

TEKİRDAĞ İLİNDEKİ TÜBERKÜLOZ ŞÜPHELİ HASTALARDA
ASİDE DİRENÇLİ BASİL TANISINDA EHRLİCH-ZIEHL NEELSEN
VE AURAMİNE-RHODAMİNE BOYAMA YÖNTEMLERİNİN
SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRMALI DEĞERLENDİRİLMESİ

1168208101

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

PROF.DR.AYNUR EREN TOPKAYA

Tez No: 2019/49

TÜRKİYE CUMHURİYETİ

TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Tekirdağ İlindeki Tüberküloz Şüpheli Hastalarda Aside Dirençli
Basil Tanısında Erlich-Ziehl-Neelsen ve Auramine-Rhodamine
Boyama Yöntemlerinin Sonuçlarının Karşılaştırmalı
Değerlendirilmesi**

Yeliz BALICA

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİMDALI

DANIŞMAN: Prof. Dr. Aynur EREN TOPKAYA

TEKİRDAĞ 2019

KABUL ve ONAY

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde Prof. Dr. Aynur EREN TOPKAYA danışmanlığında
yürütülmüş bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak
kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi

18.04.2019

Prof. Dr. Aynur EREN TOPKAYA

Yeditepe Üniversitesi

Jüri Başkanı



Doç. Dr. Dumrul GÜLEN

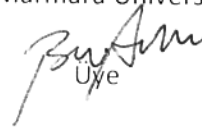
Dr. Öğr. Üyesi Burak AKSU

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Marmara Üniversitesi



Üye



Üye

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Yeliz BALICA' nın "Tekirdağ İlindeki Tüberküloz Şüpheli Hastalarda Aside Dirençli Basil Tanısında Ehrlich-Ziehl-Neelsen ve Auramine-Rhodamine Boyama Yöntemlerinin Sonuçlarının Karşılaştırılmalı Değerlendirilmesi" başlıklı tezi 18.04.2019 günü saat 13.30' da Namık Kemal Üniversitesi Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Nilda TURGUT

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve yüksek lisans öğrenimim boyunca tecrübe ve bilgilerini paylaşarak desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof.Dr.Aynur EREN TOPKAYA'ya; yüksek lisans öğrenim sürecimde çabalarımın destek olan, bilimsel birikimini benimle paylaşan, akademik duruşunu ve karakterini kendime örnek aldığım Dr.Öğr.Üyesi Berna ERDAL'a, hayatımın her anında yanımda olan desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

ÖZET

Balıca Y. Tekirdağ İlindeki Tüberküloz Şüpheli Hastalarda Aside Dirençli Basil Tanısında Erlich-Ziehl-Neelsen ve Auramine-Rhodamine Boyama Yöntemlerinin Sonuçlarının Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi, Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilimdalı Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ 2019. Tüberküloz yakın temas ile kolay bir şekilde bulaşan ve potansiyel ölüm tehlikesi olarak kabul edilen bir hastalık olması nedeniyle hızlı tanı konulması ve etkili bir şekilde tedavi edilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada; tüberküloz şüpheli hastalardan laboratuvara gelen klinik örnekler EZN ve AR boyama yöntemleriyle karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda; Kültür referans test kabul edilerek AR boyama yönteminin duyarlılığı (%92) EZN boyama yönteminin duyarlılığına (%78) göre daha yüksek bulunmuştur. EZN boyamanın özgüllüğü (%94) AR boyamanın özgüllüğüne (%84) göre daha düşük bulunmuştur. Çalışmamızda boyanan preparatların mikroskopta alan tarama süreleri karşılaştırıldığında EZN ile boyanan bir preparat ortalama 5.4 dk da, AR ile boyanan bir preparat ortalama 2.8 dk' da incelenmiştir.

Sonuç olarak; duyarlılığı yüksek bir boyama yönteminin kullanılması incelenecek örnek sayısını azaltarak, her preparat için alan tarama süresinin kısalmasıyla kültür pozitif örneklerin tespit edilme olasılığını arttıracaktır.

Anahtar kelimeler: EZN, tüberküloz, AR, floresan mikroskop

ABSTRACT

Balica Y. Comparative Evaluation of Erlich-Ziehl-Neelsen and Auramine-Rhodamine Dyeing Methods in the Diagnosis of Acid Resistant Basil in Tuberculosis Susceptible Patients in Tekirdag, Namık Kemal University Institute of Health Sciences, Department of Medical Microbiology Master Thesis, Tekirdağ, Turkey. Tuberculosis is a disease that is easily transmitted by the close contact and is considered as a potential death hazard, so it should be diagnosed quickly and treated effectively.

In this study; clinical samples from patients with suspected tuberculosis were compared with EZN and AR staining methods.

In our study; The sensitivity of AR staining method (92%) was higher than the sensitivity of EZN staining method (78%). The specificity of EZN staining (94%) was lower than the specificity of AR staining (84%). In our study, we screened the area of the microscope when compared with the EZN staining time of an average of 5.4 minutes, a preparation stained with AR was examined at an average of 2.8 minutes.

As a result; The use of a high-sensitivity staining method will reduce the number of samples to be examined, thereby increasing the probability of detecting culture-positive samples by shortening the area scanning time for each preparation.

Key words: EZN, tuberculosis, AR, fluorescent microscope

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Tarihçe.....	2
2.2. Epidemiyoloji	3
2.2.1. Dünyada Tüberküloz.....	3
2.2.2. Türkiyede Tüberküloz.....	4
2.3. Mikobakterilerin Genel Özellikleri	5
2.3.1. Üreme Özellikleri	7
2.4. Tüberküloz Patogenezi	8
2.5. Tüberküloz İmmünolojisi	12
2.6. Virulans Faktörleri	14
2.7. Tüberkülozun Mikrobiyolojik Tanısı	15
2.8. Klinik örneklerin işlenmesi	19
2.9. Mikroskopik inceleme	21
2.10. Kültür.....	25
2.11. Otomatize kültür sistemleri	27
2.12. İdentifikasyon testleri	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. Dekontaminasyon/homojenizasyon/konsantrasyon işlemleri	36
3.2. Direkt mikroskopik inceleme	37
3.2.1. Erlich-Ziehl-Neelsen boyama yöntemi	37
3.2.2. Auramin/Rhodamine/KmnO4 floresan boyama yöntemi.....	38
3.3. Löwenstein- Jensen katı kültür yöntemi.....	38
3.4. İstatistiksel analiz	39
4. BULGULAR.....	40
5. TARTIŞMA	46
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	56
KAYNAKLAR	57

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

TB: Tüberküloz

HIV: insan immün yetmezlik virusu

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

EZN: Ehrlich Ziehl–Neelsen

FM: floresan mikroskop

AR: Auramine O-rhodamine B/KMNO₄

KMNO₄: Potasyum permanganat

ARB: Aside dirençli basil

TDM: tüberküloz dışı bakteri

BAL: bronkoalveolar lavaj

BOS: beyin omurilik sıvısı

NALC: N-Asetil-L-sistein

NaOH: Sodyum hidroksit

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

LJ: Löwenstein-Jensen

İDT: İlaç duyarlılık testi

CLSI: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü

LED FM: Aydınlatma yayan floresan mikroskop

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.2.1.DSÖ'nün 2017 tahmini insidans oranları.....	4
Şekil 2.2.2.Türkiye'de 2017 yılında tahmini TB insidans oranları .. Error! Bookmark not defined.	
Şekil 2.3. Mikobakteri hücre duvarı	7
Şekil 4. LJ besiyerinde üretilen <i>M.tuberculosis</i>	41
Şekil 4.1. EZN boyama yöntemiyle boyanan ARB(+) ışık mikroskobu preparat görüntüsü.....	41
Şekil 4.2. AR boyama yöntemiyle boyanan ARB(+) FM preparat görüntüsü	42

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.3.1. Runyon sınıflaması.....	8
Tablo 2.9 Boyama yöntemlerinin karşılaştırılması.....	23
Tablo 2.9.1. EZN boyama yöntemi ile sonuç bildirimini.....	24
Tablo 2.9.2. Flourokrom boyama yöntemi ile sonuç bildirimini.....	24
Tablo 3.4. Elde edilen verilerin analizleri.....	39
Tablo 4.3. Kültür pozitif klinik örneklerin dağılımını.....	42
Tablo 4.4. Kültür negatif klinik örneklerin dağılımını.....	42
Tablo 4.5. Kültür (+) izolatların EZN boyama ve AR boyama yöntemi ile ARB sonuçları.....	44
Tablo 4.6. Kültür (-) izolatların EZN boyama ve AR boyama yöntemi ile ARB sonuçları.....	44
Tablo 4.7. EZN boyama yöntemiyle kültür sonuçlarının karşılaştırılması.....	44

Tablo 4.8. Auramine O/Rhodamine B boyama yöntemiyle kültür sonuçlarının karşılaştırılması.....45

Tablo 4.9. EZN ve Auramin O/Rhodamine B yöntemlerinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri ve testin geçerliliği (doğruluk).....45

1.GİRİŞ

Tüberküloz (TB), özellikle gelişmekte olan ülkelerde morbidite ve mortalite oranı yüksek seyreden kronik enfeksiyöz bir hastalıktır. Günümüzde dünya nüfusunun 1/3'nin tüberküloz basili ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün küresel verem raporuna göre 2017 yılında dünyada yaklaşık 1,3 milyon kişinin tüberküloz nedeniyle hayatını kaybettiği ve 300.000'ninin insan immün yetmezlik virusu (HIV) pozitif hastalar olduğu bildirilmiştir. Ölümünün düşük ve orta gelirli gelişmekte olan ülkelerde daha çok görüldüğü ifade edilmiştir. Hastalık insidansının en yüksek olduğu bölgeler Güneydoğu Asya, Afrika'da Sahra Çölü'nün güneyi ve Doğu Avrupa'dır (WHO/CDS/TB/2018.20).

Eski çağlardan beri halk sağlığını tehdit eden tüberküloz, batı ülkelerinde 18. ve 19. yüzyıllarda ciddi salgınlara ve ölümlere yol açmıştır. 20. yüzyılın başında kemoterapiden bağımsız olarak azalmaya başlamıştır. Gelişmekte olan ülkelerde ise hastalık 20.yüzyılda başlamış ve salgın en üst düzeyde seyretmiştir. Büyük bir salgınla karşılaşan bu ülkelerde, yoksulluk, tüberküloz kontrol programlarının etkili bir şekilde uygulanamaması ve özellikle Afrika'da Sahra Çölü'nün güneyi ve Güneydoğu Asya ülkelerindeki HIV/AIDS salgını hastalığın kontrol altına alınmasını güçleştirmiştir (Murray 2010).

Tüberküloz yakın temas ile kolay bir şekilde bulaşan ve potansiyel ölüm tehlikesi olarak kabul edilen bir hastalık olması nedeniyle hızlı tanı konulması ve etkili bir şekilde tedavi edilmesi gerekmektedir. Tüberkülozun yayılmasında HIV enfeksiyonları da etkili olmaktadır. Enfeksiyonun yayılımının önlenmesi ve spesifik tedaviye gecikmeksizin başlanabilmesi için *Mycobacterium tuberculosis* mümkün olan en kısa sürede laboratuvar koşullarında tanımlanmalıdır.

Tüberküloz tanısında kullanılan konvansiyonel yöntem, örneklerin Ehrlich Ziehl – Neelsen (EZN) yöntemi ile boyanarak mikroskopta incelenmesi ve etkenin kültüre edilerek tanımlanmasıdır (Özkara 2007).

Kültür, mikobakteri klinik örneklerinde yüksek duyarlılığı ve spesifitesi nedeniyle altın standart tanı yöntemidir. Ancak mikobakterilerin üretilebilmesi için en az 4-8 haftalık bir süreye ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle tüberküloz tanısında konvansiyonel yöntemlere alternatif olarak hızlı, ucuz ve pratik tanı yöntemleri geliştirilmiştir.

Konvansiyonel bir yöntem olan EZN boyamaya alternatif olarak geliştirilen floresan mikroskopi duyarlılığı daha yüksek bir yöntemdir. Daha küçük bir büyütme ile daha fazla alan taranabildiği için birim zamanda daha hızlı sonuç vermektedir. Bu nedenle özellikle günlük çok sayıda hasta örneğinin işlendiği laboratuvarlarda hem tanı amacıyla, hem de tedavi alan hastaların izleminde floresan mikroskop yöntemi önerilmektedir (Upadhyaya 2016).

Bu çalışmada, tüberküloz şüphesi olan hastalarda kültür altın standart kabul edilerek, konvansiyonel rutin tanı yöntemi olan EZN boyama ve gelecekte rutin tanıda daha aktif kullanılacağı düşünülen daha hızlı sonuç veren fluorokom boyama yöntemi olan auramine O-rhodamine B/KMNO₄ (AR) ile floresan mikroskop kullanılarak aside dirençli basil tanısında sonuçların karşılaştırmalı değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Tarihçe

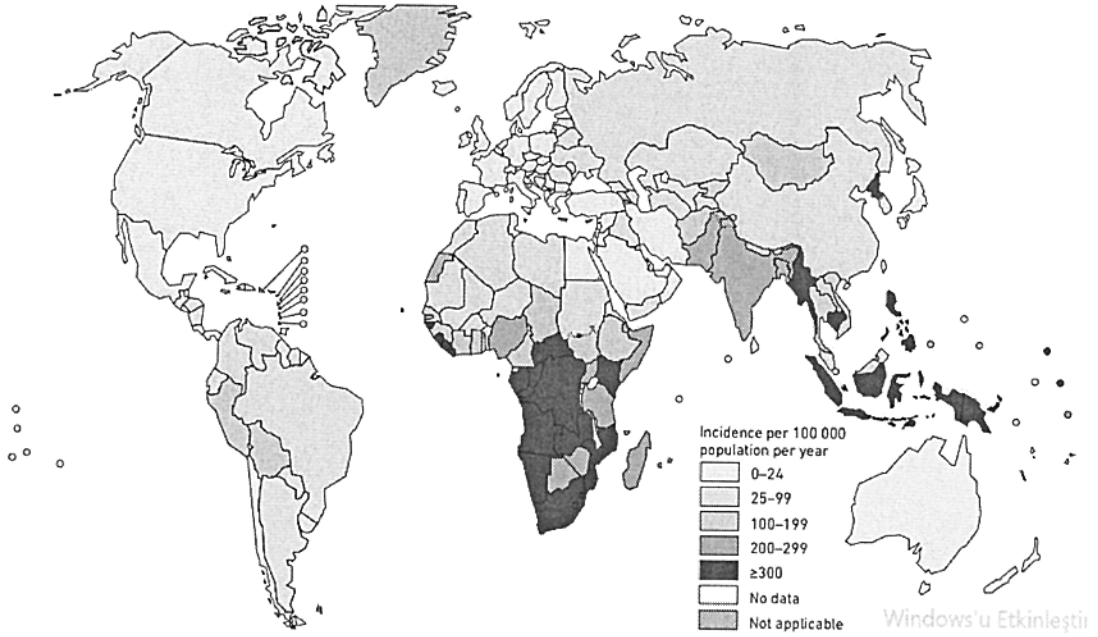
Tüberküloz bilinen insanlık tarihi boyunca bir çok ölüme neden olmuştur. 18. ve 19. yüzyıllarda Avrupa ve Kuzey Amerika'da salgın boyutlarına ulaşmıştır. Tüberküloz patogenezinin anlaşılması, 19. yüzyılın başlarında The'oise Laennec'in

çalışmasıyla başlamıştır. Tüberkülozun bulaşıcı bir hastalık olduğunu Fransız doktor Jean-Antoine Villemin kanıtlayarak insanlardan hayvanlara veya bir hayvandan diğerine temas yoluyla bulaştığını ifade etmiştir. 1882 yılında ise Robert Koch tüberküloz basillerini etyolojik ajan olarak tanımlamıştır. Clemens von Pirquet 1907'de tüberkülin deri testini geliştirerek 3 yıl sonra çocuklarda asemptomatik seyreden gizli tüberküloz enfeksiyonunu göstermek için kullanmıştır. 19. yüzyılın sonları ve 20. yüzyılın başlarında ise sanatoryum, tüberküloz hastalarının tedavisi için geliştirilmiştir. Ancak sanatoryumların tüberkülozun tedavisinde ve kontrolünde bir etkisi olmamıştır. Halk Sağlığı önlemleri ise tüberkülozun yayılması ile mücadelede, bakteriyel nedeninin keşfedilmesinden sonra ortaya çıkmıştır. BCG aşısı I. Dünya Savaşı'ndan sonra yaygın olarak uygulanmıştır. Modern tüberküloz tedavisi ve kontrolü dönemi 1944'te streptomisin ve 1952'de isoniazid keşfi ile başlamıştır (Daniel 2006).

2.2. Epidemiyoloji

2.2.1. Dünyada Tüberküloz

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tüberküloz için gerekli önlemlerin alınmasını sağlamak amacıyla 1993 yılında TB için acil durum ilan etmiştir. 1994 yılında ise tüberküloz ile daha etkin mücadele etmek için "Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi (DGTS)" adını verdiği yeni programını açıklamıştır. DSÖ, 1997 yılından beri her yıl küresel TB kontrol raporu yayımlanmaktadır. 2018 yılı küresel tüberküloz raporuna göre 2017 yılında 10 milyon vakanın tespit edildiği ve bunların 3.2 milyonu kadın, 1 milyonunun ise çocuk olduğu ifade edilmiştir. Hastalığın yaygın olarak Asya ve Afrika kıtalarında daha çok görüldüğü belirtilmiştir. DSÖ'nün 2017 tahimin insidans oranları Şekil 1.'de verilmiştir. Tüberkülozun tedavisinde kullanılan etken madde rifampisine direnç gösterenlerin sayısı 558 bin olarak açıklanmıştır. Dünya nüfusunün %23'üne eşit olan 1.7 milyar kişinin tüberküloz basilini taşıdığı belirtilmiştir. Raporda dünya genelinde tüberküloz vakalarının azaldığı görülse de DSÖ'nün belirlediği hedef olan 2020 yılında tüberkülozu yok edebilmenin zor olduğunu ifade etmişlerdir (WHO/CDS/TB/2018.20).

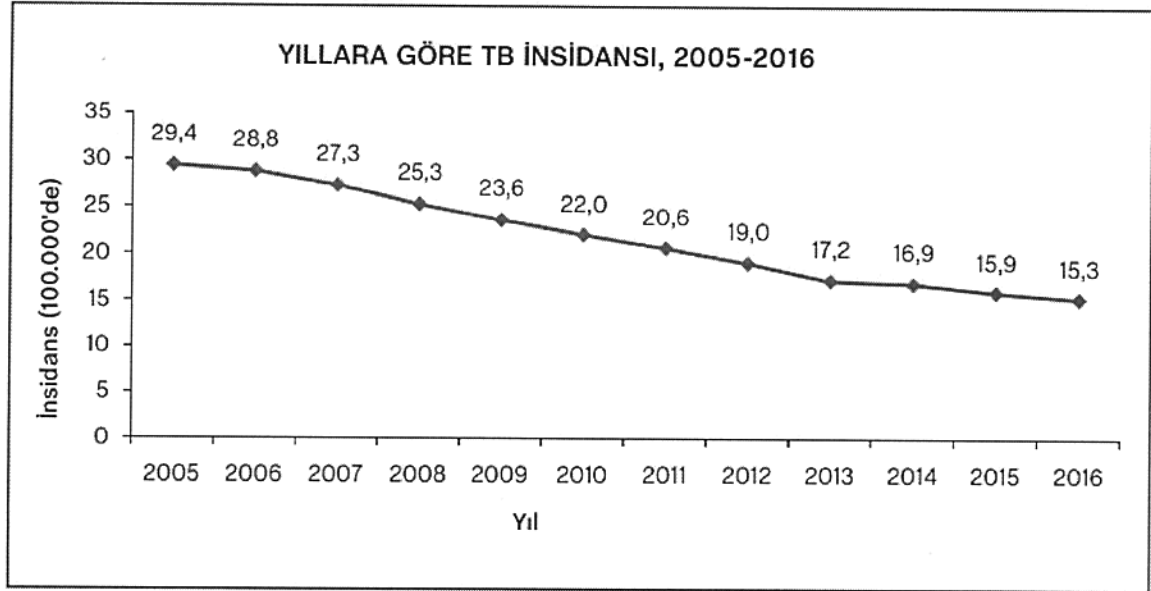


Şekil 2.2.1. DSÖ'nün 2017 tahmini insidans oranları

2.2.2. Türkiyede Tüberküloz

Türkiye Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü'nün Türkiye'de Verem Savaşı 2018 raporuna göre 2016 yılında 12.417 TB hastası verem savaşı dispanserlerinde kayıt altına alınmıştır. Toplam olgu hızının 100.000'de 16,2'den 100.000'de 15,6'ya (-%4,1) düşüş gösterdiği tespit edilmiştir. Hastaların 5.285'i (%42,6) kadın 7.132'si (%57,4) erkektir. Erkek/Kadın oranı 1,3 olarak hesaplanmıştır. Olgu hızı kadınlarda 100.000'de 13,3 erkeklerde 100.000'de 17,8'dir. Olgu hızının yaş gruplarına göre dağılımı değerlendirildiğinde, 15-24 yaş grubundan başlayarak yükseldiği, 65 ve üzeri yaşlarda en yüksek düzeye (100.000'de 33,3) ulaştığı görülmüştür. Verem Savaş Dispanserlerine kayıtlı vakaların yıllara göre TB insidansı gösterilmiştir (Şekil 2). İlaç duyarlılık testi yapılan toplam 6.037 hastanın (5.620 AC+417 AC dışı) sonuçları incelendiğinde; %19,2'sinde (1.161/6.037) en az bir ilaca direnç saptanmıştır. En yüksek oranda direncin %11,9 ile (720/6.037) izoniyazide karşı geliştiği görülmüştür. 12.417 TB vakada 60'ının HIV (+) olduğu saptanmıştır. 2016 yılında verem savaşı dispanserlerinde kayıt altına alınan yabancı ülke doğumlu

hastaların sayısı 904 olup bunların %56,2'si (508) Suriye doğumludur. Yabancı ülke doğumlu hastaların %86,1'i (778) Asya, %8,1'i (73) Avrupa, %5,7'si (52) Afrika ve %0,1'i (1) Amerika kıtası ülkelerindedir (Kara 2018).



Şekil 2.2.2 Türkiye'de 2017 yılında tahmini TB insidans oranları

2.3. Mikobakterilerin Genel Özellikleri

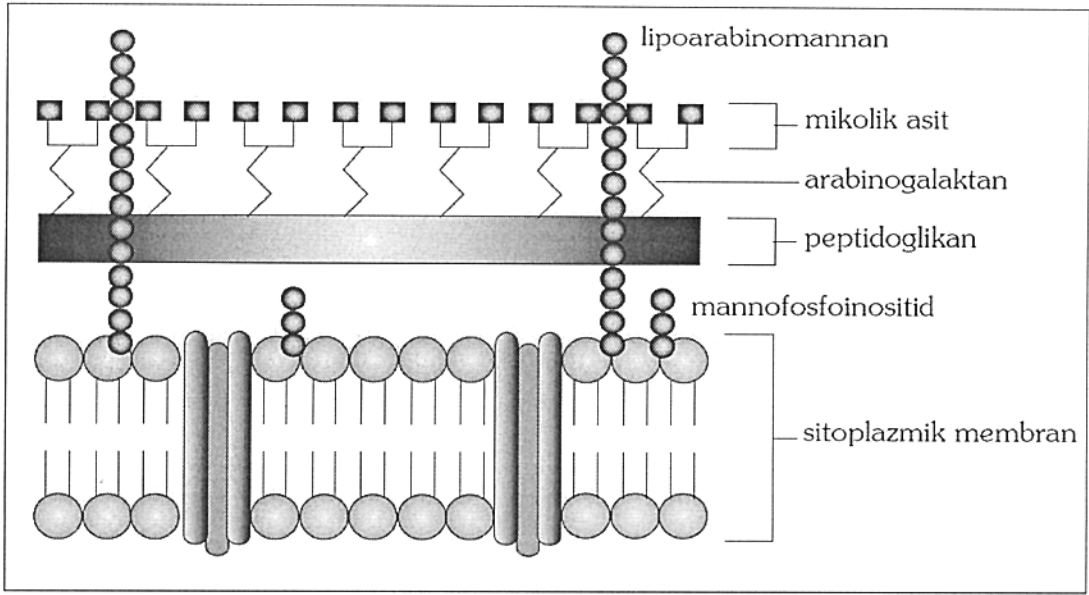
Mycobacterium cinsi, Prokaryot aleminin, Firmicutes bölümünün, Actinobacteria sınıfının, Actinomycetales takımının, Mycobacteriaceae ailesine dahil olup bu ailedeki tek cinstir. Actinomycetales takımının diğer üyeleri *Rhodococcus*, *Corynebacteria* ve *Nocardia*'dır (Murray 2010).

Mikobakteri cinsi içinde bulunan bakteriler aside dirençlilik, 70-90 karbon içeren mikolik asitlerin varlığı ve deoksiribonükleik asitlerindeki yüksek (%61-71 mol) guanin + sitozin (G+C) içeriği esasına göre sınıflandırılmaktadır. Bazı bakteri türlerinin aside direçli olabilmelerine karşın (*Nocardia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella*, *Gordonia*) daha az yoğunlukta boyanırlar ve mikolik asit zincirleri daha kısadır.

Günümüzde tüberküloz dışı mikobakteriler (nontuberculosis mycobacteria veya NTM) olarak tanımlanan diğer mikobakteriler Ernest Runyon tarafından üreme hızlarına, ve pigment oluşumlarına göre sınıflandırılmıştır.

Mikobakteri cinsi hareketsiz, spor oluşturmeyen, kapsülsüz, $0,2 - 0,6 \times 1 - 10$ μm boyutlarında aerob basillerdir (Pedro 2007). Görünüm olarak hafif kıvrık veya düzgün çomak şekilli bakteriler olup dallanmış, filamentöz veya kokoidal formda görülebilirler ve mikobakteri türleri arasında sıklıkla pleomorfik morfolojiye rastlanmaktadır.

Mikobakteriler lipidden zengin kompleks bir hücre duvarına sahiptir (Şekil 2.3). Bu hücre duvarı aside dirençlilik, yavaş üreme, dezenfektanlara karşı dirençli olma, yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere direnç geliştirme, antijenisite ve kümeleşme gibi mikobakterilerin karakteristik özelliklerinden sorumludur. Mikobakterilerde bulunan kompleks hücre duvarı dıştan içe doğru mikolik asit, arabinogalaktan ve peptidoglikandan oluşmuştur. Mikolik asitler 70 – 90 karbonlu olup uzun ve dallanmış yağ asitleri içermektedir. En içte bulunan peptidoglikan tabakasına, D-arabinoz ve D-galaktoz içeren dallanmış bir polisakkarit olan arabinogalaktanlar bağlanır ve tüberküloz basiline şekil vererek yapısal bütünlüğün korunmasını sağlamaktadır. Arabinogalaktan tabakası, mikolik asitlerle peptidoglikan tabaka arasında köprü görevi gören dallanmış bir polisakkarittir. Mikobakterilerin kompleks hücre duvarının sağlamlığı serbest lipid, polipeptid, mannosfosfoinositid ve lipoarabinomannan bağlanmasıyla daha da artmaktadır (Murray 2010) (Jarlier 1994) (Van 2008) (Ryll 2001).



Şekil 2.3. Mikobakteri hücre duvarı

M. tuberculosis lipidden zengin kompleks hücre duvarı nedeniyle ilaç moleküllerinin hücre içine girişini engelleyecek doğal direnç mekanizmasına sahiptir. Diğer bakterilerin hücre duvarından belirgin şekilde kalın olan bu kompleks hücre duvarı mikroskopik inceleme amacıyla uygulanan boyların da hücre içine girişine engel olmaktadır (Van 2008) (Somoskovi 2001).

2.3.1. Üreme Özellikleri

Mikobakterilerin üremeleri için optimum sıcaklık, türler arasında farklılık göstermektedir. Mikobakteri türleri için 30° C veya daha az ya da maksimum 45 ° C sıcaklık üreme koşulları için uygundur. Buldukları ortamda pH aralığının 6.4-7 arasında olması gerekmektedir. Üremek için ise %5-10 CO₂'e ve %0.5 C₃H₈O₃ ihtiyaç duymaktadır.

Optimum koşullar sağlandıktan sonra mikobakterileri kolonilerinin görülmeye başlama süresi 3 – 60 gün arasında değişiklik göstermektedir. *M. tuberculosis*' in replikasyon süresi yaklaşık 18 – 20 saat arasındadır.

1959 yılında ilk kez Ernest Runyon *M. tuberculosis* ve *M. bovis* dışında kalan mikobakterilerin koloni morfolojilerini, üreme hızlarını ve pigmentasyonunu temel olarak sınıflandırma yapmıştır (Tablo 2.3.1) (Jarzembowski 2008).

Tablo 2.3.1. Runyon sınıflaması

Grup	Üreme hızı	Işıқта	Karanlıkta	Örnek Türler
Fotokromojenler	Yavaş	+	-	<i>Mycobacterium kansasii</i> <i>Mycobacterium marinum</i> <i>Mycobacterium simiae</i>
Skotokromojenler	Yavaş	+	+	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i> <i>Mycobacterium szulgai</i> <i>Mycobacterium goodii</i>
Fotokromojen olmayanlar	Yavaş	-	-	<i>Mycobacterium mageritense</i> <i>Mycobacterium xenopi</i> <i>Mycobacterium avium comp.</i> <i>Mycobacterium ulcerans</i> <i>Mycobacterium haemophilum</i>
Hızlı üreyenler	Hızlı	-	-	<i>Mycobacterium fortuitum</i> <i>Mycobacterium chelonae</i> <i>Mycobacterium abscessus</i>

2.4. Tüberküloz Patogenezi

İnsanlık tarihinin bilinen en eski hastalıklarından biri olan tüberküloz, basilin genellikle inhalasyon ile alınmasıyla ortaya çıkan kronik granülatöz bir enfeksiyondur (Yaman 1999).

Tüberküloz basilinin hastalık mekanizmasının doğal gelişimini aydınlatmak amacıyla bir çok çalışma yapılmış ve çeşitli teorilerin ileri sürülmesi yaklaşık 80 yıllık bir süreci kapsamıştır. İlk araştırmalar basilin uzun süre inaktif ve canlı kalması nedeniyle çocukluk döneminde basil ile infekte olan bireylerin erişkin dönemde tüberküloz hastalığı geçirebileceği düşünülmüştür. Ancak takip eden çalışmalar primer lezyonların zaman içerisinde steril hale geldiği bildirilmiştir. Diğer bir başka hipotez ise erişkin dönemde gelişen tüberkülozun reenfeksiyon sonucunda gerçekleşebileceği bildirilen çalışmalarda gösterilmiştir. Gelişen primer

enfeksiyonun immün cevabı başlatarak tüberküloz basili ile yeniden karşılaşma durumunda daha spesifik bir hipersensitivite reaksiyon ile cevap verildiği Koch tarafından gösterilmiştir (Rieder 2008). Tüberküloz basiline bağlı enfeksiyonun gelişiminde basilin virülansından çok konağın tüberküloza karşı verdiği yanıtta hem doğal hem de edinsel immünite yeteneği rol oynamaktadır.

Tüberküloz immünopatogenezi primer enfeksiyondan kavite oluşumuna kadar evrelendirilmektedir (Dannenber 1989).

Evre I – Bulaşma, Başlangıç Evresi (1. Hafta): Tüberküloz bulaşı, akciğer tüberkülozlu olan bireyin öksürük, hapşırma gibi solunum reaksiyonlarının sağlıklı bireyler tarafından inhalasyon ile alınması sonucu başlamaktadır. Tüberkülozlu bireye ait havada asılı kalan sekresyonların sıvı kaybetmesiyle damlacık çekirdekleri oluşmaktadır. 1- 5 µ çapındaki damlacık çekirdekleri akciğer alveollerine ulaşırken daha büyük çaptaki partiküller ise hava yollarına yerleşmektedir. Alveoler makrofajlarla ilk karşılaşma da basilin virulansı, basilin dayanıklılığı ve alveoler makrofajların bakterisidal aktivitesi önemli değişkenler olup hastalığın seyrini belirlemektedir. Akciğer alveollerine ulaşabilen basiller, makrofajlar tarafından fagosit edilmektedir. Ancak makrofajların gösterdiği antimikrobiyal yanıt ve proinflamatuvar direnç bu dönemde güçlü olmadığı için basillerin bir kısmı yapısal bütünlüğü bozulmadan canlı kalırken bir diğer kısmı da makrofajlar içerisinde antijenik yapılara ayrılmaktadır. Konağın doğal immunitesinde üst solunum yollarının fiziksel engeli, fagositoz yeteneği, fagositik hücrelerin salgıladığı reaktif nitrojen ve oksijen ürünleri, inflamatuvar hücreler ve sitokin sekresyonları, alveoler makrofajların kimyasal yapısını değiştirmesi, apoptoz ve genetik faktörlerin rol oynadığı bilinmektedir. (Özbal 2006)

Evre II – Enfeksiyon, Çoğalma ve Yayılma (2 – 3 hafta): Makrofajlar içerisinde yapısal bütünlüğü bozulmadan kalan basiller, makrofajların içinde çoğalmaya başlamaktadır. Hızla çoğalan basiller makrofajların yapısını dejenere ederek serbestleşmektedir. Makrofajların yıkımıyla açığa çıkan kemokinler farklı inflamatuvar hücrelerin olay yerine göçüne neden olmaktadır. Monositler, T

lenfositler ve NK hücreleri de bu dönemde lezyon bölgesine gelmektedir. Yeni alveol makrofajları ve monositleri, basilleri yutar ancak basiller çoğalmayı sürdürür ve konakçı hücrelerini öldürerek yerel yayılma göstermektedirler. 15 – 18 saat replikasyon süresi olan bir tüberküloz basili kontrolsüz çoğalma evresinde 20 günde 54×10^7 kadar basil sayısına ulaşmaktadır. Monosit ve lenfositler lezyon bölgesine gelerek granülom oluşumunu başlatmaktadır. Bu nedenle makrofaj içerisindeki yapısal bütünlüğü bozulmayan ve antijenik yapılara ayrılan basiller dendritik hücreler tarafından alınarak lenf bezlerine taşınmaktadır. Tüm vücuda lenfohematojen yol ile yayılarak yeni yerleştikleri odaklarda granülom oluşturmaktadırlar. Lenfohematojen yayılım ile en çok akciğerler, böbrekler, uzun kemikler ve vertabralara yerleşmektedir. Sağlıklı bireylerde lenfohematojen yol ile vücuda yayılım gösteren basillerin oluşturduğu kazeöz odaklar makrofajlar tarafından temizlenmektedir. Büyük kazeöz odaklar ise fibröz bir kapsul ile çevrilerek izole edilmektedir.

Evre III – Konakçıda İmmun Yanıtın Gelişimi: Bu evrede tumor necrosis factor α (TNF α), IL-6, IL-8, IL-12 sekresyonları ile granülom ve tüberkül denen spesifik bir lezyon gelişmektedir. Tüberkülün ortasında gelişen kazeifikasyon oluşumu basilin tanındığını ve yapılan immünolojik mücadelenin başarılı olduğunu göstermektedir.

Tüberküloz antijenleri T-lenfositlere sunulurken antijenik uyarım sonrası aktive olan T-lenfositlerden salınan sitokinler, makrofajların sayıca artmasına neden olur ve makrofaj fonksiyonlarını güçlendirmektedir. Basilin inhalasyonundan 2 – 3 hafta sonra hücrel immünite gelişmektedir. Bu süreçte gelişen sekonder immünolojik yanıt gecikmiş tip aşırı duyarlılık olup aktive makrofajlar tarafından salınan IL-12 ile Tc1 hücreleri stimüle edilmesiyle gerçekleşmektedir. Tc1 hücreleri içinde tüberküloz basili bulunan makrofajları yok ederek basillerin çoğalmasını baskılar, açığa çıkan basiller solid kazeöz dokuya geçerek burada nekroz oluşturmaktadır. Solid kazeöz dokuda tüberküloz basili yaşayabilir ancak anoksik ortam, düşük pH, inhibitör yağ asitleri nedeniyle çoğalamazlar. Solid kazeöz dokuda basiller uzun yıllar dormant olarak kalmaktadır. Dormant basillerin metabolik

aktivite düzeylerinin çok düşük olması nedeniyle ilaçlardan etkilenmemektedirler. 6 – 8 haftada gelişen bu süreçte bireyin PPD deri testi pozitifleşmektedir. Kazeöz nekroz alanlarında artış ve erime enfekte kişilerin %5 'inde enfeksiyondan hemen sonra meydana gelmekte ve bu tablo primer tüberküloz enfeksiyon evresi olarak tanımlanmaktadır. Enfeksiyon bu dönem ile sınırlı kalırsa primer enfeksiyon evresi tamamlanmıştır (Kauffman 2005) (WHO/HTM/TB/2008.393).

Kazeöz lezyon, hücre aracılı immunité tarafından kontrol edilmektedir. Zayıf hücreli immunité varlığında basiller kazeöz nekrozun merkezinden kaçarak aktive olmamış çevre alveoler makrofajlar içerisinde hızla çoğalabilmektedir. Bu enfekte makrofajların sitotoksik gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu sonucu öldürülmesiyle kazeöz nekroz giderek genişlemektedir.

Evre IV – Likefaksiyon ve Hızlı Basil Çoğalması, Yeniden Bulaşma: Primer enfeksiyon döneminde lenfohematojen yolla akciğerin apikal veya subapikal bölgelerine yerleşen düşük metabolik aktiviteye sahip dormant basillerin yıllar sonra reaktifte olmasıyla ortaya çıkan tüberküloz formu postprimer tüberküloz olarak tanımlanmaktadır. Akciğer tüberkülozunda en sık rastlanan tablo endojen basillerin reaktivasyonudur. Ancak diyabet, malignite, renal yetmezlik, kortikosteroid ve immunsupressif tedaviler, silikozis ya da HIV gibi immunsuprese bireylerde endojen reaktivasyon gibi eksojen reaktivasyonun da geliştiği bilinmektedir.

Endojen ve eksojen reaktivasyon ayrımı gözetmeksizin postprimer tüberkülozun patognomonik özelliği likefaksiyon ve kavite oluşumudur. Basiller kavite içerisinde çoğalarak bronş yolu ile diğer akciğer bölümlerine yayılmaktadır. Genellikle lenfohematojen yayılım görülmemektedir. İmmunitenin bu dönemde genel tavrı likefaksiyon ve kavite formu olarak izlenmektedir.

İmmun yanıt ile primer enfeksiyonun kontrol edilebildiği bireylerde reaktivasyon riski devam etmektedir. Akciğer odağının reaktivasyonu sonucu likefaksiyon ve kavite oluşmaktadır. Hızlı basil çoğalma evresinde hücre dışı basiller logoritmik olarak çoğalmaktadır. T helper 2 (Th2) hücre yanıtının yoğun olması

makrofajların bakterisidal etkinliğini artırırken yıkım sonucu granülom dokusunda kazeifikasyon nekrozu daha yoğun gelişmektedir. Makrofajlardan salınan nükleaz, lipaz gibi hidrolitik enzimler, tüberkülin benzeri basil ürünleri kazeöz odağın erimesine neden olmaktadır. Erime alanı basiller için uygun bir besiyeri ortamı oluşturmaktadır. Basilin hücre içi ortamda çoğalması hücrel immunité ile kontrol edilirken, likefiye hücre dışı ortamda kontrol edilemez ve basil sınırsız olarak çoğalmaktadır. Hücrel immün yanıtı yeterli olan bireylerde kazeöz odakta bulunan aktif makrofajlardan salınan hidrolitik enzimler ile granülom baskılanarak yerini fibroz dokuya bırakmaktadır. Bu fibrotik odakta tüberküloz basili dormant olarak ömür boyu canlı kalabilmekte ve konağın immün sisteminin baskılandığı durumlarda aktif hale geçebilmektedir. Hücrel immunité yetersizliğinde basiller ya da konakçı hücrelerden açığa çıkan toksik yağ asitleri alveoler makrofajların ölümüne neden olarak likefaksiyon ve nekrozu arttırmaktadır. İlerleyen nekrotik doku bronş çevresinde nekroz ve rüptür oluşturarak kavite geliştirmektedir. Basil içeren likefiye materyal bronkojenik yolla akciğerin diğer bölümlerine yayılmaktadır. Likefiye materyalin ekspektorasyonu ile dış ortama sekre edilen damlacık çekirdeklerinin sağlıklı bireyler tarafından inhalasyon ile alınması sonucu enfekte olurlar (Kauffman 2001).

2.5. Tüberküloz İmmünolojisi

Üst solunum yolunun fiziksel bariyerini aşarak alveollere ulaşan basiller, fagositoz yeteneğine sahip alveoler makrofajlar ile karşılaşmaktadır. Fagosité edilen çoğu bakterinin tersine *M.tuberculosis*, fagozomun lizozomlar ile birleşmesini önlemektedir. Ancak fagozom, besinlerin geçmesini kolaylaştıran ve vakuol içi replikasyonu sağlayan diğer hücre içi veziküller ile birleşmektedir. Fagosité edilmiş bakteriler, oluşan oksidanları inaktive etmek amacıyla, nitrik oksit ve süperoksit anyonları arasında oluşan nitrojen aran ürünlerinin aracılık ettiği makrofajların bakterisidal etkisinden kaçabilmektedir.

M.tuberculosis' in neden olduğu enfeksiyona karşı yanıt olarak makrofajlar IL-12 ve TNF α sekresyonu yapmaktadır. Salınan bu sitokinler enfekte makrofajların bulunduğu bölge içinde, T hücrelerinin ve doğal öldürücü (NK) hücrelerinin bir araya gelmesiyle bölgesel enflamasyonu arttırmaktadır. T hücrelerinin T helper 1 (Th1) hücrelere dönüşmesini ve interferon gama (IFN - γ) salınımını indüklemektedir. IFN - γ varlığında, enfekte makrofajların aktivasyonu ile birlikte fagozom-lizozom birleşmesi ve hücre içi öldürme işlemi artarak uyarılmaktadır. TNF α sekresyonu ise artmış hücre içi öldürme işlemine neden olan nitrik oksit ve nitrojen ara ürünlerinin yapımını stimüle etmektedir. IFN - γ ve TNF α sekresyonu az olan ya da bu sitokinlerin reseptörlerinde bozukluk bulunan hasta bireyler ciddi mikobakteriyel enfeksiyonların gelişimine karşı yüksek risk taşımaktadır.

Makrofajlar uyarıldığında antijenik yük küçük ise bakteriler en az doku hasarı ile yok edilmektedir. Ancak bakteri yükü fazla ise hücrenel bağışık yanıt doku nekrozu ile sonuçlanmaktadır. Doku harabiyeti ile ilgili bilinen hidrolitik enzimleri ve toksinleri yoktur.

Konakta enfeksiyonun başladıktan 2 ile 6 hafta içerisinde hücrenel immun yanıt ve lezyon bölgesinde aktif alveoler makrofajlar ve CD4 ve CD8 T hücreleri bir araya gelerek granülom oluşturmaktadır. Granülom oluşumunu, *M.tuberculosis* lipidlerinin indüklemesiyle enfekte makrofajların kemokin (IL - 8) sekresyonu etkilemektedir. Granülom oluşumu ile alveoler makrofajlar tarafından fagosite edilen ve elimine edilemeyen mikobakterilerin çoğalması ve enfeksiyonun gelişimi engellenmektedir. TB enfeksiyonuna karşı gelişen bu yanıt, basilin başlangıçta çoğalarak yayılmasını sınırlamaktadır. Gelişen yanıtın başarısı virulans faktörlerine ve sayısına göre değişiklik göstermektedir. Granülom içerisinde uzun süre dormant kalan basillerin immunsupresif hastalıkların varlığında aktive olduğu bilinmektedir. Granülom, kazeöz nekroz ile sonuçlanmaktadır (Özbal 2006) (Janeway 1994) (Stenger 1999). (Özbal, 2006)

2.6. Virulans Faktörleri

M.tuberculosis virulansında rol oynayan kesin bir faktör şimdiye kadar gösterilememiş olmasına rağmen kord faktör ve sülfatidler gibi bazı immünoreaktif komponentlerin virulanstan sorumlu olabileceği ortaya konmuştur. Bakteri duvarının yapısında toksik etkiye sahip bazı komponentler olsa da bilinen toksinleri ve histolitik enzimleri yoktur. Ancak hücre duvarında bulunan bazı yapıların toksik olduğu geçmişte yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Kıyan 1999).

Polisakkaritler (arabinogalaktan ve arabinomannan); duyarlı deney hayvanlarında anaflaktik tipte aşırı duyarlılık reaksiyonlarına neden olmaktadır. Gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonlarında rolleri yoktur. Konak hücre makrofajından TNF- α salınımını arttırmaktadır. Nötrofillerin damardan dokuya geçmesini ve yangısal tepkimenin oluşmasını sağlamaktadır (Kıyan 1999).

Fosfatidil inositol mannosid (PIM); Lipid yapısında olup, esas itibariyle haptentiktir. Çapraz koruyucu immunitede rolünün olabileceği düşünülmektedir (Kıyan 1999).

Muramil dipeptid(MDP); tek başına etkisi olmadığı halde trehaloz dimikolatla birleşince immün sistemi stimule eder ve antitümör aktiviteyi ortaya çıkarmaktadır(Kıyan 1999).

Wax D; peptidoglikolipid yapıda olup Freund's adjuvanının etkisini artırıcı özelliğe sahiptir. BCG aşısının, belli tümörlerde gerileme gösteren immunoterapik etkisinde rolü vardır (Kıyan 1999).

Kord faktör (trehaloz 6'-6'-dimikolat); tüberküloz basillerine küme oluşturma kabiliyeti kazandırdığı gibi adjuvan etkiyi de içeren çok sayıda özelliğe sahiptir. Alternatif kompleman yolunu aktif etmektedir. Polimorfonükleer (PNL) lökosit göçünü önlemektedir. Granülom oluşumunda rol oynamaktadır. Anti tümör özelliği de vardır. Konak hücre membranına tutunarak solunum ve oksidatif

fosforilasyonda hasara yol açmaktadır. Farelerde karakteristik bir toksisiteye sahiptir (Kıyan 1999).

Sülfatidler (sülfolipidler); sülfür içeren glikolipidler. Makrofajlarda, fagozom-lizozom füzyonunu engellemekte ve bakteriyi lizozomal enzimlerin etkisinden korumaktadır. Tek başına etkili olmadığı halde, kord faktörlerle birlikte verildiğinde kord faktörün toksik etkisini arttırmaktadır (Kıyan 1999).

Fosfatidler; epitelyum hücrelerinin dev hücrelere dönüşmesine neden olmaktadır (Kıyan 1999).

2.7. Tüberkülozun Mikrobiyolojik Tanısı

2.7.1. Örnek alma

Tüberküloz değişik organ ve sistemleri etkileyebilen sistemik bir enfeksiyon hastalığıdır. Tanı amaçlı mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilecek örnek tipi, hastalığın tuttuğu organ göz önüne alınarak seçilmelidir. Tüberküloz hastalığının tanısında farklı tipte örneklerden yararlanılmaktadır. Pulmoner veya ekstrapulmoner olmak üzere ve floralı veya steril alanlardan örnek alınarak tanı konmaktadır.

Örneklerin alındığı kaplar steril ve tek kullanımlık olmalıdır. Örnek alınan kapların içerisine mikobakteriler için zararlı kimyasal madde, dezenfektan, alkol veya koruyucu fiksatif konmamalıdır.

Klinik örneklerden direkt mikroskopi ile birlikte çoğu zaman teksif kültür de yapıldığı için tüm işlemlerin aynı kap içerisinde yapılması önemli avantajlar sağlamaktadır. Bu nedenle toplama kapları 50 ml'lik burgu kapaklı, konik tabanlı, yaklaşık 12cm boyunda ve 3 cm genişliğinde tercihen polipropilen (ticari falcon, grainer veya muadili) olmalıdır. Örneğin kalitesi hakkında yorum yapma imkanı olduğu için dışının şeffaf olması avantajlıdır. Hastanın adı, protokol numarası ve tarih örnek kaplarının üzerine yazılmalıdır.

TB şüpheli bir hastadan alınan örnek tipinin seçimi ve alınması, laboratuvara gönderilmesi veya gerektiğinde uygun koşullar altında saklanması için genel kurallara uyulması önemlidir. Uyulması gereken genel kurallar;

TB şüpheli bireyden örnek, tercihen antitüberküloz tedavisine başlanmadan önce alınmalıdır.

Aseptik şartlarda örnek alarak flora ve çevresel kontaminasyon en aza indirgenmelidir.

Yeterli miktarda ve sayıda örnek alınarak izolasyon şansı artırılmalıdır.

Örnek uygun zamanda alınmalı ve uygun taşıma koşullarında laboratuvara ulaştırılmalıdır.

2.7.1.2. Akciğer tüberkülozu tanısında alınan örnek tipleri

Balgam: Bronş ve trakeanın ürünüdür. Hücre atıkları, organik partiküller ve boğaz mikrobiyotasındaki nonspesifik bakterileri içerdiğinden kontamine bir materyaldir. Basil saptama olasılığı en yüksek olan balgam örneği sabah aç karnına alınır. Basil görme şansını arttırmak için üç ayrı günde ve sabah yataktan kalkarken balgam örneği alınması en uygun yöntemdir. Yeterli balgam örneği miktarı 3 – 5 ml' dir. TB basili balgamın irinli kısmında bulunmaktadır. Balgamdan yayma işlemi yapılacağı zaman özellikle sarı-gri veya yeşil renkli koyu kısımları kullanılmalıdır. Balgam örneğinin yeterli miktarda ve kalitede olduğu düşünülüyorsa örnek işleme alınmalı ancak negatif sonuç raporlanırken yetersiz balgam/ uygun olmayan örnek şeklinde bildirilmelidir.

İndüklenmiş balgam: Nebülizatör yardımı ile aerosol haldeki 10 ml %3 -10 luk hipertonic tuzlu suyun 10 – 30 dk boyunca inhale edilmesi akciğerleri hem öksürme hem de sulu veya incelmış salgı üretmeye teşvik edecek kadar irrite

etmektedir. Materyalin yapısal özelliğinin tükürüğe benzemesi nedeniyle yanılmaya sebep olmamak için raporda indüklenmiş balgam örneği olduğu bildirilmelidir.

Açlık mide suyu: Genellikle nörolojik hastalık, koma hali vb. nedenlerle uyum gösteremeyen hastalardan, 10 yaşından küçük çocuklardan ve indüklenmiş balgam veremeyen hastalardan alınmaktadır. Üç ardışık günde 8-10 saatlik açlığı takiben, hasta yatağından kalkmadan, gastrik tüp ile 25-50 ml steril su veya serum fizyolojik verilip aspire edildikten sonra en az 5ml örnek alınmaktadır. Örnek tercihen hemen işleme alınmalıdır. Hemen işleme alınamayacak örneklerin mide asidini nötralize etmek amacıyla 100 mg sodyum karbonat ilave edilmektedir.

Bronkoalveoler Lavaj: Hiçbir şekilde balgam veya indüklenmiş balgam örneği veremeyen tanı konulamamış olgularda alınmaktadır. 5-10 ml bronş lavaj örneği alınmaktadır.

Bronşiyal fırçalama örneği: 5 ml serum fizyolojik içerisine alınan örnektir.

Trakeal aspirat: En az 3ml trakeal aspirat örneği alınmaktadır.

Endotrakel aspirat: Başka bir şekilde örnek veremeyen yoğun bakım hastalarında tercih edilmektedir. En az 3 ml endotrakeal aspirat örneği alınmaktadır.

Akciğer doku örneği: İnvaziv olmayan teknikler ile tanı konulamayan akciğer tüberkülozu olan hastalarda tercih edilmektedir. Aseptik koşullarda kazeöz lezyondan alınan en az 1 gr doku biyopsisi veya ince iğne aspirasyonu ile alınmaktadır. Açık akciğer biyopsi doku örneği 2-3 ml'lik serum fizyolojik içine alınmaktadır.

Larinks sürüntüsü: Çocuklarda ve diğer akciğer örneklerinin hiçbirisinin elde edilemediği hastalarda alınmaktadır. Larinks sürüntü örneği silgiç ile alınarak 2-3 ml'lik steril serum fizyolojik içine alınmaktadır.

2.7.1.3. Akciğer dışı tüberküloz tanısında alınan örnek tipleri

İdrar: Materyalin içeriği mikobakterilerin canlılığını etkilerken miktarı ise saptanmalarını etkilemektedir. Bu nedenle 40 ml'den daha az örnekler ile bekletilen veya 24 saatlik biriktirilmiş idrar kabul edilmemektedir. Özellikle sabah idrarı tercih edilmekte ve genital bölge temizlenerek aşırı kontaminasyon engellenmelidir. İdrar 3000xg 'de 15 dakika süresince santrifüj edildikten sonra üst kısım atılarak bir iki damla çöktelden alınarak doğrudan mikroskopi için boyanabilir. Kültür yapılacak durumlarda çökelti önce dekontaminasyon işlemlerinden geçmelidir. Üriner sistem tüberkülozu şüphesi bulunan hastalardan alınmaktadır. Ardışık olarak en az üç gün üst üste alınan sabah idrarı duyarlılığı arttırmaktadır.

Beyin omurilik sıvısı (BOS): Santral sinir sistemi tüberkülozu şüphesi bulunan hastalardan alınmaktadır. Aseptik koşullarda en az 2ml (optimal 10 ml) örnek alınmalıdır.

Doku biyopsi örneği: İnvaziv olmayan teknikler ile tanı konulamayan akciğer dışı tüberküloz şüphesi olan hastalardan alınmaktadır. Aseptik koşullarda kazeöz kısımlardan en az 1 gr kadar doku biyopsi örneği alınmaktadır.

Steril vücut sıvıları (plevra,periton,perikard,eklem vb): Akciğer dışı TB şüphesi bulunan hastalardan alınmaktadır. Aseptik koşullarda en az 10 ml alınmalıdır.

Apse ve yara örneği: Akciğer dışı Tb şüphesi olan hastalardan alınmaktadır. Aseptik koşullarda yüzeysel eksuda uzaklaştırıldıktan sonra apse içeriği ve aspire edilen sıvı alınmalıdır.

Kemik iliği: Yaygın TB şüphesi ve nedeni bilinmeyen ateşte tercih edilmektedir. Aseptik koşullarda heparin, SPS içeren steril tüplere veya ticari mikobakteriyel kan kültür besiyerlerine önerilen miktarlarda alınmaktadır.

Kan: Aseptik koşullarda 5-10 ml kan SPS veya heparin içeren steril tüplere veya ticari mikobakteriyel kan kültür besiyerlerine önerilen miktarlarda alınmaktadır.

Dışkı: İntestinal TB şpinesi bulunan hastalardan alınmaktadır. Özellikle AIDS'li hastalarda *M. avium-intracellulare* kompleksin izolasyonu iini gerekli olabilmektedir. Ancak TB tanısında dışkıdan yapılan mikroskopi ve kültür işlemleri, klinik yarar açısından tartışmalıdır.

2.8. Klinik örneklerin işlenmesi

TB basillerinin işlenmesi steril veya kontamine alanlardan alınan örnekler olmalarına göre farklılık göstermektedir. Laboratuvara gönderilen klinik örnekler mikobakteriler ile birlikte kontaminasyona neden olan bakteriler, mantarlar, eritrosit, lökosit, vücut sıvıları ve doku gibi organik kalıntıları da içermektedir. Bu nedenle, mikrobiyota elemanlarını içeren klinik örnekler ve kontaminasyona neden olan bakteri ve mantarları elimine etmek amacıyla dekontaminasyon işlemi uygulanmaktadır.

Dekontaminasyon işlemi, mikobakterilerin canlılığını devam ettirmesi ancak kontaminasyona neden olan mikroorganizmaların Sodyum hidroksit (NaOH) gibi kimyasal maddeler ile uzaklaştırılması ve sayı olarak indirgenmesi işlemidir. Normalde steril olduğu düşünülen BOS, kan, vücut sıvıları, eklem sıvıları, kemik iliği ve aseptik koşullarda cerrahi olarak çıkarılan doku/biyopsi örnekleri dekontaminasyon işlemi gerektirmeyen steril örneklerdir. Ancak steril boşluklardan örnek alımı ve taşınması sırasında sterilizasyon kurallarına uyulmadığı düşünülüyorsa bu örnekler de dekontaminasyon işlemine alınmalıdır.

Homojenizasyon ise klinik örneklerde bulunan epitel ve diğer şekilli elemanlar arasında bulunan basilleri ortaya çıkararak mukus yapıların erimesini sağlayarak santrifüjde sedimente olmasını ve basillerin homojen bir şekilde

dağılmasını sağlamak amacıyla NaOH ya da N-asetil-L-sistein (NALC) gibi kimyasal maddeler kullanılmaktadır.

Nötralizasyon işlemi, dekontaminasyon ve homojenizasyon işlemleri sırasında kullanılan kimyasal maddelerin örnekleri asidik ya da alkali hale getirmesi nedeniyle yapılmaktadır.

Konsantrasyon, klinik örneklerdeki basillerin yoğunlaştırılarak TB basilinin izolasyonu şansını arttırmak için santrifüj işleminin yapılmasıdır.

Rutin tanı laboratuvarında yapılan kültürlerde kabul edilebilir kontaminasyon oranı %2 ile %5 arasındadır. Hiç kontaminasyon olmaması veya çok düşük (<%2) kontaminasyon oranları ön işlem koşullarının çok sert yapıldığını ve mikobakterilerin de diğer bakterilerle birlikte elimine edildiğini göstermektedir. Yüksek kontaminasyon (>%5) oranları ise aşırı kontaminasyon olarak kabul edilmektedir.

Mikobakteriyoloji laboratuvarlarında dekontaminasyon işlemlerinde en sık N-Asetil-L-Sistein (NALC) + NaOH yöntemi tercih edilmektedir. Bu yöntemde NALC mukolitik, %2-4 oranında NaOH dekontaminan ve %2,9'lük sodyum sitrat klinik örnekte bulanabilecek ağır metal iyonlarını bağlayarak NALC'ın inaktive olmasını önlemek amacıyla kullanılmaktadır. İncelenecek klinik örneğin bulunduğu 50 ml'lik steril burgulu kapaklı tüplere, klinik örneğin miktarı kadar NALC-NaOH solüsyonu ilave edilerek oda sıcaklığında 15 dk bekletilmelidir. Ancak dekontaminasyon işleminin fazla sert olmasının önüne geçebilmek için 15dk'luk bekleme süresi aşılmamalıdır. Bekleme süresinin başlangıcında tüpler 30 sn'yi geçmeyecek şekilde vortekslenmeli ve ara sıra el ile çalkalanmalıdır. Bekleme süresi tamamlandığında falkon tüpünün 50 ml sınırına kadar 0.067 M fosfat tamponu (pH:6.8) ilave ederek nötralizasyon işlemi gerçekleştirilmeli ve dekontaminasyon işlemi durdurulmalıdır. Kullanılan fosfat tamponun sterilitesi korunmalıdır. NALC – NaOH ile yapılan dekontaminasyon işleminden sonra uygulanacak her işlemde sterilizasyon kurallarına dikkat edilmesi gerekmektedir. Sterilizasyonun atlanması durumunda kültür için kullanılacak besiyerleri kontamine olmaktadır. Konsantrasyon işlemi bakteri

yoğunluğunu arttırmak için fosfat tamponu eklenmiş tüpler 3000 Xg' de 15 -20 dk santrifüj edilmekte ve santrifüj işlemi sonrası üstte bulunan sıvı dezenfektan (% 0.1-1 sodyum hipoklorit, % 70 alkol, % 5 fenol vb.) bulunan bir kaba boşaltılarak sedimente 1-2 ml steril fosfat tamponu (pH:6.8) eklenmektedir. Tüm işlemler biyolojik emniyet kabini içinde yapılmalıdır. Normalde steril olduğu düşünülen BOS, vücut sıvıları ve kan gibi örnekler dekontaminasyon işlemi uygulanmamaktadır. Bu örnekler direkt olarak veya santrifüj işlemi uygulandıktan sonra sedimentten besiyerlerine ekilmektedir. Ancak steril alanlardan örnek alımı veya örneğin transportu sırasında sterilizasyon kurallarına uyulmadığı düşünülüyorsa bu örnekler de dekontaminasyon işlemi uygulanmalıdır. Konsantrasyon ve dekontaminasyon işlemi tamamlanmış klinik örnekler mikroskopik inceleme, kültür ve moleküler testler için kullanılabilir.

2.9. Mikroskopik inceleme

Tedavi alan hastaların izleminde ve tanı amacıyla direkt mikroskopi yöntemi hızlı, basit, ucuz ve kolay inceleme imkanı nedeniyle ilk başvuru olan yöntemdir. Mikroskopik incelemede ARB pozitifliğini saptayabilmek için örneğin ml'sinde en az 5000-10000 bakteri bulunmalıdır. Direkt mikroskopi yönteminin özgüllüğü yüksek olmakla birlikte duyarlılığı değişkendir. Mikroskopi duyarlılığı TB prevalansı, örneklerin kalitesi ve sayısı, boyama yöntemi veya mikrobiyoloğun deneyimi gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Direkt mikroskopi yönteminin duyarlılığı yapılan çalışmalarda genellikle %25 ile %65 arasında bildirilmiştir. Solunum örnekleri yayma pozitiflik oranı en yüksek olan örneklerdir. Boyama işlemi sırasında yanlış pozitif sonuçlar immersiyon yağından geçiş veya lamaların çapraz kontaminasyonu kaynaklı olabilmektedir. (Murray 2010) (Kılıçaslan 2007)(Frieden 2004)

Mikobakterilere özgü aside dirençli boyanma özelliği kullanılarak direkt mikroskopi yönteminde 2 farklı boyama tekniği tercih edilmektedir. Bunlar karbol-fuksin yöntemleri ile flourokrom yöntemleridir. Rutin tanı için en çok karbol fuksin

yöntemleri tercih edilmekle birlikte daha donanımlı ve iş yükü fazla olan laboratuvarlarda flourokrom boyama yöntemleri kullanılmaktadır. Flourokrom boyama yöntemleri mikroskopta daha küçük objektifle daha geniş alanı tarayarak bir preperatin taranması için gereken süreyi azaltarak yaklaşık onda bire düşürmektedir. Bu yöntemin duyarlılığı yüksek olmakla birlikte özgülüğü düşüktür. Özgülüğünün düşük olması nedeniyle pozitif yaymalar EZN boyama ile tekrarlanmalıdır (Oğuz 2011).

Mikobakterilerin hücre duvarı yapısı diğer bakterilere göre daha komplike olması nedeniyle lipit bakımından oldukça zengin biyokimyasal yapılar içerdiği için gram boyama yöntemi ile boyanamazlar. 1880'li yılların başlarında Ziehl ve Neelsen tarafından geliştirilen ve Erlich tarafından modifiye edilen karbol fuksin asit-alkol ve metilen mavisinden oluşan EZN yöntemi ile etkili bir şekilde ARB boyanmaktadır. Aside dirençli basil tanımı asit ya da alkole maruz bırakıldığında mikobakterilerin canlılığını devam ettirmesi ile ilgili olmayıp boyama yönteminde kullanılan konsantrasyondaki asit veya alkol maruziyetinde bile ilk aldığı boyayı bırakmamasını tanımlamaktadır. Mikobakteriler asit ve alkollere direnç gösteremezler (Köksal 2003).

Flourokrom boyamanın temelinde ise karbol fuksin yerine floresan boyalar kullanılarak bu boyaların mikobakterilerin lipit açısından zengin hücre duvarına bağlanarak görünür hale gelmesi vardır. Flourokrom boyama yöntemlerinin önemli dezavantajları arasında deneyimli personel ihtiyacı ve floresan mikroskopunun maliyetli olması yer almaktadır. Ayrıca Uluslar Arası Kanser Araştırma Ajansı'na göre kullanılan auramin boya muhtemel karsinogen ajanlar içeren Grup 2B'de sınıflandırılmaktadır. Auramin'e maruz kalma ile kanser riski arasındaki ilişki heniz ispatlanamamakla birlikte mesane ve prostat kanserlerinin insidansının artışından sorumlu tutulmaktadır (Oğuz 2011).

Hazırlanan preperatlarda karbol fuksin boyasının kullanıldığı EZN ve Kinyoun boyama yöntemlerinde basiller mavi zeminde kırmızı olarak görülürler. Flourokrom yönteminde ise kullanılan filtre sistemine göre farklılık göstererek

karanlık zeminde sarı-turuncu renk floresans veren basiller olarak görülürler. EZN ve Kinyoun boyama yöntemlerinde hazırlanan yaymalar 100x immersiyon objektifinde incelenirken flourokrom boya ile hazırlanan yaymalar 25x veya 40x objektif ile incelenmektedir (Gümürlü 1998). Karbol fuksin ve flourokrom boyama yöntemleri karşılaştırmalı olarak verilmiştir (Tablo 2.9).(UTTR 2014)

Tablo 2.9 Boyama yöntemlerinin karşılaştırılması

	Karbol fuksin boyama		Flourokrom boyama
	EZN	Kinyoun	AR
Boyama			
Bazik fuksin konsantrasyonu	%0,3	%3,3	yok
Fenol konsantrasyonu	%4,5	%6,7	%3
Isıtma	var	yok	yok
Mikroskopi			
Büyütme	x100	x100	
Görünüm	Mavi zeminde kırmızı basil		Karanlık zeminde sarı floresans veren basil
Göreceli duyarlılık	orta	düşük	yüksek
Göreceli özgülük	yüksek	orta	düşük

Mikroskopi sonuçlarını raporlarken karbol fuksin boyama tekniği kullanılmış yaymalarda yaklaşık 5 dk süren en az 300 alan taranmış olmalıdır. Flourokrom boyama tekniği ile hazırlanan yaymalarda ise 25x objektif ile 30 alan, 40x objektif ile 70 alanın taranması yeterlidir (Smithwick 1976).

Direkt mikroskopik inceleme yeni vakaların saptanması, tedaviye yanıtın izlenmesi ve ilaca dirençli vakaların ortaya konması gibi bir çok konuda öngörü sağlamaktadır. Antimikobakteriyel tedavi ile önce kültür daha sonra da yayma negatifleşmektedir. Hastanın tedavi almasına rağmen yaymadaki basil sayısında azalma olmaması ilaç direncini düşündürmektedir (Saniç 1999). Doğrudan

mikroskopi sonuçlarının raporlanmasında örnekteki basil miktarının standardize bir şekilde belirtilmesi hastalığın niteliği hakkında ya da bulaştırıcılığının hangi düzeyde olduğu konusunda fikir vermektedir. Bu nedenle raporlama hem kantitatif hem de kalitatif olarak verilmelidir. Kullanılan boyama yöntemlerine göre mikroskopi sonuçlarının bildirimi verilmiştir (Tablo 2.9.1) (Tablo 2.9.2).

Tablo 2.9.1. EZN boyama yöntemi ile sonuç bildirimi

EZN Boyama/Sonuç	ARB sayısı inceleme alanı/1000X
Negatif	0
Şüpheli	1-2/ 300 alan
1+	1-9/ 100 alan
2+	1-9/ 10 alan
3+	1-9/ 1 alan
4+	>9/ 1 alan

Tablo 2.9.2. Flourokrom boyama yöntemi ile sonuç bildirimi

Flourokrom Boyama/Sonuç	İnceleme alanı: 250 X	İnceleme alanı: 450 X
Negatif	0	0
Şüpheli, tekrar	1-2/30 alan	1-2/70 alan
1+	1-9/10 alan	2-18/50 alan
2+	1-9/1 alan	4-36/10 alan
3+	10-90/1 alan	4-36/1 alan
4+	>90/1 alan	>36/1 alan

2.10. Kültür

Altın standart olarak kabul edilen kültür önemini halen korumakla birlikte direkt mikroskopi yöntemine göre de duyarlılığı daha yüksektir. Daha hızlı sonuç veren bazı sistemlere göre geç sonuç vermesine karşın kültür, basili canlılığını doğrudan göstermesi, ekimi yapılan suşun daha sonraki inceleme ve araştırmalar için stoklanabilmesi bakımından çok önemlidir. TB tanısında mutlaka kültür yapılarak basil üretilmeye çalışılmalıdır. Bir örneğe kültür negatif diyebilmek için en az 4 – 6 hafta beklenmesi gerekmektedir (Tekerekoğlu 2000). Kültür yöntemi basillerin tür düzeyinde identifikasyonuna ve ilaç duyarlılık testlerinin yapılarak hastanın doğru tanı ve tedavi alabilmesine olanak sağlamaktadır. (Baylan 2005)

Uygun şekilde alındıktan sonra laboratuvara gönderilen örneklerin n işlemlerini takiben santifürüj yapılarak konsantre edildikten sonra besiyerlerine ekilmektedir. *M.tuberculosis* kompleksin izole edilmesi ve bazı özelliklerinin incelenmesi amacıyla kullanılan katı ve sıvı olmak üzere iki tip besiyeri bulunmaktadır. Katı bazlı besiyerleri yumurta ve agar bazlı olmak üzere iki farklı şekilde sınıflandırılmaktadır. Yumurta bazlı besiyerleri arasında en yaygın kullanılan Löwenstein-Jensen (LJ) besiyeridir. Bu besiyeri tipik koloni morfolojisi oluşturması, iyi üreme sağlaması ve uzun süre dayanıklı olması nedeniyle özellikle primer izolasyonda tercih edilmektedir. Ancak ilaç duyarlılık testlerinde ilaç konsantrasyonların tutarlı olmaması, kullanılan yumurtaların kalitesi ve tüberküloz dışı mikobakteriler (TDM) için çok güvenilir olmaması LJ besiyerinin dezavantajları arasında yer almaktadır.

Yumurta bazlı besiyerleri opak grnmlyken, agar bazlı besiyerleri şeffaf görünümlüdür. Ekim yapılan besiyerleri 10-12 gün sonra mikroskopta incelenecek olursa görünümün şeffaf olması nedeniyle kolonileri görmek mümkün olmaktadır. En çok tercih edilen agar bazlı besiyerleri Middlebrook 7H10 ve 7H11'dir (Murray 2010).

Kontamine olmayan örnekler için nonselektif besiyerleri kullanılmalıdır. Aseptik koşullarda işlem görmüş örnekten pastör pipeti yardımıyla 3 – 4 damla besiyeri yüzeyine damlatılarak el ile yanlara eğip doğrultarak örneğin besiyeri yüzeyine yayılması sağlanmalıdır. Burgu kapaklı tüpler hafifçe gevşeltilecek bir gün süre ile yatık olarak etüvde bekletilmelidir. Bekleme süresi tamamlandıktan sonra %3-11 CO₂ bulunan etüvde 7 ile 10 gün arası inkübasyondan sonra normal etüve kaldırılmalıdır. Basiller bu süreçte logaritmik üreme fazlarına girdikleri için CO₂ ihtiyaçları daha azdır. Middlebrook 7H11 agar bazlı besiyeri kullanıldığında CO₂ kullanımı zorunludur (Pfyffer 2003) (Bilgehan 2004).

Tüberküloz şüphesi ile gelen her bir örnek 2 tane LJ besiyerine 2 tane de tercihen Middlebrook 7H10 veya 7H11 besiyerine ekilmelidir. Kültürler kontaminasyon ve hızlı üreme bakımından ilk 3 ile 5 gün arasında incelenmelidir. Kontaminasyon görülüyorsa kültür tekrarlanmalıdır. Daha sonra ilk 4 hafta haftada 2 kez, sonra haftada 1 kez olmak üzere kültürler 6 hafta üreme bakımından kontrol edilmelidir. 6.haftanın sonunda üreme görülüyorsa 2 hafta daha beklenir ve yine üreme olmamışsa kültür negatif olarak bildirilmelidir. Üreme olduğunda ise kolonilerin morfolojisi ve pigment yapıları incelenmektedir. Preperat hazırlanarak boyanma özellikleri incelenir ve biyokimyasal tanı testleri kullanılarak tür identifikasyonu yapılmaktadır. LJ besiyerinde 2-3 haftada mikobakteri kolonileri beyaz ya da sarımsak renkte katı ve pürüklü koloniler yaparak üremektedir. Middlebrook 7H10 ve 7H11 besiyerleri duyarlılık ve izolasyon için kullanılmaktadır. Middlebrook 7H9 ve Dubos Tween Albumin subkültür ve antibiyotik duyarlılık testler için inokülüm hazırlanmasında en çok kullanılan sıvı besiyerleridir. Ayrıca inkübasyon ısı mikobakterilerin üremesi için önemlidir. *M.tuberculosis* için optimum üreme sıcaklığı 37°C'dir. Mikobakterin tanısı için ticari ve otomotize kültür sistemleri geliştirilmiştir. BACTEC 460 TB (Becton Dickinson, Sparks, MD), BACTEC MGIT 960 (BD Biosciences, Sparks, MD), VersaTREK (ESP Culture System II) (Trek Diagnostics, Inc., Ohio), BacT/ALERT 3D (bioMerieux, Lyon, France) bunlardan bazılarıdır. (Isenberg 2004)

2.11. Otomatize kültür sistemleri

Kullanımı artarak devam eden hızlı kültür sistemleri identifikasyon ve izolasyon ile birlikte TB ilaçların duyarlılıkları da rutin tanıda çalışılabilir. Otomatize kültür sistemleri TB basillerinin izolasyon süresini önemli oranda kısaltmakta ve izolasyon şansını arttırmaktadır. Yaklaşık 4 – 12 günde sonuç alınabilmektedir. Gözle görülen bir kontaminasyonun olmadığı ancak herhangi bir ilaca karşı direncin eşlik ettiği sonuçlarda kontaminasyon olmadığı doğrulanmalıdır.

2.11.1. BACTEC 460 TB (Becton Dickinson, Diagnostic Instruments, Sparks, MD) sistemi

Yarı otomatize bir sistem olan Bactec 460 TB, uzun bir süre identifikasyon, izolasyon ve duyarlılık çalışmalarında başarı ile uygulanmıştır. Radyometrik, sıvı bazlı ve ticari olan bu sistemde izolasyon ile birlikte MTBC ile MOTT ayrımını yapabilmekte ve MTBC suşlarının antimikobakteriyel ilaçlara duyarlılığı belirlenebilmektedir. 2 tip besiyeri (Middlebrook 7H12 ve Middlebrook 7H13) içeren sistem, C14 işaretli palmitik asitin kullanılarak metabolizma sonucu açığa çıkan $^{14}\text{CO}_2$ 'in üreme indeksi 0-999 sayısal değerleri arasında değerlendirilmektedir. Kontaminasyonu engellemek amacıyla antibiyotik karışımı olan polimiksin B, azlosilin, nalidsik asit, trimetoprim ve amfoterisin B (PANTA) ekim işleminden önce besiyerine eklenmektedir. Bactec 460 TB başarı ile kullanılmakla birlikte, sistemde bulunan besiyerlerinin radyoaktif madde içermesi ve cihazın rutin kalibrasyonları sırasında çapraz kontaminasyon riski dezavantajları arasında yer almaktadır (Martin 2011) (Siddiqi 1996).

2.11.2. BACTEC Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) 960 (BD, Sparks, MD) sistemi

Mikobakterilerin tanısı için geliştirilen tam otomatize bir ticari kültür sistemidir. Üreme kontrolünün otomatik olarak yapılması, radyoaktif madde

kullanılmaması, duyarlılık ve identifikasyon testlerine olanak sağlaması avantajları arasındadır. Bu sistemde kullanılan tüplerde 7 mL'lik modifiye edilmiş Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri ve tüplerin dip kısımlarında rutenyum metal kompleksi içeren silikon O₂'de duyarlıdır. Klinik örnekler besiyerlerine ekilmeden önce OADC ve PANTA eklenmelidir. Besiyerlerinde O₂ varlığına bağlı olarak silikon tabakaya gönderilen UV ışınına karşı floresans oluşmaması herhangi bir üremenin olmadığını göstermektedir. Mikobakteri veya diğer farklı mikroorganizmalar ürettiğinde O₂ tüketimi nedeniyle UV ışınına karşı floresans oluşmakta ve bununla birlikte oluşan floresans miktarı üreme biri olarak kullanılmaktadır. Kan dışında tüm klinik örnekleri çalışabilmektedir. Çok sayıda örneği eş zamanlı inceleyebilen BACTEC MGIT 960 sistemi genellikle iş yükü fazla olan rutin laboratuvarlarda tercih edilmektedir (Murray 2010) (BD 2004)

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

VersaTrek kültür sistemi tam otomatize bir sistem olup selüloz sünger ve Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içermektedir. Sistemde oluşan gaz basıncındaki değişiklikler ölçülerek mikroorganizmaların üremesi değerlendirilmektedir. Bilgisayar destekli bir sistem olması nedeniyle besiyerinde oluşan gaz basıncındaki değişiklikler grafiksel olarak bilgisayarda ifade edilmektedir. Mikobakterilerin üremesini indükleyen OADC ve kontaminasyonu engellemek amacıyla antibiyotik karışımı besiyerlerine klinikörnekler ekilmeden önce eklenmelidir. Sistem tüm klinik örnekleri çalışabilmektedir (Uzun 2003).

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

BacT/ALERT 3D tam otomatize bir sistemdir. Besiyerlerinin dip kısmında kolorimetrik bir sensör bulunan ve meydana gelen CO₂ düzeyini ölçerek üremeyi değerlendirmektedir. Besiyerleri, sistemin bilgisayarlı olması nedeniyle sürekli kontrol altındadır. Sistem kan dışındaki tüm klünük örnekler için uygundur. (Isenberg 2004) (Uzun 2003)

2.11.5. Bactec 9000 MB (BD, Sparks, MD)

Bactec 9000 MB tam otomatize bir sistemdir. Modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyerlerinde O₂ kullanımı floresans ile belirlenmektedir. Klinik örneklerin besiyerlerine ekiminden önce PANTA ilave edilmelidir. Balgam ve diğer solunum yolu örnekleri için Myco/F sputa, kan ve diğer steril vücut sıvılarından alınan klinik örnekler için MycoF/lytic besiyeri kullanılmaktadır. (Isenberg 2004) (Uzun 2003)

2.12. İdentifikasyon testleri

Kültürde üreyen tüm mikobakteriler için TDM ve MTBC ayrımının yapılması gerekmektedir. İnsanlarda mikobakteri kaynaklı enfeksiyonların çok büyük bir kısmında etken MTBC olduğundan tür identifikasyon testlerinde amaç MTBC'yi TDM'den ayrılmasıdır. Bu ayrımın yapılarak MTBC'nin tanımlanması uygun tedavi yönteminin belirlenerek hasta yönetiminin doğru bir şekilde gerçekleşmesini sağlamaktadır.

Kültürde üreyen TDM-MTBC izolatlarının identifikasyonunda biyokimyasal testlerden, üreme özelliklerinden ve son yıllarda kullanımı artan immünokromotografik ve hızlı genotipik yöntemlerden yararlanılmaktadır. Günümüzde kullanılan bu yöntemler güvenilir ve hızlı bir şekilde MTBC-TDM tanısı koyabilmektedir. TDM-MTBC ayrımı;

- **Fenotipik yöntemler**
 - Biyokimyasal testler
 - Üreme özellikleri
 - HPLC (High Performance Liquid Chromatography)
- **Genotipik yöntemler**
 - Ters hibridizasyon testleri
 - PCR restriksiyon enzim analizi

- **İmmünokromotografik yöntemler**

kullanılarak identifikasyon gerçekleştirilmektedir.

A. Fenotipik yöntemler

A.1. Üreme özellikleri

- MTBC'nin üreme özellikleri;

Üreme hızı; katı besiyerinde kültür pasajında 7.günden sonra üreme gözlelenebilmektedir.

Koloni morfolojisi; R (düzensiz) tip koloni, kuru ve açık kahverengi koloniler oluşturmaktadır.

Pigment üretimi; pigment oluşturmazlar.

Mikroskopik inceleme; sıvı kültürden yapılan ARB boyamanın incelenmesinde kord faktör özelliği görülmektedir.

Ancak üreme özelliği TDM-MTBC identifikasyonunda MTBC kesin tanısı için yeterli değildir. Ön tanı yöntemi olarak kullanılmaktadır.

A.2. Biyokimyasal testler

- MTBC-TDM identifikasyonunda kullanılan biyokimyasal testler ve bu biyokimyasal testlere ait MTBC sonuçları;

Katalaz testi; negatif

Niasin birikim testi; pozitif

Nitrat indirgenme testi; pozitif

Paranitrobenzoik asit (PNB)'li besiyerinde üreme; negatif

PNB besiyerinde üreme olmaması MTBC olarak değerlendirilmektedir.

TDM-MTBC ayrımı için katalaz, niasin ve nitrat indirgenme testleri bir arada kullanılmalıdır. Bu testler tek başlarına TDM-MTBC identifikasyonu yapamazlar.

Katalaz testi

Katalaz, hidrojen peroksidi (H_2O_2) su ve oksijene ayrıştıran hücre içi bir enzimdir. Bütün mikobakteriler katalaz aktivitesi göstermekle birlikte bazı iziniyazide dirençli *M.tuberculosis* ve *M.bovis* suşları katalaz aktivitesi göstermemektedir. Katalaz enzimi hakkında fikir edinebilmek için yarı kantitatif katalaz testiyle oluşan hava kabarcıklarının yüksekliği ölçülmelidir. Negatif sonuç için hava kabarcığının gözlenmemesi gerekmektedir. Mikobakterilerin katalaz üretimi ve enzimin ısıya stabilitesi değişkenlik gösterebilmektedir. *Mycobacterium tuberculosis* ve bazı diğer mikobakterilerdeki katalaz enzimleri $68^{\circ}C$ 'de 20 dakika ısıtıldığında inaktive olur. (Murray 2010) (Sürücüoğlu 2003).

Niasin birikim testi

Mikobakterilerin tamamı üremeleri devam ettiği sürece niasin üretmektedir. Ancak bazı mikobakteri türleri (*M.tuberculosis*, *M.simiae* ve *M.chelonae*) daha fazla niasini metabolize edemedikleri için ortamda daha fazla birikmektedir. Besiyerinde biriken niasin bu test ile gösterilmektedir.

Nitrat indirgenme testi

Mikobakteriler nitrati indirgeme yeteneklerine göre birbirinden ayrılmaktadır. Bazı mikobakteriler *M.tuberculosis* gibi nitroredüktaz enzimi üreterek nitratları nitritlere indirgeyebilmektedir. Bu test nitroredüktaz enzim varlığını araştırmaktadır. Günümüzde nitrat indirgenmesini tespit eden strip testler bulunmaktadır (Winn 2006).

P-nitrobenzoik asit (PNB) testi

MTBC'nin tanısında 37 °C'de PNB'li besiyerinde üreme özelliği kullanılmaktadır. PNB, MTBC'nin üremesi selektif olarak inhibe etmektedir (UTTR 2014).

A.3. HPLC

Mikobakteri kültür izolatlarının identifikasyonunda mikolik asitlerin ekstraksiyon ve ayrıştırılmasını temel alan kimyasal bir yöntemdir. Ekipman gereksinimi ve uygulamadaki zorluklar nedeniyle TB laboratuvarlarında rutin kullanım alanı bulamamıştır (UTTR 2014).

B. Genotipik yöntemler

B.1. PCR restriksiyon enzim analizi (PRA)

Katı veya sıvı kültürde üreyen mikobakterilerin kısa zamanda tür düzeyinde tanımlanmasını sağlamak amacıyla çeşitli moleküler tanı sistemleri geliştirilmiştir. Kültürden elde edilen izolatların hsp65 geninin 441 bp'lik bir parçasının PCR ile amplifikasyonundan sonra amplifiye olan ürünlerin BstEII ve HaeIII restriksiyon enzimleri ile kesimi temeline dayanmaktadır. Kesim reaksiyon ürünleri agaroz jel elektroforez yöntemi ile incelenmektedir. Elde edilen restriksiyon paternleri fragman büyüklüğü algoritması ile karşılaştırılarak mikobakteri tipine karar verilmektedir.

Test gün içinde tamamlanabilmekte ve maliyeti uygundur. Ekipman, donanım ve deneyimli personel gerektirmektedir (UTTR 2014)

B.2. Ters hibridizasyon testleri

Ters hibridizasyon testleri ‘‘Line Probe Assay (LPA)’’ hızlı, pratik, değerlendirilmesi kolay olmakla birlikte ekipman gerektiren yüksek maliyetli testlerdir. Kültür izolatlarından amplifiye edilen biyotinle işaretlenmiş PCR ürünlerinin, nitrosellüloz şeritler üzerine bağlanmış özgün DNA problemleri ile hibridize edilmesi prensibine dayanmaktadır.

B.3. İmmünokromatografik yöntemler

Katı ve sıvı kültürdeki izolatlardan hepsi ile çalışılabilmekte ve dakikalar içerisinde sonuç vermektedir. Basit, hızlı, uygulaması kolay, ekipman gereksinimi olmayan, maliyeti düşük testlerdir. MTBC’ye özgü hücre duvarı antijenlerinin (MPT-64) tespit edilmesi prensibine dayalı bir yöntemdir.

3.1 İlaç direncinin belirlenmesi

Tüberkülozda etkin tedaviye erken başlanabilmesi için ilaç direnci hızlı ve doğru olarak tanımlanmalıdır. İlaç direncinin belirlenmesi hastalığın süresini kısaltabilir, kür oranını artırabilir ve ilaç direncinin yayılımını azaltabilmektedir.

TB ile mücadelede hastaların erken belirlenmesi ve etkin tedavi yöntemleri ile bulaş zincirinin önüne geçilmelidir. Spesifik tedavinin etkinliği ilaç duyarlılık testleri göz önüne alınarak artırılabilir. TB’da direnç tedavi gören hastalarda dirençli mutant basillerin seçilmesi yolu ile ortaya çıkarak sekonder direnç, doğrudan dirençli suşlar ile bulaşı olan ve daha önceden tedavi almamış hastalarda da primer direnç olarak ortaya çıkmaktadır. Epidemiyolojik duruma ve ülkelere göre değişkenlik göstermekle birlikte sekonder direnç oranı, primer direnç oranına göre

daha yüksektir. Primer direnç oranının yüksek olması TB kontrol programının başarısızlığının göstergesidir. (UTTR 2014)

Etkinliği fazla olan antimikobakteriyel ilaçlardan izoniazid ve rifampisine dirençli basillerin sebep olduğu Tb vakaları çok ilaca dirençli tüberküloz olarak ifade edilmektedir. Yaygın ilaç dirençli tüberküloz ise rifampisin ve izoniazid direncine ek olarak bir kinolona ve bir de ikinci grup enjeksiyonla verilen ilaca (kapreomisin,kanamisin,amikasin) dirençli olmasıdır.

MTBC ilaç direnci rastgele ve düşük sıklıkta kendiliğinden gelişen mutasyonların bir sonucudur. Bu nedenle hastalığı oluşturan mikobakterilerin içerisinde düşük oranda dirençli mutantlar bulunabilmektedir.

Kültür temelli ilaç duyarlılık testleri, hastalığa neden olan mikobakterilerin içerisinde dirençli olanların belli bir oranın üzerinde olduğunda ilacın etkin tedavi sağlayamayacağı mantığına dayanmaktadır. Günümüzde yaygın olarak kullanılan ve kültür temelli bir yöntem olan proporsiyon yönteminin amacı bir ilacın kritik konsantrasyonuna dirençli olan bakterinin kritik proporsiyon olan %1'in üzerinde olup olmadığını belirlemektir. Sıvı besiyeri kültür temelli otomatize ticari yöntemlerde de benzer şekilde proporsiyon yöntemi mantığına dayandırılmıştır. Daha farklı bir prensiple çalışan moleküler yöntemlerde ise direnç ile ilişkili gen mutasyonlarını belirlemek amaçlanmıştır.

Kültür prensibine dayalı yöntemlerde antibiyotikli besiyerlerinde test için bulundurulması gereken konsantrasyonları kritik konsantrasyon kullanılan yöteme, kullanılan besiyerine ve test edilen antibiyotiğe göre farklılık göstermektedir. Önerilen kritik konsantrasyonların kullanılmaması yanlış sonuçlara neden olmaktadır.

İlaç duyarlılık testleri (İDT)'ler direkt ya da indirekt olarak yapılabilmektedir. Direk İDT yayma pozitif örnekten doğrudan yapılmakla birlikte kontaminasyon ihtimali yüksek, başarı oranı düşük bir testtir. İndirekt İDT ise üreme gerçekleşmiş

kültürden yapılmaktadır. Bu nedenle başarı oranı yüksek olmakla birlikte zaman alıcı bir testtir. Moleküler yöntemlerde ise yayma pozitif örneklerle ve kültürde üreme gerçekleşmiş örnekler ile çalışılabilmektedir.

Mikobakterilerin duyarlılık testi için CLSI her hastadan izole edilen ilk *M.tuberculosis* suşunun primer antitüberküloz ilaçlara (rifampisin, izoniyazid, etambutol, pirazinamid, streptomisin) karşı duyarlılığın test edilerek belirlenmesi gerektiğini bildirmektedir. Üç aylık tedavi sonrasında kültür negatifliğinin elde edilemediği vakalarda duyarlılık testi tekrarlanmalıdır (CLSI 2008).

MTBC antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılığını belirlemede en yaygın olarak kültür temelli yöntemler ve dirence neden olan mutasyonu belirlemeye yönelik moleküler yöntemler kullanılmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda TB şüpheli hastalardan alınan örnekler, mikobakteriyolojik inceleme amacıyla Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilmiştir. Çalışmaya toplam 100 hasta örneği dahil edildi. Laboratuvara gönderilen klinik örnekler rutin işlemler uygulandıktan sonra iki farklı boyama yöntemi ile çalışılmış ve kültür yöntemi altın standart kabul edildi.

Çalışılmak üzere burgu kapaklı, konik tabanlı, steril ve sızdırmaz kapların içerisinde yeterli miktarlarda gönderilen örnekler laboratuvarımız tarafından kabul edilmiştir. Örnek kaplarının üzerinde hastanın adı, protokol numarası ve tarih yazılı olmalıdır. Alınan ilk örnekler en kısa zamanda laboratuvara ulaştırılmış olmalı ve antimikobakteriyel tedaviye başlanmadan önce alınmış olması gerekmektedir.

Steril vücut örnekleri (BOS, plevra, periton ve biyopsi materyali gibi) dekontaminasyon işlemine tabi tutulmadan; steril olmayan (BAL, MAS, balgam ve apse materyalleri) ya da steril koşullarda alınamayan örnekler ise bakteri

konsantrasyonunu arttırmak için dekontaminasyon/homojenizasyon işlemleri uygulandı.

3.1. Dekontaminasyon/homojenizasyon/konsantrasyon işlemleri

Klinik örneklerin homojenizasyon ve dekontaminasyonu için NALC-NaOH yöntemi tercih edildi ve hazır ticari kit olarak uygulandı.

N-Asetil-L-Sistein(NALC)+Sodyum hidroksit(NaOH) yöntemi;

NALC: mukolitik

NaOH: dekontaminan

Sodyum sitrat: örnekte bulunabilecek ağır metal iyonlarını bağlayarak NALC'ın inaktive olmasını engellemek amacıyla kullanıldı.

1. Laboratuvara gelen klinik örnekler 50ml'lik polipropilen, dibi konik, burğu kapaklı falcon tüplere aktarıldı. Klinik örneğin miktarı kadar NALC-NaOH solüsyonu ilave edildi.
2. Klinik örnek ve NALC-NaOH karışımını içeren tüpler 30 sn'lik süreyi geçmeyecek şekilde vortekslendi. Tüpler oda sıcaklığında ara sıra el ile çalkalanarak 10-15 dk bekletildi.
3. Falcon tüpündeki klinik örneğin üzerine 50ml çizgisine kadar nötralizasyon amacı ile 0.067 M fosfat tamponu eklendi. Kalan fosfat tamponu diğer aşamalar için bekletildi.
4. Tüpler 10-15dk 3000 xg hızda santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası süpernatant dezenfektan içeren bir kaba boşaltıldı.
6. Kalan fosfat tamponu sedimente 1-2 ml kadar ilave edildi ve vorteks ile karıştırılarak tekrar süspansiyon geline getirildi.
7. Tüpler 10-15 dk 3000 xg hızda santrifüj edildi.
8. Üstte kalan süpernatant dezenfektan içeren bir kaba boşaltıldı.
9. Sediment vorteks ile karıştırılarak süspansiyon geline getirildi. Bu süspansiyon lam üzerine oval şekilde yayılarak direkt mikroskopi için

preperat hazırlandı ve kültür yöntemi için besiyerine ekim yapmak amacıyla kullanıldı.

10. İşlem tamamlandıktan sonra tüpler ticari kit içindeki dezenfaktan çözeltisi ile muamele edilip atıldı.

Plevral, peritoneal, BOS, perikardial, sinovial sıvılar steril olduğu düşünülen bu örnekler normal koşullarda dekontaminasyon işlemi uygulanmadığından santrifüj edilerek besiyerine ekim yapıldı. Örnek alımı ve klinik örneğin taşınma işlemleri sırasında asepsi ve antisepsi kurallarına uyulmadığı farkedilen örnekler de dekontaminasyon işlemi uygulandı.

3.2. Direkt mikroskopik inceleme

Çalışmamızda hazırlanan yayma preperatlar biyolojik güvenlik kabininde havada kurumaya bırakıldıktan sonra hazır EZN boya kiti (DAGT ZR 2A) ile otomatik boyama cihazı (AFB MULTI STAINER, AT-3001) kullanılarak boyandı ve mikroskopik inceleme yapıldı.

3.2.1. Erlich-Ziehl-Neelsen boyama yöntemi

Hazır EZN boya setinin içeriğinde;

- karbol fuksin çözeltisi 1x500 ml
- Asit/alkol karışımı 2x500 ml
- Metilen mavisi çözeltisi 1x500 ml

bulunmaktadır.

Boyanan preperatların üzerine immersiyon yağı damlatılarak 1000X büyütme ile ışık mikroskopunda (Olympus BX43) inceleme yapıldı. Aside dirençli bakteriler (ARB) pembe-kırmızı renkte diğer mikroorganizmalar ise mavi renkte boyandılar. Pembe-kırmızı renk boyanan basillerin görüldüğü örnek için sonuç ARB(+) olarak rapor edildi. En az 300 alan taranпта basillerin görülmemesi durumunda ise sonuç ARB(-) olarak rapor edildi. EZN boyama yöntemi ile sonuç bildirim Tablo 2.9.1.'e göre yapıldı.

3.2.2. Auramin/Rhodamine/KmnO4 floresan boyama yöntemi

Bizim çalışmamızda ticari auramine/rhodamine kiti (Dagatron, DAGT FR 2A, Auramin-Rhodamine) ile otomatik boyama cihazı (AFB MULTI STAINER, AT-3001) kullanıldı. Kit içeriğinde bulunanlar;

- Auramine-O
- Rhodamine-B
- Fenol, gliserin
- Ethanol
- KMNO₄

Kurumaya bırakılan preparatlar 40X objektif ile floresan mikroskopta (Olympus U-RFL-T) incelendi. Mikobakteriler koyu bir zeminde sarı-turuncu parlak, kıvrık içi tanecikli floresan veren bakteriler olarak görüldü. Parlak sarı-turuncu görülen örnekler pozitif sonuç olarak rapor edildi. Floresan vermeyen örnekler negatif sonuç olarak rapor edildi. Floresan boyama yöntemi ile sonuç bildirimini Tablo 2.9.2'ye göre yapıldı. Sonuçlar EZN boyama yönteminin verileri ile karşılaştırıldı.

3.3. Löwenstein- Jensen katı kültür yöntemi

Homojenizasyon/dekontaminasyon/konsantrasyon işlemleri sonrasında elde edilen karışımdan 0.5 ml alınarak LJ (BD BBL™) besiyerine ekim yapıldı. Ekimi yapılan besiyerleri kapağı kapalı ve yatık bir şekilde bir gece 37 °C' de bekletildikten sonra ertesi gün kapağı biraz gevşeterek bir gün boyunca dik olarak bekletildi. Bekletilme işlemi tamamlandıktan sonra kapak sıkıca kapatılarak sekiz hafta süre ile besiyerleri haftada bir kez kontrol edilerek üremenin olup olmadığı incelendi.

3.4. İstatistiksel analiz

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar bilimsel araştırma yöntemleri ile değerlendirilerek duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer, negatif prediktif değer, yanlış pozitiflik oranı, yanlış negatiflik oranı ve doğruluk oranı analizleri yapıldı (Tablo 3.4).

Tablo 3.4. Elde edilen verilerin analizleri

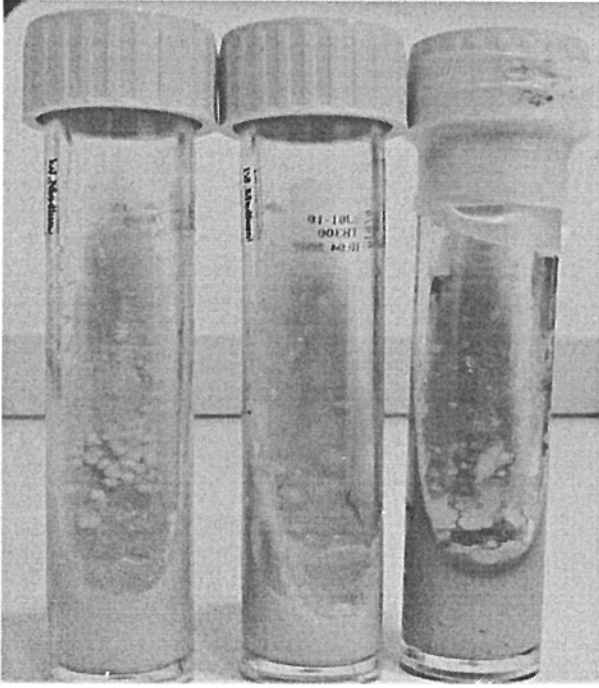
Tarama testi	Altın standart tanı testi pozitif	Altın standart tanı testi negatif	Toplam
Pozitif	A	B	A+B
Negatif	C	D	C+D
Toplam	A+C	B+D	A+B+C+D

- **Duyarlılık (Sensitivite):** Bir testin uygulandığı populasyonda gerçekten hasta olan bireyleri belirleyebilme yeteneğidir. $A/(A+C)$
- **Özgüllük (Spesifite):** Testin uygulandığı populasyonda incelenen hastalık bakımından sağlam bireyleri belirleyebilme yeteneğidir. $D/(B+D)$
- **Pozitif prediktif değer (Gerçek pozitiflik):** Testin uygulandığı populasyonda pozitif sonucu olan bireylerin gerçekte hasta olma olasılığıdır. $A/(A+B)$
- **Negatif prediktif değer (Gerçek negatiflik):** Testin uygulandığı populasyonda negatif sonucu olan bireylerin gerçekte hasta olma olasılığıdır. $D/(D+C)$

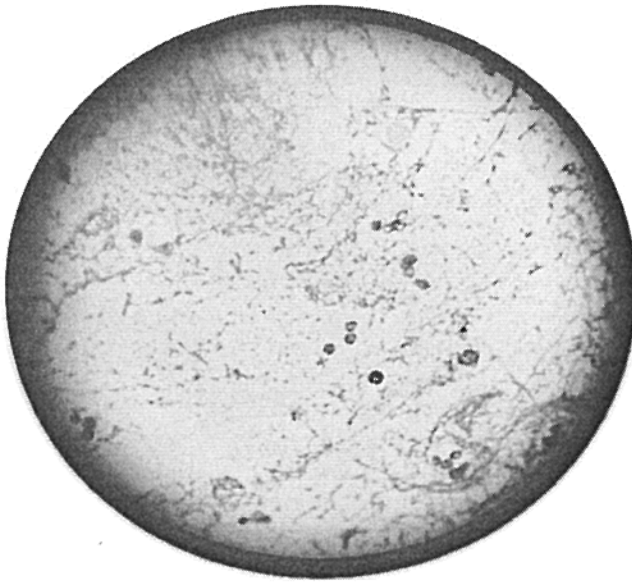
- **Yanlış pozitiflik oranı:** Testin gerçek sağlam bireyler arasından hatalı olarak hasta dediği olgulardır. $1 - [D / (B + D)]$
- **Yanlış negatiflik oranı:** Testin gerçek hastalar arasından hatalı olarak sağlam dediği olgulardır. $1 - [A / (A + C)]$
- **Doğruluk:** Gerçekte testin hasta ve sağlam olarak toplam doğru tanı oranına denir. $(A + D) / (A + B + C + D)$

4. BULGULAR

Çalışmamıza Namık Kemal Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen tüberküloz şüpheli hasta örneklerinden 100'ü dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen klinik örneklerden kültür sonucu pozitif olan 50 hasta örneği ve kültür sonucu negatif olan 50 hasta örneği EZN boyama ve AR boyama yöntemleri ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. LJ besiyerinde üretilen örneklerin morfolojik yapılarının düzgün veya bazen düzensiz kenarlı, krem rengi ve küçük koloni oluşturduğu gözlemlendi (Şekil 4). EZN boyama yöntemiyle ARB (+) preparatlar mavi zeminde kırmızı/pembe renk basiller olarak görüldü (Şekil 4.1). AR boyama yöntemiyle floresan mikroskopta ARB (+) preparatlar koyu zeminde parlak sarı floresans veren basiller olarak görüldü (Şekil 4.2).



Şekil 4. LJ besiyerinde üretilen *M.tuberculosis*



Şekil 4.1. EZN boyama yöntemiyle boyanan ARB (+) ışık mikroskopunda preparat görüntüsü



Şekil 4.2. AR boyama yöntemiyle boyanan ARB (+) FM preparat görüntüsü

Kültüründe aside dirençli basil üreyen örneklerin 44'ü (%88) balgam, 3'ü (%6) bronkoalveolar lavaj, 2'si (%4) mide açlık sıvısı(MAS) ve 1'i (%2) plevra olmak üzere 50 hasta örneği değerlendirildi (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Kültür pozitif klinik örneklerin dağılımı

Kültür (+) klinik örnek tipleri	Örnek sayısı (n)
Balgam	44 (%88)
Bronkoalveolar lavaj	3 (%6)
Mide açlık sıvısı	2 (%4)
Plevra	1 (%2)

Kültüründe aside dirençli basil üremeyen hasta örneklerinin 34'ü (%68) balgam, 9'u (%18) bronkoalveolar lavaj, 2'si (%4) idrar, 3'ü (%6) MAS, 1'i (%2) beyin omurilik sıvısı(BOS) ve 1'i (%2) yara olmak üzere 50 hasta örneği değerlendirildi (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Kültür negatif klinik örneklerin dağılımı

Kültür (-) klinik örnek tipleri	Örnek sayısı (n)
Balgam	34 (%68)
Bronkoalveolar lavaj	9 (%18)
Mide açlık sıvısı	3 (%6)
İdrar	2 (%4)
Beyin omurilik sıvısı	1 (%2)
Yara	1 (%2)

Çalışmamızda kültür sonucu pozitif klinik örneklerin EZN boyama ve AR boyama yöntemleri ile karşılaştırmalı mikroskopik değerlendirilmesinde 39 (%78) örnek EZN boyama yöntemi ile ARB pozitif, 46 (%92) örnek AR boyama yöntemi ile ARB pozitif olarak bulundu. EZN boyama yöntemi ile ARB pozitif olarak değerlendirilen 39 örneğin 37'si balgam, 1'i bronkoalveolar lavaj, 1'i mide açlık sıvısıydı. AR boyama yöntemi ile ARB pozitif olarak değerlendirilen 46 örneğin 42'si balgam, 2'si bronkoalveolar lavaj, 1'i mide açlık sıvısı ve 1'i plevraydı (Tablo 4.5).

Kültür sonucu negatif klinik örneklerin mikroskopik değerlendirilmesinde EZN boyama yöntemi ile 2'si balgam, 1'i BAL olmak üzere 3 örnek ARB(+) olarak değerlendirildi. AR boyama yöntemi ile 5'i balgam, 2'si BAL, 1'i MAS olmak üzere 8 örnek ARB(+) olarak değerlendirildi (Tablo 4.6). Değerlendirilen bu örneklerden 2'si balgam ve 1'i BAL olmak üzere hem EZN boyama yöntemiyle hem de AR boyama yöntemiyle ortak pozitif olarak belirlendi.

Tablo 4.5. Kültür (+) izolatların EZN boyama ve AR boyama yöntemi ile ARB sonuçları

Kültür (+) klinik örnekler	EZN		AR	
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
Balgam	37	7	42	2
Bronkoalveolar lavaj	1	2	2	1
Mide açlık sıvısı	1	1	1	1
Plevra	-	1	1	-
Toplam	39	11	46	4

Tablo 4.6. Kültür (-) izolatların EZN boyama ve AR boyama yöntemi ile ARB sonuçları

Kültür (-) klinik örnekler	EZN		AR	
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
Balgam	2	32	5	29
Bronkoalveolar lavaj	1	8	2	7
Mide açlık sıvısı	-	3	1	2
İdrar	-	2	-	2
Beyin Omurilik Sıvısı	-	1	-	1
Yara	-	1	-	1
Toplam	3	47	8	42

Çalışmamızda 50 kültür pozitif örneğin EZN boyama yöntemiyle 39'unda (%78), kültür negatif 50 örneğin ise 3'ünde (%6) ARB görüldü (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. EZN boyama yöntemiyle kültür sonuçlarının karşılaştırılması

EZN boyama yöntemi	Kültür pozitif	Kültür negatif	Toplam
Pozitif	39	3	42
Negatif	11	47	58
Toplam	50	50	100

Kültür pozitif 50 örneğin AR boyama yöntemiyle 46'sında (%92), kültür negatif 50 örneğin ise 8'inde (%16) ARB görüldü (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. Auramine O/Rhodamine B boyama yöntemiyle kültür sonuçlarının karşılaştırılması

Auramine O/Rhodamine B boyama yöntemi	Kültür pozitif	Kültür negatif	Toplam
Pozitif	46	8	54
Negatif	4	42	46
Toplam	50	50	100

Kültür altın standart kabul edilerek EZN boyama ve AR boyama yöntemlerinin sonuçları karşılaştırmalı olarak değerlendirilerek duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değerleri ve negatif prediktif değerleri ve testin geçerliliği (doğruluk) hesaplandı (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. EZN ve Auramin O/Rhodamine B yöntemlerinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri ve testin geçerliliği (doğruluk)

	EZN	AR
Duyarlılık	%78	%92
Özgüllük	%94	%84
Pozitif prediktif değer	%92,86	%85,19
Negatif prediktif değer	%81,03	%91,3
Doğruluk	%86	%88

AR ve EZN boyama yöntemleriyle hazırlanan preparatların boyanma süreleriyle mikroskopta incelenme süreleri karşılaştırıldı. EZN ile boyanan 10

preparat için boyanma süresi 18 dk olarak hesaplanırken AR ile boyanan 10 preparat için gereken süre 9 dk olarak hesaplandı. EZN boyama ile hazırlanan bir preparat ışık mikroskopunda ortalama 5.4 dakikada incelenirken AR boyama ile hazırlanan bir preparat FM ile ortalama 2.8 dakikada incelendi.

5. TARTIŞMA

Tüberküloz, insanlık tarihinin en eski ve en bulaşıcı hastalıklarından biri olmasıyla birlikte insidansında zaman içerisinde farklı dalgalanmalar görülse de günümüzde bir halk sağlığı sorunu olarak tüm dünyada önemini korumaktadır. İnhalasyon yolu ile bulaşan bir hastalık olması nedeniyle toplum sağlığını korumak ve tüberküloz kontrolünü sağlamak açısından hastalığın erken tanı ve tedavisi büyük önem taşımaktadır.

Akciğer tüberkülozunun tanısında kullanılan hızlı ve ekonomik EZN boyama yöntemi konvansiyonel olarak rutin tanıda kullanılmaktadır. Pulmoner ve ekstrapulmoner tüberkülozun varlığı klinik verilerle uyumlu olsa da histopatolojik ve radyolojik incelemelerin dışında, kesin tanı için direkt mikroskopik incelemede tespit edilmesi ve kültürde etkenin üretilerek doğrulanması gerekmektedir. Bu nedenle aside dirençli basil tanısında altın standart kültür yöntemi olarak kabul edilmektedir (Moore 1998) (Cheng 2005) (Alp 2011)

Moleküler yöntemler tüberküloz tanısında hızlı ve etken tanımlama aralığının geniş olması nedeniyle tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanım alanı bulmuştur. Etkenin saptanarak üretilen bakteri türünün tiplendirilmesi ve antimikobakteriyel ilaçlara direncin belirlenmesinde PZR yöntemi kullanılabilir. Ancak PZR kullanımı deneyimli personel, laboratuvar alt yapısı, yüksek maliyet ve ekipman gereksinimi, yalancı pozitiflik ve negatiflik gösterebilmesi ve sonuçların yorumlanmasının uzman kişiler tarafından yapılması gerekliliği nedeniyle rutin tanıda tercih edilmemektedir. Tüberküloz tanısında en sık kullanılan rutin yöntemler EZN boyama ile direkt mikroskopik inceleme ve kültürdür.

Direkt mikroskopik inceleme hızlı, ucuz ve basit bir yöntem olması nedeniyle tanı koymada ve tedavi sürecinde olan hastaların takibinde kullanılmaktadır. Yöntemin duyarlılığı içerdiği bakteri miktarına, örneğin türüne, uygulanan tekniğe ve sonuçları değerlendiren uzmanın deneyimine bağlı olarak %20-85 arasında farklılık göstermesine karşın özgüllüğü yüksektir. Mikroskopik incelemede ARB pozitifliğini belirleyebilmek için yayma preparat örneğinin mililitresinde 5000-10000 basil görülmesi gerekmektedir.

Mikobakteriler, hücre duvarı etrafında bulunan yoğun lipid tabakasının kazandırdığı hidrofobik özellikleri nedeniyle suda çözünen boyalar ile boyanmazlar. Bu nedenle mikobakteriler karbol fuksin boyama yöntemleriyle boyanmaktadır. Boya içerisine fenol konularak lipid tabakası yumuşatılır ve mikobakteriler hücre içine aldıkları boyayı bırakmazlar. Bu preparatlar ışık mikroskopunda incelenerek ARB tespiti yapılmaktadır. (UTTR 2014)

Rutin tanı amaçlı en çok karbol fuksin boyama yöntemleri kullanılmakla birlikte duyarlılığı daha fazla olan ve hazırlanan preparatların birim zamanda daha hızlı taranmasını sağlayan flourokrom boyama yöntemleri (auramine O, auramine rhodamine B) de günümüzde tercih edilmektedir. Flourokrom boyama yöntemi ile hazırlanan preparatlar floresan mikroskopunda incelenmektedir. Bu yöntem ile daha küçük objektifte daha geniş alan taraması yapmak mümkündür. Preparatı taramak için gereken süre yaklaşık olarak onda bire düşmektedir. Bu nedenle özellikle işlenen örnek sayısının fazla olduğu ve zaman problemi olan laboratuvarlarda flourokrom boyama yöntemi tercih edilmektedir. (UTTR 2014)

Son yıllarda EZN boyama yönteminin yanında AR boyamayla birlikte floresan mikroskop yöntemiyle de balgam örnekleri incelenmektedir. AR boyamayla FM kullanımı EZN yöntemi ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde duyarlılığının daha yüksek ve birim zaman açısından daha kısa sürede tarama yapılabildiği bildirilmektedir. TB vakalarının sıklıkla az gelişmiş ülkelerde görüldüğü göz önünde bulundurulduğunda FM için karanlık oda ve lamba ışığı gibi maliyetli ekipman gereksinimi dezavantaj olarak görülebilir.

Rutin tanıda kullanılan EZN boyama yönteminin özgüllüğünün yüksek olmasına karşın duyarlılığının düşük olması AR boyamayla birlikte FM kullanımının EZN boyama yöntemine yakın özgüllüğü ve preparat taramada yüksek duyarlılığının olması avantaj olarak kabul edilmektedir.

Tüberküloz vakalarının zaman geçirilmeden tanımlanmasına yönelik konvansiyonel yöntemlerle karşılaştırılmalı araştırmalar yapılmakta ve bu yöntemlerin etkinlikleri gösterilerek en kısa sürede en doğru sonucu verebilecek testin belirlenmesi için çalışılmaktadır. Bu amaç doğrultusunda yapılan bazı çalışmalarda elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

Oğuz ve diğ., 2011'de yaptıkları çalışmada 1013 balgam örneğinden 101 (%9,97)'inin kültürde üreme gösterdiğini belirtmişlerdir. Kültür pozitif 60 (%5,92) örneği EZN boyama yöntemiyle, kültür pozitif 53 (%5,24) balgam örneği ticari Auramine/Acridine Orange boyama kitiyle, kültür pozitif 81 (%7,99) balgam örneği Auramine-Rhodamine/KMnO4 boyama yöntemiyle de pozitif bulduklarını ifade etmişlerdir. Kültür pozitifliği belirlenen 41 (%4,05) balgam örneğini EZN boyama yöntemiyle, kültür pozitif 48 (4,74) balgam örneğini Auramine/Acridine Orange boyama kitiyle, kültür pozitif 20 (%1,97) balgam örneğini Auramine-Rhodamine/KMnO4 boyama yöntemiyle negatif bulduklarını ifade etmişlerdir. Kültür negatif 15(%1.48) balgam örneğini EZN boyama yöntemiyle, kültür negatif 61 (%6,02) balgam örneğini Auramine/Acridine Orange boyama kitiyle, kültür negatif 147 (%14,52) balgam örneğini Auramine-Rhodamine/KMnO4 boyama yöntemiyle pozitif bulduklarını belirtmişlerdir. Kültür negatif 897 (%88,5) balgam örneğini EZN boyama yöntemiyle, kültür negatif 851 (%84) balgam örneğini Auramine/Acridine Orange boyama kitiyle, kültür negatif 765 (%75,52) balgam örneğini Auramine-Rhodamine/KMnO4 boyama yöntemiyle de negatif bulmuşlardır. Kültür pozitif 101 (%9,97) balgam örneğinden 43 (%42,57)'ünün her üç boyama yöntemiyle de pozitif, 7 (%6,93)'sinin Auramine/Acridine Orange boyama kiti ve Auramine-Rhodamine/KMnO4 boyama yöntemiyle pozitif, 15 (%14,85)'inin EZN boyama ve Auramine-Rhodamine/KMnO4 boyama yöntemiyle de pozitif bulunduğunu ifade etmişlerdir. Bu sonuçlar doğrultusunda kültür altın standart kabul edilerek EZN boyama yöntemi için duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer,

negatif prediktif değer sırasıyla %59,4 %98,3 %80 ve %95,6 olarak belirlemişlerdir. Auramine/Acridine Orange boyama kiti için duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer, negatif prediktif değer sırasıyla %52,4 %94,6 %42,7 ve %94,6 olarak bildirmişlerdir. Auramine-Rhodamine/KMnO₄ boyama yöntemi için duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer, negatif prediktif değer sırasıyla %80,1 %83,8 %35,5 ve %97,4 olarak belirlediklerini ifade etmişlerdir.

Demirel 2010'da yaptığı çalışmada 291 balgam örneğini EZN boyama yöntemi ve Auramine/Rhodamine boyama yöntemiyle karşılaştırdığını belirtmiş ve Bact/Alert 3D sıvı besiyeri kültür sistemi, LJ katı besiyeri kültür yönteminin her ikisini de referans test olarak aldığını ifade etmiştir. 291 balgam örneğinden 18 (%6,1)'ini Auramine/Rhodamine yöntemiyle, 13 (%4,9)'n EZN boyama yöntemiyle ve 19(%6,5)'unu kültür yöntemiyle pozitif olarak belirlemiştir. Her iki kültür yöntemi referans alındığında EZN boyama yöntemi için duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değer sırasıyla %68,4 %99,6 %92,8 ve %97,7 olarak bildirmiştir. Auramine/Rhodamine boyama yöntemi için duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değer sırasıyla %94,7 %98 %78,2 ve %99,6 olarak belirlediğini ifade etmiştir.

Alaşehir ve diğ. 2016 yılında yaptıkları çalışmada 62.456 rneği değerlendirmişlerdir. Kültür pozitif ve EZN pozitif 2497 (%4) rnek, kültür pozitif ve EZN negatif 5114 (%8,2) rnek, kültür negatif ve EZN pozitif 356 (%0,6) rnek, kültür negatif ve EZN negatif 54.489 (%87,2) rnek belirlediklerini ifade etmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre kültür referans yöntem olarak alındığında EZN boyama yöntemi için duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değer sırasıyla %32,8 %99,4 58,75 ve %91,4 olarak belirlemişlerdir.

Can'ın 2013 yılında yaptığı bir tez çalışmasında EZN boyama yönteminin özgüllüğünü (%99.85) Auramine O boyama yönteminin özgüllüğüne (%96.3) göre daha yüksek bulmuştur. Auramine O boyama yönteminin duyarlılığını (%64.7) ise EZN boyama yönteminin duyarlılığına (%49.02) göre daha yüksek bulmuştur.

Tarhan ve diğ. 2003'te yaptıkları bir çalışmada 311 balgam örneğinin 103(%33)'nde kültür pozitifliği belirlemişlerdir. EZN boyama yöntemiyle kültür

pozitif 103(%33) örneğin 89(%86,4)'unda, kültür negatif 208 (%66,88) örneğin 8 (%3,8)'inde ARB görüldüğünü ifade etmişlerdir. Kültür pozitif 14 (%13,6) örneği EZN boyama yöntemiyle, 200 (%96,2) örneği ise hem EZN boyama yöntemiyle hem de kültür yöntemiyle ARB negatif olarak belirlemişlerdir. Auramin/Rhodamine boyama yöntemiyle kültür pozitif örneklerin 77 (%74,8)'sinde, kültür negatif örneklerin ise 24 (%11,5)'ünde ARB varlığını saptamışlardır. Kültür pozitif 26 (%25,2) örneği Auramine/Rhodamine boyama yöntemiyle, 184 (%88,5) örneği ise hem kültür hem de Auramine/Rhodamine boyama yöntemiyle ARB negatif olarak belirlemişlerdir. Bu sonuçlara göre kültürü referans yöntem kabul edilerek EZN boyama için duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %86,4 %96,2 olarak bildirmişlerdir. Auramine/Rhodamine boyama yöntemi için duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %74,8 %88,5 olarak bildirmişlerdir.

Verweij ve diğ. 2010'da Zambia'da yaptıkları bir çalışmaya 100 hastadan 271 balgam örneği almışlardır. 30 balgam örneğinde kültür pozitifliği belirlemişlerdir. 30 balgam örneğinin 17 (%56,7)'sini *M.tuberculosis* kompleks, 11 (%36,7)'ini tüberküloz dışı basil(NTM) olarak tanımlamışlardır. Kültür pozitif NTM olarak değerlendirilen 11 hastadan 3'ünü Auramine O boyama yöntemiyle, 1'ini hem Auramin-O hem EZN boyama yöntemiyle pozitif olarak belirlemişlerdir. Yapılan bu çalışmada MGIT kültür sistemini referans test olarak kabul etmişler ve sonuçları değerlendirdiklerinde Auramin-O için duyarlılığı %57,1 EZN boyama yöntemi için ise duyarlılığı %28,6 olarak bildirmişlerdir.

Bhadade ve diğ. 2015'te Hindistan'da yaptıkları bir çalışmada 800 balgam örneğinin 130'unu LED floresan mikroskop yöntemiyle 33'ünü EZN boyama yöntemiyle, 77'sini Lewenstein-Jensen kültür yöntemiyle ARB pozitif olarak belirlemişlerdir. Bu sonuçlar doğrultusunda kültür referans test olarak kabul edildiğinde LED floresan mikroskopinin duyarlılığını (%67,53) EZN boyama yönteminin duyarlılığına (%40,26) göre daha yüksek bulduklarını belirlemişlerdir. Ancak EZN yönteminin özgüllüğünü (%99,71) LED floresan mikroskopi yönteminin özgüllüğüne (%88,71) göre daha üstün bulduklarını ifade etmişlerdir.

Goyal ve diğ. 2013'te yaptıkları bir çalışmada floresan boyama yönteminin EZN boyama yöntemine göre daha duyarlı olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmaya 388

balgam örneği dahil etmişlerdir. Floresan boyama yöntemiyle toplam 57 balgam örneğini ARB pozitif olarak belirlemişlerdir. EZN boyama yöntemiyle toplam 29 balgam örneğini ARB pozitif olarak tanımlamışlardır. 28 balgam örneğini EZN boyama yöntemiyle ARB negatif, floresan boyama yöntemiyle ise ARB pozitif olarak belirlemişlerdir. 331 balgam örneğini hem EZN boyama yöntemiyle hem floresan boyama yöntemiyle ARB negatif olarak bildirmişlerdir. 29 balgam örneğini hem EZN boyama yöntemiyle hem floresan boyama yöntemiyle ARB pozitif olarak belirlemişlerdir.

Tedjo ve diğ. 2011'de Endonezya'da yaptıkları bir çalışmaya 30 hasta örneği dahil etmişlerdir. Kültür pozitif 22 örneğin, EZN boyama yöntemiyle 20'(%67)sini ve auramine boyama yöntemiyle 23 (%77)'ünü ARB pozitif olarak değerlendirmişlerdir. Kültür negatif 8 örneğin 10(%33)'nunu EZN boyama yöntemiyle, 7(%23)'sini auramine boyama yöntemiyle ARB negatif olduğunu belirtmişlerdir. Bu sonuçlar doğrultusunda EZN boyama için duyarlılığı ve özgülüğü sırasıyla %91 ve %100, Auramine boyama yöntemi için duyarlılığı ve özgülüğü sırasıyla %100 ve %88 olarak belirlediklerini ifade etmişlerdir.

Marais ve diğ. 2008 yılında Hollanda'da yaptıkları bir çalışmada MGIT ve LJ kültür sistemlerini referans test olarak kabul etmişlerdir. LED floresan mikroskop, EZN boyama yöntemi ve civalı floresan mikroskop yöntemini karşılaştırmışlardır. EZN boyama yöntemi, LED floresan mikroskop ve civalı floresan mikroskop yöntemlerinin duyarlılıklarını sırasıyla %61,1 %84,7 ve %73,6 olarak bildirmişlerdir. EZN boyama yöntemi, LED floresan mikroskop ve civalı floresan mikroskop yöntemlerinin özgülüklerini sırasıyla %98,9 %98,9 ve %99,8 olarak bulmuşlardır. Yayıması yapılan preparatların inceleme süresini her bir yayma için EZN ile 3.6 dakika ve LED floresan mikroskop ile 1.4 dakika olarak hesaplamışlar ve floresan mikroskop yönteminin %61 daha fazla zaman kazandırdığını belirlemişlerdir.

Laifangbam ve diğ. 2009'da yaptıkları çalışmaya klinik tanıli tüberkülozu olan 102 hasta örneği dahil etmişlerdir. EZN boyama yöntemi, auramin-O boyama yöntemi ve kültür yöntemi ile sırasıyla 45, 73 ve 72 örneği ARB pozitif olarak değerlendirmişlerdir. EZN yayma pozitifliği oranı ve auramine-O yayma pozitifliği

oranını sırasıyla %44,51 (45/102) ve %71,6 (73/102) olarak belirlemişlerdir. Her iki boyama yöntemi de kullanılarak kombine yayma pozitifliğini %72,5 (74/102) olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları doğrultusunda floresan mikroskopi ile kültür arasında 97/102 (%95,51) uyum, 5/102 (%4,9) uyumsuzluk olduğunu ifade etmişlerdir. Kültür pozitif 72 örnekten 43'üne EZN boyama yöntemi ile tanı koymuşlardır. EZN tarafından yanlış negatif olarak değerlendirilen 29 örneği kültür ile doğrulamışlardır. 71/102 (%69,6) örnek ile uyum, 31/102 (%30,4) örnek ile uyumsuzluk olduğunu belirtmişlerdir. Auramine-O boyama yönteminin yanlış negatif oranı %2,78 iken EZN yanlış negatif oranını %40,27 olarak bildirmişlerdir.

Lehman ve diğ. 2010'da Kamerun'da yaptıkları bir çalışmaya 300 balgam örneği dahil etmişlerdir. EZN boyama yöntemiyle ARB negatif olarak tanımladıkları 17 örneği, floresan mikroskop yöntemi ile ARB pozitif olarak bulmuşlardır. 100 (%33,3) balgam örneğini floresan mikroskop yöntemiyle ARB pozitif, 83 (%27,7) balgam örneğini EZN boyama yöntemiyle ARB negatif olarak bulmuşlardır. Bu sonuçlar doğrultusunda floresan mikroskopinin duyarlılığını, EZN boyama yöntemine göre daha yüksek olarak değerlendirdiklerini ifade etmişlerdir.

Holani ve diğ. 2014'te yaptıkları çalışmaya 50 balgam örneği ve 50 tükürük örneği olmak üzere toplam 100 örnek dahil etmişlerdir. 50 tükürük örneğinin EZN ile boyandığında %10 pozitiflik gösterdiğini, AR boyama yöntemiyle ise %76 pozitiflik gösterdiğini ifade etmişlerdir. 50 tükürük örneğinden AR boyama yöntemiyle 41(%82)'ini, EZN boyama yöntemiyle ise 5 (%10)'ini ARB pozitif olarak bulmuşlardır. 50 balgam örneğinin tamamını AR boyama ve EZN boyama yöntemiyle pozitif bulmuşlardır. LJ kültür ortamında 50 balgam örneğinin %88'inin üreme gösterdiğini, 50 tükürük örneğinin ise %60'ının kültürde üreme gösterdiğini ifade etmişlerdir. Ki-kare testi kullanarak yaptıkları istatistiksel analizde AR boyama yönteminin duyarlılığı için değeri anlamlı bulduklarını belirtmişlerdir ($p<0.001$).

Çalışmamızda 100 hasta örneği için kültür altın standart kabul edilerek yapılan değerlendirme sonucunda; EZN boyama yöntemi için duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer, negatif prediktif değer sırasıyla %78, %94, %92.86 ve %81.03 olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda kullanılan EZN boyama yönteminin duyarlılığı Oğuz ve diğ., Marais ve diğ.'nin belirledikleri değerlerden daha yüksek, Tedjo ve diğ.'nin belirledikleri değerden daha düşük bulunmuştur. Tarhan ve diğ., yaptıkları çalışmada EZN boyama yönteminin duyarlılığını %86.4 olarak belirlemişler ve bu sonuç bizim çalışmamıza en yakın değer olarak belirlenmiştir. EZN boyama yönteminin özgüllüğünü ise Demirool'un yaptığı çalışmada %99.8 olarak, Bhadade ve diğ.'nin yaptığı çalışmada ise %99.71 olarak belirlenirken bizim çalışmamızda %94 olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda 100 hasta örneği için kültür altın standart kabul edilerek yapılan değerlendirmede AR boyama yöntemi için duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değer sırasıyla %92, %84, %85.19 ve %91.3 olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda belirlenen AR boyama yönteminin duyarlılığını Tarhan ve ark., Bhadade ve ark. sırasıyla %74,8 ve %67,3 olarak belirlemişler ve bu sonuçlar bizim çalışmamızın AR boyama yönteminin duyarlılık sonucuna göre daha düşük bulunmuştur. Tedjo ve ark.'nin yaptığı çalışma sonucuna göre duyarlılığı %100 olarak belirlemişler ve bu sonuç bizim çalışmamıza göre daha yüksek bulunmuştur. Demirool'un yaptığı çalışmayla bizim sonucumuz büyük ölçüde uyumlu bulunmuştur.

Duyarlılık değer aralığının bahsi geçen çalışmalarda değişken olduğu (AR için; %67.3-%94.7 ve EZN için %28.6-%91) görülürken özgüllük sonuçlarının ise değer aralıklarının birbirine oldukça yakın olduğu görülmektedir. Duyarlılığın değişken aralıklara sahip olması; incelenen örneğin türü, hastalığın şiddeti, örnekteki mikobakteri sayısı, örneğin toplanma şekli, yaymanın kalınlığı, raporlandırma yapan kişinin tecrübesi gibi etkenlerden kaynaklanabilir.

Çalışmamızda EZN boyama ve AR boyama yönteminin duyarlılıkları arasında önemli derecede fark olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda AR boyamanın duyarlılığı %92 olarak belirlenirken, EZN yönteminin duyarlılığı %78 olarak belirlenmiştir. AR boyama yönteminin duyarlılığı %14 farkla EZN boyama yöntemine göre daha yüksek olarak hesaplanmıştır. Yapılan birçok çalışmaya göre yüksek bir sonuç olarak değerlendirilebilir. Can'ın yaptığı çalışmaya göre AR boyama yönteminin duyarlılığını %15.5 fark ile EZN boyama yönteminin

duyarlılığına göre daha yüksek bulmuştur. Çok daha yüksek bir fark bulan Marais ve ark.'nın yaptığı çalışmaya göre ise AR boyama yönteminin duyarlılığını %23.6 farkla EZN boyama yönteminin duyarlılığına göre daha yüksek olarak hesaplamışlardır. Çalışmamızda AR boyama yönteminin duyarlılığında EZN boyama yönteminin duyarlılığına göre önemli bir artış olduğu belirlenmiş ve bu artışın yapılan birçok çalışmayla paralellik gösterdiği görülmüştür. Çalışmamızda EZN boyama yönteminin özgüllüğü, AR boyama yönteminin özgüllüğüne göre daha yüksek bulunmuştur. EZN boyamanın özgüllüğü yüksek bir yöntem olduğu yapılan çalışmalarla da desteklenmiştir.

Yapılan birçok çalışmaya göre daha istisnai bir sonuç bulan Tarhan ve ark. AR boyama yönteminin duyarlılığını (%74.8), EZN boyama yönteminin duyarlılığına (%86.4) göre daha düşük olarak belirlemişlerdir. Çalışma sonucunun farklılığının örneğin kontaminasyonu, kişinin tecrübesi ve dekolarizasyon işlemlerindeki aksamalardan kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda kültürü pozitif olan 50 örneğin 4'ünde AR boyama yöntemiyle, 11'inde EZN boyama yöntemiyle aside dirençli basil görülmemiştir. Bunun nedeni olarak homojenizasyon/dekontaminasyon işlemlerinin süresinin uzun tutulması veya kültür yönteminin duyarlılığının daha yüksek olması nedeniyle pozitif sonuç verdiği düşünülmüştür.

Çalışmamızda kültür negatif 50 klinik örnekten 2'si balgam ve 1'i BAL olmak üzere hem EZN boyama yöntemiyle hem de AR boyama yöntemiyle ortak olarak ARB(+) kabul edilmiştir. Pozitif bir kültür elde etme olasılığı örnekteki ARB sayısı ile ilgilidir. Bu sonuç düşük mikobakteri sayısına sahip örneklerin aşırı dekontamine olma eğilimi göstermesiyle yanlış negatif kültürler neden olabileceği şeklinde açıklanabilir. Bhadade ve diğ. yapmış olduğu çalışmada aşırı dekontaminasyonu iş yükünün fazla olduğu laboratuvarlarda örtük motivasyonun bir sonucu olabileceğini de ifade etmiştir (Bhadade 2015).

Bizim çalışmamızda her bir yayma preparat için inceleme süresi FM ile 2.8 dk, ışık mikroskobu ile 5.4 dk olarak hesapladık. Marais ve ark. bir yayma preparat için inceleme zamanını LED FM ile 1.4 dk, ışık mikroskobu ile 3.6 dk olarak bizden

daha kısa bir sürede değerlendirmişlerdir. Burada önemli olan yayma preparatın AR boyama ve FM kullanımı ile daha kısa sürede incelenebiliyor olmasıdır. Yapılan çalışmaların tamamında FM ile yayma preparat inceleme süresi daha kısa hesaplanmıştır. Bunun nedeni FM ile x40'lık objektifte incelenerek birim zamanda daha çok alan taranabiliyor olmasındandır.

Basillerin taranması için AR boyamayla birlikte FM kullanımında düşük büyütme kullanıldığı için floresan eserler ve artefaktlar zaman zaman artabilmektedir. Ancak bu riski $KMNO_4$ kullanarak büyük ölçüde azalttığımızı düşünmekteyiz.

Holani ve ark., Lehman ve ark. ve Goyal ve ark. AR boyama yönteminin duyarlılığını EZN boyama yönteminin duyarlılığına göre daha yüksek bulmuşlardır. Bu sonuçların bizim çalışmamızla paralel olduğu görülmüştür. AR boyamanın artmış duyarlılığının mikolik aside afinitesinin EZN boyamadan daha güçlü olabileceğini düşündürmektedir. EZN boyama yönteminin duyarlılığının düşük olması yanlış negatiflik oranını arttırmaktadır. Bu durum EZN boyama yönteminin dezavantajları arasında kabul edilebilir. Yanlış negatif sonuçlar tanı ve tedavi sürecinde gecikmelere ve toplumdaki sağlıklı bireylere bulaş riski enfeksiyonun kontrolünde ve yayılımının engellenmesinde başarısızlıklara neden olacaktır.

Bizim çalışmamızda da birçok çalışmada olduğu gibi AR boyama yönteminin özgüllüğü EZN boyama yönteminin özgüllüğüne göre daha düşük olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda AR boyama yönteminin özgüllüğünün düşük olması yanlış pozitiflik oranını arttırmaktadır. Bu durum AR boyama yönteminin dezavantajıdır. Yanlış pozitif sonuçlar hastaya yanlış tanı koymaya ve hastanın gereksiz yere tedavi almasına neden olacaktır. Altı aylık TB tedavisinin ciddi yan etkileri olmakla birlikte hayatı tehdit eden yan etkilerin görülme sıklığı oldukça seyrekdir. Bir başka dezavantajı ise Uluslar Arası Kanser Araştırma Ajansının karsinogenik risklerin değerlendirilmesine ilişkin monograflarına göre auramine kanserojen ajanlar içeren Grup 2B'de sınıflandırılmıştır. Auramine'e maruz kalma ile kanser riski arasındaki ilişki henüz kanıtlanmamış olmakla birlikte mesane ve prostat kanserlerinin insidansındaki artışla ilişkili olduğu düşünülmektedir. [(<https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono100F-12.pdf>)]

Bu sonuçlar doğrultusunda duyarlılık ve özgüllük arasında bir ödün verilmesi gerekiyorsa artmış duyarlılığın altını çizmek gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde;

1. AR boyama yönteminin, EZN boyama yöntemine göre daha duyarlı olduğu ancak EZN boyama yönteminin AR boyama yöntemine göre özgüllüğünün daha yüksek olduğu bulunmuştur.
2. AR boyama yönteminin negatif prediktif değerinin EZN boyama yöntemine göre daha yüksek, EZN boyama yönteminin pozitif prediktif değeri ise AR boyama yönteminin pozitif prediktif değerine göre daha yüksek bulunmuştur.
3. Mikroskopta alan tarama süreleri karşılaştırıldığında AR boyama yöntemiyle boyanan preparatlar için gereken süre daha kısa bulunmuştur.
4. Sonuç olarak EZN boyama yöntemiyle tüberküloz tanısı koymak zaman alıcı olmakla birlikte iş yükü fazla olan laboratuvarlarda tüm örneklerin EZN ile tespit edilip doğru sonuçlar vermesi son derece zordur. Bu iş yükü daha hızlı sonuç veren AR boyama yöntemi ile FM kullanılarak pozitif olarak belirlenen örnekleri EZN boyama yöntemiyle doğrularak azaltılabilir.
5. Enfeksiyonunun kısa sürede belirlenmesi tüberküloz kontrol programlarının da başarısını arttırabilir.

KAYNAKLAR

- World Healty Organization, Global Tuberculosis Report, 2018, WHO/CDS/TB/2018.20
- Murray P R, Rosenthal K S, Pfaller A M, Başustaoğlu A C. (Ed). Klinik Mikrobiyoloji (Medical Microbiology), 2010, sy. 277-290
- Özkara ŞV. Tüberküloz Sempozyumu ve VI. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Dünyada ve Türkiye’de Tüberküloz, 18-21 Ekim 2007;15-21.
- Upadhyaya SK, Pant ND, Bhandari R, Poudel A, Shrestha B. *Braz J Infect Dis.* 2016 Sep-Oct;20(5):522-3
- Daniel T M. The history of tuberculosis, *Respiratory Medicine*, (2006) 100, 1862–1870
- Kara F, 2018 Türkiye’de Verem Savaşı Raporu, Türkiye Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü (THSGM/2018)
- Jarlier V, Nikaido H. Mycobacterial cell-wall structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett* 1994; 123: 11-8.
- Van Deun A, Hossain MA, Gumusboga M, Rieder HL. Ziehl-Neelsen staining: theory and practice. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008; 12: 108-10.
- Ryll R, Kumazawa Y, Yano I. Immunological properties of trehalose dimycolate (cord factor) and other mycolic acid-containing glycolipids - a review. *Microbiology Immunology* 2001; 45: 801-11.
- Somoskovi A, Hotaling JE, Fitzgerald M, Donnel O D, Parsons L M, Salfinger M. Lessons from a proficiency testing event for acid-fast microscopy. *Chest*, 2001 Jul;120(1):250-7
- Jarzembowski JA, Young MB. Nontuberculous mycobacterial infections. *Archives of Pathology Laboratory Medicine*, 2008; 132: 1333-41.
- Yaman M. Tüberküloz Patogenezi, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Erişkin ve Çocukta Tüberküloz Sempozyumu, 30 Nisan 1999, İstanbul, syf 15-20
- Rieder H L. Reconciling historical, epidemiological, bacteriological and immunological observations in tuberculosis. *International Journal of Epidemiology*. 2008; 37: 932-4.
- Dannenberg AM: Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Reviews of Infectious Diseases*, 1989; 11: pp 369-378.

- Özbal Y. Tüberküloz immünolojisi, *Erciyes Tıp Dergisi*, 2006 28 (1), 025-034.
- Kauffman SH, Cole ST, Mizrahi V, Rubin E, Nathan C. Mycobacterium tuberculosis and the host response. *Journal of Experimental Medicine*, 2005; 201: 1693-7.
- World Healty Organization, Global Tuberculosis Report, 2008, WHO/HTM/TB/2008.393
- Kauffman SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis, *Nature Reviews Immunology* 2001; 1: pp 20-30.
- Janeway CA Jr, Travers P. Macrophage activation by armed inflamatory CD4-T cells. In: *Immunobiology-The immune system in health and disease*, 1994; 1-49 / 14-17
- Stenger S, Modlin RL. T cell mediated immunity to mycobacterium tuberculosis, *Current Opinion in Microbiology*, 1999; 2: pp 89-93.
- Kıyan M, Mycobacteriaceae, Ustaçelebi Ş (Ed), Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, 1999; syf 419-455
- Kılıçaslan Z, Dünyada ve Türkiye' de Tüberküloz, *ANKEM Dergisi*, 2007, 21(Ek2), 76-80.
- Toman's Tuberculosis, Case Detection, Treatment and Monitoring: Questions and Answers, Edited by T. Frieden. 2nd ed. 2004
- Oğuz V A, Sezak N, Öztop A, Yapar N, Sürücüoğlu S, Yüce A. A comparison of two different fuorochrome stains for the detection of acid-fast bacilli in sputum specimens, *Turk Journal of Medical Science*, 2011; 41 (3): pp 411-417
- Koksall F, Yaman A. Farklı bir bakteri topluluğu mikobakterilerde hücre duvar yapısı. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu, 2003, Samsun, Sempozyum Kitabı: syf 34-47.
- Gümüşlü F, Ceyhan İ, Kocagöz T, Sönmez N. Tüberküloz Laboratuvar Rehberi. Ankara: T.C Sağlık Bakanlığı, 1998 : 1-20.
- Smithwick RW. Laboratory Manual for Acid Fast Microscopy, CDC, Second Edition 1976.
- Baylan O. Tüberkülozun kültüre dayalı tanı yöntemleri, *Mikrobiyoloji Bulteni*. 2005;39:107-124.
- Pfyffer GE, Brown-Elliott BA; Wallace RJ, Vincent V, Jost KC. Mycobacterium. General characteristics, isolation and Strainingprocedures. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editör. Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. ASM Press, Washington. 2003; 532-59.

Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı, 2002; 571-595.

Isenberg HD (ed). Clinical Microbiology Procedures Handbook. Newyork. Second edition. Washington,D.C. ASM; 2004.

Martin A, Bombeeck D, Fissette K, Rijk P D, Neuta I H, Portillo P D, Palomino J C. Evaluation of the BD MGIT TBc Identification Test (TBc ID), a rapid chromatographic immunoassay for the detection of Mycobacterium tuberculosis complex from liquid culture, *Journal of Microbiological Methods*, 2011; 84: syf 255–257.

Siddiqi S H. BACTEC 460TB System Product and Procedure Manual. Becton Dickinson and Company Maryland, USA, 1996.

BACTEC MGIT 960 System, User's Manuel. Becton Dickinson. Sparks, Maryland, USA 2004.

Uzun M, Örneklerin İşlenmesi ve Kültür Yöntemleri, 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun, 2003

Sürücüoğlu S. Tüberküloz Basilinin İdentifikasyonu, 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun, 2003

Winn WC, Allen SD , Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods HL, editör. Mycobacteria. Koneman's ColorAtlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6 th ed. Lippincott Company, Philadelphia. 2006: 1065-1126.

Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi (UTTR), T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı. 2014. ([<https://www.toraks.org.tr/uploadFiles/12112014161127-UTTR.pdf>])

CLSI. Laboratory Detection and Identification of Mycobacteria; Approved Guideline, CLSI document M48-A. Wayne PA (ed). Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

Moore DF, Curry JI. Detection and identification of Mycobacterium tuberculosis directly from sputum sediments by ligase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1028-1031.

Cheng VC, Yew WW, Yuen KY. Molecular diagnostics in tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24: 711-720.

Alp A. Tüberkülozun laboratuvar tanısında güncel durum. *Hacettepe Tıp Derg* 2011;42: 28-33.

Demirel M. 2010, Tüberküloz Tanısında Ehrlich-Ziehl-Neelsen ve Auramine-Rhodamine Boyama Yöntemlerinin Karşılaştırılması. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.

Alaşehir E A, Balıkcı A, Partal M, Çatmabacak G, Yaman G. Süreyyapaşa Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesimikobakteri mikroskopi ve kültür sonuçlarının değerlendirilmesi: Üç yıllık analiz, *Tüberküloz ve Toraks*, 2016.

Can Ş. 2013, Tüberküloz Tanısında Led Floresan Mikroskop Yöntemi ve Ziehl-Neelsen Yönteminin Karşılaştırılması, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi

Tarhan G, Ordulu L, Gümuşlü F, Ceyhan I ve Cesur S (2003). Comparison of auramin rhodamine and Erlich-Ziehl-Neelsen staining methods for the diagnosis of tuberculosis. *Mikrobiyol Bul*, 37(2-3), 131-136.

Verweij K E, Kamerik A R, Ingen J V, Dijk J H V, Sikwangala P, Thuma P, Nouwen J L, Soolingen D V. Application of modern microbiological diagnostic methods for tuberculosis in Macha Zambia 2010, *International Journal of Tuberculosis Lung Disease*, 14(9):1127-1131

Bhadade A, Mehta P, Kanade S, Nataraj G. Utility of light-emitting diode microscopy for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in HIV infected patients, *International Journal of Mycobacteriology* 4, 2015, pp 31-35, India

Goyal R, Kumar A. 2013, A Comparison of Ziehl-Neelsen Staining and Fluorescent Microscopy for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis, *Journal of Dental and Medical Sciences*, pp 05-08

Tedjo A, Karuniawati A, Riyanto A S, Ibrahim A S. Examination of acid-fast bacilli in sputum using modified light microscope with homemade light emitting diode additional attachment, *Makara, Kesehatan*, December 2011: pp 81-85

Marais BJ, Brittle W, Painczyk K, Hesselning AC, Beyers N, et al. Use of light-emitting diode fluorescence microscopy to detect acid-fast bacilli in sputum. *Clinic Infectious Disease*, 2008;47:203-207.

Laifangbam S, Singh H L, Singh N B, Devi K M, Singh N T. A comparative study of fluorescent microscopy with Ziehl-Neelsen staining and culture for the diagnosis of pulmonary tuberculosis, *Kathmandu University Medical Journal*, 2009, Vol. 7, No. 3, Issue 27, 226-230, India.

Lehman LG, Ngapmen Yamadji AL, Ngo Sack F, Bilong Bilong CF. The CyScope(R) fluorescence microscope, a reliable tool for tuberculosis diagnosis in resource-limited settings. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;83:906–908.

Holani A G, Ganvir S M, Shah N N, Bansode S C, Shende V , Jawade R , Bijjargi S C. Demonstration of *Mycobacterium Tuberculosis* in Sputum and Saliva Smears of Tuberculosis Patients Using Ziehl Neelsen and Flurochrome Staining- A Comparative Study, *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 2014 Jul, Vol-8(7): ZC42-ZC45

International Agency for Reseach on Cancer. Auromine and manufacture of auromine. [<https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono100F-12.pdf>], July 2010.

