yeşili	0.00025 g
Agar	15 g
Distile su	900 ml
pH: 6.6	
Gliserol	5 ml
OADC	100 ml

**OADC:** 100 ml'sinde 0.05 g oleik asit, 5 g albumin, 2 g dekstroz, 0.85 g NaCl ve 0.004 g katalaz içerir. Çözelti 0.45 µm por çaplı membran fitreden süzülerek steril hale getirilir.

**ADC:** 100 ml'sinde 5 g albumin, 2 g dekstroz, 0.85 g NaCl ve 0.004 g katalaz içerir. Çözelti 0.45 µm por çaplı membran fitreden süzülerek steril hale getirilir.

**McFarland 1 standardı:** 9.9 ml saf H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + %1.175'lik 0.1 ml BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O

## BULGULAR

Bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden Bactec yöntemi ile soyutlanan 104 TB kompleks kökeninin birinci seçenek antitüberküloz ilaçlara (INH, RİF, EMB ve STM) karşı duyarlılıkları Bactec yöntemi ve Agar proporsiyon yöntemi ile karşılaştırmalı olarak incelendi.

Bu çalışmada kullanılan 104 örneğin 2'si (%1.92) infeksiyon hastalıkları, 8'i (%7.69) pediatri, 86'sı (%82.70) göğüs hastalıkları ve 8'i (%7.69) de diğer kliniklerden laboratuvarımıza gönderilmiştir. Tablo 8'de örneklerin gönderildiği klinikler görülmektedir.

Tablo 8. Örneklerin gönderildiği kliniklere göre dağılımı

SERVİSLER	ÖRNEK SAYISI	%
İnfeksiyon	2	1.92
Pediatri	8	7.69
Diğer *	8	7.69
Göğüs Hastalıkları	86	82.70

\*: Dermatoloji, Kalp Damar Cerrahisi, Onkoloji, Nöroloji

Örneklerin 73'ü (%70.44) balgam, 9'u (%8.90) bronkoalveolar lavaj mayii, 4'ü (%4.08) plevra mayi, 2'si (%1.92) perikard mayi, 3'ü (2.88) trakeal aspirat, 8'i (%7.94) açlık mide suyu, 2'si (%1.92) beyin omurilik sıvısı, 1'i (%0.96) idrar ve 1'ini (%0.96) de abse materyali oluşturmaktadır. Çeşitli kliniklerden gönderilen örneklerin türlere göre dağılımı Tablo 9'da görülmektedir.

Tablo 9. Örneklerin türlere göre dağılımı

ÖRNEK TÜRÜ	ÖRNEK SAYISI	%
Balgam	73	70.44
Bronkoalveoler Lavaj	9	8.90
Plevra mayii	4	4.08
Perikard mayii	2	1.92
Trakeal Aspirat	3	2.88
Açlık mide suyu	8	7.94
Beyin omurilik sıvısı	2	1.92
İdrar	1	0.96
Abse	1	0.96

Örneklerin EZN yöntemi ile saptanan ARB sonuçları ise, 38'inde (%36.54) pozitif, 66'sında (%63.46) negatif olarak bulundu. Çeşitli kliniklerden gönderilen örneklerin ARB sonuçları Tablo 10'da görülmektedir.

Tablo 10. Örneklerin ARB sonuçları

ARB SONUCU	SAYI	%
ARB pozitif	38	36.5
ARB negatif	66	63.5
Toplam	104	100

Agar proporsiyon yönteminde; 104 kökenin 79'u (%75.96) izoniazidin 0.2µg/ml'sine duyarlı olarak bulunurken, 25 köken (%24.04) izoniazidin aynı konsantrasyonuna dirençli olarak saptandı. Rifampisin'in 1µg/ml'sine karşı, 93 köken (%89.42) duyarlı iken 11 köken (%10.58) dirençli olarak saptandı. Etambutolün 5µg/ml'sine karşı, 77 köken (%74.04) duyarlı iken 27 köken (%25.96) dirençli olarak saptandı. Streptomisin'in 2µg/ml'sine karşı 101 köken (%97.11) duyarlı iken 3 köken (%2.89) dirençli olarak saptandı.

Tüm kökenler içinde toplam 12 kökenin (%11.53) birden fazla ilaca dirence sahip olduğu saptandı. Toplam 7 kökenin (%6.72) iki ilaca, 5 kökenin (%4.81) üç ilaca dirençli olduğu saptanmıştır. Dört ilaca birden dirençli kökene rastlanmamıştır. Agar proporsiyon yönteminde saptanan dört antitüberküloz ilacın duyarlı ve dirençli kökenlere etkinliği Tablo 11'de görülmektedir.



Tablo 11. Agar proporsiyon yönteminde saptanan dört antitüberküloz ilacın duyarlı ve dirençli kökenlere etkinliği

İLAÇLAR	Duyarlı (%)	Dirençli (%)
İsoniazid (0.2 µg/ml)	79 (75.96)	25 (24.04)
Rifampisin (1 µg/ml)	93 (89.42)	11 (10.58)
Etambutol (5 µg/ml)	77 (74.04)	27 (25.96)
Streptomisin (2 µg/ml)	101 (97.11)	3 (2.89)

Bactec yönteminde; 104 kökenin 78'i (%75) izoniazidin 0.1 µg/ml'sine karşı duyarlı iken, 26 köken (%25) izoniazidin aynı konsantrasyonuna karşı dirençli olarak saptandı. Rifampisinin 2 µg/ml'sine karşı 93 köken duyarlı iken 11 köken (%10.58) dirençli olarak saptandı. Etambutolün 2.5 µg/ml'sine karşı 85 köken duyarlı iken 19 köken (%18.27) dirençli olarak saptandı. Streptomisinin 2 µg/ml'sine karşı 101 köken duyarlı iken 3 köken (%2.89) dirençli olarak saptandı.

Tüm kökenler içinde toplam 10 kökenin (%9.6) birden fazla ilaç direncine sahip olduğu saptandı. Toplam 6 kökenin (%5.76) iki ilaca, 4 kökenin (%3.84) üç ilaca dirençli olduğu saptandı. Dört ilaca birden dirençli kökene rastlanmadı. Bactec yönteminde saptanan dört antitüberküloz ilacın duyarlı ve dirençli kökenlere etkinliği Tablo 12'de görülmektedir.

Tablo 12. Bactec yönteminde saptanan dört antitüberküloz ilacın duyarlı ve dirençli kökenlere etkinliği

İLAÇLAR	Duyarlı (%)	Dirençli (%)
İsoniazid (0.1 µg/ml)	78 (75)	26 (25)
Rifampisin (2 µg/ml)	93 (89.42)	11 (10.58)
Etambutol (2.5 µg/ml)	85 (81.73)	19 (18.27)
Streptomisin (2 µg/ml)	101 (97.11)	3 (2.89)

Antibiyotik duyarlılığı için alınan kökenler takip eden günlerde, her gün aynı saatlerde olmak üzere Bactec 460 TB cihazında okutuldu. Kontrol şişesinin Bİ değeri genelde 3-4. günde 30'a ulaştı. Değerlendirme bundan sonra yapıldı. Ancak kontrol Bİ değeri 30'a yükselmemiş veya kontrol ΔBİ ile ilaçlı ΔBİ arasında sınırda değer saptanan kökenlerin takibi 2-3 gün fazla okutularak sonuca varıldı.

Agar proporsiyon yönteminde saptanan, çoklu direnç gösteren kökenlerin ilaç kombinasyonlarına göre dağılımı Tablo 13'de görülmektedir.

Tablo 13. Agar proporsiyon yönteminde saptanan, çoklu direnç gösteren kökenlerin ilaç kombinasyonlarına göre dağılımı

İLAÇLAR	Köken sayısı	%
INH+RIF+EMB	4	3.85
INH+RIF	1	0.96
INH+EMB	5	4.8
INH+RIF+STM	1	0.96
RIF+STM	1	0.96
TOPLAM	12	11.53

Bactec yönteminde saptanan, çoklu direnç gösteren kökenlerin ilaç kombinasyonlarına göre dağılımı Tablo 14'de görülmektedir.

Tablo 14. Bactec yönteminde saptanan çoklu direnç gösteren kökenlerin ilaç kombinasyonlarına göre dağılımı

İLAÇLAR	Köken Sayısı	%
INH+RIF+EMB	3	2.88
INH+RIF	2	1.92
INH+EMB	3	2.88
INH+RIF+STM	1	0.96
RIF+STM	1	0.96
TOPLAM	10	9.6

Bu çalışmada sonuçların değerlendirilmesinde metodolojik araştırmalar kullanılmıştır (Tablo 15). Bu tabloya göre sonuçlar birçok farklı değerlendirmeye tabi tutulabilir, ancak en sık kullanılan değerler sensitivite ve spesivitedir. Bu nedenle çalışmamızın sonuçlarını bildirirken bu değerler göz önüne alınmıştır (53).

Tablo 15. İlaç duyarlılık sonuçlarının karşılaştırılması

YENİ TEST	GEÇERLİ (REFERANS) TEST	
	Hasta	Sağlam
Hasta	A (doğru pozitifler)	B (yanlış pozitifler)
Sağlam	C (yanlış negatifler)	D (doğru negatifler)
Toplam	A+C (toplam hasta sayısı)	B+D (toplam sağlam)

**Sensitivite (duyarlılık):** Gerçekten hasta olan bireylerin test tarafından hangi oranda saptanabildiğini belirten bir olasılıktır. Testin gerçek hastaları ortaya çıkarmakta ne kadar duyarlı olduğunu belirtir (Hasta diye nitelendirilen bu çalışma için dirençli kökenlerdir).

Sensitivite =  $A/A + C \times 100$  = Yeni testin saptadığı hastalar (doğru pozitifler) / Toplam hasta sayısı (geçerli teste göre).

**Spesitivite (özgüllük):** Bir testin gerçekten hasta olmayanları (sağlam) ayırabilme yeteneğini belirten orandır (Sağlam diye nitelendirilen bu çalışma için duyarlı kökenlerdir).

Spesitivite =  $D/B + D \times 100$  = Yeni testin saptadığı sağlamlar (doğru negatifler) / Toplam sağlam sayısı (geçerli teste göre).

Bu çalışmada iki testin birbirine uyumluluğunu göstermek için kullandığımız diğer metodolojik değerler, tutarlılık (genel uyum, güvenilirlik) ve kappa sayısıdır (54).

**Tutarlılık (genel uyum):** İki testin elde ettiği sonuçların birbiriyle ne ölçüde uyumlu olduğunu ölçer.

Genel uyum (tutarlılık) =  $A+D/A+B+C+D$

**Kappa Sayısı ( $\kappa$ ):** Tutarlılığın hesaplamasında kullanılan daha güvenilir bir yöntem Kappa'dır. Gözlenen tutarlılık olasılığı ile beklenen tutarlılık olasılığının farkının değerlendirilmesi temeline dayanır.

**Kappa katsayısı değerlendirme kriterleri:**

$0 < \kappa < 0.20$  Uyumluluk yok

$0.20 < \kappa < 0.40$  Zayıf düzeyde uyumluluk

$0.40 < \kappa < 0.60$  Orta düzeyde uyumluluk

$0.60 < \kappa < 0.80$  Çok iyi (yeterli) uyumluluk

$0.80 < \kappa < 1.00$  Mükemmel düzeyde uyumluluk

İzoniazidin Bactec ve agar proporsiyon yöntemlerinde kökenler üzerindeki etkinliği Tablo 16'da görülmektedir.

Tablo 16. İzoniazidin Bactec ve agar proporsiyon yöntemlerinde kökenler üzerindeki etkinliği

BACTEC	AGAR PROPORSİYON		TOPLAM
	Dirençli	Duyarlı	
Dirençli	25	1	26
Duyarlı	0	78	78
TOPLAM	25	79	104

Sensitivite: %100

Spesitivite: %98.7

Genel uyum: %99

Kappa sayısı: 0.974

Rifampisinin Bactec ve agar proporsiyon yöntemlerinde kökenler üzerindeki etkinliği Tablo 17'de görülmektedir.

Tablo 17. Rifampisinin Bactec ve agar proporsiyon yöntemlerinde kökenler üzerindeki etkinliği

BACTEC	AGAR PROPORSİYON		TOPLAM
	Dirençli	Duyarlı	
Dirençli	11	0	11
Duyarlı	0	93	93
TOPLAM	11	93	104

Sensitivite: %100

Spesitivite: %100

Genel uyum: %100

Kappa sayısı: 1.00

Etambutolün Bactec ve agar proporsiyon yöntemlerinde kökenler üzerideki etkinliği Tablo 18'de görülmektedir.

Tablo 18. Etambutolün Bactec ve agar proporsiyon yöntemlerinde kökenler üzerideki etkinliği

BACTEC	AGAR PROPORSİYON		TOPLAM
	Dirençli	Duyarlı	
Dirençli	19	0	19
Duyarlı	8	77	85
TOPLAM	27	77	104

Sensitivite: %70.4

Spesitivite: %100

Genel uyum: %92.3

Kappa sayısı: 0.779

Streptomisinin Bactec ve agar proporsiyon yöntemlerinde kökenler üzerideki etkinliği tablo 19'da görülmektedir.

Tablo 19. Streptomisinin Bactec ve agar proporsiyon yöntemlerinde kökenler üzerideki etkinliği

BACTEC	AGAR PROPORSİYON		TOPLAM
	Dirençli	Duyarlı	
Dirençli	3	0	3
Duyarlı	0	101	101
TOPLAM	3	101	104

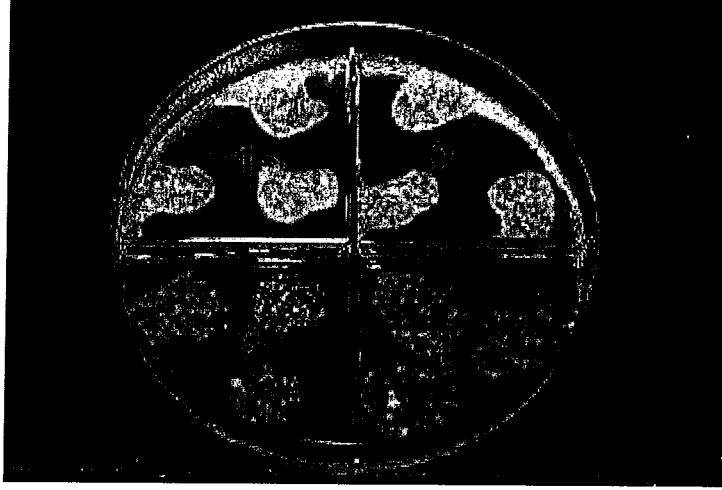
Sensitivite: %100

Spesitivite: %100

Genel uyum: %100

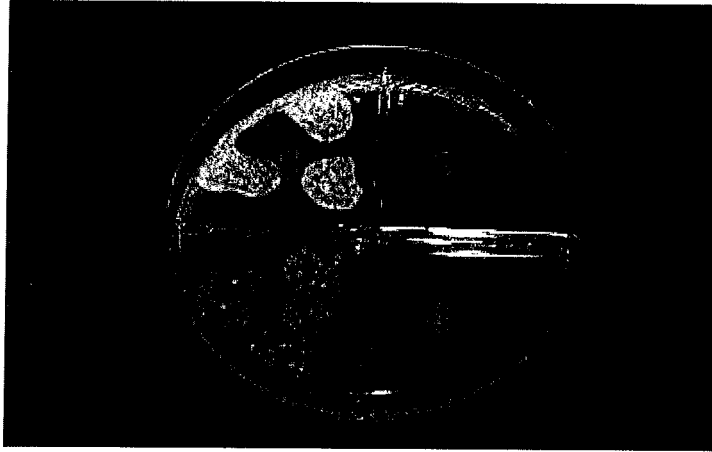
Kappa sayısı: 1.00

Agar proporsiyon yönteminde iki kökenin kontrol besiyerinde üreyen kolonileri Resim 1'de görülmektedir. Kontrol besiyerinin 1 ve 2 nolu çeyrekte bakteri süspansiyonunun  $10^{-2}$  dilüsyonundan hazırlanan inokulumda üreyen yoğun koloniler görülürken, 3 ve 4 nolu çeyrekte ise aynı kökenlerin  $10^{-4}$  dilüsyonundan hazırlanan inokulumda üreyen seyrek koloniler görülmektedir.



**Resim 1.** Agar proporsiyon yönteminde kontrol bölmesinde üreyen kolonilerin görünümü

Agar proporsiyon yönteminde iki kökenin ilaçlı besiyerinde üreyen kolonileri Resim 2'de görülmektedir. INH'ın 0.2  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonunda hazırlanmış ilaçlı besiyerinde iki kökenin duyarlılık durumu: 1 ve 3 nolu çeyrekte üremiş dirençli köken kolonileri görülürken, 2 ve 4 nolu çeyrekte ürememiş duyarlı köken görülmektedir.



**Resim 2.** Agar proporsiyon yönteminde ilaçlı besiyerinde üreyen kolonilerin görünümü

Tablo 20'de ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda saptanan birinci seçenek ilaçların direnç durumu görülmektedir.

Tablo: 20. Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda saptanan birinci seçenek ilaçların direnç durumu

	Yıl	Yöntem	Örnek sayısı	INH (%)	RIF (%)	EMB (%)	STM (%)	İki ilaç (%)	Üç ilaç (%)	Dört ilaç (%)
Arseven ve ark.(59)	1985-1990	L-J	1388	29.6	17.1	23.3	8.8	11.7	6.8	3.9
Arseven ve ark.(59)	1994	L-J	333	34.8	25.2	10.5	29.4	12.9	10.5	7.8
Orhan ve ark.(60)	1998-2001	Bactec	201	13.93	2.98	3.48	1.99	7.96	9.45	0.99
Şenyüz ve ark.(61)	1990-1994	L-J	328	33.2	20.1	5.5	35.3			
Şenyüz ve ark.(61)	1994-2000	Bactec	328	19.8	21.3	4.2	9.4			
Akçalı ve ark.(62)		E test agar proporsiyon	100					5	2	6
Kıbar ve ark.(63)	2000-2001	Bactec MGIT	354	20.90	9.03	5.08	7.62	6.49	3.10	1,12
Balcı ve ark.(64)	1995-1999	Bactec	264	33	18.6	15.9	8.7	10.6	11	0.8
Hasçelik ve ark.(15)	1995-2000	Bactec	2944	8.1	1.3	1.6	2.5	3.26	6.25	2.89
Korkmaz	2002-2003	Bactec	104	25	10.58	18.27	2.89	5.76	3.84	-
Korkmaz	2002-2003	Agar proporsiyon	104	24.04	10.58	25.96	2.89	6.72	4.81	-

Tablo 21'de Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvar'ında değişik yıllarda Bactec yöntemi ile saptanan birinci seçenek ilaçlara direnç durumu görülmektedir.

Tablo 21. Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Bactec yöntemi ile saptanan birinci seçenek ilaçların direnç durumu

	INH (%)	RIF (%)	EMB (%)	STM (%)
Balcı ve ark. (64) 264 örnek	33	18.6	15.9	8.7
Orhan ve ark. (60) 201 örnek	13.9	2.9	3.48	1.99
Korkmaz 104 örnek	25	10.58	18.27	2.89

Tablo 22'de Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda değişik yıllarda Bactec yöntemi ile saptanan çoklu ilaç direnç durumu görülmektedir.

Tablo 22. Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Bactec yöntemi ile saptanan çoklu ilaç direnç durumu

	İki ilaç direnci (%)	Üç ilaç direnci (%)	Dört ilaç direnci (%)
Balcı ve ark. (64) 1995-1999	10.6	11	0.8
Orhan ve ark. (60) 1998-2001	7.96	9.45	0.99
Korkmaz 2002-2003	5.76	3.84	—



## TARTIŞMA

Tüberküloz uzun yıllardır tedavi edilebilen bir hastalık olmasına rağmen halen insanlığı tehdit eden sağlık problemleri arasında ön sıralarda yer almaktadır. DSÖ verileri dünya nüfusunun 1/3'ünün MTB ile infekte olup, şu anda dünyada yaklaşık 30 milyon tüberkülozlu olduğuna, her yıl 8 milyon yeni tüberküloz olgusunun ortaya çıktığına ve yılda yaklaşık 3 milyon kişinin tüberkülozdan öldüğüne işaret etmektedir. Diğer yandan ABD'de yapılan tarama çalışmalarının raporları, özellikle 1985'ten bu yana birden çok ilaca dirençli MTB'nin neden olduğu salgınlardaki artışa dikkati çekmektedir (48).

Tüberkülozun en önemli bulaş yolu, akciğer tüberkülozu olan hastaların balgam ile çıkardığı bakterilerin, sağlıklı kişiler tarafından solunum yolu ile alınmasıdır. Pulmoner tüberkülozun tanısında, hastanın öyküsü, kliniği ve radyolojik bulguları önemli göstergeler olmalarına karşın, kesin tanı için etkenin izolasyonu ve identifikasyonu gereklidir. Bu amaçla, Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen tüberküloz şüpheli örneklerin ARB açısından hızla değerlendirilmesi, izolasyon, identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık testlerinin en kısa süre içinde yapılarak sonucun bildirilmesi, infeksiyöz kişilerin oluşturduğu bulaş zincirinin bir halkadan kırılmasına önemli katkıda bulunmaktadır. Tüberkülozun yayılımının önlenmesinde de bu basamağın önemi büyüktür. Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarları, özellikle infeksiyon zincirinin kırılması noktasında büyük bir sorumluluk taşımaktadır (55).

Bu çalışmaya alınan klinik örneklerin çoğunluğu (% 82.70) Göğüs Hastalıkları kliniğinden laboratuvarımıza gönderilmiştir. Tüberküloz basillinin vücuda girişi solunum yolu ile olmaktadır. Primer infeksiyonun akciğerlerde olduğundan dolayı bu sonuç doğaldır.

Bu çalışmaya alınan 104 klinik örnekten yapılan ARB araştırması sonucunda %36.54 oranında pozitiflik saptanmıştır. Bu konuda çeşitli çalışmalar yapılmış olup, duyarlılık değerleri aralığının çok fazla (%22-80) oluşu dikkat çekmektedir (56,57). Bu çalışmada alınan sonuçlar da bu değerler arasında bulunmuştur. Duyarlılık değerlerindeki aralığın çok fazla oluşu, yayma duyarlılığını etkilemesi nedeniyle, örneğin cinsi, örnekteki basil sayısı ile dekontaminasyon, konsantrasyon ve

dekolorizasyon işlemleri, yayma kalınlıkları, ve değerlendiren kişinin deneyimi gibi kişisel faktörlerle açıklanabilir.

Son 15 yılda özellikle HIV ile infekte hastalarda MDR-tb olgularının hızla artması, bu olguların %40'ının ölmesi ve sağaltımın başarısız olması, hastane kaynaklı bulaşların gözlenmesi, primer ve sekonder ilaç direncinin artması gibi nedenler tüberküloz kontrol çalışmalarını sonuçsuz bırakmıştır (58). Günümüzde tüberküloz tüm insanlık için büyük bir sağlık sorunu olma özelliğini korumaktadır. İlaçlara duyarlı mikobakteriler ile oluşan hastalıklarda uygun ilaç kombinasyonu ile olguların %88-98'nin sağaltılabilmesine karşın, MDR-tb olgularının sağaltımı büyük bir sorun olmaktadır (58). Ülkemizde 1895'lerde başlayıp 1970'li yılların ortasına kadar yapılan sıkı mücadele ile hastalık önemli ölçüde azalmış, ancak daha sonra bu mücadelenin gevşetilmesi ve ilaç direnci nedeniyle tüberküloz mücadelesi başarısızlığa uğramıştır (2). Türkiye tüberküloz yönünden hiperendemik ülkeler grubuna girmektedir. Son yıllarda tüberküloz sıklığının artışı yanında çoklu ilaç direnci de önemli bir sorun oluşturmaktadır (58). Ülkemizde yapılan bazı çalışmalarda şu sonuçlar alınmıştır.

Arseven ve ark. (59) Doğu Karadeniz bölgesinde 1985-1990 yılları arasında balgam kültürü pozitif 1388 hastanın ilaç direncini L-J proporsiyon yöntemini kullanarak araştırmışlardır. 252 olguda (%18.2) bir ilaca, 162 olguda (%11.7) iki ilaca, 95 olguda (%6.8) üç ilaca ve 54 olguda (%3.9) dört ilaca birden direnç bulmuşlardır. 1388 olguda ilaçların her birine karşı toplam direnç oranları, INH, RIF, EMB ve STM için sırasıyla %29.6, 17.1, 8.8 ve 23.3 olarak bulmuşlardır. Aynı araştırmacılar 1994 yılında 333 kültür pozitif tüberkülozlu hastada INH, RIF, EMB ve STM'e karşı ilaç direncini sırasıyla %34.8, 25.2, 10.5 ve 29.4 olarak belirlemişlerdir. Aynı grupta herhangi bir ilaca karşı direnç %45.6, bir ilaca direnç %15, iki ilaca birden direnç %12.9, üç ilaca birden direnç %10.5 ve dört ilaca birden direnç %7.8 oranında bulunmuştur.

Orhan ve ark. (60) 1998-2001 yılları arasında Bactec TB sistemi ile 201 TB kompleks kökeninin antimikobakteriyel duyarlılık testi sonucunda toplam 82 (%40.79) dirençli köken saptamışlardır. Tek ilaca direnç INH, RIF, EMB ve STM'de sırasıyla %13.93, 2.98, 3.48 ve 1.99 olarak saptamışlardır. 16 köken (%7.96) iki ilaca, 19 köken (%9.45) üç ilaca ve 2 köken %0.99 dört ilaca direnç saptamışlardır.

Şenyüz ve ark. (61), 1990-2000 yılları arasında üretilen TB kompleks kökenini, antitüberkülotiklerin kritik ilaç konsantrasyonlarına göre direncini, retrospektif olarak 328 köken L-J proporsiyon, 1994'ten sonra ise 328 köken radyometrik Bactec sistemi

ile araştırmışlardır. L-J proporsiyon ile test edilen 328 TB kompleksi mikobakteri kökeninin 109'u (33.2) INH'e, 66'sı (%20.1) RIF'e 18'i (%5.5) EMB'e ve 116'sı (%35.3) STM'e, Bactec TB sistem ile test edilen 328 TB kompleks kökeninin ise 65'i (%19.8) INH'e, 70'i (%21.3) RIF'e, 14' (%4.2) EMB'e ve 31'i (%9.4) STM'e, dirençli bulunmuştur.

Akçalı ve ark. (62) agar proporsiyon ve E test yöntemi ile karşılaştırmalı olarak 100 köken üzerinde yaptıkları duyarlılık testi sonucunda toplam 19 köken (%19) dirençli olarak saptanmıştır. İki ilaca direnç oranı %5, üç ilaca direnç oranı %2 ve dört ilaca direnç oranı %6 olarak bulmuşlardır.

Kibar ve ark. (63) Ocak 2000-Kasım 2001 arasında 354 MTB köken üzerinde 2000 yılında Bactec 460 TB ve 2001 yılında Bactec MGIT 960 sistemi kullanarak antibiyotik duyarlılık testi çalışmışlardır. 94 köken (%26.55) en az bir ilaca dirençli olarak bulunmuştur. Total direnç oranları INH, RIF, EMB ve STM için sırasıyla %20.90, 9.03, 5.08 ve 7.62 olarak bulmuşlardır. İki yada daha fazla direnç oranı %10.73 olarak bulunmuş. Kökenlerin %15.81'i tek ilaca, %6.49'u iki ilaca, %3.10'u  ilaca, %1.12'si dört ilaca dirençli olarak saptamışlardır. Tek ilaca direnç INH, RIF, EMB ve STM için sırasıyla %10.45, 1.41, 0.84 ve 3.10'du. INH ve RIF'in ikisine birden dirençli köken oranı %7.34 olarak bulunmuştur.

Balcı ve ark. (64) 1995-1999 yılları arasında retrospektif olarak yayma pozitif hastalarda Bactec 460 TB sistemi kullanarak izole ettikleri MTB'nin birinci grup ilaçlara duyarlılığını araştırmışlardır. İzole edilen 264 kökenin totalde 106 tanesini (%40.2) dirençli olarak bulmuşlardır. Bunlardan 47 köken (%17.8) bir ilaca dirençli, 28 köken (%10.6) iki ilaca dirençli, 29 köken (%11.0)  ilaca dirençli, 2 köken (%0.8) dört ilaca dirençli olarak saptamışlardır. Toplam 52 köken (%19.7) MDR-tb olarak bulmuşlardır. Bunlardan 20'si (%7.6) INH+RIF direncine sahipti. INH, RIF, EMB için tek ilaç direnci sırasıyla, %33, 18.6, 15.9 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada %8.7 ile STM en düşük dirence sahip ilaç olarak bulunmuştur.

Hasçelik ve ark. (15) tarafından Türkiye'de yedi merkezin katıldığı 1995-2000 yılları arasında yapılan çalışmada 2944 MTB kökenin antibiyotik duyarlılığını Bactec yöntemi ile çalışılmışlardır. Bu alışmaya Gaziantep Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı sonuçları da katılmıştır. Yapılan alışmada INH, RIF, EMB ve STM için direnç yüzdeleri sırasıyla %8.1, 1.3, 1.6 ve 2.5 olarak bulunmuştur. Çoklu dirençli köken sayısı 498 (%16.99) olarak saptanmıştır. Yapılan alışma sonucunda iki ilaca direnç %3.26,  ilaca direnç %6.52 ve dört ilaca direnç %2.89 olarak bulunmuştur.

Çalışmaya alınan kökenlerin %10.09'u Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Kliniği'ne aitti.

Bu çalışmada Bactec sistemi kullanılarak klinik örneklerden izole edilen 104 adet TB kompleks kökeninin birinci seçenek ilaçlara duyarlılık durumu ile Bactec ve agar proporsiyon yöntemlerine göre dirençli kökenlerin dağılımı şöyle bulunmuştur: Agar proporsiyon yöntemi ile toplam 66 kökenin (%63.46) en az bir ilaca dirençli olduğu, 25 kökenin (%24.04) İNH'e, 11 kökenin (%10.5) RIF'e, 27 kökenin (%25.96) EMB'e, 3 kökenin (%2.89) STM'e dirençli olduğu saptandı. Toplam 7 kökenin (%6.72) iki ilaca, 5 kökenin (%4.81) üç ilaca dirençli olduğu saptanmıştır. Bactec yöntemi ile, toplam 59 kökenin (%56.73) en az bir ilaca dirençli olduğu, 26 kökenin (%25) İNH'e, 11 kökenin (%10.58) RIF'e, 19 kökenin (%18.27) EMB'e, 3 kökenin (%2.89) STM'e dirençli olduğu saptandı. Toplam 6 kökenin (%5.76) iki ilaca, 4 kökenin (%3.84) üç ilaca dirençli olduğu saptandı. Her iki yöntemde de dört ilaca birden dirençli kökene rastlanmamıştır.

Ülkemizde Bactec yöntemi kullanılarak yapılan antibiyotik duyarlılık sonuçları incelendiğinde İNH için direnç oranı %8.1 ile %33 arasında değişmektedir. Bu direnç değerleri RIF için %1.3-%21.3 arasında, EMB için %1.6-%18.27 arasında STM için %1.99-%9.4 arasında değişmektedir (15,60,61,63,64).

Bactec yöntemi ile yapılan çalışmalarda genel olarak İNH en yüksek dirence sahip olup, en düşük direnç STM'e karşı saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda İNH için en düşük direnç %8.1, RIF için en düşük direnç %1.3, EMB için en düşük direnç %1.6 ile Hasçelik ve ark. (15) tarafından saptanmıştır. STM için en düşük direnç %1.99 ile Orhan ve ark. (60) tarafından saptanmıştır.

Bactec yöntemi ile yapılan çalışmalarda İNH için en yüksek direnç %33 ile Balcı ve ark. (64), RIF için en yüksek direnç %21.3 ile Şenyüz ve ark. (61), EMB için en yüksek direnç %18.27 ile bu çalışmada, STM için en yüksek direnç %9.4 ile Şenyüz ve ark. (61) saptamışlardır.

Bactec yöntemi ile yapılan çalışmalarda iki ilaç direnci en yüksek %10.6 ile Balcı ve ark. (64) tarafından, en düşük %3.26 ile Hasçelik ve ark. (15) tarafından saptanmıştır. Üç ilaç direnci %11 ile en yüksek Balcı ve ark. (64), %3.10 ile en düşük Kibar ve ark. (63) tarafından saptanmıştır. Dört ilaç direnci bu çalışmada hiç bulunmamasıyla en düşük, en yüksek ise %2.89 ile Hasçelik ve ark. (15) tarafından saptanmıştır.

Bactec yöntemi ile yapılan bu çalışmada INH, RIF, STM için alınan sonuçlar diğer çalışmalarda alınan sonuçlar arasında bulunmuştur. EMB için saptanan direnç diğerlerinden yüksek çıkmıştır. İki ilaç ve üç ilaca birden direnç oranı diğerlerinden alınan sonuçlarla kıyaslandığında orta seviyede yer almaktadır. Bu çalışmada dört ilaca birden dirençli köken bulunamamıştır.

Ülkemizde proporsiyon yöntemi ile yapılan antibiyotik duyarlılık sonuçları karşılaştırıldığında INH için direnç oranları en düşük %24.04 ve en yüksek %34.8 arasında bulunmuştur. Bu oranlar RIF için %10.58-%25.2 arasında, EMB için %5.5-%25.96 arasında ve STM için %2.89-%35.3 arasında değişmektedir (59,61).

Proporsiyon yöntemi ile INH için en düşük direnç %24.04 oranı ile, RIF için en düşük direnç %10.58 oranı ile, STM için en düşük direnç %2.89 ile bu çalışmada saptanmıştır. EMB için en düşük direnç %5.5 ile Şenyüz ve ark (61) tarafından saptanmıştır.

Proporsiyon yöntemi ile en yüksek INH direnci %34.8 ile, en yüksek RIF direnci %25.2 ile Arseven ve ark. (59) tarafından saptanmıştır. EMB için en yüksek direnç %25.96 ile bu çalışmada saptanmıştır. STM için en yüksek direnç %34.3 ile Şenyüz ve ark. (61) tarafından bulunmuştur.

Bu çalışma diğer proporsiyon yöntemi ile yapılan çalışmalarla kıyaslandığında INH, RIF ve STM için alınan değerler en düşük, EMB için alınan değer ise alınan diğer direnç değerlerinin üstünde çıkmıştır. İki ve üç ilaca birden direnç diğer çalışmalardan alınan sonuçlar ile kıyaslandığında orta seviyededir. Dört ilaca birden direnç saptanmaması dolayısıyla en düşük değer olmaktadır.

Yapılan çalışmalarda toplam çoklu direnç oranı %10.7-30.2 arasında değişmektedir (15,59,60,61,62,63,64). Bu çalışmada çoklu dirençli köken oranı Bactec yöntemi için %9.6 iken agar proporsiyon yöntemi ile %11.53 olarak saptanmıştır. Bu çalışma diğer yapılanlarla kıyaslandığında bu değerler arasında bulunmuştur.

Çalışmalar farklı zaman dilimlerinde ve farklı bölgelerde yapılmıştır. Ülke genelinde gerçek antitüberkülotik direnç oranını belirlemek için çok katımlı ve standardizasyonun sağlanmış olduğu yöntemlerle çalışılıp sonucun bu değerlere göre tartışılması gerektiği inancındayız.

Antitüberküloz ilaç direnci, özellikle çok ilaca direnç, tüberkülozun kontrolünü sağlamada ciddi problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Dirençli kökenlerin oluşmasını önlemek için standart kombinasyon tedavisi ya da yeni tedavi rejimlerinin

uygulanması önerilmektedir. Primer ilaç direncinin %5 ve daha düşük olduğu ülkelerde iyi bir ulusal tüberküloz kontrol programının uygulandığı söylenebilir, ancak %15 ve daha fazla primer ilaç direnci mevcut olması ile uygulanan programın başarılı olmadığını ve yeni bir kontrol programının uygulanması gerektiğini göstermektedir (65).

Bu direnç sonuçları, ülkemizde tüberküloz kökenlerine yüksek oranda çoklu direnç olduğunu göstermektedir. Bu durum tüberküloz olgularında direncin araştırılması ve tedavinin alınacak sonuca göre yönlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Nitekim bazı kaynaklarda primer INH direncinin yüksek (%4'den fazla) olduğu bölgelerde mutlaka direnç varlığının saptanması gerektiği vurgulanmaktadır (1,49). Ülkemizde uygulanan tüberküloz kontrol programı, çok büyük oranda kültür ve antibiyogram sonucu olmadan tedaviye başlanması, hasta uyumundaki problemler ve direnç gelişmiş hastaların aktif olarak basili topluma yayması gibi nedenlerden dolayı direnç oranlarının ülkemizde yüksek çıkması doğaldır. Çünkü aktif dönemdeki hastanın sürekli basil saçtığını, mikobakterilerin mutasyonel direnç geliştirdiğini varsayarsak ve de hastaların tedavisindeki problemleri de içine katarsak direnç profilinin sürekli artacağını söyleyebiliriz. Sekonder ilaçlarla tedavi maliyeti yüksek olup ülke ekonomisine zarar vermekte, hastaya ise yüksek toksisiteye sahip olduğundan dolayı zarar vermektedir. Bu nedenle ki; primer seçenek ilaçların önemi çok büyüktür.

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan farklı yıllarda Bactec yöntemi kullanılarak yapılmış olan çalışmalarda alınan sonuçlarda, INH için en yüksek direnç Balcı ve ark. (64) tarafından en düşük direnç ise %13.9 ile Orhan ve ark. (60) tarafından bulunmuştur. RIF için en yüksek direnç %18.6 ile Balcı ve ark. (64), en düşük direnç %2.9 ile Orhan ve ark. (60) tarafından bulunmuştur. EMB için en yüksek direnç bu çalışmada %18.27 ile, en düşük direnç %3.48 ile Orhan ve ark. (60) tarafından saptanmıştır. STM için en yüksek direnç %8.7 ile Balcı ve ark. (64) tarafından en düşük direnç %1.99 ile Orhan ve ark. (60) tarafından saptanmıştır. Yapılan çalışmalar yıllar itibarıyla değerlendirildiğinde tek ilaç direncinin önce yüksek sonra azalma trendine girdiği ve tekrar artma eğiliminde olduğu saptanmıştır. İki ilaca birden direnç %10.6 ile Balcı ve ark. (64) ile en yüksek, %5.76 ile en düşük değer bu çalışmada bulunmuştur. Üç ilaca birden direnç en yüksek %11 ile Balcı ve ark. (64) tarafından, en düşük direnç bu çalışmada %3.84 ile saptanmıştır. Dört ilaca birden direnç %0.99 ile Orhan ve ark. (60) tarafından, bu çalışmada hiç saptanmaması ile

en düşük oran olarak bulunmuştur. Çalışmalar çoklu direnç oranları açısından karşılaştırıldığında azalma eğiliminde olduğu saptanmıştır.

Yaptığımız klinik araştırmasında, antibiyotik duyarlılık sonucu verilen hastalar buldukları bölgenin VSD'e yönlendirilmekte, hastaya dörtlü ilaç tedavisine başlanmakta ve kontrole çağırılıp tedavinin gidişi balgamda ARB pozitifliği ile takip edilmektedir. Hastanın klinik durumu ve balgam ARB pozitifliğindeki gidiş ile hastada dirençli bir basil olduğu söylenmekte ve bu hastanın Göğüs Hastalıkları Hastanesine giderek ikinci grup ilaçlarla tedavi alması gerektiği söylenmektedir. Bu uygulamalar yapılırken herhangi bir kültür ve direnç çalışması genelde olmamaktadır. Bizim laboratuvarımızda tespit ettiğimiz çoklu dirençli vakalar VSD gözetiminde direkt Göğüs Hastalıkları Hastanesine başvurumaktadırlar.

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda alınan direnç sonuçlarına göre, tekli ilaç direncinin 1995-1999 yıllarında yüksek, 1998-2001 yıllarında düşme eğilimine girdiği ve 2002-2003 yıllarında tekrar yükselme eğiliminde olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar uygulanan tedavi stratejisi, hastanın tedaviye uyumunda yaşanan uyumsuzluk ve hastalığın izlediği bulaşma yolunun çok aktif işlemesi gibi nedenlerden dolayı ortaya çıkmış olabilir. Çoklu ilaç direncinin ise yıllar itibarıyla azalma eğiliminde olduğu saptanmıştır. Çoklu direnç tespit edilen hastalar, tedavisi için direkt olarak Göğüs Hastalıkları Hastanesinde yapılmak üzere sevk edilmeleri ve tedavide edinilen başarı nedeniyle çoklu ilaç direncinde bir düşme olmuş olabilir. Nitekim Tahaoğlu ve ark. (66) tarafından 1992-1999 yılları arasında MDR-tb saptanan 158 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada 36 hastaya cerrahi tedavi ve diğerlerine tedavi ilaçlarından biri ofloksasin olan rejimle 24 ayda kültürde negatifleşme sağladıklarını bildirmişlerdir.

Artan ilaç direnci etkin tedaviyi zorlaştırmakta ve duyarlılık testlerinin yapılmasını kaçınılmaz hale getirmektedir. MTB yavaş çoğalan bir organizma olduğu için klasik kültür yöntemleri ile duyarlılık testlerinin yapılması güçtür ve zaman almaktadır. Bu nedenle duyarlılık testlerinin sonuçları beklenmeden tedaviye başlanmakta ve genellikle klinik yanıt alınmazsa, duyarlılık testlerinin sonuçlarına göre tedavi değiştirilmektedir. Duyarlılık testlerinin sonucunun alınması ne kadar gecikirse, tedavinin yönlendirilmesine katkısı da o kadar az olur. Klasik kültür yöntemlerine dayalı testler uzun sürede sonuç verdiği için, önce hızlı kültür sistemleri geliştirilmiş, sonra da ilaç direncine neden olan mutasyonları saptamaya yönelik genetik saptama

yöntemleri ortaya çıkmıştır (67). Dünyada çeşitli araştırmacıların yaptığı bazı çalışmalar şunlardır:

Hoel ve Eng (68) 104 klinik örnekten izole ettikleri MTB birinci seçenek antitüberküloz ilaç direncini Bactec yöntemi ile INH, EMB, STM için L–J proporsiyon yöntemi, RIF için 7H10 agar proporsiyon yöntemini kullanarak saptamışlardır. İki yöntem arasında %97.4 uyum bulmuşlardır. Bu uyum INH, RIF, EMB ve STM için sırasıyla %95.2, 100, 96.2 ve 98.1 olarak saptanmıştır. İki yöntem karşılaştırıldığında en yüksek uyum INH için (0.2, 1 µg/ml), EMB için (5 µg/ml), STM için (5 µg/ml), RIF için (3.3 ve 10 µg/ml) de sağlanmıştır. Bactec RIF (2 µg/ml) ile agar proporsiyon yöntemi (1 µg/ml) arasındaki uyum iyi bulunmamıştır.

Fadda ve Roe (69) tarafından ekstrapulmoner örneklerde izole edilen MTB duyarlılıklarını Bactec (INH:0.2, RIF:0.2, EMB:0.2, STM:4µg/ml) ile L-J proporsiyon metodu (INH:0.2, 1 µg/ml, RIF:1, 2 µg/ml, EMB:5, 10 µg/ml, STM:2, 10 µg/ml) ile karşılaştırma yapmışlardır. STM ve INH için %95 uyum EMB ve RIF için %100 uyum bulmuşlardır

Woodley (70) tarafından 100 MTB'nin klinik izolatlarında yapılan çalışmada Bactec (INH:0.2, RIF:1, 2, EMB:10, STM:4 µg/ml) ile 7H10 agar proporsiyon (INH:0.2, RIF:1, 2, EMB:5, 10, STM:2,4,10 µg/ml) yöntemi karşılaştırılmıştır. INH için uyumu duyarlılarda 1.00, dirençlilerde 0.94 bulmuşlardır. RIF için uyumu duyarlı ve dirençlilerde 1.00 bulmuşlardır. STM 2 µg/ml için iki metod arasında duyarlılar arasında 0.99 uyum, dirençlilerde 0.97 uyum bulmuşlardır. Bactec (EMB:2.5 µg/ml) ile agar proporsiyon (EMB:5 µg/ml) arasında duyarlı ve dirençli kökenlerde 1.00 uyum bulmuşlardır.

Lee ve Heifest (71) tarafından yapılan çalışmada MTB'nin beş antitüberküloz ilaca (INH, RIF, EMB, STM, ethionamid) karşı duyarlılığını çeşitli konsantrasyonlar kullanarak Bactec yöntemi ile 7H11 agar proporsiyon yöntemini kullanarak karşılaştırmışlardır. Çalışma sonunda iki yöntem arasında MIK değerleri farklı bulunmuştur. Bunun nedeni olarak da ilaçların bu besiyerine bağlanma, absorpsiyon ve potansteki azalma özelliklerinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir.

Rastogi ve ark. (72) tarafından yapılan çalışmada MTB'nin duyarlılığını L-J, 7H10 agar, 7H11 agar ve Bactec yöntemi kullanarak karşılaştırmalı olarak saptamışlardır. Bactec (INH:0.1, RIF:2, EMB:2.5, STM:2 µg/ml) ile 7H11 agar proporsiyon (INH:0.2, RIF:1, EMB:7.5, STM:2 µg/ml) karşılaştırmışlardır. Bactec ve 7H11 agar proporsiyon



yöntemleri karşılaştırıldığında INH için sensitivitesi %100, spesitivite %98.5, RIF için sensitivite %100, spesitivite %100, EMB için sensitivite %100, spesitivite %96.0, STM için sensitivite %100, spesitivite %97.6 olarak saptamışlardır.

Sıddiqi ve ark. (73) tarafından yapılan bir çalışmada 224 MTB izolatının INH, RIF, EMB, STM'e duyarlılık durumları Bactec yöntemi ile saptanıp iki klasik yöntem (L-J ve 7H10 agar) ile karşılaştırmışlardır. Bactec (INH:0.2, RIF:2, EMB:2.5, 10, STM:2 µg/ml), 7H10 agar proporsiyon (INH:0.2, RIF:1, EMB:5, 10, STM:2, 10 µg/ml) ve L-J proporsiyon (INH:0.2, RIF:40, EMB:2, Dihidrostreptomisin:4 µg/ml) karşılaştırılmıştır. Bulgu farklılığı en çok STM ve EMB' de yaşanmıştır. Bactec EMB için 2.5 µg/ml, Middlebrook 7H10 agar 5 µg/ml, L-J 2 µg/ml birbirine benzer bulmuşlardır. EMB Bactec (10 µg/ml), 7H10 Agar (2, 10 µg/ml) ve L-J'den daha aktif bulmuşlardır. STM için Bactec (STM:4 µg/ml) 7H10 agar (STM:10 µg/ml) den hafifçe daha az aktif bulmuşlardır. INH:0.2 µg/ml Bactec ve 7H10 agar proporsiyon arasında sadece %1.8 ayrılık saptamışlardır. RIF için Bactec ile agar proporsiyon arasında %100 uyum vardı. RIF için Bactec ile L-J arasında %1.8 ayrılık bulmuşlardır.

Hawkins (74) tarafından yapılan çalışmada 104 MTB izolatı Bactec ve 7H10 disk metodu kullanılarak antitüberküloz direnci karşılaştırmalı olarak incelemişler. Bactec (INH:0.2, 1, RIF:2, EMB:2.5, 10, STM:2, 6 µg/ml) ile 7H10 disk proporsiyon (INH:0.2, 1, RIF:1, 5, EMB:5, 10, STM:2, 10 µg/ml) duyarlılıkları karşılaştırmışlar. INH:0.2 ve 1 µg/ml'de iki yöntem arasında %90 uyum bulmuşlardır. RIF:2 ve 1 µg/ml'de iki yöntem arasında %97 uyum, EMB:2.5 ve 5 µg/ml'de iki yöntem arasında %90 uyum, EMB:10µg/ml'de iki yöntem arasında %98 uyum bulmuşlardır. STM:2µg/ml'de iki yöntem arasında %99-%100 uyum, STM:6 ve 10 µg/ml'de iki yöntem arasında %96 uyum saptamışlardır.

Laszlo (75) tarafından yapılan çalışmada 224 MTB izolatında Bactec (INH:0.2, RIF:2, EMB:2, 3, 10, STM:4 µ/ml) ile L-J proporsiyon (INH:0.2, RIF:40, EMB:2, STM:4 µg/ml) karşılaştırmışlar. EMB:2 µg/ml için sensitivite %96, spesitivite %88 bulmuşlardır. EMB:3 µg/ml için sensitivite %96, spesitivite %93 bulmuşlardır. EMB:10 µg/ml için sensitivite %35, spesitivite %99, RIF:2 µg/ml için sensitivite %96, spesitivite %99, INH:0.2 µg/ml için sensitivite %98, spesitivite %99, STM: 4 µg/ml için sensitivite %85, spesitivite %97 bulmuşlardır.

Suo ve ark. (76) Taiwan'lı hastalardan izole edilen MTB kökenlerinin INH, RIF, EMB, STM için 7H10 agar, 7H11 agar proporsiyon ve Bactec yöntemini kullanarak MIK değerlerini saptamak istemişlerdir. Çalışma sonucunda Bactec MIK değerleri agar proporsiyon yöntemine göre bariz düşük bulunmuştur.

Bu çalışma NCCLS'in önerdiği antibiyotik konsantrasyonları kullanılarak yapılmış olup, toplam 104 klinik köken ve 2 standart kökenden elde edilen sonuçlara göre, Bactec sistemi izoniazide karşı duyarlılığı test etmede 0.1 µg/ml ile agar proporsiyon yönteminin 0.2 µg/ml'de karşılaştırıldığında genel uyum %99 olarak saptandı. Kappa değeri 0.974 (P<0.0001), sensitivite: %100, spesitivite: %98.7 olarak saptandı. INH için bu konsantrasyonlarda agar proporsiyon yöntemi ile dirençli olup Bactec yöntemi ile duyarlı bulunan 1 köken saptandı.

Rifampisine karşı Bactec yöntemi (2 µg/ml'de) ile agar proporsiyon yöntemi (1 µg/ml'de) ile karşılaştırıldığında elde edilen sonuçların hepsi agar proporsiyon yöntemi ile uyumluydu. Yöntemler arası genel uyum %100 olarak saptandı. Kappa değeri 1.00 (P<0.0001), sensitivite: %100, spesitivite: %100 olarak bulundu.

Bu çalışmada etambutole karşı Bactec 2.5 µg/ml'de ve agar proporsiyon 5 µg/ml'de karşılaştırıldığında Bactec yöntemi ile 19 dirençli köken saptanırken agar proporsiyon yöntemi ile 27 köken saptanmıştır. Toplam 8 köken Bactec sistemi ile duyarlı bulunurken agar proporsiyon yöntemi ile dirençli bulunmuştur. Yöntemler arası genel uyum %92.3 olarak saptandı. Kappa değeri 0.779 (P<0.0001), sensitivite: %70.4, spesitivite: %100 olarak saptandı.

Bactec yöntemi ile elde edilen streptomisin (2 µg/ml'de) sonuçları agar proporsiyon yöntemi (2 µg/ml'de) ile karşılaştırıldığında elde edilen sonuçların hepsi proporsiyon yöntemi ile uyumluydu. Yöntemler arası genel uyum %100 olarak saptandı. Kappa değeri 1.00 (P<0.0001), sensitivite: %100, spesitivite: %100 olarak saptandı.

Araştırmacıların yaptığı çalışmalar Bactec sisteminin yeni kullanıma girdiği yıllarda yapılmış olup, Bactec ile proporsiyon (L-J, 7H10 agar, 7H11 agar ve disk) metodunu genelde aynı ilaç konsantrasyonlarını kullanarak karşılaştırmışlardır. İsoniazid için yapılan çalışmalarda iki yöntem arasındaki uyumluluk %90 ile %100 arasında değişmektedir (68-70,72-75). Bu çalışmada INH için alınan sonuç bu aralıkta çıkmıştır. Rifampisin için alınan sonuçlar ise %97 ile %100 arasındadır (69,70,72-75). Bu değerler bu çalışmayı desteklemektedir. Ancak Hoel ve Eng (68) yaptıkları

çalışmada RIF için Bactec (2 µg/ml) ile 7H10 agar proporsiyon (1 µg/ml) arasında uyum bulunmadığını saptamışlardır. Bu çalışmada RIF için %100 uyum bulundu. Etambutol için yapılan çalışmalarda uyum %90 ile %100 arasında bulunmuştur (68-70,72-75). Woodley (70) tarafından yapılan çalışmada EMB için Bactec (2.5 µg/ml) 7H10 agar proporsiyon (5 µg/ml) arasında duyarlı ve rezistan kökenler arasında 1.00 uyum bulmuştur. Siddiqi ve ark. (73) tarafından yapılan çalışmada ise EMB için Bactec (2.5 µg/ml), 7H10 agar proporsiyon (5 µg/ml) ve L-J proporsiyon (2 µg/ml) birbirine uygun bulunmuştur. Bu çalışmada EMB için genel uyum %92.3 olarak saptanmıştır. Streptomisin için yapılan çalışmalarda uyum %95 ile %100 arasında değişmektedir (68-70,72-75). Bu çalışmada STM için genel uyum %100 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada NCCLS'in önerdiği STM için eşit konsantrasyonlar kullanılmış olup, INH, RIF ve EMB için farklı konsantrasyonlar kullanılmıştır. Nitekim Suo ve ark. (76) ile Lee ve Heifest (71) yaptıkları çalışmalarda iki yöntem arasında kritik konsantrasyonlar arasında fark olabileceğini belirtmişlerdir.

Son yıllarda Bactec sistemi yerine kullanılabilecek, en az bu yöntem kadar güvenilir, hızlı başka bir sıvı besiyeri içeren ve tercihan otomatik yeni bir sistemin kullanıma sokulma çabası giderek hız kazanmıştır. Bu arayıştaki en önemli neden Bactec sisteminde kullanılan besiyerinin radyoaktif madde içermesi ve sisteme ilişkin atıkların ortadan kaldırılması için pahalı ekipman gerektiren atık imha yöntemlerinin kullanılmasından dolayı testin birim maliyetinin yüksek olmasıdır. Yeni besiyeri arayışları sonucunda geliştirilen ve gelişmiş ülkeler başta olmak üzere tüm dünyada gittikçe yaygın olarak kullanılmaya başlayan ilk sıvı besiyeri MGIT besiyeridir (77). Ancak yapılan çalışmalar sonunda kontaminasyon riskinin yüksek olduğu gösterilmiştir (6). Yapılan bazı çalışmalarda EMB için duyarlılığının düşük olduğu saptanmıştır (78,79). MB/BacT/ALERT MB ile yapılan duyarlılık çalışmalarında ise, testlerin sonuçlanma süresinin Bactec sistemine göre daha uzun olduğu ve EMB için duyarlılığının düşük olduğu bilinmektedir (6).

Proporsiyon yöntemi altın standart ve referans yöntem olmasına karşın zahmetli ve iş yükünü artırıcı bir yöntemdir. Bu yöntem ile MTB'in duyarlılık paterninin ortaya konulabilmesi için 21 günlük inkübasyon süresine gereksinim vardır. Ayrıca, proporsiyon yönteminde ilaç dilüsyonları hazırlarken ilacın sterilizasyonu için membran filtrelerden geçirilmesi, kullanımdan arta kalan liyofilize toz halindeki ilacın uygun koşullarda saklanamaması ve ilacın besiyerine eklenirken uygun sıcaklıkta ve konsantrasyonlarda eklenmemesi testte kullanılan ilacın potensini azaltmakta ve

sonuç olarak test edilen kökenlerin duyarlılık paternlerinin yanlış saptanmasına neden olmaktadır. Bu yöntem referans ve altın standart bir yöntem olarak kabul edilmesine ve ucuz olmasına rağmen belirtilen bu zorluklardan dolayı tüm dünyada yaygın olarak kullanılan rutin antitüberküloz ilaç duyarlılık testi olma özelliğini kazanamamıştır (77).

Günümüzde yaygın olarak kullanılan Bactec ve agar proporsiyon yöntemleri avantaj ve dezavantajları yönünden değerlendirildiklerinde; Bactec yönteminin, zaman yönünden büyük bir üstünlüğe sahip olduğu açıktır. Bactec yöntemiyle ilaç duyarlılık sonuçları 4.2-6.9 gün arasında rapor edilebilirken, klasik yöntemlerle bu süre 13.7-21 güne çıkmaktadır. Ayrıca Bactec yöntemi kolay uygulanabilir olması nedeniyle de, klasik yöntemlere göre üstünlük gösterir. Ancak radyoaktif materyale ihtiyaç göstermesi, testin ikincil ilaçlara adaptasyonunda karşılaşılan bazı güçlükler ve maliyetin yüksek olması bu yöntemin dezavantajıdır (48).

Bactec yöntemi, agar proporsiyon yöntemi ile antibiyotik direncini saptama açısından karşılaştırıldığında, izoniazid, rifampisin, etambutol ve streptomisinde başarı oranı yüksek bulunmuştur.

Bactec sistemi izolasyon sürecinin kısıtlılığı, izolasyon sonrasında antitüberküloz ilaçlara duyarlılık çalışılabilmesi kontaminasyon azlığı gibi nedenlerden dolayı rutin laboratuvarlarda kullanılabilme kolaylığı olan bir yöntemdir.

Sonuç olarak, Bactec yöntemini birinci seçenek antitüberküloz ilaç (izoniazid, rifampisin, etambutol ve streptomisin) için duyarlılık testi olarak, agar proporsiyon yöntemine göre iş gücü az, hızlı, doğru sonuç veren ve bu sistemi kullanan laboratuvarlarda rutin amaçlı kullanılacak, güvenilir bir yöntem olarak önerebiliriz.

## SONUÇLAR

1. Bu çalışmaya alınan 104 klinik örnekten yapılan ARB araştırması sonucunda %36.54 oranında pozitiflik saptanmıştır.
2. Bu çalışmada Bactec sistemi kullanılarak klinik örneklerden izole edilen 104 adet TB kompleks kökeninin birinci seçenek ilaçlara duyarlılık testi Bactec yöntemi ve agar proporsiyon yöntemine göre araştırıldı, dirençli kökenlerin dağılımı şöyle bulundu: Bactec yöntemi ile, toplam 59 kökenin (%56.73) en az bir ilaca dirençli olduğu, 26 kökenin (%25) INH'e, 11 kökenin (%10.58) RIF'e, 19 kökenin (%18.27) EMB'e, 3 kökenin (%2.89) STM'e dirençli olduğu saptandı. Toplam 6 kökenin (%5.76) iki ilaca, 4 kökenin (%3.84) dirençli olduğu saptandı. Agar proporsiyon yöntemi ile toplam 66 kökenin (%63.46) en az bir ilaca dirençli olduğu, 25 kökenin (%24.04) INH'e, 11 kökenin (%10.5) RIF'e, 27 kökenin (%25.96) EMB'e, 3 kökenin (%2.89) STM'e dirençli olduğu saptandı. Toplam 7 kökenin (%6.72) iki ilaca, 5 kökenin (%4.81) üç ilaca dirençli olduğu saptanmıştır. Her iki yöntemde de dört ilaca birden dirençli kökene rastlanmamıştır.
3. Bu çalışmada toplam 104 köken ve 2 standart kökenden elde edilen sonuçlara göre Bactec sistemi izoniazide karşı duyarlılığı test etmede 0.1 µg/ml ile agar proporsiyon yönteminin 0.2 µg/ml'de karşılaştırıldığında genel uyum %98 olarak saptandı. Kappa değeri 0.974 (P<0.0001), sensitivite: %100, spesitivite: %98.7 olarak saptandı. INH için aynı konsantrasyonlarda agar proporsiyon yöntemi ile dirençli olup Bactec yöntemi ile duyarlı bulunan 1 köken saptandı.

Rifampisine karşı Bactec yöntemi (2 µg/ml'de) ile agar proporsiyon yöntemi (1 µg/ml'de) ile karşılaştırıldığında elde edilen sonuçların hepsi agar proporsiyon yöntemi ile uyumluydu. Yöntemler arası genel uyum %100 olarak saptandı. Kappa değeri 1.00 (P<0.0001), sensitivite: %100, spesitivite: %100 olarak bulundu.

Bu çalışmada etambutole karşı Bactec 2.5 µg/ml'de ve agar proporsiyon 5 µg/ml'de karşılaştırıldığında Bactec yöntemi ile 19 dirençli köken saptanırken agar proporsiyon yöntemi ile 27 köken saptanmıştır. Toplam 8 köken Bactec sistemi ile duyarlı bulunurken agar proporsiyon yöntemi ile dirençli bulunmuştur. Yöntemler

arası genel uyum %78 olarak saptandı. Kappa değeri 0.779 ( $P < 0.0001$ ), sensitivite: %70.4, spesitivite: %100 olarak saptandı.

Bactec yöntemi ile elde edilen streptomisin ( $2 \mu\text{g/ml}$ 'de) sonuçları agar proporsiyon yöntemi ( $2 \mu\text{g/ml}$ 'de) ile karşılaştırıldığında elde edilen sonuçların hepsi proporsiyon yöntemi ile uyumluydu. Yöntemler arası genel uyum %100 olarak saptandı. Kappa değeri 1.00 ( $P < 0.0001$ ), sensitivite: %100, spesitivite: %100 olarak saptandı.

4. Bactec yöntemi, altın standart Agar proporsiyon yöntemi ile karşılaştırıldığında birinci seçenek ilaçlara direnç ve duyarlılığı saptamada genel uyumu çok iyi olarak bulunmuştur.

## KAYNAKLAR

1. Topçu AW. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2002: 538-599
2. Özkara Ş, Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H. Türkiye'de tüberkülozun kontrolü için başvuru kitabı, Sağlık Bakanlığı Verem Savaşı Daire Başkanlığı, Ankara, 2003: 1-11
3. World Health Organization Geneva. WHO Report. 1999: 29-32
4. Öztürk R. Mikobakteriyoloji laboratuvarında Tür ve Direnç Tayininde Yenilikler. Ed: Eraksoy.H, Yenen OŞ. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2002: 35-43
5. Anđ Ö, Erturan Z. Tüberkülozun Dönüşü ve Direnç Sorunu. Eds: Anđ Ö, Uzun M. Tüberküloz Tanı, Direnç, Tedavi. İstanbul,1996: 17-25
6. Tansel Ö. Klasik Antibiyotik Duyarlılık Test Yöntemleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz laboratuvar Tanı yöntemleri Kursu Kitabı. Samsun, 2003: 347-359
7. Saniç A. Mikobakterilerde antibiyotik duyarlılık testleri. XXX Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı. Antalya, 2002:141-143
8. Barış Yi. Çağlar boyu tüberküloz. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu Kitabı. Samsun, 2003: 1-7
9. Uzun M. Tüberkülozun Epidemiyolojisi. Ed: Anđ Ö, Uzun M. Tüberküloz Tanı, Direnç, Tedavi. İstanbul, 1996: 1-9
10. Bilgiç H. Türkiyede Tüberkülozun Durumu ve Eradikasyon (kontrol) Programı. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu Kitabı. Samsun, 2003: 18-33
11. Dye C, Schelelee S, Dalin P. Global burden of tuberculosis. JAMA, 1999; 677-686
12. Kılıçaslan Z. Dünyada ve Türkiye'de Tüberküloz Epidemiyolojisi ve Kontrolü. Ed: Uzun Ö, Ünal S. Güncel Bilgiler ışığında İnfeksiyon Hastalıkları. II.Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2002: 821-833
13. Dolin PJ, Raviglione MC, Kochi A. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000, Bulletin of the Word Healt Organization. 1994;72(2):213-220

14. Kızgın Ö. Temaslı Muayenesi.13. Ulusal tüberküloz ve göğüs hastalıkları kongresi kongre kitabı. Malatya. 2003: 21-25
15. Hasçelik G, Ercis S, Özakın C, Uzun M, Yaman A, Köksal İ, et al. Is Mycobacterium Tuberculosis still a problem in Turkey? ASM 101<sup>st</sup> General Meeting, Orange County Convention Center Orlando, Florida. May 20-24, 2001: 235
16. Wolinsky E. Tuberculosis. In: Cecil Textbook of Medicine. Wyngaarden JB, Smith LH (eds)., Infection Disease. 7<sup>th</sup> Edition, Philadelphia, WB Saunders Company, 1985: 1620-1634
17. Felek S. Akciğer Tüberkülozu. Sistemik İnfeksiyon Hastalıkları. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2000: 111-123
18. Haas DW, Prez DRM. Mycobacterium Tuberculosis. In: Principles and Practice of Infectious Diseases. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Eds). Fift Edition, UK, Churchill Livingstone, 2000; (2):2576-2607
19. Oymak FS. Tüberkülozun Klinik Belirti ve Bulguları. Editörler: Uzun Ö, Ünal S. Güncel Bilgiler ışığında İnfeksiyon Hastalıkları. II.Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2002: 847-857
20. Harvey RA, Champe PC. Mycobacteria and Actinomyces. Lippincott's Illustrated Reviews. Microbiology Lippincott, Williams Wilkins, Baltimore, 2001: 245-258
21. Harris HW. Pulmonary Tuberculosis. Infectioos Diseases. Paul DH, Colin MJ (Eds) 4<sup>th</sup> Edition, JB Lippincott Company, Philadelphia, 1989: 405-448
22. Saniç A, Çoban AY. Mikobakteriler ve Laboratuvar Tanı. Samsun, 1999: 1-87
23. Orme IM, Anderson P, Boom WH. T Cell Response to Mycobacterium Tuberculosis. JID, 1993; 167:1481-1497
24. Kıyan M. Mycobacteriaceae. Editörler: Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara, Güneş Kitabevi, 1999: 419-455
25. Jaiklik W. Amos W. Mycobacterium. Zinser Microbiology. In: Mycobacterium. Wolfgang KJ, Hilda PW, Benard DA, Wilfert CM (Eds). 4<sup>th</sup>, United States of America, 1992: 497-521
26. Konemen EW, Allen SD, Danda WM, Schrec KPC, Winn WC. Mycobacteria. In: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Konemen WE (Eds). 5<sup>th</sup> , Edition, NewYork, 1997: 893-952
27. Baron EJ, Peterson LR, Firegold SM. Mycobacteria. In: Diagnostic Microbiology. Shanahan JF, Bailey S (Eds). 9<sup>th</sup> Edition, Mosby-Year Book, 1994: 590-633



28. Jawetz EMA. Mycobacteria. In: Medical Microbiology. Twenty-second Edition. Mc Graw-Hill Companies, NewYork, 2001: 275-299.
29. Pelczar MJ, Chan ECS, Krieg NR. Tuberculosis. Microbiology Concepts and applications, Mc Graw-Hill, NewYork, 1993: 654-657
30. Bauer JD, Philip G, Mann A, Toro G. Clinical Labarotory Methods. In: Mycobactericeae. Eighth Edition, C V.Mosby Company, Saint Louis, 1974: 706-715
31. Bilgehan H. Mycobacteriaceae Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri İnfeksiyonları. İzmir, Barış Yayınları, 2000: 439-488
32. Akan E. Mycobactericeae. Tıbbi Mikrobiyoloji. İstanbul, Saray Kitabevleri, 1993: 434-593
33. Bilgehan H. Mycobacteriumlar. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. İzmir, Barış Yayınları, 1995: 567-585
34. Köksal F, Yaman A. Farklı bir bakteri topluluğu mikobakterilerde hücre duvarı yapısı. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu Kitabı. Samsun, 2003: 34-47
35. Brennan PJ, Nikaido H. The Envelope of Mycobacteria. Annu Rev Biochem, 1995; 64:29-63
36. Murray PR, Kobayashi GS, Pfaller MA, Rosenthal KSM. Mycobacterium. In: Medical Micobiology, Second Edition, Mosby-Year Book, London, 1994: 320-333
37. Anderson AB, Brennan P. Proteins and Antigens of Mycobacterium Tuberculosis. In: Tuberculosis Pathogenesis Protection and Control. Bloom BR (Eds). Washington, DC ASM Press, 1994: 307-331
38. Kocagöz T. Yeni laboratuvar yöntemleri ile tüberküloz tanısı. İnfeksiyon Dergisi, 1997; 11:29-33
39. Kasımoğlu Ö. Tüberküloz tanısında yeni gelişmeler. Editörler: Anđ Ö, Uzun M. Tüberküloz tanısı, Direnç, Tedavi. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, 1996: 11-15
40. Siddigi SH. Bactec TB System, Product and Procedure Manuel. Becton Dickinson, Sparks, 1989: 1-59
41. Howard BJ, Damato JJ. Mycobacteria. In: Clinical and Pathogenic microbiology. John K, Sally JR, Alice SW, Richard Ct (Eds). Mosby Company, Washington, 1987: 479-499
42. Çöplü N. Tüberkülozda mikrobiyolojik tanı. Editörler: Uzun Ö, Ünal S. Güncel Bilgiler ışığında İnfeksiyon Hastalıkları II. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2002: 859-873

43. Roberts KD, Koneman EW, Kim YK. Mycobacterium. In: *Manual of Clinical Microbiology*. Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD (Eds). Fifth Edition, Washington DC, ASM, 1991: 304-332
44. Uzun M. Örneklerin işlenmesi ve kültür yöntemleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu Kitabı. Samsun, 2003: 283-289
45. Kocagöz T. Tüberküloz Tanısında yenilikler. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji*. Eds: Eraksoy H, Yenen OŞ, Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul, 2000: 25-33
46. Kiraz N. Antitüberküloz ilaçlara direnç mekanizmaları ve yeni ilaçlar. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu Kitabı. Samsun, 2003: 173-177
47. Kiehn TE, Cynamon MH, Inderlied CB, Roberts GD, Siddiqi SH, Wallace RJ et al. Antimycobacterial susceptibility testing for mycobacterium tuberculosis. Tentative Standard. National Committee for Clinical Laboratory Standards document M24-T, Wayne, Pennsylvania, 1995: 15 (16);1-31
48. Över U. Antitüberküloz duyarlılık testleri. Antibiyotik duyarlılık testlerinin standardizasyonu toplantısı. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, 1997: 115-125
49. Hadek D. Modified Proportion Agar Dution Test for Slowly Growing Mycobacteria *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, Isenberg HD (ed). Washington, 1992: (13);1-15
50. Siddiqi SH. Radiometric (Bactec) Test for Slowly Growing Mycobacteria *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Isenberg HD (ed). Washington, 1992: (14);1-25
51. Öztürkeri H. Bactec yöntemi ile antibiyotik duyarlılık testi. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu Kitabı. Samsun, 2003: 360-368
52. Yüce A. Mikobakterilerde antibiyotik duyarlılık testleri. *İnfeksiyon Dergisi* (1 Ulusal mikobakteri sempozyumu), 1997; 4:47-51
53. Özdamar K. Sağlık alanına özel istatistiksel yöntemler. SPSS ile Biyoistatistik. 4. Baskı, Kaan kitabevi, Etam A. Ş. Matbaa tesisleri, Eskişehir, 2001; 19:393-420
54. Aksakoğlu G. Sağlıkta araştırma teknikleri ve analiz yöntemleri. D.E.Ü. Rektörlük Matbaası. İzmir, 2001: 89-92
55. Songur M. Tüberküloz tanısında standart kültür, hızlı kültür (MGIT) ve polimeraz zincir tepkimesi (PZT). Yöntemlerinin karşılaştırılması. Doktora Tezi, İzmir, 1998 (yayınlanmış), s.1-73

56. Bekiroğlu N, Baysallar M, Gün H. Mikobakterilerin mikroskopik tanısında kullanılan iki aside dirençli boyama yönteminin karşılaştırılması. İnfeksiyon Dergisi, 1998; 12 (1):69-73
57. Sarıgzel N. Direk mikroskopi teknikleri ve değerlendirilmesi. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuar Tanı Yöntemleri Kursu Kitabı. Samsun, 2003: 291-299
58. Çoban AY, Ekinci B, Birinci A, Yenigün A, Durupınar B. Mycobacterium tuberculosis klinik suşlarında streptomisin direncinin araştırılması. İnfeksiyon Dergisi, 2002; 16 (1):35-38
59. Arseven O, Eraksoy H, Uzun Y, Sepkin C, Kalaycıoğlu A, zmenoğlu M ve ark.. Doğu Karadeniz bölgesinde tüberküloz ilaçlarına direnç durumu. Klimik Dergisi, 1995; 8 (2):63-67
60. Orhan G, Zer Y, Balcı İ, Bayram A, Korkmaz G. Mikobakteriyoloji laboratuvarında incelenen örneklerin retrospektif olarak değerlendirilmesi. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 2002; 33 (3):225-229
61. Şenyüz A, zcan M, zbal Y. Mikobakterilerde antitüberkülotiklere karşı direnç gelişimi. XXX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi. Antalya, 2002: 297
62. Akçalı S, Saydam C.Ç, Sürücüoğlu S, zbakkaloğlu B. Mycobacterium tuberculosis kökenlerinde birinci kuşak antitüberküloz ilaçlara duyarlılığın saptanmasında standart proporsiyon dilüsyon testi ile E test yönteminin karşılaştırılması. XXX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi. Antalya, 2002: 298
63. Kibar F, Yaman A, Dündar İ.H. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesinde izole edilen Mycobacterium tuberculosis suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. XXX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi. Antalya, 2002: 298
64. Balcı İ, Bayram A, Dikensoy O, Filiz A. Drug-resistant tuberculosis at The University Hospital in Gaziantep, South-eastern Turkey. The Journal of International Medical Research. 2000; 28:300-306
65. Okutan O. Hastanelerde tanı konulan tüberküloz hastalarının bildiriimi ve izlenmesi. XXIII. Ulusal Tüberküloz ve Göğüs Hastalıkları Kogresi Kitabı. 2003:52-60
66. Tahaoglu K, Torun T, Sevim T, Atac G, Kir A, Karasulu L, Ozmen Kapakli N. The treatment of multidrug-resistant tuberculosis in Turkey. N Engl J Med, 2001; 345 (3):208-210

67. Kocagöz T. Mycobacterium tuberculosis için uygulanan fenotipik ve genotipik direnç testleri. 4. Ulusal mikobakteri sempozyumu kitabı. 2002: 115-124
68. Hoel T, Eng J. Radiometric and conventional drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. APMIS, 1991; 99:977-980
69. Fadda G, Roe SL. Recovery and susceptibility testing of mycobacterium tuberculosis from extrapulmonary specimens by the Bactec radiometric method. J Clin Microbiol, 1984; 19(5):720-721
70. Woodley CL. Evaluation streptomisin and ethambutol concentrations for susceptibility testing of mycobacterium tuberculosis by radiometric and conventional procedurs. J Clin Microbiol, 1986; 23(2): 385-386
71. Lee C, Heifets LB. Determination of minimal inhibitory concentrations of antituberculosis drugs by radiometric and conventional methods. Am Rev Respir Dis, 1987; 136:349-352
72. Rastogi N, Goh KS, David HL. Drug susceptibility testing in tuberculosis: A comparision of the proportion methods using lowenstein-jensen, middlebrook 7H10 and 7H11 agar media and A radiometric method. Res Microbiol, 1989; 140:405-417
73. Sıddıqı SH, Hawkins JE, Laszlo A. Interlaboratory drug susceptibility testing of mycobacterium tuberculosis by radiometric procedure and two conventional methods. J Clin Microbiol, 1985; 22(6): 919-923
74. Hawkins JE. Nonweekend schedule for Bactec drug susceptibility testing of mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol, 1986; 23(5): 934-937
75. Laszlo A. Intralaboratory comparison of drug susceptibility testing of mycobacterium tuberculosis by Bactec and conventional methodology. J Microbiol, 1985; 31: 957-960
76. Suo J, Chang C-E, Lin TP, Heifest LB. Minimal Inhibitory Concentrations of isoniazid, rifampin, ethambutol and streptomycin against Mycobacterium tuberculosis strains isolated before treatment of patients in Taiwan. Am Rev Respir Dis, 1988; 138:999-1001
77. Dibek MA. Mycobacterium tuberculosis complex kökenlerinin MB/BacT sistemi ile ilaç duyarlılıklarının saptanması ve sistemin standardize edilmesi. Uzmanlık tezi, İzmir, 1999 (yayınlanmış), s.1-46
78. Koskela-KA, Leena-M. Susceptibility testing with Manual Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) and the MGIT 960 system provides rapid and reliable

verification of multidrug-resistant tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 2003; 41 (3):1235-1239

79. Tortoli E, Benedetti M, Fontanelli A, Simonetti MT. Evaluation of Automated Bactec MGIT 960 system for *Mycobacterium tuberculosis* to four major antituberculous drugs: Comparison with the radiometric Bactec 460 TB method and the agar plate method of proportion. *J Clin Microbiol*, 2002; 40 (2):607-610