

T.C
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİMDALI

**MİKROBAKTERİ TÜRLERİNİN İDENTİFİKASYONU İÇİN
PZR- RFLP (PARÇA UZUNLUK POLİMORFİZMİ) TEKNİĞİ
VE KLASİK YÖNTEMLERİN UYGULANMASI**

Gül BAYRAM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ

MERSİN-2007

T.C
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİMDALI

**MİKROBAKTERİ TÜRLERİNİN İDENTİFİKASYONU İÇİN
PZR- RFLP (PARÇA UZUNLUK POLİMORFİZMİ) TEKNİĞİ
VE KLASİK YÖNTEMLERİN UYGULANMASI**

Gül BAYRAM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ

Bu tez Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP-TF TTB (GB)
2006-1 TU no'lu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:.....

MERSİN-2007

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans programı Çerçevesinde yürütülmüş olan **‘Mikobakteri Türlerinin İdentifikasyonu İçin PZR- RFLP (Parça Uzunluk Polimorfizmi) Tekniği Ve Klasik Yöntemlerin Uygulanması’** adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora/Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 18/06/2007

Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji
Jüri Başkanı/Danışman

Doç. Dr. Candan ÖZTÜRK
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji
Jüri Üyesi

Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Mikrobiyoloji
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü
Doç. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin süresince her konuda yardımlarını ve desteğini esirgemeyen Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve danışman hocam Sayın Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ'a, başta Sayın Doç. Dr. Gönül ASLAN olmak üzere değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Candan ÖZTÜRK, Sayın Doç. Dr. Nuran DELİALİOğLU, Sayın Yrd. Doç. Dr. Feza OTAę'a ve Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN'e eğitim ve öğretimime katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca laboratuvar ortamında sonsuz destek ve katkılarını gördüğüm tüm Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimin ve tez çalışmam süresince maddi ve manevi desteklerinden dolayı aileme ve akrabalarımaya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ.....	3
2.1. Tanım.....	3
2.2. Tarihçe.....	3
2.3. Epidemiyoloji.....	4
2.3.1. Dünyada Tüberküloz.....	4
2.3.2. Türkiyede Tüberküloz.....	5
2.4. Tüberküloz Basili Kompleksi (MTC).....	7
2.5. Nontüberküloz Mikobakteriler (NTM).....	7
2.6. Mikobakteriyel Morfoloji.....	8
2.6.1. Mikobakterilerin Hücre Yapısı.....	9
2.7. Tüberkülozun Patogenezi ve Patolojisi.....	10
2.7.1. Tüberkülozun Patogenezi.....	10
2.7.2. Tüberkülozun Patolojisi.....	12
2.7.3. İmmün (Bağışık) yanıt mekanizmaları.....	13
2.7.4. Bacillus Calmette Guerin (BCG)'nin Patogenezdeki Yeri.....	14
2.8. Tüberküloz'un Kliniği.....	15
2.9. Tüberkülozda Bulaşıcılığı Etkileyen Faktörler.....	16
2.10. Human Immun Deficiency Virus (HIV) ve Tüberküloz.....	18
2.11. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> İzolasyonunda Kullanılan Mikrobiyolojik Tanı Yöntemleri.....	18
2.11.1. Hasta Örneklerinin İşlenmesi.....	19
2.11.2. Boyama ve Mikroskopik İnceleme.....	20
2.11.3. Kültür.....	21
2.11.4. Biyokimyasal Testler.....	23
2.11.5. Serolojik Tanı Yöntemleri.....	24
2.11.6. Moleküler Yöntemler.....	26
2.12. Tedavi.....	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
3.1. Gereçler.....	31
3.1.1. Çalışma Grubu ve Örnekler.....	31
3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Gereçler.....	31
3.1.3. Hasta Örneklerinin İşlenmesi.....	33

3.1.3.1. Homojenizasyon-Dekontaminasyon Solusyonunun Hazırlanması.....	33
3.1.4. Besiyeri'nin Hazırlanması.....	34
3.1.4.1. Löwenstein-Jensen Besiyeri.....	34
3.1.4.2. Middlebrook 7H9.....	35
3.1.5. Karbolfuksin Aside Dirençli Boyalar.....	35
3.1.6. Nitrat Çözeltisi.....	35
3.1.7. Katalaz testi kimyasalları.....	36
3.1.8. Niasin testi kimyasalları.....	36
3.1.9. Elektroforetik Analiz Solüsyonları.....	37
3.1.10. Bromtimol mavisi.....	37
3.2.Yöntemler.....	38
3.2.1.Hasta Örneklerinin İşlenmesi ve Kültürü.....	38
3.2.2.Biyokimyasal Testler.....	38
3.2.3.DNA İzolasyonu.....	39
3.2.4.Polimerize Zincir Reaksiyonu-Parça Uzunluk Polimorfizmi Tekniği.....	40
3.2.5. PZR çoğalma ürünlerinin elektroforez yöntemi ile incelenmesi.....	41
4. BULGULAR.....	44
4.1. Bakteriyolojik Bulgular.....	44
4.2.Klasik İdentifikasyon Sonucu Elde Edilen Bulgular	45
4.3. Moleküler Bulgular	47
5. TARTIŞMA.....	50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	54
7. KAYNAKLAR.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Mikobakteriyel hücre yapısı	10
Şekil 4.1. Kültür pozitif örneklerin nitrat pozitif testi sonucu renk değişimi	46
Şekil 4.2. Kültür pozitif örneklerin katalaz pozitif testi sonucu renk değişimi	46
Şekil 4.3. Kültür pozitif örneklerin niasin pozitif testi sonucu renk değişimi	47
Şekil 4.4. PZR-RFLP/Bst EII ve PZR-RFLP/Hae III kesim elektroforez görüntüsü.....	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Türkiye’de Verem Savaşı Dispanserlerinin kayıtları ile tüberküloz insidansının değişimi.....	6
Çizelge 3.1. NaOH-NALC Homojenizasyon ve Dekontaminasyon Sıvısının Hazırlanması.....	33
Çizelge 3.2. PZR programı.....	40
Çizelge 3.3 Kesim Reaksiyonu Bileşenleri.....	41
Çizelge 3.4. Mikobakteri tür değerlendirme cetveli.....	42
Çizelge 4.1. EZN yöntemi ile yapılan boyama ve kültür sonuçları (LJ ve BACTEC 12B).....	44
Çizelge 4.2. Klasik identifikasyon sonuçları	45
Çizelge 4.3. Örneklerin PZR-RFLP sonuçları.....	48
Çizelge 5.1. Kültür Pozitif Örnek Yüzdesi.....	51

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

TB	Tüberküloz
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
MTC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Complex (Tüberküloz Basil Kompleksi)
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
PPD	Purified Protein Derivate (Saflaştırılmış Protein Derivatı)
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
HIV	Human Immunodeficiency Virus
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome (Kazanılmış İmmün Yetmezlik Sendromu)
VSDB	Verem Savaş Daire Başkanlığı
NTM	Nontüberküloz Mikobakteriler
ARB	Aside Dirençli Basil
HSP	Heat Shock Protein
NALC	N-Asetil-L-Sistein
NaOH	Sodyum hidroksit
EZN	Ehrlich-Ziehl-Neelsen
LJ	Löwenstein-Jensen besiyeri
OADC	Oleic acid/Albumin/ Dextrose/Catalase
ELISA	Enzim Linked Immunosorbent Assay
TBE	Tris-Borik Asit-EDTA
BAL	Bronkoalveolar Lavaj
SVS	Steril Vücut Sıvısı
BOS	Beyin Omirilik Sıvısı

ÖZET

Mikobakteri Türlerinin İdentifikasyonu İçin PZR- RFLP (Parça Uzunluk Polimorfizmi) Tekniği Ve Klasik Yöntemlerin Uygulanması

Günümüzde tüberkülozun laboratuvar tanısında ve identifikasyonunda karşılaşılan zorluklar mevcuttur. Çalışmamızda klasik biyokimyasal identifikasyon testleri ile PZR-RFLP yönteminin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmada klasik biyokimyasal identifikasyon teknikleri ile birlikte PZR-RFLP yöntemi kullanılarak, tüberküloz şüphesi ile gönderilmiş 100 klinik materyalden izole edilen mikobakterilerin hızlı identifikasyonu yapılmıştır. Örneklerin % 43'ü (n=43) kültür yöntemi ile pozitif bulunurken, EZN ve kültür aynı anda % 30'ü (30) pozitif olarak tespit edilmiştir. *Mycobacterium spp.* olarak izole edilen 66 (% 66) örnekten 7'sinin (% 7) atipik olduğu geri kalan 59 (% 59) örneğın MTC olduğu tespit edildi. Klasik identifikasyon sonucunda 40 hastanın katalaz testi düşük, nitratı pozitif bulunurken, 30 hastanın niasin testi pozitif bulundu. Tüberkülozun laboratuvar tanısında moleküler yöntemler halen standardize edilememiş olup klasik yöntemlerle birlikte klinik ön tanı değerlendirilmelidir.

Anahtar sözcükler: PZR- RFLP (Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Parça Uzunluk Polimorfizmi) Tekniği, *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTC), nitrat, katalaz, niasin.

ABSTRACT

Identification Of Mycobacteria To The Species Level By PCR-RFLP And Classical Methods

There is still various problems at diagnosis and identification of tuberculosis. The aim of the study is comparison of biochemical and PCR-RFLP techniques. In our study, 100 clinical specimens suspected by tuberculosis, identified by PCR-RFLP and classical methods. It was detected that % 43 (n=43) of samples were culture positive beside this % 30 of samples were positive for acid-fast bacilli smear and culture at the same time. PCR-RFLP identified % 66 acid-fast isolates recovered from 100 patient specimens submitted for culture during the study. The seven isolates were Mycobacteria other than tuberculosis (MOTT). These isolates were characterized by their morphologic and biochemical characteristics too. According to biochemical identification % 40 of isolates have low activity for catalase test and positive for nitrate test. % 30 of isolates were positive for niacin test. Molecular identification methods aren't standardized so they have to be used with classical methods in clinical diagnosis.

Key Words: PCR- RFLP (Polimerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) Technique, *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC), nitrate, catalase, niacin.

GİRİŞ

Tüberküloz, *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) olarak tanımlanan bir grup mikobakteri tarafından oluşturulan, çok değişik klinik görünümlere sahip, kronik bir enfeksiyondur. Mikobakteri türleri içerisinde yer alan ve insanda tüberküloza neden olan türler, *Mycobacterium (M.) tuberculosis*, *M. bovis*, *M. canettii* ve *M. africanum* olarak saptanmıştır. Yaklaşık 70' den fazla türü olan mikobakterilerin çoğunun insanlarda hastalık oluşturmadığı ancak bazı atipik mikobakteri türlerinin hem immün sistemi baskılanmış hem de normal olan konaklarda tüberküloz dışı hastalıklar meydana getirdiği saptanmıştır (1).

Tüberküloz, 1882 yılında etkenin (*M. tuberculosis*) bulunmasına, 1921 yılında aşının geliştirilmesine ve 1950'li yılların ortalarından beri etkili bir şekilde tedavi edilebiliyor olmasına karşın, tüm dünyada, özellikle de yoksul ülkelerde önemli bir sağlık sorunu olarak varlığını sürdürmektedir. Tüm dünya nüfusunun yaklaşık üçte birinin tüberküloz basili ile infekte olduğu, her yıl 9 milyon yeni tüberküloz vakası ortaya çıktığı ve her yıl 2 milyon kişinin tüberkülozdan öldüğü Dünya Sağlık Örgütü tarafından bildirilmiştir. Ayrıca tüberkülozlu hastaların % 80'nin Afrika (sub-sahara) ve Asya'da yaşadığı da Dünya Sağlık Örgütünün verileri arasındadır (2).

Klinik ve radyolojik bulgular sonucu tüberküloz şüphesi ile gönderilen klinik örneklerde mikobakterilerin saptanmasında ilk basamak olarak, aside dirençli boyama (ARB) yöntemi uygulanmaktadır. Tüberkülozun tanısında kullanılan kültür ve duyarlılık testleri, verilen tedavinin daha etkili kılınmasını sağlamaktadır. Son yıllarda mikrobiyolojinin tüm alanlarında kullanılan moleküler biyolojik yöntemler mikobakterilerin tanısında da kullanılmakta olup, bu sayede patojen olan ve/veya patojen olmayan, sadece çevre kaynaklı olan ve çok nadir olarak görülen yeni mikobakteri türleri de tanımlanabilmektedir (3).

Tüberküloz basilinin identifikasyonunda kullanılan moleküler yöntemlerden biri olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriction Fragment Length Polymorphism (PZR-RFLP) tekniği'nin maliyet açısından ucuz ve hızlı identifikasyonu sağladığı, birçok araştırmacı tarafından vurgulanmıştır (4,5). Bu yöntemde tüm mikobakterilerde ortak olan ısı şok proteinine (hsp65) ait gen bölgesi, uygun forward (f) ve reverse (r) primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltıldıktan sonra, çoğaltılan bölgeler uygun

restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak kesilmekte ve mikobakterilerin tür düzeyinde identifikasyonu yapılmaktadır (6,7,8).

Günümüzde tüberküloz basillerinin tanımlanmasında kullanılan klasik yöntemler bakterilerin üreme hızına, üreme ısısına, koloni görünümüne, pigment üretimine ve biyokimyasal özelliklerine dayalı yöntemlerdir (9). Bu biyokimyasal yöntemlerden, bu tez çalışmasında nitrat, katalaz ve niasin testleri kullanılmıştır.

Günümüzde mikobakterilerin identifikasyonunda hızlı ve otomatize sistemler kullanılmakta olup bunlar; bakterilerin hücre duvarında bulunan mikolik asit analizine dayalı kromotografik yöntemler, DNA prob yöntemi ile özgül genetik tanımlama ve BACTEC sistemi ile kullanılan NAP (p-nitro- α acetylamino- β -hydroxy propiophenone) testidir. NAP testi biyokimyasal tekniklere göre daha duyarlı sonuçlar vermektedir ancak maliyeti biyokimyasal yöntemlere göre oldukça yüksek olduğu için çalışmamızda biyokimyasal yöntemlerle identifikasyon yapılmıştır. Biyokimyasal yöntemlerin maliyetleri yeni yöntemlere göre oldukça düşüktür ancak tüberküloz basillerinin identifikasyonunda geçerliliklerini halen korumaktadırlar. Bununla birlikte tüberküloz dışı mikobakterilerin bazı türlerinin ayırımında yanlış sonuç verebilmektedir.

Bu tez çalışmasında laboratuvarında moleküler identifikasyon tekniklerinin rutin kullanıma girmesi ve bunların klasik biyokimyasal identifikasyon teknikleri ile birlikte kullanılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tanım:

Tüberküloz (TB), *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTC) olarak tanımlanan bir grup mikobakterinin yol açtığı, çok değişik klinik görünümlere sahip bir enfeksiyondur. Bu komplekste yer alan *M. tuberculosis* ve *M. bovis* grubun en önemli üyeleri olup son yıllarda *M. africanum* ve *M. canettii* da bu komplekse dahil edilmiştir (9).

2.2. Tarihçe:

Tüberküloz, geçmişi insanlık tarihi kadar eskilere dayanan ve insanlıkla iç içe olan bir enfeksiyon hastalığıdır. İnsanların mikobakterilerle ilk karşılaşmasının, yerleşik toplulukları oluşturması ve sığırları evcilleştirmesiyle birlikte M.Ö. 8000 yıllarında olduğu tahmin edilmektedir. Almanya’da bulunan, M.Ö. 5000 yıllarına ait insan iskeletlerinde asit ve alkole dirençli basiller saptanmış, M.Ö. 3500–3000 yıllarına ait Mısır mumyaları ve Ürdün’de bulunan insan iskeletlerinde tüberkülozu düşündüren vertebra lezyonları (Pott hastalığı) ve psoas apseleri görülmüştür. En iyi tüberküloz kanıtı, M.S. 700 civarında yaşayan, sekiz yaşındaki, İnka erkek çocuğu mumyasından elde edilmiştir. Bu mumyanın omurga grafisinde Pott hastalığına ait bulgular saptanmış ve lezyon yaymalarında aside dirençli basiller görülmüştür. Hipokrat (M.Ö. 460–377) tüberküloz için erime, tükenme anlamına gelen “phtisis” (fitiz) deyimini kullanırken, M.S. 2. yüzyılda yaşayan Galen, kendisinden sonra 1000 yıl değişmeyen tedavi önerilerini ortaya koymuştur. Bu öneriler, istirahat, öksürüğün kesilmesi, göğüs yakıları, venden kan alımı, sülük uygulaması, kusturucular, müshiller, kabartıcı maddelerle ciltte yaralar oluşturmak şeklinde özetlenebilir (10).

Andreas Vesalius (M.S. 1478) fitizisli hastaların otopsilerinde kaviter lezyonların bulunduğunu bildirmiştir. Franciscus Sylvius (1614–1672) ise tüberkülozdan ölen hastaların

akciğerlerinde küçük sert nodüllerin bulunduğunu göstererek bunları “tüberkül” diye adlandırmıştır. Hastalıkla ilgili düzenli kayıtlar 17. yüzyılın başından itibaren tutulmaya başlanmıştır. On yedinci ve on sekizinci yüzyıllarda sanayi devrimi, yoksul, yetersiz beslenen ve kalabalık barınma koşullarında yaşayan insanların sayısının artmasına neden olarak tüberküloz salgınının genişlemesine neden olmuştur. Robert Koch 1882’de tüberkülozun *M. tuberculosis* ile oluşan bir enfeksiyon hastalığı olduğunu kanıtlayarak yeni bir dönem başlatmıştır. A. Willemin 1865 yılında, tüberkülozlu hastaların kavitelelerinden alınan materyali tavşanlara inoküle ederek tüberküloz geliştiğini göstermiştir (11).

1854 yılında Almanya’da ilk sanatoryumun açılmasıyla tüberküloz tedavisinde farklı bir yaklaşım başlamıştır. W. Roentgen’in 1895 yılında X ışınlarını keşfi ile sanatoryumlar bakteriyolojik ve fluoroskopik incelemelerin yapıldığı tüberküloz tedavi ve araştırma merkezleri haline gelmiştir. Florence Seibert 1930’lu yıllardan sonra old tüberkülini saflaştırmış ve elde edilen saflaştırılmış protein derivatı (PPD) ile tüberküloz enfeksiyonun varlığı saptanmaya başlanmıştır. Calmette ve Guerin isimli araştırmacılar 1921 yılında Fransa’da ilk tüberküloz aşısını yani Bacillus Calmette-Guerin (BCG)’i geliştirmişlerdir. Bu aşı II. Dünya Savaş’ından sonra tüm dünyada yaygın olarak kullanılmıştır. Bundan sonraki yıllarda çalışmalar daha çok tüberküloz tedavisi için yeni antimikrobiyallerin geliştirilmesi üzerine yoğunlaşmıştır (12,13).

Yetmişli yıllara gelindiğinde batı ülkelerinde tüberküloz sorununun artık bittiği ve hastalık eradikasyonunun yakında mümkün olabileceği düşünülüyordu. Ancak 1985 yılından itibaren bu ülkelerde tüberküloz insidansı, immün yetmezliğe neden olan viral enfeksiyonlar (Human immunodeficiency virüs (HIV) gibi) ve uygulanan immün supresif tedaviler nedeniyle tekrar artarak, hastalık yeniden tehdit edici boyutlara ulaşmıştır (14).

2.3. Epidemiyoloji:

2.3.1. Dünyada Tüberküloz

Tüberküloz hastalığı, yirminci yüzyılın ikinci yarısından itibaren gelişmiş ülkelerde kontrol altına alınmasına rağmen, tüm dünyada, özellikle de yoksul ülkelerde, önemli bir sağlık sorunu olarak varlığını sürdürmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) verilerine göre AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome), sıtma ve tüberküloz nedeniyle günümüzde her yıl 6 milyon insan ölmekte olup bu ölümlerin 2 milyonu tüberküloz nedeniyle gerçekleşmektedir. Ayrıca DSÖ'nün raporlarına göre her gün 5000 kişi tüberkülozdan ölmektedir. Bu verilere göre tüberküloz her yıl diğer enfeksiyon hastalıklarının (AIDS, diyare, sıtma, diğer tropikal hastalıkların) yol açtığı toplam ölüm sayısından fazlasını tek başına gerçekleştirmektedir (15).

Dünyada tüberküloz hastalarının % 80'ine sahip olan en çok hastanın olduğu ülkeler, yüksek hasta yükü olan ülkeler olarak bildirilmektedir. Bugün 22 ülke dünyadaki tüberkülozlu hastaların % 80'ini barındırmaktadır. Bunlardan en çok hastanın bulunduğu beş ülke Hindistan, Çin, Bangladeş, Filipinler ve Güney Afrika olarak tespit edilmiştir (16).

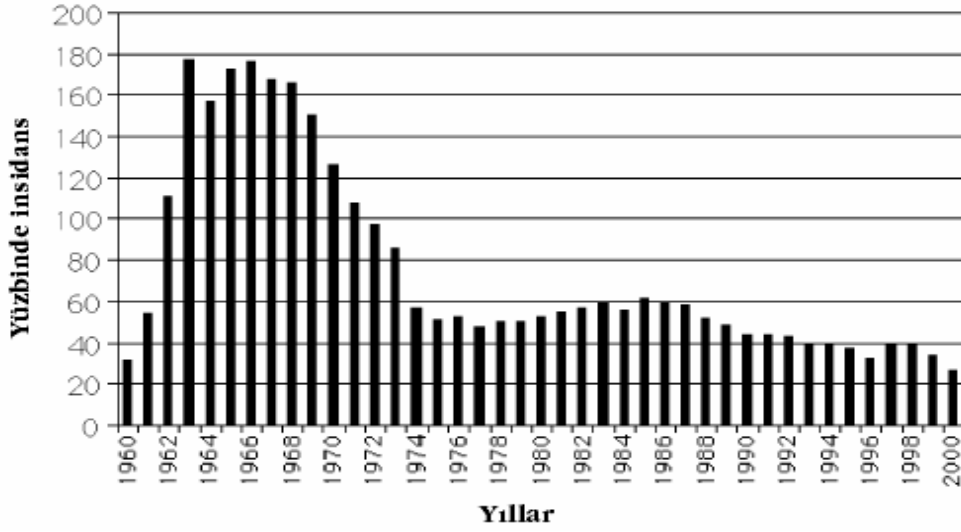
HIV enfeksiyonunun pandemisi 1980'li yıllardan sonra hızla artarak bugün birçok ülkede tüberkülozlu hasta sayısının belirgin bir şekilde artmasına neden olmuştur. Tüm dünyada 1994 ortasına kadar 5,6 milyon kişinin hem HIV hem de tüberküloz basili ile enfekte olduğu bildirilmiştir. Tüm dünyadaki enfekte kişilerin 2/3'ünün ve tüberkülozlu hastaların % 60'ının yaşadığı Asya ülkelerinde son yıllarda HIV enfeksiyonunun giderek artıyor olması ve Sahra Güneyi Afrika ile Güney Doğu Asya'da HIV ile tüberküloz birlikteliği büyük bir sorun olarak ortaya çıkmıştır. Yine DSÖ'nün verilerine göre, son 5 yıl içinde özellikle A.B.D'de HIV ile ilişkili, çoklu ilaç direnci gösteren tüberküloz salgınları bildirilmiştir (14,16).

2.3.2. Türkiye'de Tüberküloz

Ülkemizde tüberkülozla ilgili ilk veriler 19. yüzyılın ortalarından itibaren bildirilmiştir. Osmanlı İmparatorluğu'nu etkileyen tüberküloz salgını, bu yüzyılın sonlarında birçok padişahın ölümüne yol açacak yaygınlığa ulaşmıştır. Birinci Dünya Savaşı'nın getirdiği yoksulluk koşulları nedeniyle hastalık Anadolu'ya yayılmış ve 1940'ların sonunda en yüksek düzeyine ulaşmıştır. 1940'lı yılların sonunda tüberkülozun ülkemizde görülen en sık ölüm nedeni olduğu bildirilmiştir. Türkiye Büyük Millet Meclisi (TBMM)'ince 1949 yılında

onaylanan 5368 sayılı yasayla tüberküloz kontrol çalışmaları başlatılmıştır. Birincisi 1953'te olmak üzere 1980'e dek 9 kez kitlesel aşılama kampanyası yapılmıştır (17).

Verem Savaş Daire Başkanlığı (VSDB) kayıtlarına göre, 1960 sonrası ülkemizde Verem Savaş Dispanserlerine (VSD) kayıtlı tüberküloz hastalarının yıllara göre dağılım eğrisi Çizelge 1'de görülmektedir. Ülkemizde tüberküloz ile enfekte nüfusun oranının yüksek olduğu verem savaş dispanserlerinin kayıtlarında ortaya çıkmaktadır. Çizelgedeki verilerden çıkan sonuç 1953-59'da nüfusun % 56'sının, 1980-82'de ise % 25'nin enfekte olması olarak rapor edilmiştir. Son 20 yılda değişik illerde taramalar yapıldığı ancak bunların verem savaşın kayıtlarında sistematik bir şekilde yer almadığı da bildirilmiştir (18).



Çizelge 2.1. Türkiye'de verem savaş dispanserlerinin kayıtları ile tüberküloz insidansının değişimi (18).

2.4. Tüberküloz Basili Kompleksi (MTC):

Mikobakterilerin 70'in üzerinde farklı türünün olduğu, insan ve hayvanda hastalık yapanların yanısıra; toprakta ve suda yaşayan pekçok saprofit türünün doğada mevcut olduğu bildirilmiştir. Bu mikobakteri türleri içerisinde yer alan ve insanda tüberküloza neden olan türler, *Mycobacterium (M.) tuberculosis*, *M. bovis* ve Afrika ve Asya'da ılımlı tüberküloz olgularından izole edilen *M. africanum* ve son yıllarda MTC içine dahil edilen *M. canettii* olarak saptanmıştır. Ayrıca *M. microtii*'nin kuşlarda ve farelerde benzer lezyonlar oluşturduğu belirlenmiştir. Homolog DNA yapıları ile birbirine benzeyen, dokularda tüberkül ve kazeöz (peynirimsi) nekroz oluşturan bu bakteriler MTC olarak tanımlanmıştır (1).

Daha önceki çağlarda büyük salgınlar yapan, ancak günümüzde sporadik vakalar şeklinde karşımıza çıkan lepra etkeni *M. leprae* mikobakteriler içerisinde yer alan ikinci önemli türüdür. Son yıllarda AIDS vakalarının ve kanser tedavisinde sitostatik ilaç kullanımının artması nedeni ile immün sistemi zayıflamış bireylerde diğer mikobakteri türlerinin de hastalık oluşturma sıklığı artmıştır (3).

2.5. Nontüberküloz Mikobakteriler (NTM):

Robert Koch'un tüberküloz basilini bulmasından kısa bir süre sonra *M. tuberculosis*'den farklı birçok mikobakteri türleri belirlenmiştir. Bu bakteriler tüberküloz dışı mikobakterler (*Mycobacteria other than tuberculosis (MOTT)*) veya nontüberküloz mikobakteriler (NTM) olarak adlandırılmıştır (19).

NTM'lerin su, toprak, toz, çeşitli gıda maddelerinde, evcil ve yabani hayvanlarda yaygın olarak bulunduğu bildirilmiştir. NTM'lerin çoğunun insanda hastalık oluşturmadığı ancak bu gruptaki bazı türlerin, hem immün sistemi baskılanmış hem de normal bireylerde tüberküloz dışı hastalıklar meydana getirdiği saptanmıştır. Tüm mikobakteriyel enfeksiyonların % 0,5–30' nun tüberküloz dışı mikobakteriyel etkenlerden kaynaklandığı bildirilmiştir (20).

Tüberküloz dışı mikobakteriler (*M. avium* ve *M. intracellulare*) son yıllarda nozokomiyal enfeksiyonlar ve özellikle HIV enfeksiyonları nedeniyle önem kazanmışlardır (21).

NTM'ler, vücut yüzeylelerinde ve sekresyonlarda kolonize olabildikleri gibi enfeksiyon etkeni olarak da izole edilebilmektedirler. Ancak NTM'lerin, insanlar arasında geçişini gösteren kanıt yoktur. Tüberküloz dışı mikobakterilerin sıklıkla sistemik ve akciğer enfeksiyonu, lenfadenit, lokalize deri ve yumuşak doku enfeksiyonu ve kateter enfeksiyonuna neden oldukları belirlenmiştir (22).

Daha öncesinde, NTM ile oluşan enfeksiyonlar, hastalığın bulunduğu yer ve etkenin türü dikkate alınmaksızın "atipik tüberküloz" olarak değerlendiriliyordu. Ancak günümüzde, her NTM türünün virulansı ve enfeksiyonun yeri dikkate alınarak tedavinin uygulanması gerektiği bildirilmiştir (23).

2.6. Mikobakteriyel Morfoloji:

Mikobakteriler, ince, bazen hafif kıvrık, kapsülsüz, hareketsiz, spor oluşturmayan, 0,2 x 5,0 mikron boyutlarında birer basil olup, hücre zarlarının dış kısmında Gram pozitif bakterilerdeki gibi ince bir peptidoglikan tabaka bulunmaktadır. Peptidoglikan iskeletine, polisakkarid yapısında arabinogalaktan ve bu yapıların uç kısımlarına da yüksek molekül ağırlıklı mikolik asid esteri bağlanmıştır (24).

Mikobakterilerin, hücre duvarı ve sitoplazmalarında değişik yapıda antijenlerin yer aldığı bildirilmiştir. Bu antijenlere karşı konakçı immün sisteminin gösterdiği cevap tüberküloz patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. Bakterinin patojenitesinde rol oynayan ve antijenik özelliğini veren kord faktörü (6-6'-dimikolat-a-D-trehaloz), glikolipidler (sülfolipidler, fosfolipidler), peptidoglikolipidler (wax D) ve antijenik özelliği arttıran Freud adjuvanı'nın hücre duvarında yer aldığı tespit edilmiştir (25).

Bu bakterilerin en önemli biyolojik özelliklerinden birisi zorunlu aerob olmalarıdır. Bu nedenle oksijen konsantrasyonunun yüksek olduğu dokularda yerleşmeye eğilimlidirler ve akciğerlerde de oksijen konsantrasyonunun yüksek olduğu apikal bölgede tutulum bu nedenle daha sık gerçekleşmektedir. Hücre duvarlarındaki lipid düzeyi miktarının fazla olmasına bağlı olarak, karbolüksin ile boyandıktan sonra asit ve alkolle dekolorize edilememektedirler. Bu özellik nedeni ile aside dirençli bakteri (ARB) olarak tanımlanmışlardır (26).

Tüberküloz basillerinin üremeleri birçok bakteriye göre daha yavaş olup, katı besiyerinde oluşan kolonilerin görünür hale gelebilmesi için, ortalama 4-6 haftalık bir sürenin

gerekli olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeni ise *M. tuberculosis*'in jenerasyon zamanının 14–15 saat olması olup, *M. bovis*'te bu sürenin *M. tuberculosis*'e kıyasla daha uzun olduğu bildirilmiştir (1).

M. tuberculosis'in izolasyonunda genellikle yumurtalı besiyeri kullanılmaktadır. Çünkü yumurtalı besiyerinde bulunan gliserin üremeyi artırmaktadır. *M. tuberculosis*'in, yumurtalı besiyerinde 2–6 haftada, birbirleri ile birleşen düzensiz karnabahar görünümde, R tipi koloniler oluşturduğu saptanmıştır (3).

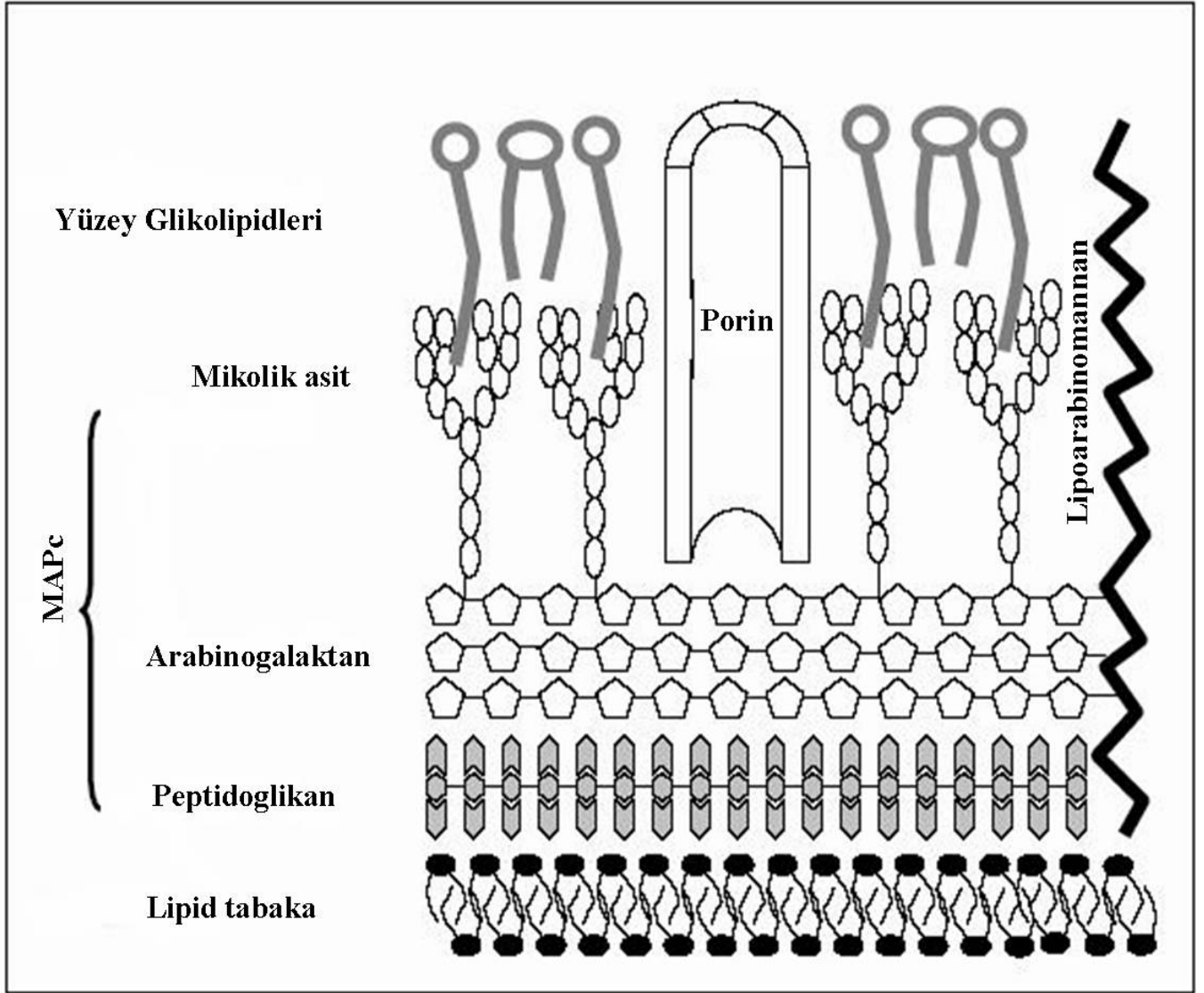
M. bovis mikroaerofilik olup besiyerinde daha geç üremektedir. Gliserin *M. Bovis*'in üremesini zorlaştırdığı için, besiyeri olarak gliserinsiz Löwenstein Jensen veya Petregani besiyeri kullanılmaktadır. *M. bovis* 'in besiyerinde oluşturduğu koloniler küçük, yuvarlak hafif kabarık, nemli beyazımtırak olarak belirlenmiştir (27).

M. africanum, Afrika'da ilk olarak Senegalli bir kişiden izole edilmiş olup, görünüm ve boyanma özellikleri ile *M. tuberculosis*'e benzemektedir. *M. africanum* besiyerinde mat R tipi koloniler oluşturmaktadır. Sodyum pirüvatın bu bakterinin üremesini hızlandırdığı tespit edilmiştir. *M. africanum*'un niasin testi negatif olup diğer biyokimyasal özellikleri *M. tuberculosis* ile *M. bovis*'e benzemektedir (3).

2.6.1. Mikobakterilerin Hücre Yapısı:

Mikobakteriler, bir plazma membranı ile sınırlanan sitoplazmadan ve bunları çevreleyen lipitten zengin bir hücre duvarından oluşmuşlardır. Hücre membranı iki tabaka halinde polar fosfolipid ile çevrilidir. Hücre membranının iç tabakası hidrofobik, dış tabakası ise hidrofilik özelliktedir. Hücre duvarının en önemli özelliği çok yüksek oranda lipid (% 60) içermesidir. Bu yapısı sayesinde; aside dayanıklılık, konakçı hücreleri tarafından yapılan litik enzimlere ve bakterisidal ilaçlara direnç özellikleri kazanılmaktadır. Ayrıca bu yapı sayesinde bazı besinler hatta antibiyotiklerin hücre içine girişinin engellendiği bildirilmiştir (5).

Mikobakteriyel hücre duvarı iskeleti, peptidoglikan, arabinogalaktan (arabinoz + galaktaz) ve mikolik asit olmak üzere üç ana makromolekülden oluşmakta olup bu yapılar şekil 2.1'de görülmektedir (28).



Şekil 2.1. Mikobakteriyel hücre yapısı (28)

2.7. Tüberkülozun Patogenezi ve Patolojisi

2.7.1. Tüberkülozun Patogenezi

Akciğer enfeksiyonunun başlaması için tüberküloz basilinin alveollere kadar ulaşması gerekmektedir. Bu durum vakaların sadece % 5-10'unda gerçekleşebilmektedir. Basille karşılaşan her bireyde hastalık gelişmemesi, kişisel ve irksal faktörlerin hastalık gelişmesinde rol oynayabileceği düşüncesini ortaya çıkarmıştır. Tüberküloza karşı dirençli ailelerin olmasının ve tek yumurta ikizlerinde hastalığa yakalanma konusunda görülen benzer özellikler bu görüşü desteklemektedir. Zencilerdeki ve beyazlardaki duyarlılığın farklı olmasının makrofaj aktivasyonundaki genetik farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir. Süt çocukluğu, ergenlik çağında ve yaşlılıkta tüberküloza yakalanma olasılığının yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yetersiz (dengesiz) beslenme ve kıtlığın da hastalığa yakalanmada risk faktörü olduğu yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir (29).

Konağın lokal savunma mekanizmalarını geçerek alveoler düzeye kadar ulaşmış bir tüberküloz basilinin neden olduğu olaylar zincirinde aşağıdaki olaylar gerçekleşmektedir.

I. Alveoler makrofajlar inhale edilen basili herhangi bir lezyon oluşturmadan elimine edebilirler.

II. İn hale edilen basiller, alveoler makrofajlar içinde çoğalabilirler ve kazeöz bir odak oluştururlar. Oluşan bu kazeöz odak;

a. İyileşebilir,

b. Radyolojik bir görüntü vermeden stabilize olarak kalabilir ya da,

c. Progresyon göstererek, daha büyük odaklar oluşturabilir.

Daha büyük kazeöz odaklar da;

i. İyileşebilir,

ii. Stabilize olarak kalabilir ya da,

iii. Lokal olarak giderek büyür, kan ve lenf dolaşımına karışarak yayılır.

Çeşitli patogenetik süreçler sonucunda (gecikmiş tip aşırı duyarlılık ve hücrel immünite gelişmesi) oluşan büyük kazeöz odaklar, içlerindeki kazeöz materyali ve basilleri bronşiyal ağaca boşaltarak bronş yolu ile yayılıma neden olurlar. Bu daha çok enfekte olmuş bireylerde, basille yeniden (endojen ya da eksojen kaynaklı) karşılaşma sonucunda erişkin tip akciğer tüberkülozu şeklinde ortaya çıkmaktadır.

2.7.2. Tüberkülozun Patolojisi

Primer enfeksiyon sırasında damlacık çekirdekleri içinde alınan basiller öncelikle akciğerlerin orta ve alt alanlarında ve hemen plevranın altında yerleşirler. Basiller önce ortamda bulunan aktive olmamış alveolar makrofajlarla karşılaşır ve makrofajlar tarafından fagosite edilir. Fagosite edilen basiller makrofajlar tarafından tamamen yok edebilir ya da inhibe edebilir veya basiller makrofaj içinde çoğalabilir. Eğer az sayıda, virülansı düşük basil ile karşılaşma gerçekleşirse makrofajlar basilleri tamamen yok eder. Makrofajlar tarafından yok edilemeyen basiller ise hücre içinde logaritmik olarak hızla çoğalmaya başlar, çoğalan basiller makrofajı parçalayarak hücre dışına çıkar, ortamdaki diğer makrofajlar tarafından fagosite edilir, onların içinde de çoğalmaya devam ederler. Basiller bu dönemde sadece hücre içinde çoğalabilme yeteneğine sahiptir. Bu olayların devam etmesiyle ortamdaki basil sayısı hızla artar, kemotaktik faktörlerin de etkisiyle makrofajlar, monositler bu bölgede toplanır. Enfeksiyonu izleyen gün ve haftalarda epitelioid histiositlere dönüşüm gerçekleşir ve Langerhans dev hücreleri meydana gelir. Bunların oluşturduğu odak lenfositler tarafından çevrelenir ve böylece “tüberkül” veya “granülom” olarak tanımlanan ilk tüberküloz lezyonu oluşur. Primer odakta çoğalan basiller önce bölgesel lenf bezlerine ulaşarak lenfadenite neden olur ve lenf bezinde granülatöz doku gelişir. Primer odak ve bölgesel lenfadenit ikilisi “Primer Kompleks” veya “Gohn Kompleksi” olarak tanımlanır. Bölgesel lenf bezinde çoğalan basiller lenfatik dolaşıma karışır ve lenfo-hematojen yolla tüm organizmaya, primer odaktan bağımsız uzak bölgelere dağılır. Dolaşıma karışan basiller özellikle akciğerlerin üst alanları, böbrek parankimi, uzun kemiklerin epifizleri, beyin korteksi, periferik lenf bezleri gibi yerlere yerleşerek buralarda granülomlar oluşturur. Akciğer apekslerinde oluşan küçük granülomlar “Simon Odağı” olarak tanımlanır. Doku oksijen basıncı yüksekliğinin basillerin lokalizasyonunda rol oynadığı düşünülmektedir. Enfeksiyonun bu döneminde bireylerde herhangi bir semptom yoktur ve PPD (-) dir. BCG ile aşılanmış hayvanlarda da basiller ilk 2 hafta gene benzer şekilde çoğalır ancak doku reaksiyonu ve hematojen yayılım daha sınırlıdır.

2.7.3. İmmün (Bağışık) yanıt mekanizmaları:

Mikobakterilerin sitoplazmasında ve hücre duvarındaki lipidlerden bazılarının antijenik özellikte olduğu belirlenmiştir. Mikolik asitler, fosfolipidler, Wax D, mikosidler, toksisite ve immunolojik aktivitede rol oynadıkları bildirilmiştir. *M. tuberculosis*'de bulunan proteinler; sitoplazmik proteinler, membran ilişkili proteinler, peptidoglikan ilişkili proteinler, dış hücre duvarı proteinleri, ısı şok proteinleri (hsp) ve hücre membranından salınan proteinleridir. Bunlardan ısı şok proteinleri ve hücre membranından salınan proteinlerin immun yanıt oluşumunda etkileri bulunduğu saptanmıştır. Kord faktörünün virulans ile ilgili olduğu, sülfolipidlerin konak mitokondri membranını eriticisi etkisi nedeniyle hastalık oluşturma olasılığını daha da arttırdığı, polisakkaridlerin nötrofillerin damardan dokuya göçünü engellediği, fosfolipidlerin epithelial hücrelerin langerhans dev hücrelerine dönüşmesine neden olduğu, Wax D'nin (balmumu maddesi) aşırı duyarlılık tepkimelerine neden olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (30).

Tüberküloz immünolojisinde hücresel bağışıklık, hücresel aşırı duyarlılık reaksiyonları ve bu mikroorganizmalara karşı antikor cevabından söz edilse bile; esas bağışıklıktan sorumlu mekanizma hücresel bağışıklık olarak gerçekleşmektedir. Vücuda ilk kez tüberküloz basili girdiğinde, basil polimorf nüveli lökositler (PNL) ve uyarılmış makrofajlar tarafından fagosite edilmektedirler. Bu hücreler tüberküloz basilini parçalayamadıkları için, basiller hücre içinde çoğalarak makrofajlar tarafından bölgesel lenf düğümlerine taşınmaktadırlar. Lenf düğümlerinde canlı basillerin etrafı lenfositler tarafından sarılır ve oluşturulan bariyer yardımı ile lezyon sınırlandırılmaya çalışılır. Lenfosit bariyeri yanında olay bölgesinde gelişen nekroz ve kalsiyum çökmesi ile oluşturulan oksijensiz ortam basil çoğalmasını sınırlandırmaktadır. Eğer bireyin immün sistemi sağlam ise bu dönemde hiçbir klinik bulgu vermeden meydana gelen lezyonların iyileştiği saptanmıştır (31).

Enfeksiyonu takiben 2- 6 hafta sonra hücresel bağışık gelişmektedir. Yardımcı - T (Th) lenfositleri tarafından salgılanan sitokinlere bağılı olarak makrofajların aktivitesi artar ve aktive olan makrofajlar tüberküloz basilini fagosite ederek bakteriyi parçalarlar. Ayrıca doğrudan T lenfositlerin salgıladıkları sitotoksinlerin bakterilerin yok edilmesini kolaylaştırdığı tespit edilmiştir. Bu olayları takiben lokal kronik granülatöz iltihap meydana gelmektedir. Eğer ortamda öldürülemeyen basiller varsa bunlar aktive olmuş makrofajlar ve duyarlı lenfositler tarafından sarılarak tüberkül adı verilen yapı oluşturulur ve

öldürülemeyen basiller buraya hapsedilir. Buradaki basillerin üreyemedikleri ancak canlılıklarını devam ettirdikleri saptanmış olup bunlara Dormant basiller adı verilmektedir (32).

Hücrel immüniteye ek olarak devreye giren aşırı duyarlılık mekanizmalarının peynirleşme nekrozu adı verilen olaya neden oldukları belirlenmiştir. Normal şartlarda peynirleşme nekrozu anaerobik ortam meydana getirerek basilin çoğalmasını önleyebilir. Ancak basilin üremesinin sınırlandırılmadığı durumlarda basilin ve metabolik ürünlerinin aşırı artmasına bağlı olarak aşırı duyarlılık mekanizmaları harekete geçerek; geniş nekrotik alanlar meydana getirdiği bildirilmiştir. Nekrotik alanların içeriği boşalır ise kaviteler gelişebileceği saptanmıştır. Tüberküloz enfeksiyonunda humoral cevapta IgG, IgA ve IgM'nin açığa çıktığı saptanmış olup bu immunglobulinlerin bağışıklıkta rolü olmadığı belirlenmiştir. Tüberküloza spesifik bu antikorlar ELISA gibi serolojik testlerle araştırılmak sureti ile tüberküloz teşhisinde kullanılmaktadır (33).

2.7.4. Bacillus Calmette Guerin (BCG)'nin Patogenezdaki Yeri:

BCG aşısı, Fransa'da Calmette ve Guérin tarafından 1920'li yıllarda bovin tip tüberküloz basillerini 13 senelik bir süre sadece safralı ve gliserinli patates üzerinde 230 defa kültürden kültüre aktararak üretilmiştir. Bu şekilde üretilen basillerin yapılan deneylerde insanlarda hastalık yapmadığı, fakat tüberküloz basiline karşı insan organizmasında bir direnç oluşturduğu belirlendi. Bu şekilde virulansı azaltılmış yani hastalık yapmadan direnç kazandıran bu basile, basil ve keşefedenlerin isimlerinin baş harfleri alınarak kısaca BCG ismi verilmiştir (34).

BCG aşısı, ısı ve ışığa çok dayanıksızdır. Aşılanan kişiyi 5–6 yıl süreyle ve % 80 oranında korur. Özellikle doğumdan itibaren uygulanabilir. BCG aşısı 1 ml'lik, bir kullanımlık (Disposable) diziyem taksimatlı enjektörlerle sol omuz deltoid adelenin alt ucuna, deri içine (intradermal) 0–12 aylık bebeklere 1/2 diziyem, daha yüksek yaş gruplarına 1 diziyem (0,1 ml.) olarak uygulanır (18).

BCG aşısı kişide tüberkülin immünitesi meydana getirmek amacı ile yapılmaktadır. Bu kazanılmış immünite, makrofajlara basille karşılaşınca daha kolay fagositoz ve basili sınırlama özelliğini sağlamaktadır. Fakat BCG aşısı yapılan kişide primer tüberküloz

enfeksiyonu ve hastalığının tekrar oluşabildiği rapor edilmiştir. Miliyer ve menenjit tüberkülozu ve bunlara bağlı ölümün bu aşı sayesinde azaldığı bildirilmiştir. BCG'nin post primer tüberkülozun ortaya çıkmasını önleyemediği ve özellikle eksojen kaynaklı reenfeksiyonda koruyuculuğunun olmadığı da saptanmıştır (31).

BCG aşısının ateşli hastalığı olanlara, kızamık salgını sırasında (Kızamık aşısı yapılmamış olanlar), immün yetmezliği olan hastalara, tüberküloz hastalığı geçirenlere, deri hastalığı olanlara (ekzema vs.), kortizon grubu ilaçlarla tedavi görenlere, tüberkülin cilt testi pozitif olanlara uygulanmaması gerektiği bildirilmiştir (12).

Ülkemizde 1981–1982 yıllarında yapılan prevalans çalışmasının verilerine göre, BCG'nin Türkiye'de bütün yaş gruplarında koruyuculuğu % 72,7 bulunmuştur. Bu oranın 0–6 yaş grubunda % 85 olduğu bildirilmiştir. Sağlık Bakanlığı, biri doğumdan 2 ay sonra, diğeri ilkokul birinci sınıfta olmak üzere, çocuklarda iki kez BCG aşısı yapılmasını kararlaştırmıştır. Doğumdan hemen sonra BCG aşısı yapılabilir, fakat bebeğin cildi çok ince olduğu için teknik zorlukları olduğu bildirilmiştir. Ayrıca komplikasyonların daha fazla olması ve bağışıklık yanıtının yeterli gelişmemesi nedeniyle pek tercih edilmemektedir (18).

2.8. Tüberküloz'un Kliniği:

Tüberküloz etkeni mikobakterilerin çeşitli organlara yerleşebileceği saptanmış olup akciğer, gastrointestinal sistem, plevra, periton, meninks, eklem ve kemik, lenf bezleri, larinks, kemik, deri, uterus, ovaryum; nadiren dalak, karaciğer, mide ve pankreası tutabileceği bildirilmiştir. Genelde akciğer ve gastrointestinal sistem dışındaki organlarda enfeksiyonun sekonder enfeksiyon olarak görüldüğü ve organ tüberkülozunun gelişebilmesi için basilin hematojen yayılımının olması gerektiği belirtilmektedir (35).

Hastalığın genel bulguları olarak, yorgunluk, halsizlik, iştahsızlık, zayıflama, ateş, terleme, eritrosit sedimentasyon hızında artma gösterilebilir. Bazen tek bir organa değil, tüm organlara yayılım sonucu meydana gelen ağır enfeksiyona "miliyer tüberküloz" adı verilmektedir (36).

Tüberküloz olgularının % 82,5'nin pulmoner, % 17,5'nin ekstrapulmoner tüberküloz şeklinde olduğu bildirilmiş olup; ekstrapulmoner tüberküloz vakalarının dağılımı; % 30 lenfatik, % 23 plevral, % 12 genitoüriner, % 10 kemik-eklem, % 7 milier, % 5 menenjit, % 3 peritonit, % 10 diğerleri olarak değerlendirilmiştir (37).

Tedavi edilmeyen tüberkülozlu olguların % 50'sinin 5 yıl içinde öldüğü tespit edilmiştir. Yaş ilerledikçe mortalitenin arttığı ve mortalite oranının 5–14 yaşta % 16 iken, 65 yaş üzerinde % 63 olduğu bildirilmiştir. Ayrıca tedavisiz iyileşme oranının % 25 olduğu elde edilen bulgular arasındadır (16).

2.9. Tüberkülozda Bulaşıcılığı Etkileyen Faktörler:

Tüberküloz enfeksiyonu, içinde canlı tüberküloz basili içeren ve havada asılı halde duran, damlacık çekirdeklerinin (1–5 μm) solunum yolu ile alınması ve bunların alveollere yerleşmesiyle meydana gelmektedir. Ağız ve burundan atılan damlacıklar, havada asılı dururken sularını kaybederler. Bu şekilde oluşan küçük toz parçacıklarına damlacık çekirdeği denir. Bir hastanın bulaştırıcı olabilmesi için basilin havaya verilmesi ve aerosol haline geçmesi gerekir. Bu nedenle yalnızca akciğer ve larinks tüberkülozlu hastalar bulaştırıcı olarak kabul edilmektedir. Bir öksürüğün 3000 damlacık çekirdeği oluşturabilme kapasitesine sahip olduğu bildirilmiştir. Aerosol şeklinde olan damlacıklardan büyük olanları hemen aşağıya çöker ve bulaşıcı özelliği kalmaz. Bazıları ise hemen kuruyarak damlacık çekirdekleri oluşturur. Bunlardan 1–10 μm büyüklüktekiler yere çökmeden havada asılı halde kalırlar ve buldukları ortamda hava akımına bağlı olarak yer değiştirirler. Bu nedenle çok sayıda basil içeren büyük tanecikler yerine tek basil içeren küçük çekirdekçiklerin daha bulaştırıcı olduğu ve 10 μm 'den büyük çekirdeklerin alveollere ulaşamadıkları bildirilmiştir (38).

Tüberkülozda bulaşıcılığı etkileyen faktörler mikroorganizmaya ait etmenler, konakçıya ait etmenler ve çevresel etmenler olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (18).

Kaynak olgularda, öksürük, hapsirik, esneme gibi hareketlerin üst solunum yollarında hızlı hava akımları ile hava yolunu kaplayan sıvıdan ve akciğerdeki hastalık odaklarından çok

sayıda sekresyon damlacıklarının saçılmasına neden oldukları saptanmıştır. Bulaştırıcılıktan en çok sorumlu olan hastaların balgam yaymaları pozitif olan hastalar olduğu, yayması negatif ama kültürü pozitif olanların bulaştırıcılığının az olduğu tespit edilmiştir. Yayma pozitif olguların gelişmiş ülkelerde her yıl 10 kişiyi, gelişmemiş ülkelerde 20 kişiyi infekte ettiği kabul edilmektedir. Kaynak olgunun bulaştırıcılığının önlenmesinde en önemli yol yayma pozitif hastaların tedavisidir. Tedaviye alınan hastaların tedavinin ikinci haftasından sonra bulaştırıcı özelliğini kaybettiği bildirilmiştir. Etkin bir tedavinin, hem hastalarda basil sayısını azalttığı (iki haftada %99), hem de öksürüğü azaltarak (iki haftada %66) bulaştırıcılık riskini azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca hastanın öksürürken ağzını kapatması ve maske kullanması gibi önlemler sayesinde hastanın diğer bireyleri enfekte etme riskinin azaldığı rapor edilmiştir (39).

İnfekte olmayan ama risk altındaki bireylerin BCG aşısı olmaları, önceden tüberkülozun veya atipik bir enfeksiyonun geçirilmiş olmasının bulaşma oranını azalttığı belirlenmiştir. Ancak temaslarda diyabet, alkolizm ve HIV enfeksiyonu gibi immün sistemin zayıfladığı durumlarda bulaşma riskinin arttığı da tespit edilmiştir (40).

Tüberkülozda bulaşıcılığı etkileyen faktörlerden biri olan çevresel etmenler ortamın ısısı, nemi, büyüklüğü ve kalabalık olmaması olarak sıralanabilir. Kapalı ortamlarda, standart nem ve ısı koşullarında aerosol halindeki tüberküloz basillerinin % 60-71'nin üç saat, % 48-56'sının altı saat, % 28-30'nun dokuz saat süre ile canlı kaldıkları bildirilmiştir. Bu nedenle solunan ortamdaki damlacık çekirdeklerinin havalandırma ve süzme yoluyla uzaklaştırılması veya ultraviyole ışık ile öldürülmesi bulaşıcılığı önlemede etkin önlemler olarak bildirilmektedir. Oda havasının saatte 6-10 kez değiştirilmesi ile 60 dakikada ortamdaki basil sayısının % 99,9 oranında azaldığı saptanmıştır (18).

2.10. İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü (HIV) ve Tüberküloz

İmmün sistemi sağlam olan bireylerde, tüberküloz enfeksiyonu sonrası yaşam boyu aktif tüberküloz gelişme riski % 5–15 iken, HIV enfeksiyonlularda en az % 30 olarak saptanmıştır. A.B.D' inde tüberküloz hastalarının % 20-29'unda HIV pozitifliği saptandığı bildirilmiştir (14).

HIV pozitif hastalarda tüberküloz gelişme riski normal bireylere göre 113 kat fazla olup bu risk AIDS'lerde 170 kat daha fazla olarak tespit edilmiştir. AIDS' li hastalarda tüberküloz enfeksiyonu sonucu görülen organ tutulumu sırasıyla, % 38 akciğer, % 30 ekstra pulmoner tutulum, % 32 pulmoner ve ekstra pulmoner tutulum olarak bildirilmiştir (41).

2.11. *Mycobacterium tuberculosis* İzolasyonunda Kullanılan Mikrobiyolojik Tanı Yöntemleri:

Klinik, radyolojik ve/veya histolojik bulgularla bir hastada tüberkülozdan şüphelenilse de hastalığın kesin tanısı klinik örneklerden tüberküloz basilinin gösterilmesi ile konulabilmektedir. Mikobakteriyoloji laboratuvarının tüberküloz tanı ve tedavisine katkısı, mikobakterilerin saptanması ve izolasyonu, mikobakteri türlerinin tür tayini ve üretilen basillerin tüberküloz ilaçlarına karşı duyarlılığının saptamasıdır. Bu nedenle incelenen örneğin uygun şekilde elde edilmesi ve yine uygun şekilde laboratuvara gönderilmesi, gönderilen örneğin laboratuvarında organik atıklardan temizlenmesi, yayma ve kültürünün yapılması, üretilen basilin biyokimyasal veya diğer yöntemlerle tip tayininin yapılması ve son olarak antibiyotiklere direnç özelliklerinin değerlendirilmesi gerekmektedir. Tüm bu süreç 2–8 haftayı almaktadır (42).

Akciğer tüberkülozu düşünülen olgularda incelenmesi gereken ilk örnek balgam olup üç gün arka arkaya sabah balgamlarının incelenmesi ile doğru tanı konabilmektedir. Balgam çıkaramayan olgularda hipertonic tuzlu su çözeltilerinin inhalasyonu ile balgam çıkartılabilir. Balgam çıkartamayan olgularda (özellikle çocuklarda) diğer bir yöntem nazogastrik sonda ile aspirasyonu yapılmaktadır. Fiberoptik bronkoskopi ile yapılan bronkoalveoler lavaj (BAL) ve biyopsi de tüberkülozun teşhisinde yapılmaktadır (43).

2.11.1. Hasta Örneklerinin İşlenmesi:

Tüberküloz değişik organ ve sistem tutulumları ile seyrettiğinden, hastalığın tanısında balgam, mide lavajı, bronşiyal lavaj, laringeal sürüntü, beyin omurilik sıvısı (BOS), plevra sıvısı, idrar, gaita, cilt ve yumuşak doku biyopsi örnekleri gibi çok çeşitli klinik örnek kullanılabilir. Hastalardan alındıktan sonra mikobakteriyoloji laboratuvarına gönderilen klinik örnekler, steril örnekler (kan, kemik iliği, suprapubik aspirasyon, BOS, diğer vücut sıvıları ve biyopsi örnekleri) veya farklı mikroorganizmaların bulunduğu vücudun çeşitli bölgelerinden alınmış örnekler (balgam, apse, bronkoalveoler lavaj sıvısı, açlık mide suyu, larengieal sürüntü, idrar, gaita, cilt ve yumuşak doku) olmak üzere iki grup altında toplanmaktadır. Klinik örneklere; organik kalıntıları sindirip homojenize etmek için homojenizasyon ve kontaminasyona neden olabilecek mikroorganizmaları (bakteri, mantar vb.) ortamdaki uzaklaştırmak için dekontaminasyon işlemi uygulanmaktadır (44).

Balgam örneklerinin yoğunlaştırıldıktan sonra incelenmesinin testin pozitif prediktif değerini arttırdığı bildirilmiştir. Bu amaçla farklı prosedürler homojenizasyon ve dekontaminasyon işlemi için kullanılmaktadır. Günümüzde homojenizasyon ve dekontaminasyon işlemi için farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler; N-Asetil-L-Sistein (NALC)- Sodyum hidroksit (NaOH), sadece NaOH, Zefiran-trisodyum fosfat (Z-TSP), sadece oksalik asit ve Cetylpyridinium chloride (CPC)-sodyum klorid kullanılarak yapılmaktadır. Mikobakteriyoloji laboratuvarlarında bu yöntemlerden en çok NALC- NaOH prosedürü tercih edilmektedir. Bu yöntemde kullanılan kimyasallardan NALC mukolitik, % 4'lük NaOH dekontaminant olup % 2.9'lük sodyum sitrat klinik örnekte bulunabilecek ağır metal iyonlarını bağlayarak NALC'in inaktive olmasını önlemektedir (45).

Günümüzde tüberkülozun mikrobiyolojik tanısında kullanılan yöntemler üç ana başlık altında toplanabilmekte olup bunlar boyama ve mikroskopik inceleme, kültür ve moleküler biyolojik yöntemlerdir.

2.11.2. Boyama ve Mikroskopik İnceleme

Mikroskop ile tüberküloz basillerinin saptanması, tüberküloz hastalığının tanısının konmasında en hızlı, en ucuz, en yararlı yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir. Tüberküloz basili kültürde çok geç üretildiğinden mikroskop ile saptanması büyük önem taşır. Tüberküloz basilinin doğrudan yayma ile en kolay saptanabileceği örnek türü balgamdır. Balgam örneğinden yapılan doğrudan yaymalarda basil görülebilir. Bu şekilde hazırlanmış örneklerde basil görülebilmesi için balgamın her ml'sinde 5000–10000 basil bulunmalıdır (46).

Bunların dışında kalan örneklerde genellikle basil miktarı azdır. Örneklerin santrifüjle bir tüpün dibine çöktürülerek toplanması, yani yoğunlaştırılması ve buradan yayma yapılması, tanı koyma şansını artırdığı için, homojenize ve dekontamine edilmiş örneklerden elde edilen konsantre sedimentten hazırlanan preparatlar, aside dirençli boyama yöntemi ile boyanıp, mikroskopik olarak incelenebilmektedir (47).

Direkt yayma preparatların incelenmesinde en sık kullanılan boyama yöntemleri Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) ve Auramin-rhodamine'dir. Balgam yaymasında aside dirençli basilin (ARB) bulunması örnekte mikobakterinin varlığını gösteren ilk bulgudur.

Ülkemizde en sık kullanılan boyama yöntemi EZN boyamadır. Boyamadan sonra hazırlanan yayma preparat, ışık mikroskobunda immersiyon objektifi ile incelenmektedir. Karşı boya olarak metilen mavisi kullanıldığında aside dirençli basiller mavi zeminde pembe-kırmızı ince çubuklar halinde görülebilmektedir (18).

Auramin-rhodamine metodu ile boyanan aside dirençli organizmalar sarı-turuncu renkte floresan verirler. Auramin-rhodamine boyama yönteminin EZN'ye kıyasla daha hassas olduğu ve kısa zamanda geniş bir tarama imkanı verdiği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (48). Ba ve arkadaşlarının 2630 balgam örneğinde yaptıkları çalışmada, her 100 alanda en az 10 basil varsa, EZN ve florokrom boyamanın duyarlılıklarının benzer, her 100 alanda 10'dan daha az basil varsa florokrom boyama metodunun duyarlılığının daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Ayrıca bir yaymayı negatif olarak raporlamadan önce gerekli ortalama zamanın, EZN boyama metodu ile 7 dakika 44 saniye, floresan mikroskopla ise 3 dakika 34 saniye olduğunu saptamışlardır (49). Kumar ve arkadaşları, doku biyopsilerinde bakteri yükünün düşük olduğu durumlarda florokrom boyama metodunun EZN boyama

metoduna üstün olduğunu bildirmişlerdir (50). Auramin-rhodamine boyama yönteminde değerlendirme floresan mikroskopta yapıldığı için bu mikroskobu temin edemeyen laboratuvarlar için DSÖ tarafından EZN yöntemi önerilmektedir. Bu nedenden dolayı birçok ülkede rutin olarak EZN metodu kullanılmaktadır (15).

2.11.3. Kültür:

Mikobakterilerin ikiye bölünmesi için gerekli süre 16–18 saat kadar olduğu için besiyerinden izole edilebilmeleri için kültürlerin uzun süre inkübe edilmesi gerekmektedir. Kültür süreleri ise katı besiyerinde 35–37 °C’de 6–8 hafta kadardır (1).

Genel olarak mikobakteri izolasyonu amacıyla kullanılan besiyerleri özelliklerine göre katı ve sıvı besiyerleri olarak ayrılmaktadır. Tüp veya petri kabı kullanarak hazırlanan katı besiyerlerinde karışık kolonilerin ve kontaminantların tespiti mümkün olmaktadır. Günümüzde katı besiyerleri altın standart olarak kabul edilmektedir. Mikobakterilerin izolasyonunda kullanılan katı besiyerleri içerisinde yer alan yumurta bazlı besiyerleri: Löwenstein-Jensen besiyeri (LJ), petraghani besiyeri, American Thoracic Society besiyeri olup agar bazlı besiyerleri olarak Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11, sıvı besiyeri olarak ise Middlebrook 7H9 kullanılmaktadır. Bu besiyerlerinin en önemli avantajı mikobakterilerin birçoğunun üretilmesinin mümkün olmasıdır (51).

Günümüzde yumurta bazlı besiyeri olan Löwenstein-Jensen besiyeri (LJ) yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu besiyerinin avantajları, uygun saklama koşullarında uzun süre korunabilmeleri, içerdiği fosfolipidler sayesinde besiyeri veya inokulum içindeki toksik maddeleri bağlayarak etkisizleştirmesi, içerdiği malaşit yeşili ile kontaminan mikroorganizmaların üremesini engellemesi, ucuz olması ve birçok mikobakteri türünü üretebilme özelliği sıralanmaktadır (52).

Petraghani besiyeri, özellikle yoğun kontamine örneklerden mikobakteri izolasyonunda tercih edilmektedir çünkü inhibitör madde olarak besiyerine eklenen malaşit yeşilini daha yüksek konsantrasyonda içermektedir (27).

American Thoracic Society Medium (ATSM), diğerlerine göre daha düşük oranda malaşit yeşili içerdiğinden özellikle BOS, plevra sıvısı, biyopsi gibi steril örneklerin kültüründe önerilmektedir. Avrupa’da ve gelişmekte olan ülkelerde yumurtalı besiyerlerinin

kullanıldığı, buna karşılık A.B.D'de agarlı besiyerlerinin (Middlebrook) daha fazla kullanıldığı bildirilmiştir (53).

Middlebrook 7H10 ve 7H11 besiyerleri ilk kez Middlebrook ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (54). Middlebrook besiyerlerinin hazırlanması ve saklanması zordur. Middlebrook 7H10 ve 7H11 agar bazına, gliserol ve OADC eki eklenmek suretiyle kullanılmaktadır. Besiyerine eklenen ek maddeler (Oleic acid/Albumin/ Dextrose/Catalase - OADC-) besiyeri maliyetini arttırmaktadır. Besiyeri hazırlandıktan sonra en kısa sürede (en fazla üç hafta) kullanılmak zorundadır (55). Ayrıca kolonilerin görünür hale gelmesinin LJ besiyerine göre çok daha erken olması, antitüberküloz ilaçlarla etkileşime girmemesi, Middlebrook 7H11 besiyerinde izoniazid (INH) dirençli bakterilerin daha kolay üremesi gibi üstünlükleri saptanmıştır. Middlebrook 7H11, 7H10'dan farklı olarak % 0,1 kazein içerdiği için INH dirençli mikobakteriler için üremeyi artırıcı etkisi vardır. Ayrıca % 2 gliserol içermekte olup bu sayede *M. avium* kompleksi bu besiyerinde daha kolay üremektedir (56,57). Sıvı besiyerleri içinde yer alan Middlebrook 7H9, 7H12, 7H13 ve Dubos tween albumin besiyerleri, mikobakterilerin stok suşlarının subkültürlerinin yapılması, duyarlık deneyleri ve diğer in vitro deneylerde kullanılmaktadır. Özellikle Middlebrook 7H9, bakteri sayısının az olduğu steril bölgelerden alınan klinik örneklerde, bakteriyi çoğaltmak ve dolayısıyla izolasyon şansını artırmak amacıyla da kullanılabilir. Günümüzde Middlebrook 7H12 (BACTEC 12B) ve Middlebrook 7H13 (BACTEC 13A) sıvı besiyerleri, hızlı kültür sistemlerinde temel besiyeri olarak yer almaktadır (58).

Klasik kültür yöntemleri dışında hızlı sonuç veren kültür yöntemleri de tüberkülozun tanısında kullanılan rutin yöntemler arasında yer almaktadır. Bu yöntemlerde zengin içerikli besiyerleri kullanılarak hem mikobakterilerin izolasyon şansı artırılmakta hem de mikobakterilerin üremesi erken dönemde sağlanmaktadır. Bu sistemler, radiometrik sistem (BACTEC 460 TB), bifazik sistem (Septi-check AFB sistemi), kolorimetrik sistem (BacT/ALERT sistemi), karbondioksit oluşumunu saptayan sistem (ESP MYCO sistemi), floresans ile değerlendirilen sistem (Mycobacteria Growth Indicator Tube) ve manuel sistemler (MB-Redoks) olarak sıralanmaktadır (59).

BACTEC 460 TB, radyometrik bir yöntem olup klinik örneklerden mikobakteri saptanması ve tür ayrımı için gereken süreyi önemli oranda kısaltmıştır. Bu sistem, izolasyon, identifikasyon ve duyarlılık deneylerinin uygulandığı bir sistem olarak kullanılmaktadır. Ayrıca sistemde MTC ile NTM'lerin ayrımı yapılmakta olup mikobakterilerin antitüberküloz

ilaçlara duyarlılığı saptanabilmektedir. Bu sistem; BACTEC 12B (Middlebrook 7H12) ve BACTEC 13A (Middlebrook 7H13) olmak üzere bu sistem iki tip besiyeri içerir. Pulmoner ve ekstrapulmoner örnekler, mikobakter izolasyonu için BACTEC 12B besiyerine ekilir. Kan, kemik iliği ve BOS örnekleri BACTEC 13A sıvı besiyerine ekilir (60). BACTEC 13A kanın konsantre edilmesi gerekmeden ve liziz yapılmadan direkt ekilebileceği besiyeridir. Hipotonik bir ortam olduğu için kan hücreleri parçalanır. Bu besiyeri içerisinde antikoagülan olarak sodium polyanethanesulfonate (SPS) içermektedir. C¹⁴ işaretli palmitik asitin kullanılması ve metabolizma sonucu oluşan işaretli CO₂'in 0-999 sayısal değerleri arasında üreme indeksi (GI) olarak ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Ekim işleminden önce besiyerlerine polimiksin B, azlosilin, nalidiksik asit, trimetoprim ve amfoterisin B (PANTA) içeren antibiyotik karışımı, kontaminant mikroorganizmaların üremesini engellemek için ilave edilmelidir (61).

2.11.4. Biyokimyasal Testler:

Mikobakteri türü öncelikle çoğalma karakteristiklerine göre (üreme hızı, üreme ısısı, pigment oluşturma, koloni morfolojisi) alt gruba ayrıldıktan sonra, uygun geleneksel biyokimyasal testler kullanılarak tür bazında kesin tanısı yapılır. Daha sonra niasin birikimi, nitrat indirgemesi, katalaz, üreaz, tween 80 hidrolizi, pirazinamidaz, aril sülfataz, %5 NaCl'li ortamda üreme, tiofen -2- karboksilik asitli (T2H) ortamda üreme gibi biyokimyasal testler kullanılarak tür ayrımı yapılır (62).

Biyokimyasal testlerle *M. tuberculosis*'in diğer mikobakterilerden ayrımında kullanılan testlerden biri niasin birikimi testidir. Bu test *M. tuberculosis* ile bazı *M. simiae* ve *M. chelonae* izolatlarının nikotinik asiti diğer mikobakterilere göre daha az metabolize etmeleri nedeniyle, besiyerine niasin salmaları ve bu niasinin çeşitli kimyasallarla saptanması esasına dayanmaktadır. Nitrat indirgeme testi ise asit solüsyonlarda nitrit iyonlarının nitrozonyum iyonlarına dönüşmesi ve bu iyonların da ortama eklenen sülfanilik asit ve naftil amin ile gözle görünür hale gelmesini temel alır. Bunlarla birlikte kullanılan bir diğer biyokimyasal test ise katalaz testidir. Katalaz, hidrojen peroksidi (H₂O₂) su ve oksijene

ayırır, intraselüler çözünebilir bir enzimdir. Enzimin varlığı, besiyerine H₂O₂ eklendiğinde oluşan oksijen kabarcığıyla anlaşılır. Katalaz enziminin bazı formları 68 ° C' de 20 dakika ısıtıldığında inaktive olmaktadır. Enzimin ısı ile inaktivasyonu, bazı mikobakteri türlerinin ayırt edilmesinde değerli bir tanı yöntemi olarak kullanılmaktadır. Mikobakteri türlerinin identifikasyonunda kullanılan hidrojen peroksit, diğer bakterilerde bulunan enzimin araştırılmasında kullanılan ayıraçtan farklıdır. Hidrofobik ve kümeli olan mikobakterilerin dağılmasını ve enzimin kolayca açığa çıkmasını sağlamak için testte % 30 H₂O₂ ile güçlü bir deterjan olan % 10 Tween-80'nin karışımı kullanılır. Genel olarak *M. tuberculosis*, *M. bovis* ve *M. kansasii*' nin izoniazide dirençli kökenleri ve *M. gastri* dışındaki tüm mikobakteri türlerinin katalaz enzimi ürettikleri bildirilmiştir (63).

2.11.5. Serolojik Tanı Yöntemleri:

Tüberküloz tanısında serolojik testlerin kullanılmasına uzun zaman önce başlanılmış olmasına rağmen, bu testler rutin olarak kullanılabilecek performansı göstermemiştir. Serolojik tanı yöntemlerinin, özellikle klinik ve radyolojik tüberküloz bulguları olmayan hastaların hızlı tanısını sağladığı bildirilmiştir. Serolojik testlerin çoğu, kısa zamanda tamamlanması ve negatif prediktif değerinin yüksek olmasından dolayı tarama amacıyla yararlı olan testlerdir. Ancak bu testlerin yüksek enfeksiyon hızı olan ülkelerdeki hastalarda, AIDS'li ve yayma negatif hastalarda duyarlılığının düşük olduğu saptanmıştır. Bunlar; pahalı, deneyimli personel gerektiren ve *M. tuberculosis* ile tüberküloz dışı mikobakterileri her zaman birbirinden ayırt edemeyen testler olarak belirlenmiştir (64).

Mikobakteri antijenlerinin fraksiyonlarına ayrılması, izolasyonu ve analizi için, *M. tuberculosis*'in, karbonhidrat ve glikolipid kısımları bulunan çeşitli protein antijenleri gösterilmiş ve detaylı yapısal özellikleri tanımlanmıştır. Mikobakterilerin plazma membranında bulunan antijenler, antijen 5, Lipoarabinomannan (LAM), sitoplazmik antijenler ve diğer antijenleri tespit eden çeşitli serolojik test kitleri dizayn edilmiştir (65).

Mikobakterilerin hücre duvarında bulunan bir lipopolisakkarit olan LAM'ın, enfeksiyon sırasında antikör yanıtını indüklediği bildirilmiştir. Bu nedenle *M. tuberculosis*'ten

saflaştırılan LAM, mikobakteri enfeksiyonlarının serolojik tanısında kullanılmaya başlanmıştır. İdrar örneklerinde bulunan tüberküloz basillerini tespit etmek için, LAM'ı kantitatif olarak tespit eden bir test geliştirilmiştir. Alan taramalarında, akciğer ve akciğer dışı örneklerde bulunan LAM'ı, yarı kantitatif olarak tespit etmek amacıyla dipstik metodu kullanılmaktadır. Bu metodun duyarlılığı % 93 ve özgüllüğü % 95 olarak saptanmıştır (66).

Tüberkülozun endemik olduğu alanlarda, özellikle akciğer tüberkülozunun diğer indikatörleri ile birlikte olduğunda, anti-LAM negatifliğinin pratik önemi vardır. Anti-LAM ELISA testi, yayma sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde, yayma pozitif akciğer tüberkülozlu hastaların %90,6'sına ve yayma negatif olanların % 52,5'ne doğru olarak tanı koymuştur (67).

İdrar dışında, akciğer tüberkülozlu hastaların balgam ve serumunda bulunan mikobakteri antijen veya antikorlarını tespit eden, immün blotlama ve immünoassay temelli testler geliştirilmiş ve bu testlerle hızlı tanı konulduğu belirtilmiştir (68). Antijen tespiti amacıyla; sandviç ELISA, inhibisyon ELISA, lateks aglütinasyon ve zıt pasif hemaglütinasyon yöntemine dayanan testler kullanılmıştır. Antijen olarak kord faktörü kullanılan ELISA testinin, akciğer tüberkülozu tanısında duyarlılığı % 66,6–74,1 ve özgüllüğü % 95,2–99,0 olarak bulunmuştur (69).

Tüberkülozlu hastaların kan, plazma veya serumlarında bulunan antikorları tespit etmek amacıyla, immünokromatografi temelli, hızlı in vitro testler (InstaTest TB, TB STAT-PAK ve ICT diagnostics, BIO-ANALYTICS TB gibi) geliştirilmiştir. Bu testlerde, membrana bağlanmış tüberküloz antijeni kombinasyonları ve kolloid haldeki altın partiküllerine birleştirilen antikor bağlayıcı bir protein kullanılmaktadır. İmmünokromatografik testlerin duyarlılık ve özgüllüğü, sırasıyla % 75–97 ve % 95–98 olarak bildirilmiştir. Ayrıca, Mikobakterilerin süperoksit dismutaz enzimine karşı oluşan antikorların tespit edilmesi, MPB 64 transdermal yama testi, interferon gamma üretiminin ölçülmesi tüberküloz tanısında kullanılan diğer serolojik testlerdir (70).

2.11.6. Moleküler Yöntemler:

Mikroskopi ve kültür gibi klasik tanı yöntemleri mikobakteri kaynaklı enfeksiyonların tanısında günümüzde halen altın standart olarak kabul edilmekle birlikte, tanı süresinin uzun olması ve yeni etkenlerin tanımlanmasında yetersiz kalmaları nedeniyle moleküler yöntemler gibi hızlı tanı yöntemleri üzerindeki araştırmalar devam etmektedir. Tanıda kullanılan moleküler yöntemlerin ana prensibi, mikroorganizmanın genomunda çok iyi korunmuş, sadece o mikroorganizmaya özgü dizilerin kullanılmasıyla tür tayinin (identifikasyon) gerçekleştirilebilmesi esasına dayanmaktadır. Bu yüzden tek bir nükleotidin delesyonu veya yer değiştirmesiyle oluşmuş farklı türler birbirinden ayırt edilebilmektedir. Mikroorganizmaların moleküler yöntemlerle tiplendirilmesinde en yaygın olarak seçilen hedef bölge, 16S rRNA' yı kodlayan gen bölgesi olarak bildirilmiştir. Bu gen yaklaşık olarak 1500 nükleotitten oluşmakta olup, bu dizi içindeki 10–15 nükleotitteki farklılık tür ayırımının yapılabilmesini sağlamaktadır (71).

Restriksiyon endonükleaz (RE) enzimleri, kısa DNA dizilimlerini spesifik olarak tanıyan ve bu dizilimler içinde belli bölgelerden spesifik kesimler yapan enzimler olup büyük bir kısmı bakteriler bir kısmı virüsler ve ökaryotik canlılar tarafından sentezlenmektedir. RE enzimlerinin Tip II sınıfı genelde DNA'daki 4–8 bazlık dizisini tanıyıp kesim yaparlar. Transisyon veya transversiyon tipindeki nokta mutasyonları sonucu herhangi bir restriksiyon enzimi için kesim bölgesi ortaya çıkabildiği gibi enzimin kesim bölgesi de ortadan kalkabilir. Kesimden sonra örnekler agaroz jelde veya poliakrilamid jelde analiz edilir. Eğer RE enzimi için kesim bölgesi yaratan bir polimorfizm söz konusu ise hasta örneğinde kesim yapıldığı için iki bant, kontrolde ise tek bant görülecektir. Bunun tersi durumda; polimorfizm RE enziminin kesim bölgesini yok ediyorsa, hastada tek bant kontrolde ise iki bant görülecektir (72).

İlk kez Telenti ve arkadaşları, tüm mikobakterilerde mevcut olan 439 bp' lik ısı şok proteinini kodlayan genin (hsp65), restriksiyon enzimi ile kesilmesi prensibine dayalı hızlı ve kolay bir yöntem olan PZR-RLFP' yi geliştirmişlerdir (4). İzole edilen mikobakteri DNA' sını PZR yöntemi ile çoğaltıldıktan sonra *BstE* II ve *Hae* III restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir.

Daha sonra bu kesilen bölgeler poliakrilamid jel elektroforezinde moleküler ağırlık standartlarına göre birbirilerinden ayrılıp, genotiplendirme şemasına göre tür bazında mikobakteri tiplendirilmesi yapılmıştır (6,7). PZR-RLFP yöntemi ile yapılan çalışmalarda PZR'nin duyarlılığı yayma pozitif örneklerde % 95 iken, yayma negatif örneklerde % 50–60, özgülüğü ise % 98'ler düzeyinde bulunmuştur. Bu nedenle günümüzde yayma pozitif olgularda kullanılması önerilmektedir (5,6,7).

Tanıda kullanılan moleküler yöntemlerin başında polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) gelmektedir. Geliştirilen ticari kitlerle örneklerin işlenmesi, amplifikasyon ve sonuç gözleme standardize edilerek laboratuvarlar arası uyumsuzluklar giderilmeye çalışılmıştır.

Günümüzde tüberkülozun moleküler tanısında kullanılan çeşitli ticari hızlı tanı kitleri mevcuttur. PZR yönteminin ticari olarak üretilmiş şekli (COBAS AMPLICOR PCR) solunum yolu örnekleri için önerilmekte olup yöntemin duyarlılığının % 66,7–85,2, özgülüğünün % 98,8–99,7 olduğu belirlenmiştir (73). Yayma pozitif olan örneklerde duyarlılığın % 92,6–96,1'e çıktığı, negatif olanlarda ise % 48–71,7'ye düştüğü saptanmıştır (74). Aynı kitin beyin omurilik sıvılarında uygulanması halinde duyarlılığın % 60, solunum yolu dışındaki diğer örneklerde ise % 61–100 olduğu bildirilmiştir (75,76).

Solunum yolu örneklerinde kullanılmak üzere üretilmiş diğer bir kit “Gen-Probe Amplified Mycobacterium Direct Test” (Gen-Probe)'tir (77). Bu testte, hedef molekül olarak her hücrede yaklaşık 2000 kadar bulunabilen rRNA seçilerek, duyarlılığı artırmak hedeflenmiştir. Kültür pozitif solunum yolu örneklerinde yöntemin duyarlılığı % 91–98,4 iken, özgülük % 98,5–98,9 olarak saptanmıştır (78). Solunum yolu dışındaki örneklerde duyarlılık % 20–100, özgülük % 95–96,4 olarak belirlenmiştir (77).

Diğer bir moleküler yöntem olan zincir ayrıştırma amplifikasyon (strand displacement amplification=SDA) ile solunum yolu örneklerinden tüberküloz basillerinin araştırılmasında; kültür ve yayma pozitif örneklerin tamamından pozitif sonuç alınmış, testin özgülüğü % 85–94 arasında bulunmuştur (79). Yöntemin bir versiyonu olan “BDProbeTec-SDA” ile kültür pozitif örneklerin % 94,7'sinden pozitif sonuç alınırken, özgülük %99,8 olarak saptanmıştır (80). Tüberkülozun tanısında alternatif bir DNA amplifikasyon yöntemi olan Ligaz zincir reaksiyon (Ligase chain reaction=LCR) ticari kit halinde üretilmiştir. Bu yöntemle yapılan çalışmalarda; klinik örneklere göre değişmekle birlikte duyarlılık % 84–97,5, özgülük

%95.8–100 olarak bulunmaktadır. Tüberküloz laboratuvarlarında fazla sayıda değişik moleküler tanı yöntemleri denenmiş olmakla birlikte, bu yöntemlerin hiç biri henüz mikroskopi ve kültür gibi konvensiyonel yöntemlerin yerini alamamışlardır. Genelde teknik tam olmadan, gerekli internal ve eksternal kontroller sağlanmadan, PZR yönteminin tüberkülozun rutin tanısında kullanılmaması önerilmektedir (81).

DNA prob tekniği kullanılarak klinik örneklerden mikobakterilerin saptanması, identifikasyonu, genotiplenmesi ve antimikrobial ilaçlara direnç durumunu belirlemek olasıdır. İdeal olarak hibridizasyonun kültürden daha duyarlı olması beklenir. Ancak ticari olarak geliştirilmiş olan Gen-Probe sistemi, klinik örneklerle pozitif sonuç verebilmesi için yaklaşık $1-3 \times 10^7$ basil gereksinir (82).

Amplifikasyona dayalı yöntemlerin genel pozitiflik oranlarının ve duyarlılığının kültürden anlamlı derecede yüksek olmayışı ki özellikle bu durum; balgam, idrar ve BOS gibi örneklerde bulunan inhibitörlere veya uygun olmayan örnek alma ve işleme koşullarının kullanılmasına bağlıdır. Homojenizasyon ve dekontaminasyon ile örnekteki canlı basillerin % 80'inin kaybolabileceği hesaplanmıştır. Tüberküloz basilleri küme halinde bir arada bulunurlar bu nedenle, iyice homojenize edilmemiş örneklerde çalışılan hacim azaldıkça duyarlılığında azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca kültür için kullanılan örnek miktarı, genelde, moleküler yöntemler için kullanılan 4–20 kat daha fazladır. Pozitif klinik örneklerin birbirine karışmasına bağlı olarak hatalı pozitiflikler olabilmektedir. Her klinik örnek için kullanılacak, standardize edilmiş ticari kitin henüz bulunmayışı tüberkülozun moleküler tanısında karşılaşılan güçlüklerin en önemli nedenlerinden biridir. Mevcut ticari kitler genelde solunum yolu örnekleriyle çalışılmaya uygundur (83).

Tüberküloz tedavisi görmüş olan hastalarda, klinik örnekte ölü basil varlığında bile DNA yöntemleriyle pozitif sonuç alınabileceğinden, tedavinin etkinliğini takip için kültür gerekli olmaktadır. Bir çalışmada altı aylık tedaviden sonra örneklerin tamamında kültür negatif olduğu halde, % 25 örnekte SDA (Strand Displacement Amplification) ve PZR yöntemleriyle pozitif sonuç alınmıştır (84). Genelde teknik tam olmadan, gerekli internal ve eksternal kontroller sağlanmadan, PZR yönteminin tüberkülozun rutin tanısında kullanılmaması önerilmektedir (83).

2.12. Tedavi:

1950'den önce tüberküloz için etkin bir ilaç tedavisi bulunmamaktaydı. 1950'lerin ortalarında hastaların ilaç tedavisi ile hemen tamamı tedavi edilebilir hale gelmiştir. Günümüzde eğer hastaya doğru bir tedavi şeması önerilir ve hasta da bu şemayı uygun bir şekilde uygularsa hemen tüm hastalar tedavi edilebilir hale gelmektedir. Tüberküloz tedavisinde 1940'ların ortasında A.B.D' de streptomisin (SM) ve İsveç'te p-aminosalisilicid (PAS)'ın bulunması ile yeni bir dönem başladı. Tek başına kullanılan bu ilaçlara bir ay gibi kısa zaman içinde direnç gelişince yeni ilaçlar bulmak için araştırmalar hızlanmıştır. İzoniazid (INH)'in 1952 yılında Robizek ve Selikof (A.B.D) tarafından bulunmasından sonra üç ilaçla 18–24 ay süren kombine tedavinin uygulanarak tüberküloz tedavi edilebilir bir hastalık haline gelmiştir. Daha sonra 1954 yılında pirazinamid (PZA), 1962 yılında etambutol (EMB) ve 1966 yılında rifampisin (RIF) bulunmuştur (85).

Kullanılan İlaçlar kullanım önceliğine göre çeşitli kategorilere ayrılmaktadır. "Birinci seçenek ilaçlar" arasında, INH, RIF, PZA, SM, EMB gelmektedir. EMB dışındakilerin hepsi bakterisidaldir. Toksisiteleri azdır ve kombine olarak kullanılırsa mükemmel bir etkiye sahiptirler. Günde tek doz olarak uygulanırlar. İkinci seçenek ilaçlar; sikloserin, etionamid, tioasetozon, kanamisin, kapreomisin ve PAS şeklinde sıralanmaktadır. Bu ilaçlar birinci seçenek ilaçlara göre daha toksik, daha az tolere edilebilen ve daha az etkili ilaçlardır. Hastanelerde ve deneyimli hekimlerce kullanılması uygun olan ilaçlardır. Genellikle dirençli tüberküloz olgularında kullanılmaktadır. Bu grup ilaçlara henüz deneme safhasında olan ve yeni geliştirilen ilaçlar olan β laktam inhibitörleri, kinolonlar, amikasin ve rifabutini eklemek mümkündür. Bu yeni ilaçların henüz tüberküloz tedavisindeki kesin dozları ve kullanım süreleri hakkında kesinleşmiş bilgiler yoktur. Bu yeni ilaçların özellikle dirençli tüberküloz

olgularında faydalı olacağı düşünülmektedir (18).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler:

3.1.1. Çalışma Grubu ve Örnekler:

Çalışmamızda, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına tüberküloz şüphesi ile rutin olarak gönderilen balgam, idrar, steril vücut sıvısı (SVS), bronkoalveolar lavaj (BAL), plevral mayi, apse ve açlık mide sıvısı (AMS) örnekleri kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Gereçler:

➤ **Otomatik Pipetler:**

- Tek kanallı 20 µl, 200 µl ve 1000 µl lik Eppendorf (Eppendorf Reference, Germany) marka pipetler, kullanıldı. Steril pipet ucu olarak 2 µl, 10 µl, 200 µl ve 1000 µl'lik filtreli plastik pipet (Eppendorf Reference, Germany) uçları kullanıldı.

➤ **Thermal Cycler:**

- PZR işlemlerinin yapılmasında programlanabilen üst kapak ısıtmalı otomatik thermal cycler (Eppendorf, Mastercycler Gradient 22331, Germany) kullanıldı.

➤ **Elektroforez Tankı ve Güç Kaynağı:**

- Agaroz jel elektroforez (Biometra) işlemlerini gerçekleştirmek amacıyla kullanıldı.

➤ **Jel Görüntüleme ve Analiz Sistemi:**

- UV translüminatörlü (Salubris-technica) bilgisayarlı jel dokümantasyon sistemi elde edilen jeldeki bantların görüntülenmesinde kullanıldı.
- **Hassas Terazi:**
 - Kimyasal maddelerin tartımında hassas terazi (Scaltec) kullanıldı.
- **Vorteks (Mekanik Karıştırıcı) :**
 - PZR işlemleri sırasında örneklerin ve PZR komponentlerinin karıştırılması için Vorteks (Nüve) cihazı kullanıldı.
- **Soğutmalı Santrifüj:**
 - Örneklerin santrifüj edilmesi ve PZR işlemleri sırasında santrifüj işleminin gerekli olduğu durumlarda çözelti ve karışımların çöktürülmesi amacıyla soğutmalı santrifüj cihazı (Hettich) kullanıldı.
- **İnkübatör:**
 - Ekimi yapılan besiyerlerinin inkübasyonu için inkübatör (Memmert) kullanıldı.
- **Otoklav:**
 - Besiyerlerinin ve solüsyonların sterilizasyonu için otoklav (Nüve) kullanıldı.
- **Steril laminar akımlı güvenlik kabini:**
 - Ekimlerin, besiyerlerinin steril bir biçimde hazırlanması, aynı şekilde DNA ekstraksiyonu, PZR ve kesim reaksiyonunun steril bir ortamda gerçekleştirilebilmesi için steril laminar akımlı güvenlik kabini (Heraeus, Germany) kullanıldı.
- **Benmari:**
 - Ben-mari (Memmert), DNA ekstraksiyonunda ve hazırlanan solüsyonların ısı ile çözülmesinde kullanıldı.
- **Mikroskop:**
 - Aside dirençli boya ile boyanan preparatların incelemesi ışık mikroskopunda (Olympus) yapıldı.
- **Mikrodalga Fırın:**
 - Elektroforezde kullanılan agarozun tampon solüsyonu içerisinde eritilmesinde mikrodalga fırın (Beko, MD 1500) kullanıldı.
- **Derin Dondurucu:**

- DNA ekstraksiyonu, PZR ve kesim sonucu elde edilen örneklerin saklanması için derin dondurucuda (- 20 °C, Uğur, 2005) yapıldı.

3.1.3. Hasta Örneklerinin İşlenmesi:

3.1.3.1. Homojenizasyon-Dekontaminasyon Solüsyonunun Hazırlanması (46):

➤ **Fosfat tamponu 0,067 M (pH:8)**

- 9,47 g sodyum monohidrojen fosfat (Na_2HPO_4 , Sigma, S0876, USA) tartıldı.
- 1000 ml distile suda çözüldü.
- 9,07 g potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4 , Sigma, P5379, USA) 1000 ml distile suda çözüldü.
- Her iki solüsyon 1/1 oranında karıştırılır, pH 6,8' e ayarlandı.
- Otoklavda 121 °C' de 15 dakika steril edildi.

➤ **% 4' lük NaOH:**

- 20 g NaOH (S8045; Sigma, USA) tartıldı.
- 500 ml distile suda eritilerek hazırlandı.

➤ **% 2,9 Sodyum Sitrat:**

- Sodyum Sitrat (Merck A578148,USA) 1,45 g tartıldı.
- 50 ml distile suda eritilerek hazırlandı.

Hacim (ml)	NaOH-sodyum sitrat (ml)	NALC (g)
50	50	0,25
100	100	0,50
250	250	1,25
500	500	2,50

Çizelge 3.1: NaOH-NALC Homojenizasyon ve Dekontaminasyon Sıvısının Hazırlanması

3.1.4. Besiyerinin Hazırlanması (52):

3.1.4.1. LJ besiyeri

- 37,5 g toz LJ besiyeri (Merck, 01256–03, USA) tartıldı.
- Cam balona aktarılıp, üzerine 600 ml distile su ilave edildi ve üzerine 12 ml gliserol eklendi.
- 121 °C’ de 15 dakika otoklavlandı.
- Yumurtaların uç tarafı önce % 2’ lik iyotla (Merck 34806, USA) daha sonra alkol (% 70’lik Etil Alkol) ile silindi.
- Steril pens ile yumurtalar uç tarafından kırılarak, 1000 ml olacak şekilde balon jojeye aktarıldı.
- Otoklavdan çıkan besiyeri 50 °C’ ye kadar soğutuldu.
- Yumurta bu besiyeri üzerine ilave edildi ve iyice karıştırıldı.
- Hazırlanan besiyerinden steril tüplere 5’ er ml dağıtıldı.
- Pasteur fırınında, 80 °C’ de 45 dakika koagüle edildi.
- Besiyerine, sikloheksimid (400 µg/ml (Sigma, C-2859, USA)), nalidiksik asit (35 µg/ml, Sigma, C-7698, USA) ve linkomisin (2 µg/ml, Lincocin,045K1424,USA) antibiyotikleri ticari olarak sağlanıp ilave edilerek selektif besiyeri hazırlandı.
- Besiyerlerinde sterilizasyon kontrolü ve elimizde bulunan standart suşlarla (*M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. scroflaceum*, *H37Rv*) üreme kontrolü yapıldı.

3.1.4.2. Middlebrook 7H9 (55):

- Oleic acid-albumine-dextrose-catalase (OADC % 10, BBL, 212240, USA)
- Middlebrook 7H9 (Difco, 271310, USA) 4,25 g tartıldı.
- 300 ml distile suda çözüldü.
- 121 °C' de 15 dakika otoklavlandı.
- Hazırlanan besiyerinden steril tüplere 5' er ml dağıtıldı.

3.1.5. Karbolfuksin Aside Dirençli Boyalar:

➤ Ziehl-Neelsen karbolfuksin:

- 0,3 g bazik fuksin (Sigma C-4165, USA) tartıldı.
- 10 ml %95 etanolde (Sigma E-285, USA) çözüldü.
- 5 gr fenol kristalleri (Sigma P-1039, USA) tartıldı.
- 100 ml distile suda çözüldü.
- Solüsyonlar 1/1 oranında karıştırıldı.

➤ % 3 Asid-Alkol:

- 3 ml hidroklorik asit(Sigma 920-01, USA), 97 ml % 95 etanol de çözüldü.

➤ Metilen Mavisi:

- 0,3 g metilen mavisi (Sigma 6900, USA) tartıldı.
- 100 ml distile suda çözüldü.

3.1.6. Nitrat Çözeltisi:

- M/45 fosfat tamponu eriyiği (0,02 M, pH 7,0) içindeki nitrat test substratı
 - 0,8 g NaNO₃, (Sigma S8170, USA) 1,17 g KH₂PO₄ (P-2222, USA) ve 1,93 g Na₂HPO₄ (Sigma S0876, USA) tartıldı.

- 1 litre steril distile suda çözüldü.
- **% 0,2 Sulfanilamid:**
 - 0,1 gram sulfanilamid (Sigma S9251, USA) tartıldı.
 - 50 ml steril distile suda çözüldü.
- **% 0,1 *N*-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride:**
 - *N*-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride *N*-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (Sigma N9125, USA) 0,1 g tartıldı
 - 100 ml steril distile suda çözüldü.

3.1.7. Katalaz testi kimyasalları:

- **% 30 Hidrojen Peroksit:**
 - 30 ml H₂O₂ (Sigma H6520, USA) çözeltisi 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.
- **% 10 Tween-80:**
 - 10 ml Tween-80 (Sigma P043, USA), 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.

3.1.8. Niasin testi kimyasalları (63):

- **% 4 Anilin**
 - 4 ml anilin (Sigma A9880, USA) 100 ml'ye % 95 etanolle tamamlandı.
- **% 10 Siyanojen Bromid**
 - 10 g siyanojen bromid (Sigma C9142, USA) tartıldı.
 - 100 ml distile suda çözüldü.

3.1.9. Elektroforetik Analiz Solüsyonları

a) 10 X TBE (Tris-Borik Asit-EDTA) Stok solüsyonu

- 108 g Tris-base(Sigma T-1503, USA) (0,9 M)
- 55 g Borik asid (Merck 2993665, USA) (0,9 M)
- 8,3 g EDTA (Sigma E-6788, USA) pH 8,0 (20mM)
- Distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.
- Manyetik karıştırıcıda çözülerek pH 8,0'e ayarlandı.
- Otoklavda sterilizasyon yapılarak oda ısısında saklandı.

b) 1X TBE (Çalışma solüsyonu)

- 100 ml 10 X TBE üzerine, 900 ml distile su eklendi.
- Elektroforez tankına konularak kullanıldı.

c) Etidiyum Bromid Solüsyonu (10mg/ml)

- 0,1 g Etidiyum bromid (Sigma E-9884, USA) 10 ml distile su içinde çözüldü.
- Işığa hassas olduğu için alüminyum folyo ile sarılarak + 4 ° C' de saklandı.

d) Yükleme tamponu (6X) (86):

- 1 X TBE
- % 40 Sukroz (Sigma S-7903, USA)
- % 0,025 Brom fenol mavisi (Sigma B-0126, USA) .

3.1.10. Bromtimol mavisi:

- 0,4 gr bromtimol (Merck 64271, Darmstad, Germany) mavisi 100 ml distile su içerisinde çözüldü.

3.2. Yöntemler:

3.2.1 Hasta Örneklerinin İşlenmesi ve Kültürü:

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına tüberküloz şüphesi ile rutin olarak gönderilen materyal, steril ve steril olmayan şekilde ayrıldıktan sonra, steril olmayan örnekler homojenizasyon-dekontaminasyon işlemi uygulanmıştır. Cam boncuk içeren 50 ml'lik falkon tüplere klinik örneklerle eşit hacimde NALC-NaOH solüsyonu ilave edilerek oda ısısında 30 dakika bekletildi. Daha sonra tüpler, 30 saniyeyi geçmeyecek şekilde vortekslendikten sonra tüplere 50 ml işareti kadar 0,067 M fosfat tamponu (pH 6,8) ilave edildi. Fosfat tamponu ilave edilmiş tüpler bakteri yoğunluğunu arttırmak için $4000 \times g$ 'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra supernatant, içerisinde dezenfektan (%0,1–1 sodyum hipoklorit) olan bir kaba boşaltıldı. 0,067 M fosfat tamponu (pH 6,8) tekrar 50 ml işareti kadar eklendi. Fosfat tamponu ortamın pH'sını dengelemek için kullanılmakta olup içerisinde bulunan bromtimol mavisi yeşile dönüştüğünde, nötralizasyonun gerçekleştiği düşünülmektedir. Bir sonraki aşamada, tüp tekrar santrifüj yapıp dipteki sedimentten daha sonra LJ ve/veya BACTEC besiyerine inokülasyon yapıldı. Ayrıca aside dirençli boyama için sedimentten lama yayma hazırlandı (46).

3.2.2. Biyokimyasal Testler:

Mikobakteri üremesi tesbit edilen LJ besiyerinden ve/veya BACTEC besiyerinden (yaklaşık olarak 10–40 gün sonra) biyokimyasal identifikasyon yapıldı. Biyokimyasal identifikasyon için üremenin olduğu kültürlerden 1 öze dolusu koloni ve/veya 100 µl örnek, middlebrook 7H9 sıvı besiyerine aktarıldı ve 1 hafta sonra besiyerinde üreme olup olmadığını kontrol etmek ve kontaminasyon olup olmadığını tespit etmek için aside dirençli boyama ve

çikolata besiyerine ekim ile örnekler değerlendirildi. Çikolata ve sıvı besiyeri saf olan örneklerle nitrat, katalaz ve niasin testleri uygulandı.

Nitrat testi için, taze kültürlerden bir öze dolusu koloni alınarak, 2 ml nitrat çözeltisi içerisine ilave edildi ve 37 °C' lik etüvde 2 saat bekletildi. Bu süre sonunda kültür süspansiyonu üzerine 1 damla hidroklorik asit, 2 damla % 0,2' lik sülfanilamid çözeltisi ve 2 damla % 0,12 lik N-naftil etilen diamin dihidroklorid çözeltisi ilave edildi. Tüpler çalkalanıp renk oluşumuna göre değerlendirildi. Pembe renk oluşumu nitrat redüksiyonunun olduğunu göstermektedir. *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. szulgai*, bazı saprofit nonkromojenler, *M. smegmatis* ve *M. fortuitum* grubu nitrat redüktaz pozitifdir.

Niasin testi için, LJ besiyerindeki 3–4 haftalık taze kültür tüplerine 1,5 ml steril distile su (serum fizyolojik de olabilir) konuldu. Sıvı kolonilerin üzerine örtecek biçimde 30 dakika bekletildi. Bu süre sonunda tüplerdeki sıvılardan 1' er ml boş tüplere aktarıldı. Tüplerin üzerine % 4 anilin ve %10 siyanojen bromid'den 0.5' er ml ilave edildi. 10 dakika içinde renk oluşumuna göre değerlendirilme yapıldı. Sarı renk oluşumu besiyerinde biriken niasini göstermektedir. Bütün mikobakteriler niasin ribonukleotidini üretir ancak *M. tuberculosis* ile *M. simiae* ve *M. chelonae*'nin bazı suşlarının niasini nikotinamid adenin dinükleotide (NAD) dönüştürecek enzimlerinin olmadığı saptanmıştır.

Katalaz testi, ısıya stabil katalaz testi ve semikantitatif katalaz testi olmak üzere iki farklı şekilde uygulanmaktadır. Bu çalışmada semikantitatif katalaz testi yapıldı. LJ besiyerine 1 ml H₂O₂-Tween karışımı eklendi. Tüp oda ısısında 5 dakika bekletildi. Oluşan hava kabarcıklarının yüksekliği ölçüldü. Yüksek katalaz reaksiyonunda hava kabarcıklarının yüksekliği > 45 mm iken düşük katalaz reaksiyonunda < 45 mm'dir. *M. tuberculosis* ve MAC düşük katalaz reaksiyonu verir. *M. kansasii*, hızlı üreyen mikobakteriler ve sıklıkla izole edilen skotokromojenler yüksek katalaz reaksiyonu verir⁶³. Testte kontrol olarak *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. austroafricanum* ve *H37Rv* standart suşları kullanılmıştır.

3.2.3. DNA İzolasyonu:

Hızlı DNA saflaştırma yöntemi ile DNA izolasyonu, bunu takiben PZR yapıldı. DNA izolasyonu, üremenin olduğu katı besiyerlerinden 1 öze dolusu koloni 1 ml distile suya

alınarak ya da BACTEC besiyerinden 1 ml sıvı alınarak yapılmıştır. Bunlar daha sonra benmaride 20 dakika 60 °C inkübe edildikten sonra 12000 × g'de 10 dakika santrifüj edildi. Supernatant atıldı yaklaşık olarak 200 µl sıvı üzerine 200 µl sadece kloform eklenip vortekslendikten sonra 6000 × g'de 1 dakika santrifüjde çevrildi. Supernatant atılmadan üzerine 200 µl steril su eklendi. 6000 × g'de 1 dakika santrifüj edildi. Supernatant steril eppendorflara alındı. Bu sıvı bakteri DNA'sı içermektedir. Ekstrakte edilen DNA PZR ile amplifiye edildi (87).

3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu - Parça Uzunluk Polimorfizmi Tekniği (PZR-RFLP)

PZR ile mikobakterilerin ısı şok proteini (hsp65), forward ve reverse primerler kullanılarak çoğaltıldı. PZR koşullarının standardizasyonu amacıyla ön denemeler yapıldı. PZR karışımı kontaminasyonun önlenmesi amacıyla steril, temiz kabinlerde hazırlanmıştır. PZR karışımı 50 µl olacak şekilde steril distile su, tampon (1X) (promega), MgCl₂ (2.5 mM) (promega), dNTP (200 µl) (promega), primer Tb 11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT) (MOLBIOL, 50 pM/µl), primer Tb 12 (5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT) (MOLBIOL, 50 pM/µl), Taq polimeraz (2.5 U/µl) (Promega) ve ekstrakte edilen DNA' sı konularak hazırlanmıştır. Amplifikasyonda kullanılan PZR programı Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	94	10	1
Denatürasyon	94	1	45
Primer Bağlanması	55	1	
Zincir Uzaması	72	1	
Son Uzatma	72	10	1

Çizelge 3.2: PZR Programı

PZR ile çoğaltılan bölgelerin amplifikasyon ürünleri % 3'lük agaroz jele yüklenerek elektroforez yapıldı. Bant oluşumu gözlenen örnekler *Hae* III ve *BstE* II enzimleri ile kesildi. Bu enzimlerin tanıma bölgeleri ve kesim sonucu oluşacak bant uzunlukları her mikobakteri türü için farklıdır. Örnekler agaroz jelde yürütülerek elde edilen bant uzunluklarına göre mikobakteri türlerinin identifikasyonu yapıldı. Mikobakterilerin tiplendirilmesinde kullanılan algoritma şeması çizelge 3.4'de verilmiştir (4).

3.2.5. PZR çoğalma ürünlerinin elektroforez yöntemi ile incelenmesi:

PZR programı tamamlandıktan sonra amplifiye olan bölgeler % 3'lük agaroz jelde analiz edildi. % 3'lük agaroz jel içerisine 0,5 mg/ml etidiyum bromür eklendi. Daha sonra, PZR reaksiyonu ürünlerine 6X yükleme tamponundan 1/5 oranında (1 hacim yükleme tamponu, 5 hacim PZR reaksiyonu ürünü) eklendi. Örnekler agaroz jele yüklendikten sonra 100mA, 70 Voltta 35 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforez sonucu, Uvitec jel görüntüleme cihazı ile fotoğrafı çekilerek yorumlandı. Primerlerin çoğalttığı bölge 439 bp'lik olup, beklenen bant uzunluğu, moleküler marker (Roche'dan DNA 100 base pair ladder (katalog no:1721933) yardımıyla yorumlanmıştır. Beklenen bantlar elektroforez sonucu tespit edildikten sonra restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim reaksiyonu çizelge 3.3'deki gibi hazırlanmıştır.

BstE II içeren tüpler 60 °C' de, *Hae* III içeren tüpler ise 37 °C' de 2 saat bekletildi. Buradan alınan örnekler % 4' lük agaroz jele yüklenip, 100mA, 70 Voltta 35 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforez sonucu Uvitec jel görüntüleme cihazı ile fotoğrafı çekilerek yorumlandı. Her iki enzimle kesim sonucu elde edilen bant uzunluklarına göre mikobakteri türlerinin identifikasyonu yapıldı. Tiplendirme için Çizelge 3.4' deki tür değerlendirme cetveline göre mikobakteriler tür düzeyinde değerlendirildi.

	Stok	Son hacim
Restriksiyon enzim tamponu	10X	1X (2,5 µl)
Restriksiyon enzimi	10Ü/µl	1Ü/µl (0,5 µl)
PZR ürünü	–	10 µl
Distile su	–	11 µl
Son Hacim	–	24 µl

Çizelge 3.3. Kesim Reaksiyonu Bileşenleri (5)

<i>BstE</i> II	<i>Hae</i> III	Mikobakteri Türü
Kesim yok/ 442	190/80/60	<i>M. gadium</i>
	180/140	<i>M. triviale</i>
	175/85/60	<i>M. gallinarum</i>
	160/80/60	<i>M. parafortuitum</i>
	150/130	<i>M. lentiflavum I</i>
Kesim yok/ 442	140/105/70	<i>M. szulgai</i>
	140/80/70	<i>M. duvalii</i>
	140	<i>M. flavescens I</i>
325/140	210	<i>M. chelonae I</i>
	200/70/60	<i>M. aichiense</i>
	175	<i>M. haemophilum</i>
	160/170	<i>M. immunogen I</i>
	155/85	<i>M. mucogenicum I</i>
325/115	190/140	<i>M. terrae</i>
	190/140	<i>M. diernhoferi</i>
	180/150	<i>M. neoarum, M. aurum II</i>
	175/120/60	<i>M. rhodesiae</i>
	155/85	<i>M. mucogenicum III</i>
	155/85/60	<i>M. chitae</i>
	150/130	<i>M. lentiflavum II</i>
	140/115/65	<i>M. gordonae IV</i>
	140/105	<i>M. genavense</i>

	140/100/80	<i>M. kansasii V</i>
	140/65/60	<i>M. chelonae II</i>
BstE II	Hae III	Mikobakteri Türü
245/220	210 / 70	<i>M. abscessus II</i>
	200 / 135	<i>M. simiae</i>
	200 / 115 / 80	<i>M. ulcerans</i>
	180 / 60 / 55	<i>M. austroafricanum</i>
	175	<i>M. scotochromogen</i>
	160 / 115 / 80	<i>M. marinum</i>
	160 / 70	<i>M. abscessus I</i>
	155 / 150 / 100	<i>M. peregrinum II</i>
	155 / 150 / 50	<i>M. scrofulaceum</i>
	155 / 140	<i>M. simiae II</i>
	150 / 135 / 100	<i>M. peregrinum II</i>
	150 / 125 / 100	<i>M. porcinum</i>
	150 / 100	<i>M. flavescens II</i>
	150 / 80	<i>M. phlei</i>
	150 / 80 / 60	<i>M. chubuense</i>
	140 / 115	<i>M. gordonae IV</i>
	140 / 105 / 60	<i>M. avium</i>
140 / 75 / 60	<i>M. celatum</i>	
245/140/85	175 / 80	<i>M. aurum I</i>
	160 / 130 / 60	<i>M. smegmatis</i>
	155 / 150 / 100	<i>M. peregrinum II</i>
	150 / 110 / 70	<i>M. shimodei</i>
	150 / 80 / 60	<i>M. tokaiense</i>
	140 / 120 / 95	<i>M. gordonae IV</i>
	140 / 105 / 70	<i>M. gastri</i>
	140 / 105	<i>M. kansasii II</i>
245/115/100	170 / 115	<i>M. gordonae III</i>
	155 / 140 / 60	<i>M. intracellulare</i>
	155 / 110 / 70	<i>M. malmoense</i>
	150 / 135	<i>M. lentiflavum III</i>
	150 / 65	<i>M. hibernae</i>
	140 / 120	<i>M. gordonae III</i>
245/115/80	235 / 115	<i>M. gordonae II</i>
	200 / 150	<i>M. senegalense</i>
	170 / 115 / 60	<i>M. gordonae I</i>
	170 / 105 / 60	<i>M. xenopi</i>
	160 / 140 / 70	<i>M. tuberculosis complex</i>
	160	<i>M. nonchromogenicum I</i>
	155 / 135	<i>M. fortuitum I</i>
	150 / 135 / 60 / 55	<i>M. fortuitum II</i>
	140 / 115 / 70	<i>M. kansasii IV</i>

Çizelge 3.4: Mikobakteri tür değerlendirme cetveli (5)

4. BULGULAR

4.1. Bakteriyolojik Bulgular:

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına tüberküloz şüphesi ile gönderilen toplam 100 hasta örneği çalışmamıza dahil edildi. Hastaların % 60'ı erkek (60 hasta), % 40'ı kadın (40 kadın) olup örneklerin dağılımı ise; balgam 70 (% 70), idrar 14 (% 14), steril vücut sıvısı (SVS) 5 (% 5), bronkoalveolar lavaj (BAL) 2 (% 2), plevral mayi 4 (% 4), apse 3 (% 3), açlık mide sıvısı (AMS) 2 (% 2) şeklindedir. Hasta örneklerinin gönderildiği klinikler ise Göğüs hastalıkları, Dahiliye, Pediatri, Kardiyoloji, Dermatoloji, Enfeksiyon, Ortopedi, Üroloji, Nöroloji, Silifke Verem Savaş Dispanseri ve Mersin Verem Savaş Dispanseri'dir.

Örneklerin EZN yöntemi ile kültür sonuçları (LJ ve BACTEC 12B) çizelge 4.1'de verilmiştir.

Örnek	Hasta Sayısı	ARB		LJ			BACTEC		
		Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Kontamine	Pozitif	Negatif	Kontamine
Balgam	70	28	42	33	37	2	29	41	3
İdrar	14	1	13	6	8	3	6	8	1
SVS	5		5		5		1	4	
BAL	2		2		2			2	
Abse	3		3	2	1		2	1	1
Plevra Sıvısı	4		4	2	2		3	1	1
AMS	2	1	1		2		1	1	
Toplam	100	30	70	43	57	5	42	58	6

Çizelge 4.1. EZN yöntemi ile yapılan boyama ve kültür sonuçları (LJ ve BACTEC 12B)

Ekim öncesi yapılan EZN direkt incelemelerinde ARB pozitifliği örneklerin % 30'nda (n=30) saptanmıştır. Örneklerin % 43'ü (n=43) kültür yöntemi (LJ ve/veya BACTEC 460) ile pozitif bulunurken, EZN ve kültürün aynı anda % 30'ü (30) pozitif olarak tespit edilmiştir. LJ besiyerindeki kontaminasyon 5 (% 5), BACTEC için ise 6 (% 6) olarak tespit edildi.

4.2. Klasik İdentifikasyon Sonucu Elde Edilen Bulgular:

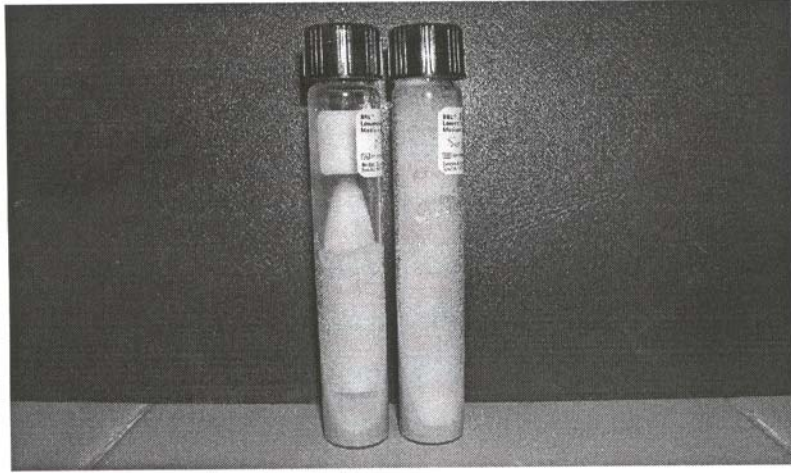
Ayrıca kültürde üremesi olan örnekler klasik yöntem ile de identifikasyon yapıldı. Bu amaçla nitrat, katalaz ve niasin testleri uygulandı. Tüm hastalara klasik identifikasyon yapıldı. Bunun sonucunda 40 hastanın katalaz testi düşük, nitratı pozitif bulunmuştur (Çizelge 4.2). Şekil 4.2' de nitrat testi pozitif olan hastalar pembe, negatif olanlar renksiz olarak görülmektedir. Şekil 4.3' te katalaz testinde düşük ve pozitif olan hasta kültürleri verilmiştir. 30 hastanın niasin testi pozitif olarak saptanmıştır. Şekil 4.4' de niasin testi pozitif olan örnekler sarı olarak elde edilmiştir.

Hasta Sayısı	Nitrat	Nitrat	Katalaz	Katalaz	Niasin	Niasin	Koloni morfolojisi	
43	Pozitif	Negatif	Düşük	Yüksek	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
	40	3	40	3	30	13	Karıbahar görünümlü, R tipi koloni	Sarımsı, S tipi koloni

Çizelge 4.2. Klasik İdentifikasyon sonuçları



Şekil 4.1. Kùltür pozitif örneklerin nitrat testi sonucu renk değişimi



Şekil 4.2. Kùltür pozitif örneklerin katalaz testi sonucu renk değişimi



Şekil 4.3. Kültür pozitif örneklerin niasin testi sonucu renk değişimi

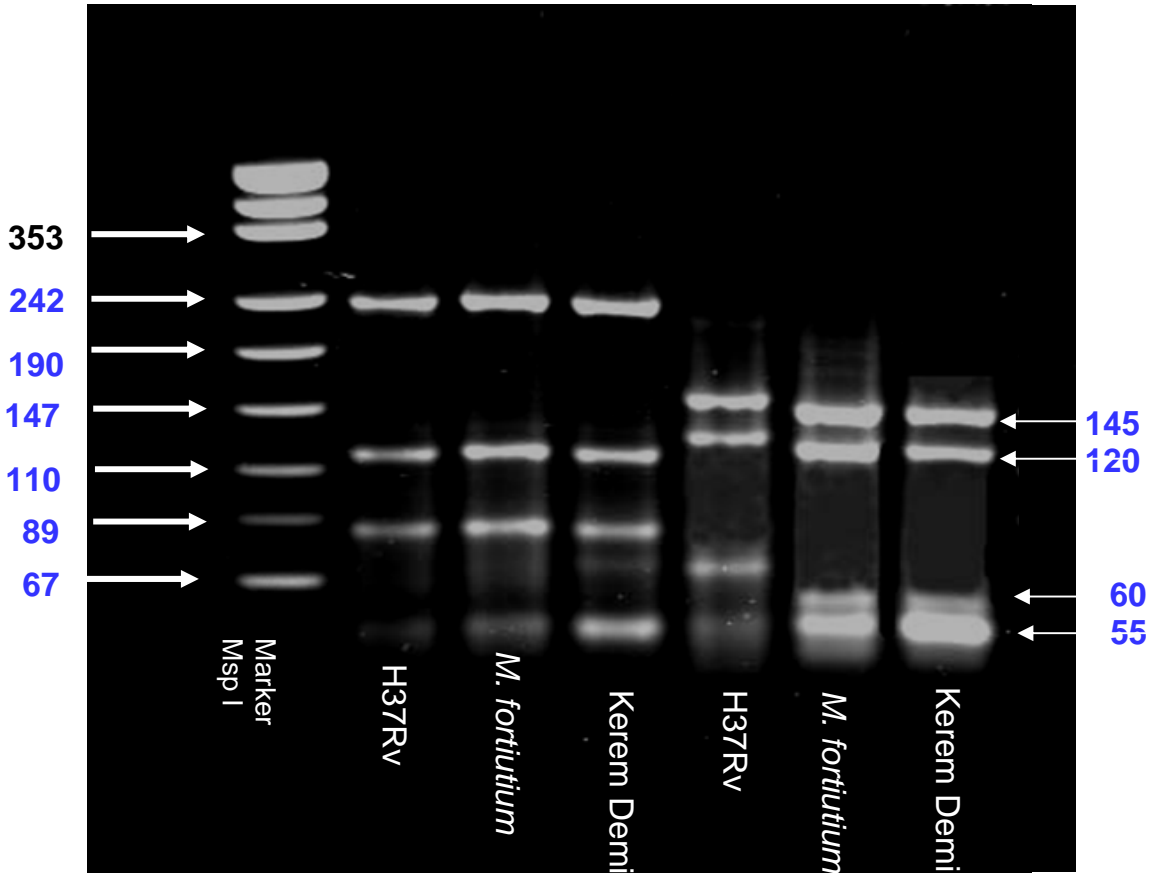
4.3. Moleküler Bulgular:

Bu örneklerden, kültür pozitif olanların hızlı DNA saflaştırma yöntemi ile ekstraksiyonu yapıldı. Daha sonra PZR sonrası elde edilen ürünler % 3'lük agaroz jel elektroforezinde analiz edildi. 439 bp bantların tespit edildiği örnekler *Mycobacterium spp.* olarak tanımlandıktan sonra *BstE* II ve *Hae* III enzimleri ile kesim yapılarak tiplendirilmiştir. Şekil 4.1'de MTC ve NTM olan hastaların elektroforez sonuçları verilmiştir

Mycobacterium spp. olarak izole edilen 66 (% 66) örnekten 7'sinin (% 7) atipik olduğu geri kalan 59 (% 59) örneğin MTC olduğu tespit edildi. Çizelge 4.3'de örneklerin PZR/RFLP sonuçları verilmiştir.

Örnek	PZR	Negatif	PZR/RFLP sonucu	
	<i>Mycobacterium spp.</i>		MTC	NTM
Balgam	49	21 negatif	47 MTC	2 <i>M. fortuitum</i>
İdrar	10	4 negatif	5 MTC	5 <i>M. fortuitum</i>
SVS	1	4 negatif	1 MTC	
BAL	1	1 negatif	1 MTC	
ABSE	3		3 MTC	
Plevral Mai	2	2 negatif	2 MTC	
AMS		2 negatif		
Toplam	66	34	59	7 hasta

Çizelge 4.3. Örneklerin PZR/RFLP sonuçları



Şekil 4.4 PZR-RFLP/Bst EII ve PZR-RFLP/Hae III kesim elektroforez görüntüsü.

Çalışmamızda örneklerimizin % 30'unda ARB pozitif, % 43'ünde LJ/BACTEC pozitifliği, % 66'sında PZR pozitifliği tespit edilmiştir. Kültür ve PZR pozitif 36 örnek klasik yöntem ve PZR RFLP ile MTC olarak 7 Örnek ise NTM olarak tanımlanmıştır. LJ/BACTEC kültüründe kontaminasyon ve üreme olmadığı olarak değerlendirilen örnekler PZR pozitif olarak tespit edildi bu sonuçlar 14 yanlış pozitiflik olarak değerlendirilmiştir

Ayrıca LJ/BACTEC de MTC izolasyonu yapılan 43 örnekten 17'si PZR ile belirlenmemiştir. Bu örnekler için PZR sonuçları yanlış negatif olarak değerlendirilmiştir.

5. TARTIŞMA

Tüberküloz, insidansında artış ve azalmaların olduğu, günümüzde halk sağlığı açısından önemini kaybetmemiş bulaşıcı bir hastalıktır. Geçmişte çiçek, veba veya kolera gibi hastalıklarla birlikte oldukça ciddi salgınlara neden olan tüberküloz, günümüzde AIDS ile birlikte değerlendirildiğinde benzer bir salgın modeli oluşturan bir enfeksiyon olarak kabul edilmektedir (42).

Tüberkülozun tüm dünyada önlenabilir ölüm nedenleri içinde % 25 ile ilk sırada olduğu bildirilmiştir. Dünya nüfusunun 1/3'ünü oluşturan 1,7 milyar insanın tüberküloz basili ile infekte olduğu ve bunların büyük çoğunluğunun gelişmekte olan ülkelerdeki insanlardan olduğu saptanmıştır. Gelişmiş ülkelerdeki infekte bireylerin % 80'i 50 yaş ve üzerinde iken, gelişmekte olan ülkelerdeki bireylerin ise % 77'si 50 yaş ve altındakilerden oluşmaktadır. Ayrıca DSÖ' nün verilerinde, dünyada 20 milyondan fazla tüberküloz hastası olduğu ve buna her yıl 8 milyon yeni hasta eklendiği belirtilmiştir. Her yıl ortaya çıkan olgulardan akciğer tüberkülozlu olguların 3,6 milyonunun bulaştırıcı olgular (yayma pozitif) 3,6 milyonunun ise bulaştırıcı niteliği olmayan (yayma negatif) olgular olduğu saptanmış olup, geri kalan 0,8 milyon olgunun akciğer dışı organ tüberkülozlu olgular olduğu DSÖ tarafından bildirilmiştir (15).

Tüberkülozun tanısında günümüzde halen altın standart olarak kültür kabul edilmektedir. Kültür sonucunun mikroskopiye göre daha duyarlı olmasının nedeni ise balgamın mililitresinde sadece 10 tane tüberküloz basili olmasının, kültürden pozitif bir sonuç elde edilmesini sağlamasıdır. Ancak bu yöntemin doğru ve güvenilir bir sonuç vermesi için örneklerin zamanında ve uygun şartlarda alınması, laboratuvara uygun koşullarda ve en kısa zamanda ulaştırılması gerekmektedir. Kültürün direkt bakıya göre bir diğer üstünlüğü ise mikobakteri türlerinin identifikasyonuna ve antibiyotik duyarlılık testlerinin uygulanmasını sağlamasıdır. Yaptığımız çalışmada tüberküloz şüphesi ile gönderilmiş ve kültürü pozitif olan örneklerle identifikasyon yapılmıştır. Bu nedenle 100 hastada kültür pozitifliği, % 43 (n=43) olup EZN ve kültürün aynı anda pozitifliği % 30 (n=30) olarak belirlenmiştir. Mikobakterilerin kültür ortamında üretilmesinde değişik kültür ortamlarının karşılaştırıldığı çalışmalarda elde edilen sonuçlar çizelge 5.1'de verilmiştir (88, 89, 90, 91, 92). Ülkemizde

yapılan çalışmalarda kültür pozitiflik oranının % 4,8–18,0 arasında değiştiği saptanmıştır. Örneklerin cinsiyetlere göre dağılımına baktığımızda erkek olguların sayısının kadın olgulardan fazla olduğu tespit edilmiştir. Benzer sonuç Özkütük ve ark. tarafından da bildirilmiştir (88).

Araştırmacılar	Kültür Pozitif (%)
Uslu	% 4,6
Özkütük	% 10
Yağcı	% 8.1
Enis	% 18.0
Kısa	% 11
Orhan	%8.45

Çizelge 5.1. Kültür Pozitif Örnek Yüzdesi

Çalışmamızda örneklerimizin % 30'unda ARB pozitif, % 43'ünde LJ/BACTEC pozitifliği, % 66'sında PZR pozitifliği tespit edilmiştir. Kültür ve PZR pozitif 36 örnek klasik yöntem ve PZR RFLP ile MTC olarak 7 Örnek ise NTM olarak tanımlanmıştır. LJ/BACTEC kültüründe kontaminasyon ve üzeme olmadı olarak değerlendirilen örnekler PZR pozitif olarak tesbit edildi bu sonuçlar 14 yanlış pozitiflik olarak değerlendirilmiştir

Ayrıca LJ/BACTEC de MTC izolasyonu yapılan 43 örnekten 17'si PZR ile belirlenememiştir. Bu örnekler için PZR sonuçları yanlış negatif olarak değerlendirilmiştir.

Kültürden DNA izolasyonu yapıldığı halde PZR kültür uyumsuzluğunun bu kadar yüksek olması dikkat çekici bulunarak sonuçlar yeniden gözden geçirildiğinde bunun nedeninin BACTEC'ten yapılan izolasyonlardan kaynaklandığı saptanmıştır. Yanlış negatif sonuçların, BACTEC'te erken dönemde üreyen örneklerden yapılan izolasyonlardan kaynaklandığı saptanmıştır. BACTEC'in erken dönemde pozitif verdiği zaman alınan örneklerden yapılan izolasyonda bu hatalar gözlenmiş ancak özellikle LJ'den alınan

kolonilerden yapılan izolasyonlarda yanlış negatiflik elde edilmediği belirlenmiştir (93, 94, 95, 96).

Örneklerin dağılımına baktığımızda, çalışmamızda en fazla sayıda incelenen örneklerin ilk üçünü balgam, idrar ve SVS oluşturmaktadır. Bu sıra Orhan ve ark.'nın çalışmalarında balgam, plevra, ve BAL olarak yer almıştır (91). Tekereoğlu ve ark Malatya'da yaptıkları çalışmalarında ise ilk üç sırada balgam, idrar ve steril vücut sıvıları yer almıştır (97).

DSÖ verilerine göre her yıl yaklaşık 3 milyon kişinin ölümüne yol açması, takibi zor olması gibi nedenlerle mikobakteriyel enfeksiyonların erken tanı ve tedavisinde moleküler yöntemler, genotiplendirme ve ilaç direnci çalışmaları gündeme gelmiştir. Tüberkülozun tanısında kullanılan moleküler yöntemler genellikle PZR tabanlı teknikler olup hızlı identifikasyon amacı ile PZR-RFLP yöntemi tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda mikobakterilerin identifikasyonu için moleküler teknik olarak PZR-RFLP tekniği kullanılmıştır. Bu teknik kullanılarak tüm mikobakterilere spesifik olan 65 kilo daltonluk ısı şok proteini bölgesine ait PZR ürününün restriksiyon enzimleri ile kesilerek mikobakteri türleri belirlenmiştir (4).

Tekereoğlu ve arkadaşları çalışmalarında direk bakı, kültür, PZR pozitifliklerini incelemişler ve ARB için % 14.2, kültür için % 14.3 ve PZR için % 28.9 oranlarını bildirmişler ve alınan bu sonuçlar ışığında özellikle steril vücut sıvısı ve idrar örneklerinde moleküler yöntemlerin kullanılmasının yerinde olacağını belirtmişlerdir (97).

Tüberküloz basilinin identifikasyonunda kullanılan alternatif yöntemlerden olan nükleik asit hibridizasyon tekniklerinin uygulanması kolay, hızlı ve pratiktir. Klinik örneklerden tüberküloz basil kompleksinin identifikasyonunda kullanılacak çok sayıda moleküler yöntem mevcuttur. Ancak bu yöntemlerin standardizasyonu halen sağlanamamıştır (98). Noordhoek ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada nükleik asit amplifikasyon tekniklerinin doğruluğu değerlendirilmiştir. Bu çalışmaya 18 ülkeden 30 laboratuvar katılmış olup 20 örnek çalışılmıştır. Bunlar içerisinde sadece 5 laboratuvar örnekleri doğru bir şekilde identifiye edebilmiştir. Moleküler tekniklerin duyarlılığı ve doğruluğunun laboratuvarında kullanılan prosedürlerin kalite kontrolüne ve deneyimli personele bağlı olduğu yapılan çalışmada saptanmıştır (99).

Yayma ve kültür negatif olan olgularda ortamda bulunan basil sayısı çok az sayıda olsa bile tbc tanısı yapılabilirdi için PZR-RFLP yöntemi oldukça duyarlı ve spesifik bir tekniktir. Ayrıca bu yöntemle NTM'ler saptanabilmiştir. Ancak bu yöntemde bazı mikobakteri türlerinin bant paternlerinin birbirine çok yakın olması nedeniyle identifikasyon zaman zaman güçleşmektedir. Ayrıca ortamda bulunabilecek inhibitör ya da kontaminant ajanlar nedeniyle ortaya çıkan yanlış pozitif veya yanlış negatif olguların önüne geçilmesi için mutlaka negatif ve pozitif kontrollerle birlikte çalışmak gereklidir.

Günümüzde laboratuvar ortamında izole edilen mikobakterinin MTC yada MOTT olup olmadığını rutin olarak tespit edebilmek için çeşitli biyokimyasal identifikasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Bu amaçla kord faktör oluşumu, MacConkey agarda, kanlı agarda üreme testi, NAP (p-nitro- α -acetylamino- β -hydro-xypropioiphenone) testi gibi testler yanı sıra katalaz testi, niasin testi, pirazinamidaz testi, thiophene-2 karboksilik asit hidrazid testi gibi birçok biyokimyasal test kullanılmaktadır (62). Bu biyokimyasal testlerden nitrat, katalaz ve niasin testlerini çalışmamızda kullandık. Yaptığımız çalışmada nitrat ve katalaz test sonuçlarının aynı olduğunu (% 40) ancak niasin test (% 30) sonucunun biraz daha farklı olduğunu tespit ettik.

Çeşitli araştırmacılar tarafından çalışmalarında saptanmış olan kontaminasyon oranları; Somoskovi ve ark. BACTEC sisteminde % 2,9, LJ besiyerinde % 1,2, Kirihara ark., BACTEC sisteminde % 1,6, LJ besiyerinde ise % 5,5 olarak bildirmişlerdir (94, 95). Koç ve ark., BACTEC'de % 8 ve LJ besiyerinde % 4,3 ve Özekinci, BACTEC'de % 6,4, LJ besiyerinde % 7,3 şeklinde olduğunu belirtilmişlerdir (100, 101). Yaptığımız çalışmada ise kontaminasyon oranı LJ besiyeri için % 5 olup bu araştırmacıların oranlarına yakın olarak bulunmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına tüberküloz şüphesi ile gönderilen toplam 100 hasta örneğinde *Mycobacterium spp* izolasyonu için klasik (ARB, LJ / BACTEC 46) yöntemler kullanılmış izolatların identifikasyonunda klasik yöntemler ve PZR-RFLP kullanılmıştır. Çalışmamızda örneklerin % 43'ü (n=43) kültür yöntemi ile pozitif bulunurken, EZN ve kültürün aynı anda % 30'ü (30) pozitif olarak tespit edilmiştir. Kültür sonrası yapılan PZR sonucu örneklerin 66'sı (% 66) *Mycobacterium spp.* olarak tanımlanmıştır. PZR RFLP ile bu örneklerin 59'u (%59) MTC, 7'si (%7) NTM (*M. fortuitum*) olarak identifiye edilmiştir. Günümüzde tüberkülozun tanısında, izolatların identifikasyon ve duyarlılığının belirlenebilmesi kültür halen altın standart olarak yerini korumaktadır. Ancak mikobakterilerin besiyerinden izolasyonları için 6–8 hafta inkübe edilmesi ayrıca klasik identifikasyon içinde 2-4 haftalık zaman gerekmektedir. Bundan dolayı izolasyon, identifikasyon ve duyarlılık belirlenmesinde daha hızlı moleküler yöntemler kullanıma girmeye başlamıştır. Özellikle yayma ve kültür negatif olan olgularda ortamda bulunan basil sayısı düşük miktarda olduğu durumlarda PZR-RFLP yöntemi ile mikobakterilerin identifikasyonu mümkün olmaktadır. Ancak diğer çalışmalarda olduğu gibi bizim çalışmamızda da yöntemin en önemli dezavantajı olarak zaman zaman yanlış pozitif ve negatif sonuçlar ortaya çıkmıştır. Yanlış negatif ve yanlış pozitif sonuçların, kullanılan yöntemin standardize olmamasından, izolasyon sırasında ortamda bulunan inhibitör, kontaminant maddeler, yetersiz ekstraksiyon ve homojenizasyon ve dekontaminasyon şartlarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Tüberkülozun laboratuvar tanısında klasik (ARB ve LJ/BACTEC) ve moleküler yöntemlerin sonuçları değerlendirilirken mutlaka klinik ön tanı ile birlikte değerlendirilmelidir.

7. KAYNAKLAR

1. **Tevfik Cengiz.** Tıp ve Diş Hekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi, **2004**.
2. **World Health Organization.** *Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report.* **2006**.
3. **Bilgehan Hakkı.** Klinik Mikrobiyoloji. 10. baskı, İzmir: Barış kitabevi, **2000**; 439–486.
4. **Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T.** Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Journal of Clinical Microbiology.* **1993**, 31(2):171–178.
5. **Ergin A, Kocagöz T, Us Dürdal, Günali A.** Polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon enzim analizi ile mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanması. *Mikrobiyoloji Bult.* **1999**, 33: 251–261.
6. **Taylor T, Patterson C, Hale Y, Safranek WW.** Routine use of PZR-Restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. *Journal of Clinical Microbiology.* **1997**, 35(1):79–85.
7. **Brunello F, Ligozzi M, Cristelli E, Bonora S, Tortoli E, Fontana R.** Identification of 54 mycobacterial species by PZR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of the *hsp65* gene. *Journal of Clinical Microbiology.* **2001**, 39(8):2799–2806.
8. **Steingrube VA, Gibson JL, Brown BA, Zhang Y, Wilson RW, Rajagopalan M, Wallace RJ.** PZR amplification and restriction endonuclease analysis of a 65-Kilodalton heat shock protein gene sequence for taxonomic separation of rapidly growing mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology.* **1995**, 33(1): 149–153.
9. **Huard CR et al.** Novel Genetic Polymorphisms That Further Delineate the Phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Journal of Bacteriology*, **2006**, 188 (12): 4271-4287.
10. **Köksal F.** Mikobakterilerin evrimi ve ekolojisi. 6. Ulusal Mikobakteri sempozyumu, Ankara, **2006**. Sempozyum Kitabı 91–93.
11. **Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omas B.** Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of mycobacterium tuberculosis. *Plos Pathology*, **2005**;1(1):e5.
12. **Rota S.** Yeni tüberküloz aşılıarı. 6. Ulusal Mikobakteri sempozyumu, Ankara, **2006**. Sempozyum Kitabı 127–129.

13. **Glespie S.** Evolution of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Clinical and Molecular Perspective. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, **2002**, 267–274.
14. **Currie, SM, Williams BG, Cheng RCH Dye C.** Tuberculosis epidemics driven by HIV: is prevention better than cure? *AIDS*. **2003**, 17:2501–2508.
15. WHO. Erişim: www.who.org/2006tuberculosis facts, Erişim Tarihi 5.05.2006.
16. **Dye C.** Global epidemiology of tuberculosis. *Lancet.*,**2006**; 367: 938–40.
17. **Barış İ.** Osmalıda Tüberküloz. *Toraks Dergisi*, **2002**;3(3): 335-337
18. **Özkara Ş., Aktaş Z., Özkan S., Ecevit H.** Türkiyede tüberkülozun kontrolü için başvuru kitabı. 1. baskı, Ankara: Rekmay Ltd. Şti., **2003**; 12-14.
19. **Cousins VD et al.** Tuberculosis in seals caused by a novel member of the Mycobacterium tuberculosis complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **2003**; 53: 1305–1314.
20. **Aranaz A, Cousins D, Mateos A ve Dominguez L.** Elevation of Mycobacterium tuberculosis subsp.caprae Aranaz et al. 1999 to species rank as Mycobacterium caprae comb. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **2003**; 53: 1785–1789.
21. **Lai CC, Lee LN, Ding LW.** Emergence of disseminated infections due to nontuberculous mycobacteria in non-HIV-infected patients, including immunocompetent and immunocompromised patients in a university hospital in Taiwan. *J Infect.* **2006**; 53(2): 77–84.
22. **Largus TA, Scott TK, Allison SA, Norman RP, Mark T** Molecular identification of potential pathogens in water and air of a hospital therapy pool Hernandez. *Pnas.* **2005**;102(13): 4860–4865.
23. **Ilene B, Bayer G, Cox MD, Margie A, Smoller BR.** Mycobacteria other than Mycobacterium tuberculosis are not present in erythema induratum/nodular vasculitis: a case series and literature review of the clinical and histologic findings. *J Cutan Pathol.* **2005**: 32: 220–226.
24. **Dahl JL.** Scanning electron microscopy analysis of aged *Mycobacterium tuberculosis* cells. *Can. J. Microbiol.* **2005**; 51(3): 277–281.
25. **Vergene I, Chua J, Singh BS, Deretic V.** Cell Biology Of *Mycobacterium Tuberculosis* Phagosome. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* **2004**; 20: 367–394.
26. **Riley LW.** Of mice and elephants:mycobacterium tuberculosis cell envelope lipids and pathogenesis. *Journal of clinical investigation.* **2006**; 116:1475–1478.

27. **Isenberg DH.** Solid media: selection, inoculation, incubation and examination. Essentials procedures for clinical microbiology. Washington, D.C: ASM Pres, **2000**: 182-197.
28. **Bary C, Lee R, Midluli K, Sampson A, Schroeder BG, Slayden RA,, Yuan Y.** Mycolic acids: structure biosynthesis and physiological functions. *Prog Lipid Res.* **1998**; 37:143-179.
29. **Özbal Y.** Tüberküloz immünolojisi. *Erciyes tıp dergisi.* **2006**;28(1):25-34.
30. **Ferrazi JC, Meloi FB, Albuquerque M , Abath F.** Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. *Brazilian Journal of Medical Biological research.*2006;39:1387-1397.
31. **Mustafa AS.** Development of new vaccines and diagnostic reagents against tuberculosis. *Molecular Immunology.* **2002**; 39:113–119.
32. **Tom H, Ottenhoff M,Tuna M.** Specific Killing Of Cytotoxic T Cells and Antigen-Presenting Cells By Cd4+ Cytotoxic T Cell Clones A Novel Potentially Immunoregulatory T-T Cell Interaction In Man. *J. Exp. MED.* **1990** 2011–2024.
33. Loeuillet C, Martinon F, Perez C, Munoz M, Thome M, Meylan PR. *Mycobacterium tuberculosis* Subverts Innate Immunity to Evade Specific Effectors. *J Immunol.* **2006**;177(9):6245–55.
34. **Watson JM.** Tuberculosis in Europe. *Eurosurveillance.* **2006**;11:1–3.
35. **Tiruvilumala P, Reichman LB.** Tuberculosis. *Annual Review of Public Health.***2002**;23: 403–426
36. **Mert A, Bilir M, Tabak F, Ozaras R, Ozturk R.** Miliary tuberculosis: Clinical manifestations, diagnosis and outcome in 38 adults. *Respirology.* **2001**; 6:217–224.
37. **World Health Organization.** The Stop TB Strategy: building on and enhancing DOTS to meet the TB-related Millennium Development Goals. *WHO.* **2006**; 35–37.
38. **Sepkowitz KA.** How Contagious Is Tuberculosis. *Clin Infect Dis.***1996**; 23: 954–962.
39. **Kıter G, Uçan S.** Tüberkülozdan Korunma. *Toraks Dergisi,* **2001**;2(1):85–90.
40. **Bouke CJ, Israelski DM, Corbett EL, Small PM.** Clinical management of tuberculosis in the context of HIV infection. *Annual Review of Medicine.* **2004**; 55: 283–301.
41. **Espinal MA, Reingold AL.** *Mycobacterium tuberculosis* Transmission and HIV status. *Lancet.* **2000**; 355:2077.

42. **Oğuz AV.** Tüberküloz Basilinin bulaş yolları ve konaktaki seyri. **21. yüzyılda** Tüberküloz sempozyumu ve II. Tüberküloz tanı yöntemleri kursu, Samsun, **2003**. Kurs Kitabı; 48–58.
43. **Ducati RG, Netto AR, Basso LA, Santos DS.** The resumption of consumption-A review on tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. **2006**; Vol. 101(7): 697–714.
44. **Aslan G.** Hasta örneklerinin işlnmesi ve kültürü. III. Tüberküloz sempozyumu ve III. Tüberküloz laboratuvar tanı yöntemleri uygulama kursu, Adana, **2004**. Kurs kitabı; 10-18.
45. **Isenberg DH.** Homogenization-decontamination Procedures. . Essentials procedures for clinical microbiology. Washington, D.C: ASM Pres, **2000**: 182-184.
46. **Sarıgüzel N.** Direk Mikroskopi Teknikleri Ve Değerlendirilmesi. *21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun.* **2003**;292–299
47. **Isenberg DH.** Acid, fast stain procedures. Essentials procedures for clinical microbiology. Washington, D.C: ASM Pres, **2000**: 179–181.
48. **Ulukanlıgil M, Aslan G, Taşçı S.** A Comparative Study on the Different Staining Methods and Number of Specimens for the Detection of Acid Fast Bacilli. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **2000**; 95(6): 855-858.
49. **Ba F, Rieder HL.** A comparison of fluorescence microscopy with the Ziehl- Neelsen technique in the examination of sputum for acid- fast bacilli. *Int J Tuberc Lung Dis*, 1999; 3(12): 1101- 5.
50. **Kumar N, Tiwari MC, Verma K.** AFB staining in cytodiagnosis of tuberculosis without classical features:a comparison of Ziehl- Neelsen and fluorescent methods. *Cytopathology*, 1998; 9(3):208-14.
51. **Hines N, Payeur JB and Hoffman LJ.** Comparison of the recovery of Mycobacterium bovis iozlates using MGIT 960 system, BACTEC 460 system, and Middlebrook 7H10 and 7H11 solid media. *J Vet Diagn Invest.* **2006**; 18:243-250
52. **Liu PI et al.** Comparison of three culture Media for isolation of Mycobacterium tuberculosis: a 6 year study. *Applied Microbiology.* **1973**; 880-883.
53. **American Thoracic Society.** Diagnosis and Treatment of Disease Caused by Nontuberculous Mycobacteria. *American Thoracic Society Medical Section Of The American Lung Associatton.* **1997**;1-1-25.
54. **G. Middlebrook. M. L. Cohn. W. B. Dye. W. B. Russell. D. Levy.** Microbiologic procedures of value in tuberculosis. *Acta. Tub. Scand.* **1960**; 38. 66.

55. **Isenberg D. H.** Liquid media. Essentials procedures for clinical microbiology. Washington, D.C: ASM Pres, 2000: 183-187.
56. **Hines N, Payeur JB and Hoffman LJ.** Comparison of the recovery of *Mycobacterium bovis* iozlates using MGIT 960 system, BACTEC 460 system, and Middlebrook 7H10 and 7H11 solid media. *J Vet Diagn Invest.* **2006**; 18:243-250
57. **Salfinger M, Stool EW, Piot D, Heifets L.** Comparison of three methods for recovery of *Mycobacterium avium* Complex from blood specimens. *Journal of Clinical Microbiology.* **1988**;1225-1226.
58. **Isenberg DH.** Liquid media. Essentials procedures for clinical microbiology. Washington, D.C: ASM Pres, **2000**: 183-187.
59. **Köksalan OK, Aydın MD, Eraslan S, Bekiroğlu N.** Reliability of corf formation in BACTEC 12B/13A Media for presumptive identification of *mycobacterium tuberculosis* complex in laboratories with a high prevalance of *mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **2002**; 21: 314-317.
60. **Bemer P, Palicova F, Rusch-Gerdes S, Drugeon HB, Pfyffer GE.** Multicenter evaluation of fully automated BACTEC mycobacteria growth indicator tube 960 system for susceptibility testing of *mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology.* **2002**; 150-154.
61. **Grange JM, Yates MD, Kantor IN.** Guidelines for speciation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *World Health Organisation. Emerging and other Communicable Diseases, Surveillance and Control.* **1996**; 4: 1-23.
62. **Sürücüoğlu S.** Tüberküloz basillerinin identifikasyonu. III. Tüberküloz sempozyumu ve III. Tüberküloz laboratuvar tanı yöntemleri uygulama kursu, Adana, **2004**. Kurs kitabı; 30–43.
63. **Perkins MD.** New diagnostic tools for tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* **2000**; 4(12): 182-188
64. **Perkins MD., Conde MB., Martins M, Kritski LA.** Serologic Diagnosis of Tuberculosis Using a Simple Commercial Multiantigen Assay. *Chest.* **2003**;123;107-112.
65. **Tessema TA et al.** Circulating antibodies to lipoarabinomannan in relation to sputum microscopy, clinical features and urinary anti-lipoarabinomannan detection in pulmonary tuberculosis. *Scand J Infect Dis.* **2002**;34: 97–103.
66. **Hamasur B et al.** Rapid diagnosis of tuberculosis by detection of mycobacterial lipoarabinomannan in urine. *J Microbiol Methods* **2001**;45:41-52.
67. **Perkins MD, Conde MB, Martins M, Kritski AL.** Serologic diagnosis of tuberculosis using a simple commercial multiantigen assay. *Chest* **2003**;123:107-12.

68. **Julian E, Cama M, Martinez P, Luquin M.** An ELISA for five glycolipids from the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*: Tween 20 interference in the assay. *J Immunol Methods*. **2001**;251: 21-30.
69. **Gounder C et al.** Field evaluation of a rapid immunochromatographic test for tuberculosis. *J Clin Microbiol*. **2002**;40: 1989–93.
70. **Durmaz R.** Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Nobel Tıp Kitabevleri, 2.Baskı,**2001**.
71. **Solak M, Bağcı H, Şengil Z, Öztaş S.** *Moleküler genetik ve rekombinant dna teknolojisi (temel bilgiler)*. 2. Baskı, Ankara: Afyon Kocatepe Ünv Eğitim Sağlık Ve Bilimsel Araştırmalar Vakfı Yayın No:5, **2000**, 124–135.
72. **Bogard M, Vincelette J, Antinozzi R.** Multicenter study of a commercial, automated polymerase chain reaction system for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens in routine clinical practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **2001**; 20: 724-731.
73. **Reischl U, Lehn N, Wolf H, Naumann L.** Clinical evaluation of the automated COBAS AMPLICOR MTB assay for testing respiratory and nonrespiratory specimens. *J Clin Microbiol* **1998**; 36: 2853-2860.
74. **D'amato RF, Wallman AA, Hochstein LH.** Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis by using Roche AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* PCR test. *J Clin Microbiol* **1995**; 33: 1832-1834.
75. **Bonington A, Strang G, Klapper PE.** Use of Roche AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* PCR in early diagnosis of tuberculosis meningitidis. *J Clin Microbiol*. **1998**; 36,1251–1254.
76. **Vlaspolder F, Singer P, Roggeveen C.** Diagnostic value of an amplification method (Gen-Probe) compared with that of culture for diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol* **1995**; 33: 2699–2703.
77. **Miller N, Hernandez SG, Cleary TJ.** Evaluation of Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test and PCR for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens. *J Clin Microbiol* **1994**; 32: 393–397.
78. **Down JA, O'Connell MA, Dey MS.** Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens by strand displacement amplification of DNA. *J Clin Microbiol*. **1996**; 34: 860–865.
79. **Ichiyama S, Ito Y, Sugiura F.** Diagnostic value of the strand displacement amplification method compared to those of Roche Amplicor PCR and culture for detecting mycobacteria in sputum samples. *J Clin Microbiol*. **1997**; 35: 3082–3085.
80. **Viinänen AH, Soini H, Marjamaki M, Liippo K, Viljanen MK.** Ligase chain reaction assay is clinically useful in the discrimination of smear-positive pulmonary tuberculosis from atypical mycobacterioses. *Ann med* **2000**; 4: 279–283.

81. **Pfaller MA.** Application of new technology to the detection, identification, and antimicrobial susceptibility testing of Mycobacteria. *Am J Clin Pathol.* **1994**; 101:329–337.
82. **Yajko DM, Wagner C, Tevere VJ.** Quantitative culture of *Mycobacterium tuberculosis* from clinical sputum specimens and dilution end points of its detection by the Amplicor PCR assay. *J Clin Microbiol* **1995**; 33,1944–1947.
83. **Grosset J, Mouton Y.** Is PCR a useful tool for the diagnosis of tuberculosis in 1995?. *Tubercle Lung Dis* **1995**; 76: 183-184.
84. **Hellyer TJ, Fletcher TW, Bates JH.** Strand displacement amplification and the polymerase chain reaction for monitoring response to treatment in patients with pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* **1996**; 173(4): 934–941.
85. **Glespie S.** Evolution of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Clinical and Molecular Perspective. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, **2002**, 267–274.
86. **Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J.** *Molecular cloning: a laboratory manuel.* 2nd Ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory, **1989**.
87. **Siddiqi SH.** BACTEC 460 TB System Product and Procedure Manual. Becton Dickinson and Company, Sparks, Md., **2000**, 300-400.
88. **Özkütük N, Sürücüoğlu S, Sezgin C, Özbakkaloğlu B.** Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikobakteriyoloji Verilerinin Değerlendirilmesi. X. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi (KLİMİK), Kongre Kitabı. Adana: 2001: 176–177.
89. **Eriş FN, Biçmen C, Şenol G, Florat N.** İzmir Göğüs Hastanesi Mikobakteriyoloji Verilerinin Retrospektif Değerlendirilmesi, XXIX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı. 8–13, Antalya: **2000**: 325.
90. **Uslu H, Özbek A, Aktaş O.** Tüberküloz Ön Tanılı Hastalara Ait Klinik Örneklerden Elde Edilen Mikrobiyolojik Sonuçların Değerlendirilmesi. *AÜTD*; **2003**; 35: 43–47.
91. **Orhan G, Zor Y, Balcı İ, Bayram A, Korkmaz G.** Hastanemiz Mikobakteriyoloji Laboratuvarına Gelen Materyallerin Retrospektif Değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* **2002**; 32; 225–229.
92. **Yağcı A, İlki A, Söyletir G.** Marmara Üniversitesi Hastanesi Mikobakteriyoloji Laboratuvar Verileri, XXIX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı. 8–13.Ekim, Antalya: 2000: 355
93. **Abe C, Hosojima S, Fukasawa Y, et al.** Comparison of MB-Check BACTEC and Egg-Based media for recoery of *mycobacteriae*. *J. Clin Microbiol*, **1992**: 30; 878.
94. **Somoskövi A, Ködmon C, Lantos A et al.** Comparison of recoveries of *Mycobacterium tuberculosis* using the automated BATEC MGIT 960 system, the BACTEC 460 TB system and Löwenstein-Jensen medium. *J. Clin Microbiol*, **2000**: 38; 2395–97.

95. **Kirihara JM, Hillier SL, Coyle MB.** Improved detection times for *Mycobacterium avium complex* and *Mycobacterium tuberculosis* with the BACTEC radiometric system. *J. Clin Microbiol*, **1985**; 22; 841.
96. **İsitez M, Çetinkaya Z, Altındış M, Çiftçi İH, Fidan F.** Afyon Bölgesinde Löwenstein-Jensen, Bactec ve TK Medium Yöntemleri İle İzole Edilen *Mycobacterium Tuberculosis* Suşlarının Dört Major İlaça Karşı Dirençlerinin Belirlenmesi. *Kocatepe Tıp Dergisi*: **2005**;5:45–48.
97. **Tekeroğlu S.** Mycobacterium tuberculosis'in laboratuvar Tanısı. *Turgut Özal Tıp Dergisi*. **2000**;7(2),171-176.
98. **Noorhoek GT, Mulder S, Wallace P, Loon AM.** Multicenter quality control study for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by nucleic amplification methods. *Clin Microbiol Infect*, **2004**; 10:295-301.
99. **Noorhoek GT, Embden JDA, Kolk AH.** Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*, **1996**;34: 2522-2525.
100. **Koç AN, Özcan M, Özbal Y, Fazlı ŞA.** Comparison of Bactec TB system and conventional methods for recovery of *Mycobacterium tuberculosis* from clinical specimens, **Turkish J. Infec 10:1-5, 1996.**
101. **Özekinci T.** Tüberküloz tanısında Erlich-Ziehl-Nielsen, fluokrom boyama yöntemleri ile BACTEC ve Löwenstein-Jensen kültür yöntemlerinin sonuçlarının değerlendirilmesi. Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi, **2000.**

8. ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Adana'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Adana'da tamamladı. 2001 yılında Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji bölümünden mezun oldu. 2004 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2005 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.

Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrencisi olarak öğrenim görmekte ve sağlık hizmetleri meslek yüksekokulunda öğretim görevlisi olarak görev yapmaktadır.