

MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

TÜBERKÜLOZ TANISINDA LED FLORESAN MİKROSKOPİNİN
PERFORMANSININ DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Gizem ADISANLI

Tez Danışmanı
Prof. Dr.Süheyla SÜRÜCÜOĞLU

Manisa, 2020

ÖNSÖZ

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda sürdürdüğüm uzmanlık eğitimim süresince verdikleri destek ve katkılarından dolayı başta tez danışmanım Prof. Dr. Süheyla SÜRÜCÜOĞLU'na ve değerli hocalarım Prof. Dr. Nuri ÖZKÜTÜK'e, Prof. Dr.Semra KURUTEPE'ye, Prof. Dr. Hörü GAZİ'ye, Prof. Dr. Sinem AKÇALI'ya, Prof. Dr. Kenan DEĞERLİ'ye ve Doç. Dr.Talat ECEMİŞ'e,

Dört yıl boyunca çalışmalarımızı uyumlu bir şekilde yürüttüğümüz, iyi ve kötü zamanlarda birbirimize destek olduğumuz asistan arkadaşlarıma ve Yeşim SOLAKOĞLU ve Sibel HURMA başta olmak üzere tüm teknisyen arkadaşlarıma,

Her zaman yanımda olan ve maddi manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme,

En içten teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Dr.Gizem ADISANLI

Manisa 2020

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Epidemiyoloji	3
2.1.1. Dünyada Tüberküloz Epidemiyolojisi	4
2.1.2. Ülkemizde Tüberküloz Epidemiyolojisi	5
2.2. Tüberküloz Kontrolü	6
2.3. Tüberkülozdan Korunma	7
2.4. Etiyoloji	9
2.4.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Kompleksi	10
2.4.2. Morfoloji	10
2.5. Tüberkülozun Laboratuvar Tanısı	13
2.5.1. Örneklerin Alınması ve Taşınması	15
2.5.2. Örneklerin İşlenmesi	20
2.5.3. Mikroskopik İnceleme	22
2.5.4. Kültür Yöntemleri	26
2.5.5. Tüberküloz Basillerinin İdentifikasyonu	28
2.5.5.1. Üreme Özellikleri	29
2.5.5.2. Biyokimyasal Testler	29
2.5.5.3. İnhibisyon Testleri	29
2.5.5.4. İmmünokromotografik Testler	29
2.5.5.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	30
2.5.5.6. MALDI-TOF MS	30
2.5.5.7. Moleküler İdentifikasyon	30
2.5.6. Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri	32
2.6. İlaç Duyarlılık Testleri ve Tüberküloz Tedavisi	33
III. GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1. Hasta Örnekleri	36
3.2. Örneklerin İşlenmesi	36
3.3. Mikroskopik İnceleme	37
3.4. Kültür	41
3.5. İmmünokromotografik test	42
3.6. İstatistiksel değerlendirme	43
IV. BULGULAR	44
V. TARTIŞMA	49
VI. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	56
VII. ÖZET	57
VIII. İNGİLİZCE ÖZET	58
IX. KAYNAKLAR	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Patogeneze dayalı TB epidemiyolojisi modeli

Şekil 2.2. Mikobakterilerin hücre duvar yapısı

Şekil 2.3. Yaymaların mikroskopik incelemesi



TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Akciğer tüberkülozu tanısında kullanılan örneklerin alınmasına ilişkin özellikler

Tablo 2.2. Örnek türlerine göre uygunsuzluk durumları

Tablo 2.3. Örneklerin dekontaminasyonu için kullanılan kimyasal maddeler ve kullanıldığı durumlar

Tablo 2.4. Mikroskopik inceleme değerlendirme kriterleri

Tablo 4.1. Klinik örneklerin dağılımı

Tablo 4.2. Klinik örneklerin mikroskopik inceleme ve kültür sonuçları

Tablo 4.3. EZN boyama ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması

Tablo 4.4. LED FM sonuçlarının kültür sonuçlarıyla karşılaştırılması

Tablo 4.5. EZN boyama ve LED FM'nin performans değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.6. EZN boyama ve LED FM sonuçlarının kantitatif olarak karşılaştırılması

Tablo 5.1. LED FM'nin bazı çalışmalardan elde edilen performans değerleri

KISALTMALAR DİZİNİ

AMS	: Açlık Mide Sıvısı
ARB	: Aside Dirençli Basil
BAL	: Bronkoalveolar Lavaj Sıvısı
BCG	: Bacillus-Calmette-Guerin
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention (Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri)
ÇİD TB	: Çok İlaça Dirençli Tüberküloz
DGTS	: Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization- WHO)
ETA	: Endotrakeal Aspirat
EZN	: Ehrlich-Ziehl-Neelsen
FM	: Floresan Mikroskopi
H	: İzonyazid
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
HRZE	: İzonyazid, Rifampisin, Pirazinamid, Etambutol
İDT	: İlaç Duyarlılık Testleri
KFM	: Konvansiyonel Floresan Mikroskopi
LED FM	: Light Emitting Diode Floresan Mikroskopi
LTBE	: Latent Tüberküloz Enfeksiyonu
MALDI-TOF MS	: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (Matriks aracılı lazer dezorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi)
MGIT	: Mycobacterium Growth Indicator Tube
MTBK	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleks
NAAT	: Nükleik Asit Amplifikasyon Testi
NALC	: N asetil L sistein
NaOH	: Sodyum Hidroksit

NPD	: Negatif Prediktif Değer
PANTA	: Polimiksin B, amfoterisin B, nalidiksik asit, trimetoprim, azlosilin
PCR	: (Polymerase Chain Reaction) Polimeraz zincir reaksiyonu
PPD	: Pozitif Prediktif Değer
R	: Rifampisin
TB	: Tüberküloz
TDM	: Tüberküloz Dışı Mikobakteri
YİD TB	: Yaygın İlaça Dirençli Tüberküloz



I. GİRİŞ

Tüberküloz (TB), yeni tanı yöntemleri ve antitüberküloz ilaçlara rağmen günümüzde halen küresel bir sağlık sorunudur (1). Önlenemez ve tedavi edilebilir bir hastalık olmakla birlikte, her yıl milyonlarca insan tüberkülozdan hayatını kaybetmektedir. Hastalığın yayılımının önlenmesi ve tedavi başarısı için hastalık etkeni olan *M. tuberculosis*'in mümkün olan en kısa sürede tanımlanması gereklidir. Tüberküloz tanısında altın standart yöntem kültürdür. Fakat kültür zaman alıcı bir yöntemdir. Bu nedenle akciğer tüberkülozu tanısında balgamın mikroskopik incelemesi en hızlı, en kolay ve en ucuz yöntem olarak tüm dünyada halen geçerliliğini korumaktadır. Mikroskopik inceleme tüberkülozun laboratuvar tanısında ve bulaştırıcı hastaları saptamada en önemli yöntemlerden biridir. Özellikle direkt mikroskopik inceleme pozitif olan akciğer tüberkülozlu hastalar, kendileri ile yakın ilişki içindeki kişiler için yüksek risk taşırlar. Mikroskopi sadece potansiyel bulaştırıcı vakaları saptamada değil, aynı zamanda tedavinin etkinliğinin izlenmesinde de yol göstericidir (2).

Akciğer TB tanısında balgamın mikroskopik incelemesinde 100 yılı aşkın süredir karbol fuksin boyama yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Işık mikroskoplarının kullanıldığı bu yöntemin özgüllüğü yüksek (%95) olmakla birlikte duyarlılığı %22-78 arasında değişmektedir (3). Mikroskopinin duyarlılığı çeşitli faktörlerden etkilenir. Hastalığın şiddeti, örnek tipi, örnek toplama kalitesi, örnekteki basil sayısı, örnek işleme yöntemi, boyama yöntemi ve incelemenin kalitesi bu faktörler arasındadır. Negatif sonuç vermek için ışık mikroskopunda en az 300 alan incelenmelidir. Bu nedenle doğru yapıldığında karbol fuksin boyama yöntemi zaman alıcı ve iş yükünü artırıcıdır. Diğer bir boyama yöntemi ise floresan mikroskopların kullanıldığı florokrom boyama yöntemidir (3). Bu yöntemde koyu zeminde floresans veren basillerin saptanması daha kolay olduğundan daha düşük büyütmede

tarama yapılabilir. Böylelikle karbol fuksin boyama yöntemine göre daha az sayıda alan daha kısa sürede taranabilir. Yapılan çalışmalarda florokrom boyama yönteminin karbol fuksin boyama yönteminden %10 daha duyarlı olduğu, özgüllüklerinin ise benzer olduğu bildirilmiştir (4). Bu nedenle özellikle yüksek insidanslı ülkelerde ve iş yükü yüksek olan laboratuvarlarda florokrom boyama yönteminin kullanılması önerilmektedir. Ancak bu yöntemin bazı dezavantajları vardır; floresan mikroskoplar pahalıdır, bakımları zordur, karanlık oda gerektirir, aydınlatmada kullanılan civa buharlı lambalar kısa ömürlü ve toksiktir. Floresan mikroskoba alternatif olarak geliştirilen LED (Light emitting diodes) mikroskoplar ise floresan mikroskoplara oranla daha ekonomik, daha düşük bakım gereksinimi olan, daha az elektrik harcayan ve pille çalışabilen cihazlardır. LED ampullerin yarı ömrü uzundur ve ultraviyole ışık üretmez. Aynı zamanda inceleme için karanlık oda gerekmez. Ancak inorganik materyallerin florokrom boya ile boyanma olasılığı nedeni ile yalancı pozitiflikler görülebilir.

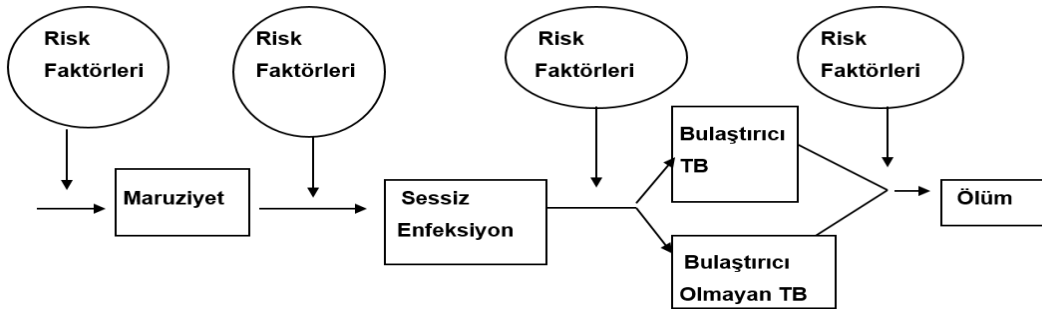
Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2011 yılında floresan mikroskop kullanan laboratuvarlarda LED mikroskoplara geçilmesini öneren bir politika yayınlamıştır (4). Bu politikada ışık mikroskobu kullanan laboratuvarlar için de aşamalı olarak LED mikroskoplara geçilmesi önerilmiştir. Bu önerilere rağmen LED mikroskopların kullanımı ışık mikroskopları veya konvansiyonel floresan mikroskoplar kadar yaygın değildir. Dünyada LED mikroskopların rutin kullanımına dair veriler sınırlıdır. Ülkemizde Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı Daire Başkanlığı tarafından uygulanan bir ankete göre ise 2013 yılında mikroskopik inceleme yapan 385 laboratuvardan sadece ikisinde LED floresan mikroskop kullanıldığı bildirilmiştir (5).

Bu çalışmanın amacı akciğer tüberkülozu kuşkusu olan hastaların solunum yolu örneklerinin mikroskopik incelemesinde LED floresan mikroskopi ile EZN boyama yöntemini karşılaştırmak ve kültür sonuçları referans alınarak LED floresan mikroskopinin performansını araştırmaktır.

II. GENEL BİLGİLER

2.1. Epidemiyoloji

Tüberküloz dünyada en çok mortalite ve morbiditeye yol açan hastalıklardan biri olduğundan hastalıkla mücadelede epidemiyolojik verilerin büyük önemi vardır. Tüberküloz epidemiyolojisi, TB enfeksiyonu ve hastalığının zaman içindeki gelişimini inceler ve hastalığın kontrol altına alınabilmesi için gerekli temel bilgiyi sağlar. Tüberküloz patogenezinde başlıca iki ana evre vardır. Bunlardan birincisi bulaşma ve enfeksiyon evresi, diğeri ise enfeksiyondan hastalığa geçiş evresidir (6). Şekil 2.1'de TB'nin patogeneze dayalı epidemiyolojik modeli gösterilmiştir. Buradaki modelde görüldüğü gibi bulaştırıcı bir hastayla temas ile başlayan süreç, ölüme kadar değişen evrelerde çeşitli risk faktörlerinden etkilenmektedir.



Şekil 2.1. Patogeneze dayalı TB epidemiyolojisi modeli

Tüberküloz hastalığının risk faktörleri; basille karşılaşma riskini etkileyen faktörler ve enfeksiyondan hastalığa geçişi kolaylaştıran faktörler olarak iki grupta toplanabilir. Tüberküloz basili ile enfekte olma riski kişinin bulaştırıcı bir hasta ile karşılaşma süresine ve kişinin bağışıklık sistemini

etkileyen faktörlere bağlıdır. Hastalığın bulaşmasında asıl sorumlu olan olgular balgam yayması pozitif olanlardır. Bu olguların bir yıllık sürede ortalama 12-20 kişiyi enfekte ettiği bilinmektedir. Enfeksiyonun hastalığa dönüşmesini kolaylaştıran faktörler arasında yoksulluk gibi düşük sosyoekonomik yaşam koşullarının yanı sıra HIV/AIDS, diyabet, son dönem böbrek yetersizliği, silikozis, bazı kanserler, organ transplantasyonları, bağışıklığı baskılayan tedaviler gibi birçok tıbbi durum sayılabilir (6).

2.1.1. Dünyada Tüberküloz Epidemiyolojisi

M. tuberculosis, son 100 yılda 100 milyondan fazla insanın ölümüne neden olmuştur. Batı ülkelerinde 18. ve 19. yüzyıllarda ciddi salgınlara ve ölümlere yol açan bu hastalık, 20. yüzyıl başlarından bu yana tedaviden bağımsız olarak azalmaya başlamıştır. Az gelişmiş ülkelerde ise 20. yüzyılda yayılmaya başlamış ve salgının tepe noktasına yeni ulaşılmıştır.

Tüberkülozun küresel yükü çok büyüktür. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2019 Küresel Tüberküloz Raporu verilerine göre (1) 2018 yılında 10 milyon kişi TB hastalığına yakalanmıştır. Küresel TB insidansı ortalama yüzde 130'dur. Hastalık yükü ülkeler arasında büyük farklılıklar göstermektedir. Bu oran bazı ülkelerde yüzde 5 iken, bazı ülkelerde yüzde 500'den fazladır. Coğrafik olarak 2018 yılında TB olgularının çoğu Güney Doğu Asya (%44), Afrika (%24) ve Batı Pasifik'ten (%18) bildirilmiştir. Toplam vakaların üçte ikisi sekiz ülkede (Hindistan, Çin, Endonezya, Filipinler, Pakistan, Nijerya, Bangladeş ve Güney Afrika) görülürken, yalnızca %3'ü Avrupa Bölgesi'nde ve %3'ü Amerika'da görülmüştür. 2018 yılında 1,4 milyon kişi TB'den hayatını kaybetmiştir. Tüberküloza bağlı ölümlerin %95'i düşük ve orta gelirli ülkelerde olmuştur. Ölen 251.000 hasta HIV pozitifdir. HIV pozitif olguların %72'si Afrika kıtasında yaşamaktadır. Küresel olarak HIV-TB koenfeksiyonu oranı %8.6'dır.

İlaca dirençli TB önemli bir sağlık sorunudur. 2018 yılında rifampisine (R) dirençli yarım milyon yeni olguya tanı konmuştur. Bu olguların %78'i çok ilaca dirençli TB (ÇİD-TB) dir. ÇİD-TB olgularının yaklaşık yarısı Hindistan

(%27), Çin (%14) ve Rusya Federasyonu'nda (%9) görülmüştür. Küresel olarak yeni TB olgularının %3.4'ü ve önceden tedavi almış olguların %18'i R dirençli veya ÇİD-TB'dir (1).

Tüberkülozda hasta bildirim hastalığın kontrolü için büyük önem taşımaktadır. Ancak küresel olarak yeni vakaların ancak %64'ünün raporlandığı, kayıtsız hasta sayısının ise üç milyon olduğu tahmin edilmektedir (1). Kayıp vakaların ise en çok Hindistan, Endonezya ve Nijerya'dan olduğu tahmin edilmektedir. Bu ülkelerde hastalığın tanısı ve tedavinin başlatılabilmesi için bildirim sisteminin iyileştirilmesine yönelik yoğun çaba gereklidir. Bakteriyolojik olarak doğrulanmış olguların oranı da izlenmelidir. 2018 yılında akciğer TB olgularının sadece %55'i bakteriyolojik tanı almıştır (1). Yüksek geliri olan ülkelerde en duyarlı tanı testlerinin yaygın kullanımı ile akciğer TB olgularının %80'i bakteriyolojik olarak doğrulanmıştır. Tüberkülozun neden olduğu küresel hastalık yükü yıllık olarak %2,7 düşmektedir. Ancak bu yeterli bir rakam değildir. Bu oran yıllık %4-5 olmalıdır. Sosyal koruma sağlamanın ve aşırı yoksulluğu ortadan kaldırmanın TB insidansını önemli ölçüde azaltabileceği gösterilmiştir (7). Küresel çabalar, etkili tanı ve tedavi ile 2000 yılından beri tahmini olarak 54 milyon hayat kurtarılmıştır. Ancak insidansdaki düşüşler DSÖ'nün hedefi olan 2030 yılına kadar tüm dünyada TB insidansının %90 azaltılmasına ulaşmak için yeterli düzeyde değildir. 21. yüzyılda milyonlarca insanın bu önlenemez ve iyileştirilebilir hastalıktan hayatlarını kaybetmesi kabul edilemez.

2.1.2. Ülkemizde Tüberküloz Epidemiyolojisi

Dünya Sağlık Örgütü 2019 verilerine göre (1), 2018 yılında Türkiye'de TB tanısı alan toplam hasta sayısı 13.000'dir. Bunlardan %92,2'si yeni olgu, %7,8'i önceden tedavi görmüş olgudur. Olguların %40'ı kadın, %54'ü erkek, %6'sı çocuktur. Klinik olarak %65'inde akciğer tutulumu vardır, %35'inde sadece akciğer dışı organ tutulumu vardır. Ülkemizde kayıtlı tüberküloz insidansında, son 10 yıllık ortalama düşüş %5'tir. 2005 yılında toplam kayıtlı hasta sayısı 20.535 ve insidans yüz binde 29,4 iken 2018 yılında insidans yüz binde 16'dır. 2018 yılında ülkemizde ÇİD TB sayısı 550, ÇİD-TB

insidansı yüzbinde 0.67 olarak belirlenmiştir. ÇİD-TB sıklığı yeni olgularda %3.5, önceden tedavi gören olgularda %12'dir.

Ülkemizde son 15 yıldır temaslı muayenesinde artış gözlenmektedir. Sağlık Bakanlığı Türkiye'de Verem Savaş 2018 Raporu'na (7) göre 2017 yılında hasta başına yapılan temaslı muayenesi sayısı 9,9 dur. Tüberkülozdan koruyucu ilaç tedavisi, tüm ülkede giderek artan oranda ve kalitede uygulanmaktadır. 2017 yılında TB'li hasta başına koruyucu tedavi verilen kişi sayısı 2,7'dir. Yine 2017 yılında TB hastalarının %71,2'sine HIV testi yapılmıştır ve 68 olguda sonuç pozitif saptanmıştır. 2016 yılı hastalarında tüm olgularda %85,4 tedavi başarısı saptanırken, bu oran önceden tedavi görmüş olgularda %67,2'dir. Yabancı ülke doğumlularda ise %76,4'tür. 2015 yılındaki ÇİD TB hastalarının 24. ayda tedavi başarısı ise %67,8'dir. Ülkemiz EndTB stratejisinin hedeflerini gerçekleştirmeyi amaçlamaktadır.

2.2. Tüberküloz Kontrolü

Dünya Sağlık Örgütü tüberküloz kontrolünde çeşitli politikalar geliştirmekte ve hedefler koymaktadır. Dünya Sağlık Asamblesi 2014 Mart ayında DSÖ'nün End TB Stratejisi'ni benimsemiştir (8). Bu strateji, tüberküloza karşı yürütülen mücadelenin güçlendirilmesini ve küresel tüberküloz salgını sonlandırmayı hedeflemektedir. Dünya Sağlık Örgütü tarafından geliştirilen bu strateji 2035'te tüberküloz insidansında %90 düşüş sağlamayı amaçlamaktadır. Bu strateji, sağlıkla ilgili Sürdürülebilir Gelişme Hedefleri'nin "Tüberküloz Salgını Sonlandırmak" başlığı altında yer almaktadır. Tüberkülozun tanı ve tedavisinde önemli başarılar sağlanmıştır. Bunun yanında TB'nin sadece tıbbi bir sorun veya halk sağlığı sorunu olmadığı, aynı zamanda yoksullukla ilişkili olduğu görülmektedir. Yoksulluk sürdükçe TB sorunu da devam edecektir. End TB Stratejisi, sağlık ve sosyal müdahaleleri bir bütün olarak içermektedir. Bu nedenle ülkelerin TB salgını bitirmek için hem sağlık kapsamını hem de sosyal koruma kapsamını birlikte güçlendirmesi gereklidir. Buna ek olarak; TB enfeksiyonu ve hastalığı tanısında hasta başı bir test, hastalık ve enfeksiyon tedavisinde daha kısa

sürelî ve daha iyi rejimler ve maruziyet öncesi ve sonrası aşı gibi yeni araçlara da ihtiyaç vardır.

Tüberküloz kontrolünün başlıca amaçları;

- Tüberküloz bulaşını azaltmak ve yeni hastaların ortaya çıkışını önlemek
- Hastalara erken tanı konulmasını sağlamak
- Hastaları iyileştirerek yaşam kalitelerini artırmak ve üretkenliklerini sağlamak
- Aktif tüberküloz hastalığı ya da geç dönem etkilerinden dolayı hastanın ölümünü önlemek
- İlaç direnci gelişimini önlemek
- İlaça dirençli olguları erken tanı ve etkili tedavi ile iyileştirmek
- Dirençli basilin bulaşmasını önlemektir.

2.3. Tüberkülozdan Korunma

Tüberkülozdan korunmanın başlıca dört yolu vardır;

1. Bulaştırıcı hastaların tedavisi
2. Koruyucu ilaç tedavisi
3. BCG aşısı
4. TB bulaşının önlenmesi

Bu amaçlara ulaşmak için yapılması gereken ana faaliyetler şunlardır (7):

- TB hastalarına erken tanı konulmalıdır ve TB tanısı konulan hastaların temaslıları taranmalıdır.
- TB hastalarına tanı bakteriyolojik olarak konulmalıdır.
- Yayma mikroskopisi yapılan her materyal katı ve sıvı kùltüre ekilmeli ve kùltürde üreyen ilk materyalde ilaç duyarlılık testi yapılmalıdır.
- Yayma pozitif her hastada tür ayrımı yapılmalı ve hızlı RİF direnci test edilmelidir.

- Tanı konulan her hastanın bildirim yapılmalı ve bildirim kaydı tutulmalıdır.
- Hastaya ve yakınlarına bulaşma, hastalık, tedavi, ilaçlar ve yan etkiler açısından eğitim verilmelidir.
- Tedavi standart rejimle, yeterli süre boyunca ve düzenli olarak yapılmalıdır.
- Standart dışı tedavi uygulanmak zorunda kalıncaya kadar kür sağlayıcı ve nüksü önleyici bir rejim uygulanmalı ve tedavi süresi belirlenmelidir.
- Doğrudan gözetimli tedavi standart olarak uygulanmalıdır.
- Saptanan her bir hastanın kür ya da tedavi başarısı sağlanana kadar tedavisi izlenmelidir.
- TB hastasının tedaviye uyumunu sağlamada gerekli uygulamalar yapılmalı, uyumsuz hastalarla ilgili tedbirler alınmalıdır.
- Tüberküloz ilaçları kesintisiz temin edilmeli, depolanmalı ve hastalara ücretsiz verilmelidir.
- Temaslılara, yeni enfekte olanlara ve tüberküloz hastalığı gelişme riski yüksek olan diğer topluluk ve kişilere koruyucu ilaç tedavisi verilmelidir.
- Latent TB enfeksiyonundan TB hastalığı gelişme riski yüksek olan gruplara tarama yapılmalıdır.
- TB hastalarının ve tedavi sonuçlarının standart kayıt ve raporlama sistemi sürdürülmeli, hasta bilgileri elektronik sistemle gerçek zamanlı kaydedilmelidir.
- Düzenli aralıklarla bu bilgiler analiz edilip sonuçları tüberküloz kontrol çalışmalarının geliştirilmesinde kullanılmalı ve kamuoyu ile paylaşılmalıdır.
- Çocukluk çağında BCG aşısı yapılması sürdürülmeli, kurumlarda TB bulaşını önleyici önlemler alınmalı ve geliştirilmeli, tüberküloz kontrolünde denetim çalışmaları programlı ve düzenli yürütülmelidir.
- Tüberküloz kontrolünde çalışan bütün personel düzenli olarak eğitilmeli, hekim ve diğer sağlık personelinin mezuniyet öncesi eğitim programlarında tüberküloz ve tüberküloz kontrolü yeterli düzeyde ele

alınmalı, topluma yönelik TB eğitimi ve bilinçlendirme (propaganda) çalışmaları yapılmalıdır.

- TB hastalarına ve ailelerine yönelik sosyal yardım ve ekonomik destek sağlanmalı, TB hastaları ve ailelerinin TB nedeniyle yıkıcı ekonomik sıkıntı yaşamaları önlenmeli ve burada belirtilen bütün faaliyetler için gerektiğinde kamu ile sivil toplum kuruluşlarının iş birliği yapmaları sağlanmalıdır.

2.4. Etiyoloji

Mycobacteriaceae familyasındaki bakteriler insanlardaki ve hayvanlardaki patojenik potansiyelleri, rezervuarları ve kültürdeki üreme dinamikleri gibi çeşitli özellikleriyle geniş ölçüde farklılık gösterirler. Çoğu zaman epidemiyoloji, hastalıklarla ilişkilendirilme ve *in vitro* üreme özelliklerindeki farklılıklara dayanarak dört ana gruba ayrılırlar (9):

- *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi (MTBK)
- *Mycobacterium leprae*
- *Mycobacterium ulcerans*
- Tüberküloz Dışı Mikobakteri (TDM)

M. tuberculosis kompleksi içinde;

- *M. tuberculosis*,
- *Mycobacterium bovis*,
- *Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guérin (BCG)*,
- *Mycobacterium caprae*,
- *Mycobacterium africanum*,
- *Mycobacterium pinnipedii*,
- *Mycobacterium microti*,
- *Mycobacterium orygis*,
- *Mycobacterium mungi*,
- *Mycobacterium canettii*
- Dassie basili
- Şempanze basili bulunur.

Mycobacterium cinsi, kesin patojenleri, potansiyel veya fırsatçı patojenleri ve patojenik olmayan saprofitik türleri içerir. Cins içindeki gen sekansı benzerlikleri (16S rRNA geni için >%94,3) ve housekeeping genleri yavaş ve hızlı üreyen mikobakteriler arasındaki ayrımı doğrulamıştır. Ayrıca yavaş üreyen tüm mikobakterilerin, hızlı üreyen mikobakterilerden ortaya çıkan tek bir evrim dalına ait olduğu gösterilmiştir. Bu özellik, insanları enfekte etme yetenekleriyle bağlantılıdır. Bu nedenle, tüm kesin patojenler ve çoğu fırsatçı patojen, yavaş üreyen mikobakterilerin evrimsel dallarına aittir. 1980'de *Mycobacterium* cinsi içinde 41 tür varken, şu an yaklaşık 200 tanımlanmış tür ve alt tür vardır. Bunların bir kısmı klinik olarak hastalığa neden olabilirken, bir kısmı da bilinen herhangi bir klinik ilişki olmadan örneklerden izole edilmiştir.

2.4.1. *Mycobacterium tuberculosis* Kompleksi

Mycobacterium tuberculosis kompleksi, insanlar da dahil olmak üzere geniş bir memeli spektrumunu enfekte eden ve tüberküloz etkeni olan mikobakteri türlerini içermektedir. Tüberküloz enfekte dokularda granülomların varlığı ile karakterize, kronik, nekrotizan, bakteriyel bir enfeksiyon hastalığıdır. Hastalığın oluşumundan %97 oranında *M. tuberculosis* sorumludur. Hastalıkta tüm organlar tutulabilir, ancak en sık tutulan organ akciğerlerdir. Enfeksiyon 1-3 canlı basili içeren 1-5 µm büyüklüğündeki damlacık partiküllerinin solunmasıyla meydana gelir. Basiller inhale edildikten sonra konağın bağışıklık sistemi tarafından öldürülebilirler veya latent TB enfeksiyonu (LTBE) gelişebilir veya akciğer, bölgesel lenf düğümleri, böbrekler, beyin, kemik gibi vücudun farklı alanlarında aktif TB hastalığı oluşabilir. Latentlik, klinik belirti olmadan kronik enfeksiyon durumunu ifade eder. Latent TB enfeksiyonu önemlidir, çünkü enfekte olmuş kişilerde yaşam boyu %10 olasılıkla aktif TB hastalığı gelişme riski vardır. Dünya nüfusunun %23'ünde yani yaklaşık 1,7 milyar insanda LTBE olduğu düşünülmektedir (6). HIV, yetersiz beslenme veya diyabetle yaşayan insanlar gibi bağışıklık sistemi zayıflamış kişilerde LTBE'nin aktif hastalığa ilerleme

riski daha yüksektir. Örneğin, HIV ile yaşayan ve *M. tuberculosis* ile enfekte olmuş bireylerde, aktif TB hastalığı gelişme riski yıllık %7-10'dur.

2.4.2. Morfoloji

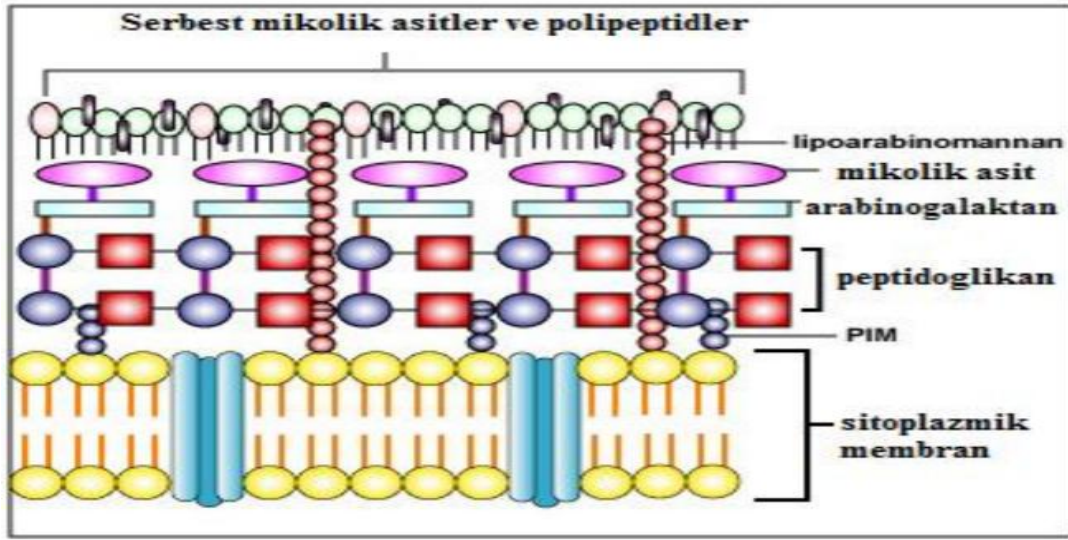
Mycobacteriaceae ailesinden olan *M. tuberculosis* genellikle tüberküloz basili olarak adlandırılır. Mikobakteriler hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz, pleomorfik, zayıf gram pozitif boyanan, aerop, katalaz üreten bakterilerdir. *Mycobacterium* cinsinin tüm üyeleri diğer bakterilerden belirgin olarak küçüktür; enleri 0,2-0,6 µm, boyları 1-10 µm arasında değişmektedir. Tipik olarak silindir şeklinde ve hafif eğimli çubuklardır. Bazen filamentöz formda veya kokobasil şeklinde görülebilirler. Mikobakteri türleri arasında sıklıkla pleomorfik morfolojiye rastlanır. Mikroskop altında bazıları boncuk gibi dizilmiş halde görülürken, bazıları kümeleşmiş halde görülür. Bu cins içerisinde yer alan bakteriler morfolojik olarak birbirlerinden ayrılmazlar. Üremeleri yavaştır, katı ortamda bölünme süresi 14-24 saattir. Hidrofobik olmaları nedeniyle çalışma yapılması güçtür. Mikobakterilerin yüksek Guanin (G) + Sitozin (C) içerikleri, diğer mikolik asit içeren *Gordonia*, *Tsukamurella*, *Nocardia* ve *Rhodococcus* gibi mikroorganizmalar ile benzerlik göstermektedir (10). Koloni morfolojileri türler arasında çeşitlilik göstermekte olup, S (*smooth*) tipi koloniden, R (*rough*) tipi koloniye ve pigmentli koloniden (kromojenik), pigmentsiz koloniye (nonkromojenik) kadar değişebilir (10).

Üremeleri için gerekli olan en uygun sıcaklık derecesi, türler arasında geniş çapta değişkenlik göstermektedir (<30-45°C). Kolonilerin uygun ısılarda görülmeye başlaması mikobakteri türüne göre değişmekle birlikte 2-60 gün almaktadır (3). Basil olumsuz dış koşullara son derece dayanıklıdır ve uzun süre canlı kalabilir; +4°C'de haftalarca, -70°C'de yıllarca canlılığını korur. Buna rağmen; +60°C'de 20 dakikada, +70°C'de beş dakikada ölür.

Mikobakteriler sitoplazma, plazma membranı ve bunları çevreleyen dallanmış ve uzun zincirli yağ asitlerinden oluşan lipidçe zengin hücre duvarından oluşmuştur (Şekil 2.2). Mikobakterinin bütünlüğünü sağlayan hücre duvarı, bilinen bakteriler arasında en kompleks hücre duvarı

yapısında ve bakterinin birçok biyolojik özelliğini belirler. Hücre duvarının %60'ı lipit, %15'i polipeptit, %25'i de karbonhidrattan oluşmaktadır. Lipitler; gram negatif bakterilerde hücre duvarının %3'ünü, gram pozitif bakterilerde %0,5'ini, mikobakterilerde ise hücre duvar ağırlığının %60'ını oluşturmaktadır.

M. tuberculosis'in hücre duvar iskeleti birbirine kovalent bağlarla bağlı üç molekülden oluşur. Bunlar peptidoglikan, arabinogalaktan ve mikolik asitlerdir. Hücre duvarının plazma membranına dayanak noktası lipoarabinomannan (LAM)'dır. Mikobakterilerde hücre duvarında plazma zarının üzerinde bulunan en iç tabakada kemotip IV peptidoglikan yapı vardır. Bu yapı basile şeklini verir, aynı zamanda hücre duvarına bütünlük ve sertlik kazandırır. Bu tabakanın üzerinde ise arabinoz ve galaktozdan oluşan bir polisakkarid olan arabinogalaktan tabakası vardır (3). Arabinogalaktan tabakası peptidoglikan tabakasına fosfodiester köprüleriyle bağlıdır. Arabinogalaktanların yan zincirindeki uç arabinaz birimlerine mikolik asit olarak adlandırılan, uzun zincirli bir grup yağ asiti kovalent olarak bağlanır. Bu asitler hücre duvarı kalınlığından ve büyük oranda da hücrenin aside dirençli olmasından sorumludur. En dış tabaka ise bir grup heterojen peptidoglikolipid ve/veya fenolik glikolipidden oluşmuştur ve mikozidler olarak adlandırılırlar. Hücre duvarında bulunan lipidlerin çoğu uzun zincirli yağ asitleridir ve tüberkülostearik asit, mikoserik asit ve mikolik asitleri içerir. Bir beta hidroksi yağ asidi olan mikolik asit, hücre duvarının ana içeriği olup hücre duvar ağırlığının büyük kısmını oluşturmaktadır.



Şekil 2.2. Mikobakterilerin hücre duvar yapısı

Aside direncin esas nedeni, hücre duvarında yüksek düzeyde bulunan lipidlerdir. Lipitten zengin hücre duvarı diğer bakterileri boyamada kullanılan anilin boyaların geçişine izin vermez. Anilin boyaların hücre duvarından geçebilmesi için fenol veya ısı ile birlikte fenol uygulanır. Fenollü fuksin içine yüzey gerilimini azaltan Tween 80, propilen glikoz ve dimetil sülfonat gibi maddelerin eklenmesi de boyanma özelliğini kuvvetlendirir (11). Aside dirençli özellik; karbolfuksin, kristal viyole, auramine ve rhodamine ile stabil kompleks oluşturup boyanması ve %90 etanol ve hidroklorik asit ile yıkanmasına rağmen boyanın uzaklaştırılmamasıdır. Hücreler fuksin ile boyandıklarında (Ehrlich Ziehl-Neelsen veya Kinyoun boyama) kırmızı, kristal viyole ile boyadıklarında mor olarak görülürler. Auramine ve rhodamine ile boyandıklarında ise ultraviyole ışığı altında sarı-yeşil floresans verirler. Klinik örneklerde standart boyama yöntemi Ehrlich Ziehl Neelsen (EZN) boyamadır. Bu yöntemde materyal karbol fuksin ile kapatıldıktan sonra ısı ile fikse edilir ve ardından asit-alkol ile dekolorize edilerek metilen mavisi ile tekrar boyanır. Auramine-rhodamine ile florokrom boyama ise daha hızlı ve duyarlı bir yöntemdir. Duyarlılıkla ilgili çalışmalarda sonuçlar %50 ila 90 arasında bildirilmiştir (12). *M. tuberculosis* kompleks suşları sıvı besiyerinde karakteristik olarak ip veya demet şeklinde yılan benzeri kord oluşturarak ürerler. Mikolik asitler trehaloz gibi şekerlere bağlanarak glikolipid yapıda

kord faktörü oluştururlar. Kord faktör (trehaloz 6'-6'-dimikolat) tüberküloz basillerine küme oluşturma yeteneği kazandırır ve adjuvan etkiyi de içeren çok sayıda özelliğe sahiptir. Alternatif kompleman yolunu aktifler. Polimorfonükleer lökosit göçünü önler. Granülom oluşumunda önemlidir. Anti tümöral özelliği de vardır. Konak hücre membranına tutunarak solunum ve oksidatif fosforilasyonda hasara yol açar.

2.5. Tüberkülozun Laboratuvar Tanısı

Tüberküloz hastalığının tanısı klinik, histopatolojik, immünolojik ve mikrobiyolojik olarak konulmaktadır. Tüberkülozun kesin tanısı ise mikrobiyolojik olarak klinik örneklerde tüberküloz basilinin gösterilmesi ile konur. Mikobakteriyoloji laboratuvarlarının tanı ve tedaviye katkısı; incelenmesi istenen klinik örneğin hastadan uygun şekilde alınıp, laboratuvarda işlemlendikten sonra mikroskopik incelemesinin yapılması, kültürünün yapılması, üreyen mikobakteri türünün tanımlanması ve ilaca duyarlılığının saptanmasıyla olur (13).

Mikrobiyolojik tanıda kullanılan yöntemler mikroskopik inceleme, kültür ve moleküler testlerdir (13). Her yöntemin kendi içinde avantajları ve dezavantajları vardır. Tanıda altın standart yöntem kültür olarak kabul edilmektedir. Kültür ile 10-100 organizma/ml saptanabilmesi önemli bir avantajdır. Ayrıca tür tanımlanmasına ve duyarlılık testlerine de olanak sağlar. Kültür için sıvı ve katı besiyerleri kullanılmaktadır. Katı besiyerleri hem koloni morfolojisini gösterir hem de karışık enfeksiyonu saptayabilir. Ancak 3-8 haftalık üreme süresi gerektirir. Sıvı besiyerleri, katı besiyerleriyle duyarlılık ve özgüllük açısından benzerdir. Otomatize sıvı kültür sistemleri işgücünü azaltmakta ve 7-21 gün gibi daha kısa bir sürede üremeyi saptayabilmektedir. Ancak sıvı besiyerlerinin koloni morfolojisini göstermemesi ve bu nedenle karışık kültürleri saptayamaması dezavantaj oluşturmaktadır.

Gelişmekte olan ülkelerde tüberküloz tanısında yayma mikroskopisi son gelişmelere rağmen hala anahtar rolü oynamaktadır. Çünkü yüksek

derecede bulaştırıcı olan ARB pozitif olguları tanımlar. Ayrıca kolay ve ucuz bir yöntem olup kısa sürede sonuç verir. Ancak duyarlılığı kültürden daha düşüktür, pozitiflik için mililitrede 5000-10000 basil olması gerekir. Mikroskopik incelemenin diğer olumsuz yönleri ise *M. tuberculosis* ile TDM'lerin ayırt edilememesi, canlı-ölü ve duyarlı-dirençli basil ayrımının yapılamamasıdır. Yaymada görülen bakteriler TDM olabileceği için kesin tanı kültürle konmaktadır. Fakat basil kültürde çok yavaş ürediği için (2-4 hafta) mikroskopik incelemeler ile hastalar "yayma pozitif" ya da "yayma negatif" olarak gruplandırılmaktadır (14). Duyarlılığı düşük olmakla birlikte, bir klinik örnekte ARB görülmesi, antitüberküloz tedaviye başlanması için yeterli özgüllükte bir kriterdir.

Mikroskopik incelemenin duyarlılığı genelde %22-80 arasında bildirilmektedir (15). Duyarlılığı etkileyen önemli faktörler arasında; laboratuvara gelen örnek miktarı, test edilen örneğin türü, yaymanın kalınlığı, hastalığın prevalansı ve şiddeti, örnek toplamanın kalitesi, örnekteki organizma sayısı, dekontaminasyon işleminin etkisi, boyama yöntemleri ve okuyucunun deneyimi gibi faktörler sayılabilir. En yüksek yayma pozitiflik oranına solunum örneklerinde rastlanır. Akciğer tüberkülozu olgularının %50-75'inde balgamın mikroskopik incelemesi pozitifdir. İleri derecede alveolar infiltrasyon veya kaviteli olgularda pozitiflik %90'ların üzerinde iken; interstisyel tutulumda, alt loblarda infiltrasyon olanlarda veya nodüler olgularda %55'lere kadar inmektedir. Çocuk hastalarda, HIV pozitif kişilerde ve akciğer dışı organ tüberkülozu olanlarda basil yükü düşük olduğundan mikroskopik incelemenin yararı sınırlıdır. Bu nedenle tanıda alternatif yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Tüberküloz laboratuvarlarında moleküler testler; klinik örnekten TB tanısı, hızlı ilaç direnci saptanması ve tür tanımlaması amacı ile kullanılmaktadır. Sonuçlar kısa sürede alınabilir ancak ilaç duyarlılıkları açısından moleküler test sonuçları kültür yöntemleri ile doğrulanmalıdır. Tanıdaki duyarlılığı mikroskopi ile kültür arasındadır. Ancak ileri laboratuvar teknikleri gerektirir ve canlı-ölü organizma arasında ayırım yapamaz.

Moleküler testler genotiplendirme (moleküler epidemiyoloji) amacı ile de kullanılmaktadır. Toplumdaki MTBK izolatları arasındaki klonal ilişkinin tanımlanması için gerekli durumlarda ulusal ve bölgesel genotiplendirme çalışmaları TB Kontrol Programı kapsamında yetkilendirilmiş laboratuvarlarca yapılmalıdır. En hızlı ve en güvenilir sonuçların TB laboratuvarı sorumlusu ve klinisyen arasındaki yakın iş birliği ile alınabileceği unutulmamalıdır. CDC; ARB yayma sonuçlarının 24 saat içinde, pozitif nükleik asit amplifikasyon testi (NAAT) sonucunun 48 saat içinde, MTBK pozitif kültür sonuçlarının 21 gün içinde, birinci seçenek ilaç duyarlılığının 28 gün içinde bildirilmesini önermektedir (9).

2.5.1. Örneklerin Alınması ve Taşınması

Tüberkülozun doğru tanısı için, hasta örneğinin doğru yerden, doğru şekilde alınması ve uygun şekilde laboratuvara taşınması çok önemlidir. Bu amaçla hastalığın etkilediği organa göre akciğer veya akciğer dışı olmak üzere ve mikrobiyotası olan veya steril alanlardan farklı tipte örneklerden yararlanılmaktadır. İzolasyon şansını artırmak için hasta örneği; tercihen antitüberküloz tedaviden önce alınmalı, uygun kalitede, yeterli miktarda ve sayıda olmalı, alırken mümkün olduğunca aseptik şartlara uyulmalı, örneği koymak için tek kullanımlık, steril, vida kapaklı sızdırmaz kaplar kullanılmalı, içerisine hiçbir zaman alkol, formol ve benzeri fiksatif veya koruyucu kimyasal madde konulmamalıdır. Örneklerin doğru etiketlenmesi çok önemlidir. Örnek kabının üzerinde, hasta adı-soyadı, dosya ya da örnek numarası bulunmalı, örneğin alınma tarihi ve örnek türü belirtilmelidir. Örnek bilgileri kabın üzerine etiketlenmelidir, işlem sırasında kapakların açılması ile örnekler karışabileceğinden kapağa etiketleme sakıncalıdır. Ayrıca istem formunda ya da otomasyon sisteminde testi isteyen merkez ya da hekimin iletişim bilgileri, hasta ve örnek bilgileri bulunmalıdır.

Akciğer tüberkülozu düşünülen hastadan balgam, endotrakeal aspirat (ETA), bronkoalveolar lavaj sıvısı (BAL), açlık mide suyu (AMS) gibi örnekler istenir. Dünya Sağlık Örgütü akciğer tüberkülozu tanısında bir tanesi sabah alınmış olmak koşulu ile iki örneğin incelenmesinin yeterli olduğunu

bildirmiştir. Balgam örneği sayısını 3'ten 2'ye düşürmek üzere çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Balgam örneklerinde ARB yayma verimi hakkında yapılan bir derlemede, ARB saptanan tüm hastaların %85,8'inde ilk örneğin pozitif, hastaların %11,9'unda ikinci örneğin pozitif, hastaların %2,3'ünde ise üçüncü örneğin pozitif olduğu saptanmıştır (16). Kültürü referans alan çalışmalarda, duyarlılığın ikinci örnekle ortalama %11,1 arttığı, üçüncü örnekle ise %3,1 arttığı saptanmıştır. Bu nedenle TB tanısında en az iki örneğin alınması gerektiği düşünülmüştür. Bazı durumlarda üçüncü bir örnek faydalı olabilir, ancak ikiden fazla örneğin incelenmesi, elde edilen pozitif örnek sayısına minimal katkı sağlar. Ayrıca iki örnek incelemenin iş yükünü azaltması nedeniyle teknisyenler tarafından değerlendirmelerin daha doğru yapıldığı gösterilmiştir (17). Genel olarak, bir hastanın akciğer TB'ye sahip olduğundan şüpheleniliyorsa, iki veya daha fazla yayma negatif balgam örneği serisi, bu tanının pek muhtemel olmadığını gösterir. Tablo 2.1'de akciğer TB tanısında kullanılan örneklere ilişkin özellikler gösterilmiştir (18).

Tablo 2.1. Akciğer tüberkülozu tanısında kullanılan örneklerin alınmasına ilişkin özellikler*

Örnek	Endikasyon	Örnek alma özelliği
Balgam	İlk tercih edilen ve basil saptama oranı en yüksek örnek türüdür	Tercihen üç ardışık günde sabah aç karnına 3-5 mL alt solunum yollarından gelen örnek alınmalıdır
İndüklenmiş balgam	Balgam çıkaramayan ayaktan hastalar	Nebülizatör yardımı ile 10 mL hipertonic tuzlu su 15-30 dk solutulduktan sonra, derin ve kuvvetli öksürük ile yaklaşık 10 mL balgam örneği alınır
BAL, Bronş lavajı / bronşiyal fırçalama örneği / Trakeal aspirat	Hiçbir şekilde balgam veya uyarılmış balgam örneği veremeyen tanı konulamamış olgular	5-10 mL bronş lavajı, BAL örneği / 5 mL serum fizyolojik içerisine alınan fırçalama örneği / En az 3 mL trakeal aspirat alınır

Endotrakeal aspirat	Başka şekilde örnek veremeyen yoğun bakım hastaları	En az 3 mL endotrakeal aspirat alınır
Açlık mide sıvısı	Bilinci kapalı hastalar, 10 yaşından küçük çocuklar, indüklenmiş balgam alınamayan hastalar	Üç ardışık günde, sabah 8-10 saatlik açlığı takiben, hasta yatağından kalkmadan, gastrik tüp ile 25-50 mL steril su veya serum fizyolojik (SF) verilip aspire edildikten sonra en az 5 mL örnek alınır
Akciğer doku örneği	İnvazif olmayan teknikler ile tanı konulamayan olgular	Aseptik şartlarda kazeöz lezyondan alınan en az 1 gr doku biyopsisi veya ince iğne aspirasyonu 2-3 mL'lik steril SF içine alınır.
Larinks sürüntüsü	Çocuklarda ve diğer akciğer örneklerinin elde edilemediği hastalar	Larinks sürüntü örneği silgiç ile alınıp 2-3 mL'lik steril SF içine konur

*Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi'nden alınmıştır.

Akciğer dışı örnekler; idrar, beyin omurilik sıvısı (BOS), perikart sıvısı, periton sıvısı, abse örnekleri, aspirasyon sıvıları, kan-kemik iliği, dışkı, biyopsi materyali gibi örneklerdir. İdrar örnekleri birbirini izleyen en az üç gün, sabah idrarı şeklinde alınmalıdır. Örnek miktarı en az 40 mL olmalı, 24 saat biriktirilen idrarlar kabul edilmemelidir. BOS aseptik şartlarda en az 2 mL (optimal 10 mL) alınmalıdır. Doku biyopsi örneği aseptik şartlarda kazeöz kısımlardan en az 1 gr kadar alınmalıdır. Steril vücut sıvıları (plevra, periton, perikard, eklem vb.) aseptik şartlarda en az 10 mL alınmalıdır. Apse ve yara örneği alınırken aseptik şartlarda yüzeysel eksuda uzaklaştırıldıktan sonra apse içeriği ve aspire edilen sıvı alınmalıdır. Kutanöz lezyonlarda optimal üreme sıcaklığı daha düşük olan mikobakterilerden biri (*M. haemophilum*, *M. marinum*, *M. ulcerans*) etken olabileceğinden, ikinci bir kültür seti 30°C'de enkübe edilmelidir. Kemik iliği aseptik şartlarda heparin, SPS içeren steril tüplere ve/veya ticari mikobakteriyel kan kültür besiyerlerine alınmalıdır. Dışkı örnekleri *M. tuberculosis* tanısında çok tercih edilen bir örnek değildir. Sadece AIDS'li hastalarda *M. avium* kompleks tanısında yararlı olabileceği belirtilmiştir; tercih edildiğinde en az bir gram olmalıdır (3). Kan kültürü gönderilecekse, pıhtılaşmayı engellemek için sodyum polianethol sülfonat,

heparin veya sitrat içeren kan tüpleri kullanılmalı ve tüpler en kısa sürede laboratuvara taşınmalıdır. EDTA'lı tüpler kullanılmamalıdır.

Tüberküloz basili balgamda bir haftaya kadar canlı kalabilmesine rağmen kültürde başarıyla üretme ihtimali zamanla azalır ve bu durum özellikle az basil içeren örnekler için önemlidir. Bu nedenle örnekler laboratuvara mümkün olduğunca hızlı teslim edilmelidir. Laboratuvara iki saat içinde gönderilemeyecek örnekler (kan, kemik iliği ve BOS hariç) +4°C'de bekletilmelidir. Başka bir kuruma gönderilecek olan klinik örnekler veya üremiş kültürler üçlü taşıma kabı ile taşıma kurallarına uygun olarak laboratuvara yollanmalıdır.

Kabul Edilebilir Örnekler ve Reddetme Kriterleri

Her laboratuvar mikobakterilerin optimum izolasyonu için kullanılan yöntemlere göre kabul ve ret kriterlerini belirlemelidir. Mikobakterileri tespit etmek için uygun olmayan klinik örneklerin işlenmesi hem finansal hem de personel kaynakları israfıdır. Ret kriterlerinin neden uygulanması gerektiğini açıklamak için klinisyenler ve diğer sağlık profesyonellerinin görüşmesi gerekebilir. Bu kriterler internet üzerinde ve prosedür kılavuzlarında hazır olmalıdır. Herhangi bir hasta örneği atılmadan önce örnek toplama koşullarının ilgili klinisyen ile görüşülmesi gerekir. İnvaziv yöntemler ile alınan örnekler için reddetme kriterlerine ilişkin istisna yapılabilir (18). Solunum yolu örnekleri ve diğer örneklere ait uygunsuzluk durumları Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Örnek türlerine göre uygunsuzluk durumları*

Örnek	Uygunsuzluklar	Öneri
Balgam	Örneğin tükürük olması, 24 saat süre ile biriktirilen balgam örnekleri, içinde yiyecek artıkları olan balgam örnekleri, şehirlerarası taşıma süresinin 3 günü geçmesi	Tekrar balgam alınamıyorsa, uygun olmayan örnek çalışılır, ancak sonuç negatif bulunduğu bu durum "yetersiz/uygun olmayan örnek" şeklinde raporda belirtilmelidir

BAL, Bronş lavajı, Endotrakeal / trakeal aspirat	Yetersiz hacimde örnek	Örnek çok az olsa bile kabul edilmeli; fakat örnek miktarının yetersiz olduğu raporda belirtilmelidir
Larinks sürüntüsü	Eküvyon ile alınan sürüntü örnekleri	Başka örnek alınamıyorsa işlenmeli; ancak örneğin uygun olmadığı raporda belirtilmelidir
Açlık mide sıvısı	Nötralize edilmeden 4 saatten daha uzun süre bekletilmiş örnekler	Yalancı negatif sonuçlara yol açabileceğinden işleme alınmamalı
İdrar	24 saatlik biriktirilmiş, bekletilmiş idrar, kateter torbasından alınan idrar örnekleri	Kontaminasyon ve seyrelme nedeni ile kabul edilmemeli
BOS	Yetersiz hacimde örnek	Miktarı ne olursa olsun laboratuvar tarafından kabul edilmeli; yetersiz miktar olduğu raporda belirtilmeli
Doku örneği	Yetersiz miktarda örnek, gazlı bez, pamuk gibi materyale sarılmış örnek	Kabul edilmeli; fakat örnek miktarının yetersiz olduğu veya uygunsuz olduğu raporda belirtilmeli
Steril vücut sıvıları, kan, kemik iliği	Pıhtılaşmış örnek	Kabul edilmeli; fakat örneğin uygunsuz olduğu raporda belirtilmeli

*Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi'nden alınmıştır.

2.5.2. Örneklerin İşlenmesi

Mikobakterilerin çoğunun üreme süresi uzun olduğundan örnekleri ekmeden önce diğer bakterileri ve mantarları ortadan kaldırmak gerekir. Steril dokular ve vücut sıvıları için dekontaminasyon işlemine gerek duyulmayabilir. Bununla birlikte balgam, BAL, dışkı, idrar, deri gibi kontamine edici mikroorganizmalar içeren diğer birçok örneğin dekontamine edilmesi gerekir. Seçilen dekontaminasyon işlemi, mikobakterilerin canlılığını ciddi şekilde etkilememelidir. Mikobakterilerin izolasyonunu artırmak için steril ve steril olmayan tüm örnekler konsantre edilmelidir. Balgam gibi viskoz örnekler için dekontaminasyon ve konsantrasyon ile birlikte sıvılaştırma gereklidir.

Steril Örnekler

Dokular, serum fizyolojik içinde öğütüldükten sonra sıvı ve katı besiyerlerine ekilir. BOS, plevral efüzyon veya asit gibi vücut sıvıları, ekilmeden önce 15 dakika boyunca $\geq 3.000 \times g$ 'de santrifüjlenerek konsantre edilmelidir. Bununla birlikte, kültür için alınan vücut sıvısının hacmi azsa veya tekrar elde edilemeyecekse, doğrudan sıvı kültüre ekilebilir. Steril örnekler en kısa sürede laboratuvara ulaştırılmalı ve işlenmelidir.

Steril Olmayan veya Kontamine Olmuş Örnekler

Örneğin dekontaminasyonu ve homojenizasyonu, özellikle solunum yolu örnekleri için önemlidir. En yaygın dekontaminantlardan biri, aynı zamanda mukolitik bir ajan olan sodyum hidroksit (NaOH). Bununla birlikte NaOH, konsantrasyonuna ve işlem süresine bağlı olarak mikobakterilere zarar verebilir. Daha yaygın kullanılan bir yöntem ise bakterilere zarar vermeyen, daha düşük konsantrasyonda NaOH ile birlikte N-asetil-L-sistein (NALC) kombinasyonudur. En yaygın kullanılan kombinasyon NALC-%2 NaOH'dır. Yoğun kontamine örnekler için %5-6'ya varan NaOH konsantrasyonları kullanılabilir ancak bu mikobakterilerin %90'ına yakınına zarar verir. Bazı örnekler için ve kistik fibroz gibi bazı hastalık durumlarında kullanılan başka dekontaminasyon ajanları da vardır. Tablo 2.3'de örneklerin dekontaminasyonu için kullanılan kimyasal maddeler ve kullanıldığı durumlar gösterilmiştir.

Tablo 2.3. Örneklerin dekontaminasyonu için kullanılan kimyasal maddeler ve kullanıldığı durumlar

Dekontaminasyon ajanı	Kullanım Durumu
NALC-%2NaOH	Balgam ve diğer steril olmayan örneklerin dekontaminasyonunda kullanılır
Oksalik asit	<i>Pseudomonas</i> spp. ile kontamine olduğu bilinen örnekler ve kistik fibrozis hastalarında kullanılır

NALC-NaOH ve oksalik asit	Kistik fibrozis hastalarının solunum yolu örneklerinde kullanılır
Klorheksidin	Kistik fibrozisli çocuk ve ergenlerde ve <i>M. abscessus</i> enfeksiyonu şüphesi olan herhangi bir yaşta kistik fibrozis hastasının solunum yolu örneklerinde kullanılır
Sülfürik asit	NALC-NaOH ile işlendiğinde kültürde sürekli olarak kontamine saptanan idrar örneklerinde kullanılabilir

Dekontaminasyon işleminin etkinliğini değerlendirmek için çeşitli göstergeler vardır. Mikobakteriyoloji laboratuvarında kültürde kontaminasyon oranları izlenmelidir. Genel yaklaşım kontaminasyon oranlarının katı ortamlar için %3-5 ve antimikrobiyaller içeren sıvı ortamlar için %10 olmasıdır. Yaygın bir kontaminant olan *M. gordonae* üreme oranı da dekontaminasyonun etkinliğinin önemli bir göstergesi olabilir. Bu oranların dışına çıkıldığında, dekontaminasyon işleminin tüm basamakları gözden geçirilmelidir. Kontaminasyon oranının yüksek olması, işlemin yetersiz olduğunun göstergesidir. Mikobakteri dışındaki bakteriler aşırı çoğalarak gerçek patojenin izolasyonunu engelleyebilir. Bu durumda dekontaminasyon süresini uzatmak yerine NaOH son konsantrasyonunu %4'e çıkarmak önerilir. Örneklerin laboratuvara ulaştırılması için geçen süre uzadığında kontaminasyon oranı artabilir. Kontaminasyon oranının düşük olması dekontaminasyon işleminin fazla olduğunun göstergesidir ve yanlış negatif kültüre yol açabilir. Bu durumda konsantrasyon düşürülmeli veya işlem süresi kısaltılmalıdır.

2.5.3. Mikroskopik İnceleme

Mikroskopik inceleme için mikrobiyotası olan bölgelerden alınan örnekler işlendikten sonra; BOS, plevral sıvı, periton gibi steril vücut sıvıları santrifüj edildikten sonra dipten örnek alınarak yayma yapılmalıdır. Örnekler temiz bir lam üzerine boyu 1-2 ve eni ise 2-3 cm olacak şekilde dairesel hareketler ile yayılır. Malzemenin biyogüvenlik kabininden çıkarılmasından önce, örnekte bulunması olası basillerin etkisiz hale getirilmesi, sağlık personeline bulaşı önlemede önemli bir basamaktır. Bunun için lamlar

havada kuruduktan sonra 65°C ila 75°C'de bir lam ısıtıcısının üzerinde en az iki saat boyunca bekletilmelidir. Aside dirençli boyanma özelliği, mikobakterilerle özdeşleşmiş bir özelliktir; bugüne dek tanımlanan mikobakterilerin tamamı aside dirençli boyanmaktadır. Bu özellik kullanılarak başlıca iki tip boyama yöntemi geliştirilmiştir (10);

1. Karbol fuksin boyama

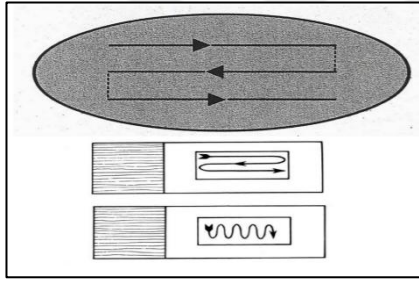
2. Florokrom boyama

Erlich Ziehl Neelsen (EZN) yöntemi ve Kinyoun yöntemi, karbol fuksin boyama yöntemlerindedir. En yaygın kullanılan yöntem EZN yöntemidir (sıcak karbol fuksin boyama). EZN yönteminde karbol fuksin ile ısıtılarak boyanan preparata %3'lük asit-alkol karışımı ile dekolorizasyon işlemi uygulanır ve sonra zıt bir boya (metilen mavisi, brillant yeşili) ile ilk aşamada rengini kaybetmiş hücreler mavi renge boyanır. Boyanan preparat immersiyon objektifi (1000X büyütme) ile incelendiğinde diğer hücreler ve bakteriler mavi görünürken, mikobakteriler mavi zemin üzerinde kırmızıya boyanmış olarak ortaya çıkar. Kinyoun boyama yöntemi EZN yöntemine benzer, fakat kullanılan karbol fuksin ve fenol konsantrasyonu artırılarak, ısıtma işlemini gereksiz kılan modifiye bir boyama yöntemidir (soğuk karbol fuksin boyama) (11). Kinyoun boyama yönteminin duyarlılığının, EZN veya floresan ARB boyamasına göre daha düşük olduğu gösterilmiştir. EZN ile Kinyoun boyamalarının karşılaştırıldığı bir çalışmada, EZN boyama yönteminin belirgin şekilde daha iyi performans gösterdiği ortaya konmuştur ($P < 0.01$).

Florokrom boyamada (Auramine O, Auramine-rhodamine) ise ana ilke fenollü fuksin yerine floresan boyaların kullanılmasıdır. Floresan boyalar, mikobakterilerin lipitten zengin hücre duvarına bağlanarak, görünür hale gelmesini sağlar (19). Auramine O'nun yapısı da karbol fuksine benzer, mikobakteri duvarına bağlandıktan sonra asit alkol karışımı ile buradan ayrılmaz. ARB'ler floresan mikroskopunda Auramine ve Rhodamine kullanıldığında, sarımsı-turuncu renkte, sadece Auramine O boyası

kullanıldığında ise sarı-yeşil floresan verirler. Bu boyama yönteminde, daha küçük bir büyütme ile daha geniş bir alan taranarak daha hızlı ve daha duyarlı inceleme yapılabilir. Bu nedenle özellikle iş yükü fazla laboratuvarlarda tercih edilebilir (19). Ancak floresan boyanın solması nedeniyle kısa sürede değerlendirilmelidir. Ayrıca boyamada kullanılan Auramine O gibi florokrom boyalar kanserojendir. Bu yöntemin duyarlılığının yüksek olmasına karşın, örnekteki inorganik materyellerin florokrom boya ile boyanabilmesi nedeniyle özgüllüğü düşüktür.

Bir preparata negatif diyebilmek için; ışık mikroskobu ile $\times 1000$ büyütmede en az 300 alan (en az 9 dikey ya da 3 yatay çizgi boyunca), floresan mikroskobu ile $\times 250$ büyütmede en az 30, $\times 400$ büyütmede en az 70 alan incelenmelidir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Yaymaların mikroskobik incelemesi

Yayma değerlendirmesi yarı kantitatif olarak yapılır. Tablo 2.4’de bu kriterler gösterilmiştir.

Tablo 2.4. Mikroskobik inceleme değerlendirme kriterleri

Sonuç	Görülen ARB sayısı		
	Karbol fuksin boyama X100	Florokrom boyama X250	Florokrom boyama X400
Negatif	0	0	0
Şüpheli, tekrar	1-2/300 alan	1-2/30 alan	1-2/70 alan

1+	1-9/100 alan	1-9/10 alan	2-18/50 alan
2+	1-9/10 alan	1-9/1 alan	4-36/10 alan
3+	1-9/1 alan	10-90/1 alan	4-36/1 alan
4+	>9/1 alan	>90/1 alan	>36/1 alan

Yayma pozitiflikleri *M. tuberculosis* olarak verilmemeli, derecesine göre “ARB pozitifliği” olarak raporlanmalıdır. Yayma pozitif bulunan preparatlar, kalite kontrol açısından en az kültür sonucu çıkana kadar ya da üç ay süre ile saklanmalıdır. Tüm pozitif mikroskopi sonuçları ilgili birim/hekime ve İl Halk Sağlığı Müdürlüğüne bir an önce (24 saat içerisinde) bildirilmelidir.

Mikroskopide yalancı pozitiflik ve negatiflikler olabilir. Mikroskopide yalancı pozitiflik nedenleri (yayma pozitif kültür negatif);

- Örneğin niteliği nedeniyle saprofit TDM'lerin bulunması
- Bronkoskop dezenfeksiyonunun uygunsuzluğu nedeniyle kontamine olmuş örnek
- Musluk suyunda bulunabilen saprofit TDM'ler ile kontaminasyonu
- Yemek artıkları
- Çalışma bankoları, biyogüvenlik kabinleri, distile su cihazlarının kontaminasyonu
- Kullanılmış lamaların tekrar kullanılması
- Boyaların / tamponların kontaminasyonu
- Boya artıkları
- Boyama işlemi sırasında çapraz bulaş
- Yetersiz renksizleştirme
- ARB pozitif diğer yapılar
- İmmersiyon yağının çapraz bulaşı
- Mikroskop objektifinin kirlenmesi
- Yanlış okuma, skollama hatası

Mikroskopide yalancı negatiflik nedenleri;

- Yetersiz kalite ve/veya hacimde örnek
- Yetersiz homojenizasyon sonucu yayma alanına basil düşmemesi
- Örneğin niteliksiz kısımdan yayma hazırlanması
- Yaymaların çok ince veya çok kalın hazırlanması
- Yayma alanının çok geniş olması
- Boyaların son kullanma tarihinin geçmesi, yanlış saklama koşulları
- Tespit süresi ve sıcaklığın yanlış olması
- Lam ısıtıcısının sıcaklığının yanlış olması
- Uygunsuz boyama (boyanmamış veya zayıf boyanmış basiller)
- Uygun olmayan mikroskop
- Yanlış okuma, skollama hatası

Sonuçlar yorumlanırken her ARB negatif sonuç hastanın TB olmadığı anlamına gelmediği gibi, yüksek özgüllüğe rağmen her pozitif sonuç da TB anlamına gelmez (örneğin TDM). Sonuçlar klinik bulgular ve diğer tanısal testler eşliğinde yorumlanmalı ve kültür ile doğrulanmalıdır. ARB pozitifliği oranındaki bir artış; laboratuvarı sağlık kurumundaki olası bir salgın veya sahte salgın hakkında uyarabilir. Bununla birlikte, pozitiflik oranı beklenen yüzdelere göre azalır, bu dekontaminasyon işleminin çok katı olduğu ve yanlış negatif kültürlerle sonuçlandığı anlamına gelebilir. Tüm bu kalite göstergeleri, mikobakteriyoloji laboratuvarındaki işlemlerin doğruluğunu değerlendirmek için önemlidir.

Asidorezistan boyamada basiller farklı morfolojilerde gözlenebilir. Örneğin, sıvı besiyerinden boyandığında *M. tuberculosis* sıklıkla kord yapısı gösterir. MAC, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. chelonae* ve *M. marinum* gibi bazı TDM türleri nadiren de olsa kord yapısı gösterebilir. TDM'ler genellikle pleomorfiktir, bazen uzun filamentler veya kokoid formlar olarak ortaya çıkar. ARB boyamada sıklıkla zorlayıcı olan bir mikobakteri grubu ise hızlı üreyen mikobakterilerdir. Bu organizmalar her zaman karbol fuksin, Auramine O veya Auramine-rhodamine boyamayla aside dirençli boyanmayabilir.

Kısıtlı kaynakları olan laboratuvarlarda TB tanısında en yaygın kullanılan yöntem; direk balgam örneğinden hazırlanan yaymanın EZN ile boyanıp konvansiyonel ışık mikroskobunda incelenmesidir. Basillerin floresan boyama yöntemi ile boyanıp floresan mikroskobu ile incelendiğinde gerçek pozitifliğin arttığı, EZN yöntemine göre zamandan tasarruf sağlandığı ve artık gelişmiş ülkelerde floresan mikroskop yönteminin tercih edildiği bildirilmiştir (4). Ancak floresan mikroskopi pahalı civa buharlı ışık kaynakları, düzenli mikroskop bakım ihtiyacı, karanlık oda gereksinimi ve pahalı olmasından dolayı gereken önemi kazanamamıştır (4). Son yıllarda floresan mikroskopa alternatif olarak geliştirilen Light Emitting Diode (LED) mikroskopi yöntemi ise, konvansiyonel civa buharı floresan mikroskopları (KFM) ile kıyaslandığında daha ucuzdur, daha az iş gücü gerektirirler, çekirdeklerinin yarı ömrü çok uzundur, güçlü ışık kaynağına sahiptir ve kırılıp bozulduklarında potansiyel toksik ürün salınım riskleri yoktur. Tek bir aparat ile ışık mikroskobuna uygulanabilir. Dünya Sağlık Örgütü, karanlık oda gereksiniminin olmaması ve duyarlılığın yüksek olması nedeniyle; konvansiyonel floresan mikroskobunun yerini LED floresan mikroskobunun almasını ve LED floresan mikroskobunun konvansiyonel ışık mikroskobuna alternatif olarak kullanılmasını önermiştir (4). LED FM ile örnek incelemenin duyarlılığı EZN ile incelemeye göre %10 daha fazla, bakı zamanı ise %25 daha kısadır (20). Ülkemizde yapılan bir çalışmada verilerine göre mikroskopi yapan laboratuvarların sadece %2'si LED mikroskop kullanmaktadır (5).

2.5.4. Kültür Yöntemleri

Tüberkülozun kesin tanısı için bakterinin kültür ortamında üretilmesi ve tanımlanması gerekir. Bu nedenle günümüzde tüberküloz tanısında altın standart yöntem kültürdür. Kültür yöntemleri; TB basillerinin üremesine, tanımlanmasına, ilaç duyarlılık testleri ve epidemiyolojik moleküler çalışmaların yapılmasına olanak sağlar. Genel olarak mikroskopi yapılan her örneğin kültürünün yapılması zorunludur. Aynı laboratuvarda kültür yapılamıyorsa örnekler mutlaka kültür yapılacak bir laboratuvara gönderilmeli ve her hastadan üreyen ilk kültürde ilaç duyarlılık testi yapılmalıdır.

Mikobakterilerin izole edilmesinde, iyi bir laboratuvar uygulaması için en az bir katı besiyeri ile birlikte bir sıvı besiyerinin kullanılması gereklidir. Çünkü besiyerlerinden birisinde kontaminasyon olabilir ve katı besiyerleri koloninin morfolojisininin görölmesini sağlar. Sıvı besiyeri mikobakterilerin daha kısa sürede üremesini sağlar. Çoğu otomatize mikobakteriyel tanımlama sistemlerine dahil edilen sıvı besiyerleri Middlebrook 7H9 temellidir. Sıvı besiyeri içinde üremeyen nadir türlerin üremesini sağlamak için katı besiyerleri de kullanılmaktadır.

Katı besiyerleri yumurta bazlı ve agar bazlı olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Yumurta bazlı besiyerleri çoğu mikobakterinin iyi bir şekilde üremesini sağlar. Yumurta bazlı besiyerlerinde besiyerinin kalitesi kullanılan yumurtanın tazeliği ile ilgilidir. Agar bazlı katı besiyerlerinde daha basit formülasyon nedeniyle daha az kontaminasyon görülür. Besiyeri içeren tüpler inokulumun düzgün bir şekilde dağılmasını sağlamak için en az bir hafta boyunca vidalı kapaklar gevşek olacak şekilde eğimli olarak enkübe edilmelidir. Daha sonra buharlaşmayı ve ortamın kurummasını en aza indirmek için kapakları sıkılmış şekilde dik olarak yerleştirilebilir. Plak besiyerleri ideal olarak CO₂ geçirgen plastik poşetlere yerleştirilmiş veya CO₂ geçirgen bantla kapatılmış olarak enkübe edilmelidir. Besiyeri yüzeyinde inokulum absorbe olmamışsa, plaklar ters çevrilip enkübe edilmelidir.

Sürekli izlenen otomatize sıvı kültür sistemlerinde tespit süresi katı ortamdaki çok daha kısadır. Ancak mikobakteriyel üreme, cihaz tarafından saptanamayabilir. Kanlı örnekler floresansı maskeleyebilir veya kontaminasyonu önlemek için kullanılan antimikrobiyal karışımlar bazı mikobakterilerin üremesini önleyebilir. Tüpler negatif olarak atılmadan önce görsel olarak kontrol edilmelidir. Ayrıca negatif kültürler atılmadan önce ARB yayma ile kontrol edilebilir ve/veya alt kültür yapılabilir. Kültürün sonuçlanma süresi yumurta bazlı besiyerlerinde sekiz haftadır. Agar bazlı besiyerleri ve sıvı besiyerlerinde ise bu süre altı haftadır. ARB yayma veya NAAT pozitifse veya zor üreyen bir organizmadan kuşulanılıyorsa (*M. genavense* veya *M. haemophilum* gibi), kültürü negatif olarak bildirmeden önce ek olarak 2-4

hafta daha enkübe etmek uygun olacaktır. Bazı özel ortam veya üreme koşullarını sağlamak mümkün değilse, örnek referans laboratuvara gönderilmelidir. Katı besiyerleri kontaminasyon ve üreme takibi açısından ilk iki hafta haftada iki kez, sonra sekizinci haftaya dek en az haftada bir kez kontrol edilmelidir. Sıvı besiyerlerinde üreme haftada iki kez bulanıklık, yüzeyde zar ve partikül oluşumu açısından görsel olarak takip edilir. Ticari sistemlerde üretici firmanın önerileri doğrultusunda üreme takibi yapılır. Ayrıca, sıvı ortamda kontaminasyonu dışlamak için; kanlı veya çikolata agar plağına alt kültür yapılması önerilir. Üreme tespit edilip ARB olarak onaylandıktan sonra, tanımlama yöntemleri uygulanır. Pozitif kültürler, birkaç hafta boyunca 35°C ila 37°C ye kadar sıcaklıklarda tutulabilir. Olası takipler için izolatların -80°C'de dondurulması önerilmektedir.

2.5.5. Tüberküloz Basillerinin İdentifikasyonu

Kültür işlemleri sonucu izole edilen mikobakterilerin tür düzeyine kadar tanımlanması, hastaların doğru tedavisi ve aynı zamanda halk sağlığı için gereklidir. Mikobakterilerin tanımlanmasında bakterilerin üreme özellikleri, konvansiyonel biyokimyasal yöntemler, inhibisyon testi, moleküler yöntemler veya kromatografik yöntemler kullanılabilir (21).

Mikobakterilerin tanımlanması geleneksel olarak üreme hızı, koloni morfolojisi, pigmentasyon, optimum üreme sıcaklığı ve biyokimyasal testlerdeki reaksiyonlar gibi fenotipik özelliklere dayanmaktadır. Bu testlerin birçoğu katı ortamda üreme gerektirir, zayıf şekilde tekrarlanabilir ve tür düzeyinde bir tanımlama yapmadan önce birkaç hafta enkübasyon gerektirir. Ek olarak, bir türün suşlarında fenotipik özelliklerde değişkenlik görülebilir. Moleküler yöntemlerin geliştirilmesiyle, 200'e yakın mikobakteri türü tanımlanmıştır. Bu yeni türlerin birçoğu biyokimyasal olarak karakterize edilmemiştir ve biyokimyasal yöntemler kullanılarak güvenilir bir şekilde tanımlanamamaktadır.

2.5.5.1. Üreme özellikleri

Tüberküloz basilinin üreme hızı yavaştır. Katı besiyerine kültür pasajında yedinci günden sonra ürer. R tipi (düzensiz), kuru, devetüyü renginde koloniler oluşturur. Pigment yapmaz. Sıvı kültürden yapılan ARB boyamanın incelenmesinde kord oluşumu görülür. Üreme özellikleri bakterinin ön tanımlamasında MTBK-TDM ayırımına yardımcı olmakla birlikte, MTBK'nin kesin tanısı için yeterli değildir.

2.5.5.2. Biyokimyasal testler

Mikobakterilerin identifikasyonunda kullanılan biyokimyasal testler güvenilir değildir, zaman alıcıdır ve genellikle birkaçının bir arada uygulanması gerekir. Tüberküloz basillerinin identifikasyonu için üç anahtar test birlikte uygulanmalıdır, tek başlarına MTBK-TDM ayırımı yapamazlar. Bunlar niasin (pozitif), nitrat indirgenme testi (pozitif) ve katalaz testidir (negatif) (21).

2.5.5.3. İnhibisyon testleri

M. tuberculosis kompleks suşlarının üremesini inhibe eden, ancak TDM'leri inhibe etmeyen, böylelikle sınırlı bir identifikasyon sağlayan, p-nitrobenzoat, hidroksilamin hidroklorür, 8-azaguanin, nitroksolin gibi bazı kimyasal maddeler kullanılmaktadır. Tüberküloz basilleri paranitrobenzoik asitli besiyerinde üremez.

2.5.5.4. İmmünokromatografik Testler

M. tuberculosis kompleksinin Rv1980c veya RD2 geninde kodlanan MPT64 proteinine karşı monoklonal antikorun kullanıldığı immünokromatografi bazlı lateral akım yöntemleri, sıvı veya katı kültürden *M. tuberculosis* kompleksini tanımlamak ve kompleks üyelerini TDM'den ayırmak için güvenilir, hızlı ve basit yöntemlerdir. Ancak MPT64'ü kodlayan gendeki bazı mutasyonlar nedeniyle, özellikle de en yaygın olarak 196 konumundaki 63 bp'lik bir delesyon nedeniyle, testler bazı *M. bovis* BCG ve *M. africanum* varyantları için yanlış negatif sonuçlar verebilir.

2.5.5.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Mikobakterilerin tanımlanması için HPLC kullanımı, 1985'te CDC tarafından önerilmiş ve 1990'da CDC Mikobakteriyoloji Referans Laboratuvarı'nda standart bir test olarak sunulmuştur. HPLC hızlı üreyen mikobakterileri gruplar veya kompleksler halinde tanımlayabilir, ancak çoğu türü tanımlayacak kadar spesifik değildir. HPLC, çoğu laboratuvarında daha doğru tür tanımlaması için moleküler yöntemlerle (örneğin, rpoB gen dizilimi ve MALDI-TOF) değiştirilmiştir.

2.5.5.6. MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry; Matriks aracılı lazer dezorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi), mikobakteriyel izolatları tanımlamak için artan sıklıkta kullanılmaktadır. Bu yöntemde mikroorganizmalara ait biyomoleküller (protein, peptid, şeker) ve büyük organik moleküller (polimer, dendrimer, makromolekül) iyonize edildikten sonra elektrik ve/veya manyetik alandan geçirilerek protein kalıpları çıkarılmaktadır (22). Bu kalıba ait grafiksel görüntüler, sistemin veri tabanındaki referans organizmaya uyumuna göre mikroorganizmalar cins ve tür düzeyinde tanımlanabilmektedir. Spektral veriler daha sonra organizmanın muhtemel kimliğini belirlemek için bir veri tabanı ile karşılaştırılır.

2.5.5.7. Moleküler identifikasyon

Hasta örneklerinden üretilen mikobakterilerin tanımlanması için kullanılan moleküler teknikler arasında doğrudan prob hibridizasyonu ve sekans bazlı teknikler bulunur. Problar, çeşitli ebatlarda olabilen ancak genellikle 50 bp'den kısa olan tek zincirli oligonükleotitlerdir. Probin özgüllüğü, probun nükleik asit sekansı ile belirlenir. Bakterilerde yüksek kopya sayısında bulunduğu için rRNA, tanımlama için ortak bir hedeftir ve

duyarlılığı yüksektir. Ayrıca rRNA dizileri, hiperdeğişken bölgelere ek olarak korunmuş bölgeler de içerir. Bu, tespit seviyesinin prob dizisine bağlı olarak değişmesine izin verir.

Kültürden identifikasyon için ticari olarak temin edilebilen proplar arasında *M. tuberculosis* kompleksi, *M. avium*, *M. intracellulare*, MAK, *M. gordonae* ve *M. kansasii* (AccuProbe; Hologic, San Diego, CA) bulunur. Prob tabanlı tespit ve tanımlama yöntemleri, geleneksel kültür ve tanımlama yöntemlerinden daha pahalı olsa da geleneksel biyokimyasal yöntemlere göre duyarlılıkları daha yüksek ve test süreleri daha kısadır. Ancak, yanlış negatif ve pozitif sonuçlar alınabilir. Bakteriyel suşlar hibridizasyonu önleyen polimorfizmlere sahip olabilir veya suşlar arasında benzer sekanslar bulunabilir. Ek dezavantajları, sınırlı sayıda ticari prob bulunması ve doğrudan klinik örneklerden çalışılmamasıdır (23, 24).

Sekansa dayalı tanımlama, birçok laboratuvarında mikobakterileri hızlı bir şekilde tanımlamak için primer yöntem haline gelmiştir (25). Bu yöntem, konvansiyonel yöntemlere göre tanımlama süresini kısaltsa da izolatin öncelikle kültürde üretilmesi gereklidir. Sekanslama doğrudan pozitif bir MGIT sıvı kültüründen de yapılabilir, ancak dikkatli bir doğrulama gereklidir ve sonuçlar her zaman alt kültürden elde edilen üreme ile ilişkilendirilmelidir. Sekans tabanlı tanımlama için kullanılan birçok hedef vardır, ancak 16S rRNA geni en yaygın hedeftir. 16S rRNA'nın sekanslanması için ticari olarak temin edilebilen sadece araştırma amaçlı kullanılan kitler vardır (MicroSeq; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). *M. tuberculosis* kompleks üyeleri, *M. avium* alt türleri gibi bazı mikobakteriler 16S rRNA gen dizilimi ile ayırt edilemez. Epidemiyolojik veya klinik nedenlerle daha fazla ayırım gerekirse, bu organizmaların çoğu internal transcribed spacer (ITS), *rpoB*, *secA* veya *hsp65* gibi diğer genlerin sekanslanmasıyla ayrıştırılabilir. *M. tuberculosis* kompleksi içindeki türleri ayırmak için *gyrB* dizileme veya delesyon analizi gerekir.

2.5.6. Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri

Nükleik asit amplifikasyon testleri tüberkülozun hem tanısında hem de ilaç duyarlılık testlerinde kullanılabilir. CDC rehberleri, akciğer tüberkülozuyla uyumlu semptomları ve bulguları olan hastalardan en az bir solunum yolu örneğine NAAT uygulanmasını önermektedir (26). Nükleik asit amplifikasyon testleri ARB yayma da dahil olmak üzere rutin mikrobiyolojik yöntemlerin yerini almamalıdır. Nükleik asit amplifikasyon testleri ideal olarak TB şüphesi olan tüm yeni hastalara uygulanmalı ve sonuçlar 48 saat içinde rapor edilmelidir. Klinisyenin NAAT sonucunu ARB yayma ile birlikte yorumlaması önemlidir. Nükleik asit amplifikasyon testleri TB tanısı için hızlı ve özgüllüğü çok yüksek testler olmasına rağmen, duyarlılıkları değişkendir. Duyarlılık örneğin kalitesine ve türüne, kullanılan spesifik NAAT'ye ve örnekteki bakteri yüküne bağlı olarak değişebilir (26). Ek olarak, çoğu NAAT TDM'yi tespit etmez. Tüberküloz için negatif bir NAAT sonucu ve pozitif bir ARB yayma, TDM varlığını düşündürdüğü göstergelerdendir. *M. tuberculosis* kompleksinin doğrudan klinik örneklerden moleküler olarak tespit edilmesinin diğer bir dezavantajı, *M. tuberculosis* kompleksindeki türler arasında ayırım yapamamasıdır. Ek olarak, pozitif bir NAAT sonucu canlı ve ölü organizmalar arasında ayırım yapamaz. Bu nedenle, yedi günden fazla antitüberküloz ilaç kullanan veya örnek alınımından önceki 12 ay içinde bu tedaviyi alan hastaların örnekleri üzerinde amplifikasyon testleri kullanılmamalıdır. Ayrıca, akciğer örneklerinin yaklaşık %4'ü ve akciğer dışı örneklerin %19'u amplifikasyonu engelleyen (başarısız internal amplifikasyon kontrolü) maddelere sahiptir. Bu maddeler negatif test sonuçlarını geçersiz kılar. Belirli bir hastadan alınan tüm örneklerin inhibisyon göstermesi nadir olduğu için, çoklu örneklerin test edilmesi avantajlı olabilir.

Nükleik asit amplifikasyon testleri pozitif örnekler moleküler bir yöntemle ilaç direnci açısından test edilebilir. Rifampisin dirençli bir *M. tuberculosis* kompleks izolatu sıklıkla izoniyazide de (H) dirençlidir ve bu nedenle, en azından R'ye direnç için tarama yapan moleküler bir yöntem ÇİD-TB için vekil bir test olarak kabul edilebilir. Bazı durumlarda bu tarama

yalnızca yabancı uyruklu, ÇİD-TB temaslı, daha önce TB tedavisi almış veya düzensiz tedavi alanlar gibi ÇİD-TB için belirli risk faktörleri olan hastalarda yapılabilir. Bununla birlikte, ideal algoritmada, bu tarama tüm NAAT pozitif örneklerde gerçekleştirilmelidir. Testler arasında Xpert Ultra MTB/RIF testi, sanger sekanslama, pirosekanslama ve line probe assay (örneğin Hain Genotype MTBDRplus ve MTBDRsl) gibi testler vardır.

2.6. İlaç Duyarlılık Testleri ve Tüberküloz Tedavisi

Bilim adamları yüzyıllardır etkili bir tüberküloz tedavisi bulmak için araştırmalar yapmaktadır. Tedavi başlangıcında basil sayısı en yüksek düzeyde olduğu için, dirençli mutant suşların ortaya çıkma olasılığı en yüksektir. Duyarlı bulunan hastalarda başlangıçta standart iki ay dört ilaç tedavisi (HRZE) kullanılmalıdır. İdame döneminde ise dört ay HR tedavisi kullanılmalıdır. Tedavide ilaçların düzenli olarak ve yeterli süre alınması çok önemlidir; aksi takdirde ilaç direnci, tedavi başarısızlığı ya da nüks ortaya çıkmaktadır. Ayrıca ilaçlar, sadece önerilen dozlarda kullanıldığında etkindir. Hastanın kilosuna uygun dozlarda ilaç kullanılmasına dikkat edilmelidir. İlaç duyarlılığı başlıca iki yöntemle saptanabilir;

1.Fenotipik yöntemler: Kültür

- ✓ Katı besiyerleri
 - Löwenstein-Jensen besiyeri
 - Middlebrook agar
- ✓ Otomatize sıvı besiyerleri
 - Bactec 460
 - MGIT
 - Mycolor-TK

2.Genotipik yöntemler: Moleküler yöntemler

- Ters hibridizasyon
- Real-time PCR

- DNA dizi analizi

İndirekt agar proporsiyon yöntemi, MTBK izolatlarının fenotipik ilaç duyarlılık testi (İDT) için referans yöntem olarak kabul edilir. Moleküler yöntemler, TB karşıtı ilaçlara direnç ile ilişkili genlerdeki mutasyonları tespit eder. Bu yöntemler hızlı ve spesifiktir, ancak genotipik direnç her zaman fenotipik direnç anlamına gelmeyeceğinden fenotipik İDT hala yapılmalıdır.

Genotipik-fenotipik direnç farklılıkları nedenleri:

- Mutasyon genotipik olarak incelenen gen bölgesi dışında olabilir.
- Mutasyon düşük düzeyde direnci tanımlar, daha yüksek düzeyde duyarlı olabilir.
- İlaç direncini tanımlayan, bilinmeyen direnç mekanizmaları vardır.
- Kültüre dayalı direnç testlerinde hata olabilir.
- Moleküler testlerin tanımlamadığı heterozistanslar olabilir.
- Sessiz mutasyonlar olabilir.
- Probun bağlanmasında hatalar olabilir.

M. tuberculosis izolatlarında ilaç direnci iki şekilde görülebilir;

Primer direnç: Başlangıçta dirençli organizmalarla enfekte olmuş kişilerde ortaya çıkan direnç

İkincil direnç veya edinilmiş direnç: TB tedavisi sırasında, hastanın yetersiz bir rejimle tedavi edilmesi, öngörülen rejimi uygun şekilde almaması, ilaç emilim bozukluğu, bileşiğin yetersiz bir potansiyeli veya düşük serum seviyelerine yol açan ilaç-ilaç etkileşimleri gibi diğer koşullar nedeniyle gelişen direnç

ÇİD-TB suşları, en az R ve H'ye dirençlidir. Yaygın ilaca dirençli TB (YİD-TB) suşları, R ve H direncine ek olarak en az bir florokinolona ve en az

bir adet ikinci seçenek enjekte edilebilir ajana (amikasin, kapreomisin ve kanamisin) dirençlidir. Küresel olarak ÇİD-TB'li kişilerin %6.2'sinin YİD-TB olduğu tahmin edilmektedir (1).

Tüberküloz tedavisinde kür; başlangıçta bakteriyolojik olarak tanı konulmuş akciğer TB hastasında, klinik ve radyolojik iyileşmeyle birlikte, biri tedavinin idame döneminde diğeri tedavi tamamlandığında olmak üzere en az iki kez yayma ya da kültür negatifliğinin gösterilmesidir. Tedavi başarısızlığı ise tedavinin beşinci ayı ve sonrasında hastanın balgam yayma ya da kültür pozitifliğinin saptanmasıdır. Pozitiflik tedavi süresince devam edebilir ya da negatifleşir ve yeniden pozitifleşebilir (27).

Tedavi etkinliğinin değerlendirilmesinde ardışık iki balgam kültür sonucu negatif saptanana kadar aylık mikroskopik inceleme ve kültür yapılması önerilmektedir. Balgam örneklerinin toplanması, tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde tedavinin erken döneminde ve tedavinin sonunda isteğe bağlıdır. Devam aşaması rejiminin süresi, başlangıç tedavi aşamasının sonundaki mikrobiyolojik duruma dayanır. Bu nedenle, eğer balgam kültürünün negatifleşmesi daha önce gösterilmemişse, iki aylık tedaviyi tamamlarken balgam kültürü almak çok önemlidir. Tedavinin üçüncü ayından sonra yeni kültür üremesi olursa, yeniden İDT yapılmalıdır. Moleküler olarak R direnci görülürse, birinci ve ikinci seçenek TB ilaçlarına İDT gerekir. Fenotipik olarak R direnci saptandığında ikinci seçenek TB ilaçlarına ve pirazinamide karşı da İDT yapılır.

III. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırma Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hafsa Sultan Hastanesi Tüberküloz Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Etik Kurulu'ndan 25/10/2017 tarihli 20.478.486 sayılı etik kurul onayı alınmıştır. Proje Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (proje no: 2017-203).

3.1 Hasta Örnekleri

Araştırmada Şubat 2018-Aralık 2019 döneminde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Hafsa Sultan Hastanesi Tüberküloz Laboratuvarında TB ön tanısı ile mikobakteriyolojik inceleme istenen hastaların balgam ve BAL gibi solunum yolu örnekleri incelenmiştir. Araştırmaya solunum yolu dışı örnekler, çocuk hastalardan alınan AMS örnekleri, kültürü yapılmamış örnekler, kültürü kontamine olan örnekler veya tedavi altındaki hastaların örnekleri dahil edilmemiştir.

Laboratuvarımızda iç ve dış kalite kontrol uygulamaları sürdürülmektedir.

3.2. Örneklerin İşlenmesi

Klinik örneklere homojenizasyon dekontaminasyon ve konsantrasyon işlemi NALC-NaOH yöntemi ile uygulanmıştır (28). Bunun için Tüberküloz Dekontaminasyon ve Konsantrasyon Kiti kullanılmıştır (RTA Laboratuvarları AŞ, Türkiye). Kitin içerisinde;

- Örnek toplama tüpü: N-asetil-L-sistein ve cam boncuklar içeren 50 ml'lik poli-propilen tüp

- Sodyum hidroksit trisodyum sitrat: 250 ml'lik polietilen şişede 200 ml
- Fosfat tamponu: Steril, 50 ml'lik poli-propilen şişede 50 ml
- Dezenfektan solüsyonu: Sodyum hipoklorit 250 ml'lik polietilen şişede 200 ml bulunmaktadır.

Alınan solunum yolu örnekleri en fazla 10 ml olacak şekilde örnek toplama tüpüne alınmıştır. Tüpteki örneğin üzerine sodyum hidroksit trisodyum sitrat çözeltisinden 1:1 oranında eklenmiştir. Tüpün kapağı iyice kapatılıp vorteks ile karıştırarak homojenize edilmiştir. Oda sıcaklığında 10-15 dakika bekletildikten sonra örneğin üzerine 50 ml çizgisine kadar fosfat tamponu eklenmiştir. Tüpler 15 dakika 3000xg hızda emniyet kapaklı soğutmalı santrifüjde santrifüj edilip üstte kalan sıvı dezenfektan içeren kaba boşaltılmıştır. Kalan fosfat tamponu örnek toplama tüpüne birkaç damla, en fazla 5 ml çizgisine kadar doldurulup çökelti vorteksle karıştırarak süspansiyon haline getirilmiştir. Bu süspansiyon; kültür ve mikroskopik incelemeler için kullanılmıştır. İşlem tamamlandıktan sonra tüpler kit içerisindeki dezenfektan çözeltisi ile dezenfekte edilip tıbbi atığa atılmıştır.

3.3. Mikroskopik İnceleme

Hazırlanan süspansiyondan pastör pipeti ile alınan 1-2 damla (40-50 µL), lamın ortasında yaklaşık 1x2 cm'lik alan içinde dairesel hareketlerle yayılmıştır. Laboratuvarımızda mikroskopik incelemede rutin olarak EZN boyama yöntemi kullanılmaktadır. Araştırmada preparat hazırlama aşamasında rutin incelemeye ek olarak bir tane de florokrom boyama için preparat hazırlanmıştır. Kurumuş yaymaların tespit edilmesi için preparatlar elektrikli preparat kurutucusunda 65-70°C'de en az iki saat bekletilmiştir. Çalışılırken kişisel koruyucu donanım kullanılmıştır. İşlemler sınıf IIA biyogüvenlik kabininde yapılmıştır.

EZN boya çözeltisi hazırlamak üzere; karbol fuksin çözeltisi, asit alkol ve metilen mavisi çözeltisi hazırlanmıştır (29).

➤ **Karbol fuksin çözeltisi** için iki ayrı çözelti hazırlanmıştır;

1. Çözelti

- Bazik fuksin 0,3 g
- %95'lik etanol 10 mL

Bazik fuksin bir havana konup üzerine etil alkol azar azar eklenerek ezilmiştir.

2. Çözelti

- Kristalize fenol 5 g
- Distile su 100 mL

Kristalize fenol, küçük bir balon içerisinde su banyosunda eritilmiştir. Sıvı fenol yaklaşık 45°C iken üzerine distile su eklenip karıştırılmıştır.

Birinci çözeltiden 10 mL ile ikinci çözeltiden 90 mL karıştırılmıştır. Koyu renkli bir şişeye aktarılıp çalkalanarak homojenize edilmiştir. Kullanılmadan önce oda ısısında en az 24 saat bekletilmiş ve filtre kağıdından süzülerek kullanılmıştır.

➤ **Asit alkol** hazırlamak için;

- %95'lik etanol 97 mL
- Konsantre HCl 3 mL

Konsantre HCl %90-95'lik alkol içerisine ilave edilmiştir.

➤ **Metilen mavisi** çözeltisi hazırlamak için;

- Metilen mavisi 0,3 gr
- Distile su 100 mL

Metilen mavisi distile su içerisinde eritilmiştir. Koyu renkli bir şişeye aktarılıp çalkalanarak homojenize edilmiştir.

Hazırlanan yaymalar, boyama yapmak üzere boya düzeneğinin üzerine, birbirleri ile temas etmeyecek şekilde yerleştirilmiştir. Preparatların üzerine yayma alanını kaplayacak şekilde karbol fuksin dökülmüştür. Yaymalar,

buhar çıkacak fakat kaynamayacak şekilde beş dakika boyunca alttan ısıtılmıştır. Yaymalar su ile yıkanıp lamlar eğilerek üzerinde kalan su süzdürülmüştür. Yaymaların üzerine %3'lük asit-alkol çözeltisinden dökülüp, 1-2 dk renksizleşme işlemi yapılmıştır. Yaymalar su ile yıkanıp lamlar eğilerek yayma üzerinde kalan su süzdürülmüştür. Preparatların üzerine yayma alanını kaplayacak şekilde metilen mavisi çözeltisinden dökülüp, 1-2 dk beklenmiştir. Yaymalar tekrar su ile yıkanıp lamlar eğilerek yayma üzerinde kalan su süzdürülmüştür. Lamlar dik bir şekilde oda ısısında kurumaya bırakılıp ışık mikroskobunda değerlendirilmiştir.

Değerlendirme için yaymanın üzerine bir damla immersiyon yağı damlatılmıştır. Yaymalar $\times 1000$ büyütme ($100\times$ objektif) ile incelenmiştir. Yaymalar, negatif olarak raporlanmadan önce en az dokuz dikey ya da üç yatay çizgi boyunca (yaklaşık 300 mikroskopi alanı) dikkatli bir şekilde taranmıştır. Mavi zeminde kırmızı pembe, düz veya hafif kıvrık, tek tek veya kümeler halinde basiller aranmıştır. Yaymaların değerlendirilmesi yarı kantitatif olarak yapılmıştır (29).

Auramine-O boya çözeltisi hazırlamak üzere; Auramine O, asit alkol ve karşıt boya hazırlanmıştır (29).

➤ **Auramine-O** boya çözeltisi için iki ayrı çözelti hazırlanmıştır,

1. Çözelti

- Auramine-O boyası 0,1 g
- %95'lik etanol 10 mL

Auramine-O boyası etil alkol içinde eritilmiştir.

2. Çözelti

- Kristalize fenol 3 g
- Distile su 87 mL

Kristalize fenol, küçük bir balon içerisinde su banyosunda eritilmiştir. Sıvı fenol yaklaşık 45°C iken üzerine distile su eklenip karıştırılmıştır.

Birinci ve ikinci çözelti karıştırılıp koyu renkli bir şişeye aktarılmıştır. İyice çalkalanarak homojenize edilmiştir.

➤ **Asit alkol**

- %95'lik etanol 99,5 mL
- Konsantre HCl 0,5 mL

Konsantre HCl, yavaşça %70'lik alkol içerisine eklenmiştir.

➤ **Karşıt boya**

- Potasyum permanganat 0,5 g
- Distile su 100 mL

Distile su içerisinde potasyum permanganat eritilip koyu renkli bir şişeye aktarılmıştır. İyice çalkalanarak homojenize edilmiştir.

Florokrom boyama için hazırlanan yaymalar, boya düzeneğinin üzerinde birbirileri ile temas etmeyecek şekilde yerleştirilmiştir. Preparatların üzerine yayma alanını kaplayacak şekilde Auramine O dökülüp, 20 dk beklenmiştir. Yaymalar distile su ile yıkanıp lamlar eğilerek üzerinde kalan su süzdürülmüştür. Yaymaların üzerine %0,5'lik asit-alkol çözeltisinden dökülüp, iki dk boyunca renksizleştirme işlemi yapılmıştır. Yaymalar distile su ile yıkanıp lamlar eğilerek yayma üzerinde kalan su süzdürülmüştür. Preparatların üzerine örtecek şekilde potasyum permanganat çözeltisinden dökülüp, iki dk beklenmiştir. Yaymalar distile su ile tekrar yıkanıp lamlar eğilerek yayma üzerinde kalan su süzdürülmüştür. Lamlar dik bir şekilde oda ısısında kurumaya bırakılmıştır.

Çalışma başlamadan önce laboratuvarımızda rutin hizmet vermekte olan iki teknisyen ve proje ekibinde yer alan araştırma görevlisi, iki hafta süre ile floresan mikroskop kullanımı ve florokrom boyalı lamların değerlendirilmesi konusunda eğitim almıştır. Karbol fuksin ve florokrom boya

ile boyanan lamalar hem teknisyenler hem de araştırma görevlisi tarafından okunmuştur. Lamlara hasta ismi yazılmamış, araştırma yürütücüsü tarafından numara verilmiştir. Boyalı lamalar OLYMPUS CX43 model LED floresan ataçmanlı mikroskopta x40 objektif ile hem teknisyen hem de araştırma görevlisi tarafından çift kör olarak okunmuştur. Yayımlar, negatif olarak raporlanmadan önce x400 büyütmede en az 70 mikroskopi alanı taranmıştır. Aydınlik bir odada yapılan değerlendirmede yeşil-sarı, düz veya hafif kıvrık, tek tek veya kümeler halinde basiller aranmıştır. Yayımların değerlendirilmesi yarı kantitatif olarak yapılmıştır (Tablo 2.2) (29). Ayrıca her lam için okumanın başlangıcı ve bitişi arasındaki süre kronometre ile kaydedilmiştir. Çalışma sonunda teknisyenlerin LED floresan mikroskobik incelemeye uyumlarının sorgulanması için bir anket uygulanmıştır.

Anket soruları;

1. Boyama yönteminin uygulanması hakkında ne düşünüyorsunuz?

- Kolay Kararsızım Zor

2. İnceleme süresi hakkında ne düşünüyorsunuz?

- Kısa Kararsızım Uzun

3. Bu yöntemi kullanmak ister misiniz?

- Evet Kararsızım Hayır

4. Mikroskopi yöntemlerinden birini tercih edecek olsanız hangisini tercih edersiniz?

- Işık mikroskopi LED mikroskopi

3.4. Kültür

İşlenmiş örnekler hem katı hem sıvı besiyerine ekilmiştir. Katı kültür için Löwenstein-Jensen ticari besiyeri (BD, BBL) kullanılmıştır. Hazırlanmış olan süspansiyondan 0.5 ml alınarak Löwenstein-Jensen besiyerine ekim

yapılmıştır. Ekim yapılan besiyerleri 37°C'de vidalı kapağı kapalı şekilde bir gece eğik bırakıldıktan sonra ertesi gün kapağı gevşetilerek bir hafta boyunca eğik olarak bekletilmiştir. Ardından kapağı sıkıca kapatılıp dik pozisyonda ilk iki hafta haftada iki kez, sekizinci haftaya kadar ise haftada bir kez olacak şekilde üreme varlığı açısından incelenmiştir.

Çalışmada sıvı kültür için otomatize sistemlerden BD BACTEC MGIT 960 sistemi kullanılmıştır. Örnek ekiminden önce MGIT PANTA şişesi 15 ml MGIT Çoğalma Destekleyicisi ile çözününceye kadar karıştırılmıştır. Her bir MGIT tüpüne bu zenginleştirmeden 0.8 ml eklenip ardından 0.5 ml işlenmiş örnek eklenmiştir. Tüpler, BACTEC MGIT cihazına yerleştirilmiştir ve 37°C'de sürekli olarak enkübe edilmiştir. Cihaz tarafından her 60 dakikada bir floresandaki artış izlenmiştir. En az altı hafta boyunca negatif sonuç veren ve hiçbir pozitiflik belirtisi göstermeyen kültür şişeleri cihazdan alınarak negatif olarak değerlendirilmiştir ve atılmadan önce sterilize edilmiştir. Pozitif sinyal veren örneklerden birer yayma hazırlanarak EZN ile boyanıp ARB varlığı ve kord oluşumu açısından incelenmiştir. ARB varlığında kültürden immünokromotografik test çalışılmıştır.

Kontaminasyonu belirlemek için besiyerinde üreme görüldüğünde çikolata besiyerine aktarım yapılmıştır. Kültürler 35°C'de enkübe edilmiş ve 24 saat sonunda incelenmiştir. Kontaminasyon durumunda işlenmiş örnekler yeniden dekontamine edilerek kültür yinelenmiştir. Kontaminasyonun tekrarlanması durumunda bu örnekler değerlendirme dışında tutulmuştur.

3.5. İmmünokromotografik test

Kültürde üreyen tüberküloz basilinin identifikasyonu için BD MGIT TBc Tanımlama Testi (TBc ID, BD) kullanılmıştır. TBc ID testi tüberküloz basillerine özgü MPT64 antijenini saptamaktadır. Örnekler test cihazına eklendiğinde, MPT64 antijeni, test stripinde görünen partiküllere konjuge olmuş MPT64 antikolarına bağlanır. Antijen-konjugat kompleksi, test sribi üzerinden reaksiyon alanına ilerler ve membrana uygulanan ikinci bir özel MPT64 antikoru tarafından yakalanır. Örnekte MPT64 antijeni varsa, etiketli

koloidal altın partikülleri tarafından bir renk reaksiyonu üretilir ve pembe-kırmızı renklere bir çizgi olarak görülür.

Test prosedürü gereğince ARB yayma pozitif MGIT tüpü tersine döndürerek ve vortekslenerek tamamen karıştırılmıştır. MGIT tüpünden steril bir pipet ucu kullanılarak örneğin 100 µL'si scribe pipetlenmiştir. Sonuç 15. dakikada okunup kaydedilmiştir. Kontrol ve test çizgilerinin ikisinin de belirginleşmesi MTBK basili olduğunu göstermektedir. Sadece kontrol çizgisinin belirginleşmesi bu bakterinin MTBK olmadığını, TDM olduğunu düşündürür. Kontrol çizgisinin belirginleşmemesi ise kart testin çalışmadığını gösterir, test geçersiz olarak değerlendirilir.

3.6. İstatistiksel değerlendirme

İstatistiksel değerlendirme için SPSS 21.0 paket programı (SPSS Inc, Chicago, USA) kullanılmıştır. Grup değişkenleri yüzde ile, sürekli değişkenler ortalama ile sunulmuştur. Gruplar arasındaki sayısal değişkenlerdeki farklılıklar Pierson ki-kare testi ile belirlenmiştir. İki mikroskopik inceleme yöntemi arasındaki uyum kappa değerleri belirlenerek incelenmiştir. Kappa değeri >0,75 mükemmel uyum, 0,40-0,75 orta-iyi uyum ve <0,40 düşük uyum olarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel değerlendirme sonucunda $p < 0,05$ değerler anlamlı kabul edilmiştir.

IV. BULGULAR

Çalışmaya Şubat 2018-Aralık 2019 döneminde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Hafsa Sultan Hastanesi Tüberküloz Laboratuvarına tüberküloz ön tanısı ile mikobakteriyolojik inceleme için gönderilen 1499 solunum yolu örneği dahil edilmiştir. Klinik örneklerde LED FM ile EZN boyama yöntemi karşılaştırılmış ve kültür sonuçları referans alınarak LED FM'nin performansı araştırılmıştır. Çalışmada 1101'i balgam, 392'si BAL, 6'sı ETA olmak üzere toplam 1499 hasta örneği değerlendirilmiştir (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. Klinik örneklerin dağılımı

Klinik örnek	Sayı	Yüzde
Balgam	1101	%73.4
BAL	392	%26.2
ETA	6	%0.4
Toplam	1499	%100

Çalışmada LED FM yönteminde iki ayrı okuyucu olduğu için, bakıda pozitif ve/veya yüksek olan değer LED FM sonucu olarak kabul edilmiştir.

İncelenen 1499 örneğin 71'i (%4.7) EZN boyama yöntemi ile, 140'ı (%9.3) LED FM ile pozitif saptanmıştır. Örneklerin 134'ünde (%8.9) sıvı veya katı kültürden en az birinde kültürde üreme saptanmıştır. Kültürde üreme olan 134 kökenin 36'sı (%26.9) TDM olarak tanımlanmıştır. Tüberküloz dışı mikobakteri üreyen örneklerin 21'i balgam, 15'i BAL'dır. Örneklerin mikroskopik inceleme ve kültür sonuçları Tablo 4.2.'de gösterilmiştir.

Örnekler (n)	EZN		LED FM			Kültür	
	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	
	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %	
Balgam (1101)	1055 %95.8	46 %4.2	1021 %92.7	80 %7.3	1021 %92.7	80 %7.3	
BAL (392)	368 %93.9	24 %6.1	333 %84.9	59 %15.1	339 %86.5	53 %13.5	
ETA (6)	5 %83.3	1 %16.7	5 %83.3	1 %16.7	5 %83.3	1 %16.7	
Toplam (1499)	1428 %95.3	71 %4.7	1359 %90.7	140 %9.3	1365 %91.1	134 %8.9	

Tablo 4.2. Klinik örneklerin mikroskopik inceleme ve kültür sonuçları

Satır yüzdeleri alınmıştır.

Kültürde üreme olan 134 örneğin EZN boyama yöntemiyle bakısında; 69'u (%51.5) pozitif, 65'i (%48.5) negatif saptanmıştır. Tablo 4.3.'de örneklerin EZN boyama ile yapılan mikroskopik inceleme sonuçları kültür sonuçları ile karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Tablo 4.3. EZN boyama ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması

EZN	Kültür negatif		Kültür pozitif		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Negatif	1363	%99.9	65	%48.5	1428	%95.3
Pozitif	2	%0.1	69	%51.5	71	%4.7
Şüpheli		0		2		2
1+		0		28		28
2+		2		18		20

3+	0	10	10
4+	0	11	11
Toplam	1365 %100	134 %100	1499 %100

Kültür sonuçları referans olarak alındığında EZN boyama yönteminin duyarlılığı %51.5, özgüllüğü %99.9, pozitif prediktif değeri (PPD) %97.2, negatif prediktif değeri (NPD) %95.4 olarak hesaplanmıştır.

Kültürde üreme olan 134 örneğin LED FM ile 86'sı (%64.2) pozitif, 48'i (%35.8) negatif saptanmıştır. Tablo 4.4'de LED FM sonuçları kültür sonuçları ile karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir. LED FM sonucu şüpheli olan 52 örneğin ve 2+ olan iki örneğin kültüründe ise üreme olmamıştır.

Tablo 4.4. LED FM sonuçlarının kültür sonuçlarıyla karşılaştırılması

LED FM	Kültür negatif		Kültür pozitif		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Negatif	1311	%96	48	%35.8	1359	%90.7
Pozitif	54	%4	86	%64.2	140	%9.3
Şüpheli +		52		16		68
1+		0		25		25
2+		2		19		21
3+		0		9		9
4+		0		17		17
Toplam	1365	%100	134	%100	1499	%100

Kültür sonuçları referans olarak alındığında LED FM'nin duyarlılığı %64.2 özgüllüğü %96, PPD %61.4, NPD %96.5 olarak hesaplanmıştır. Tablo 4.5.'de her iki mikroskopik inceleme yönteminin performans değerleri gösterilmiştir.

Tablo 4.5. EZN boyama ve LED FM'nin performans değerlerinin karşılaştırılması

	EZN	LED FM
Duyarlılık	%51.5	%64.2
Özgüllük	%99.9	%96.0
PPD	%97.2	%61.4
NPD	%95.4	%96.5

Tablo 4.6.'da EZN boyama ve LED FM sonuçları kantitatif olarak karşılaştırılmıştır.

Tablo 4.6. EZN boyama ve LED FM sonuçlarının kantitatif olarak karşılaştırılması

EZN	LED						Toplam
	Negatif	Şüpheli	1+	2+	3+	4+	
Negatif	1357	64	5	2	0	0	1428
Şüpheli	1	1	0	0	0	0	2
1+	1	3	15	6	1	2	28
2+	0	0	3	11	5	1	20
3+	0	0	2	1	3	4	10
4+	0	0	0	1	0	10	11
Toplam	1359	68	25	21	9	17	1499

LED FM ile EZN sonuçları arasındaki uyum kapa istatistiği ile değerlendirilmiş ve sonuç 0.63 ile iyi düzeye uyumu göstermiştir. LED FM okuyucularının sonuçları arasındaki uyum da kapa istatistiği ile değerlendirilmiş ve sonuç 0.71 ile iyi derecede uyumu göstermiştir. LED FM okuyucularından birincisinin ortalama okuma süresi 104.5 ± 35.6 saniye olarak, ikincisinin ortalama okuma süresi 83.0 ± 25.7 saniye olarak hesaplanmıştır. İki okuma süresi arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0.01$). EZN okuma süresi kronometre ile düzenli olarak kaydedilememiş olup ortalama okuma süresi 300 saniye olarak kabul edilmiştir. LED FM okuma süreleriyle EZN okuma süresi arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0.01$). LED FM için ortalama okuma süresi 94 saniye olarak alındığında, ışık mikroskobu ile okuma süresine oranla %69 zaman tasarrufu sağlanmıştır.

Kullanılan boyaların maliyetleri karşılaştırıldığında bir lam başına ortalama maliyet EZN için 0.22 TL, LED FM için 0.09 TL olarak hesaplanmıştır (1 USD=6,05 TL). Mikroskopların markaları ve donanımlarına göre değişiklik göstermekle birlikte LED FM maliyeti ortalama 22.000 TL, ışık mikroskobunun maliyeti ise ortalama 7000 TL'dir. Maliyet analizinde diğer giderler (elektrik, su, mesai süresi ve personel giderleri gibi) dahil edilmemiştir.

LED FM okuyucularına uygulanan anket sonuçlarında her iki okuyucu; floresan boyama yönteminin kolay, inceleme süresinin kısa olduğunu, LED FM ile mikroskobik incelemeyi kullanmak istediklerini ve mikroskopi yöntemlerinden birini tercih edecek olsalar LED FM'yi tercih edeceklerini belirtmişlerdir.

V. TARTIŞMA

Akciğer tüberkülozunun tanısında günümüzde yaygın olarak kullanılmakta olan moleküler testlere karşın balgamın ışık mikroskobu kullanılarak yapılan EZN boyalı mikroskopik incelemesi halen değerini korumaktadır. Bunun nedeni mikroskopik incelemenin kolay ve ucuz olması ve örneğin alındığı gün sonuç vermesidir. Ancak balgamda basilin görülebilmesi için örneğin mililitresinde en az 5000 basil olması gerektiğinden duyarlılığı düşüktür. Konvansiyonel floresan mikroskopi ise EZN'den daha duyarlı olmakla birlikte yüksek maliyeti, civa buharlı aydınlatma sistemi, karanlık oda ihtiyacı ve UV ışın maruziyeti gibi engellerden dolayı düşük ve orta gelirli ülkelerde tercih edilmemektedir (4). Ek bir aparat ile ışık mikroskobuna uygulanabilen LED floresan mikroskoplar, KFM'lerin dezavantajlarını gidermek amacı ile geliştirilmiştir. LED floresan mikroskoplar KFM'lere oranla daha ekonomik, daha düşük bakım gereksinimi olan, daha az elektrik harcayan ve pille çalışabilen cihazlardır. LED ampullerin yarı ömrü uzundur ve UV ışını üretmez. Aynı zamanda inceleme için karanlık oda gerekmez (4). Dünya Sağlık Örgütü tarafından 2009 yılında LED FM'nin tüberküloz tanısında güvenilirliği araştırılmış ve kültür referans yöntem olarak alındığında LED FM'nin duyarlılığı %84, özgüllüğü %98 olarak belirlenmiştir (4). LED FM, EZN mikroskopi ile kıyaslandığında özgüllükte herhangi bir azalma olmadan duyarlılıkta ortalama %6'lık bir artış görülmüştür. Ayrıca LED FM ile yapılan incelemenin EZN'ye göre %50 daha kısa sürede tamamlandığı belirtilmiştir. Bu sonuçların ardından DSÖ 2011 yılında LED FM kullanımına ilişkin bir politika yayınlamıştır (4). Bu politikada LED FM'nin

KFM'nin yerini alması önerilmiş ve LED FM'nin EZN boyalı mikroskopik incelemeye alternatif olabileceği bildirilmiştir.

Dünyada özellikle olgu yükü yüksek olan ve dirençli olguların bulunduğu ülkeler başta olmak üzere birçok ülkede 2004 yılından sonra LED floresan mikroskopinin performansını araştıran çalışma yapılmıştır. Ülkemizde ise tüberküloz tanısında KFM ile EZN boyama yöntemini karşılaştıran çalışmalara rastlanmakla birlikte bir tez çalışması dışında LED FM ile ilgili yayınlanmış özgün bir araştırma yoktur. Bu nedenle araştırmamızın ülkemizde üçüncü düzey hizmet veren bir üniversite hastanesi laboratuvarında akciğer tüberkülozu tanısında LED FM'nin performansını araştırması açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Araştırmamızda LED FM, EZN boyama yöntemine oranla %12.7 daha duyarlı bulunmuştur. Özgüllüğü ise %96 ile EZN'ye göre %3.9 daha düşüktür. Yapılan çalışmalarda da LED FM'nin duyarlılığı EZN'ye göre daha yüksek bulunmuştur. Bu konuda yapılan bir meta-analizde 2000-2014 yılları arasında yayınlanan çalışmalar 11 veri tabanı kullanılarak araştırılmış ve 12 çalışma değerlendirmeye alınmıştır (30). Kültürün referans olarak alındığı bu çalışmalarda LED FM'nin havuzlanmış duyarlılık değeri %66.9, özgüllük değeri %96.1 olarak bulunmuştur. HIV pozitif bireylerde ise duyarlılığın %53'e düştüğü bildirilmiştir. Floresan mikroskopi yöntemlerinde duyarlılığın daha yüksek olmasının bir nedeni mikobakterilerin hücre duvarında yer alan mikolik asitin karbol füksine oranla florokrom boyaları daha iyi absorbe etmesi, bu nedenle hasar görmüş basiller dahil daha fazla sayıda basilin boyanabilmesidir. Duyarlılığı artıran bir başka neden ise, LED FM'de basillerin parlak görünümünden dolayı teknisyenlerin daha çok basili görüp tanıyabilmeleridir (31). LED FM, KFM ve EZN boyama yöntemlerini karşılaştıran ilk çalışma 2008 yılında yayınlanmıştır (32). Bu araştırmada toplam 221 balgam örneği değerlendirilmiştir. Örneklerin %16'sında kültürde üreme olmuştur. LED FM'nin duyarlılığı %84.7, özgüllüğü %98.9, KFM'nin duyarlılığı %73.6, özgüllüğü %99.8, EZN boyamanın duyarlılığı %61.1 ve özgüllüğü %98.9 olarak bulunmuştur. Ayrıca LED FM ile %61 zaman

tasarrufu sağladığı bildirilmiştir. Bu çalışmanın ardından özellikle olgu yükü yüksek olan, direnç sorunu yaşanan ve HIV ile komorbid olguların fazla olduğu Afrika ülkeleri, Hindistan, Çin, Etiyopya gibi Asya ülkelerinden araştırmalar bildirilmiştir. Olgu yükü en yüksek ülkeler arasında olan Hindistan'da 2012 yılında Ulusal Tüberküloz Kontrol Programı gereği 200 mikroskopi laboratuvarında LED FM'ye geçilmiştir. Bir yıl içinde TB ön tanılı hastalarda EZN pozitifliği oranında değişiklik olmazken LED FM pozitifliğinde %30 artış gözlenmiştir (33). Tablo 5.1'de bu araştırmalardan bazılarının sonuçları özetlenmiştir.

Tablo 5.1. LED FM'nin bazı çalışmalardan elde edilen performans değerleri

Araştırma (referans)	Örnek	LED FM		EZN	
		Duyarlılık	Özgüllük	Duyarlılık	Özgüllük
Albert H et al. 2010 Uganda (34)	1394 balgam	%67.9-71.7	%95.3-99.2	%62.3	%98.4
Khatun Z et al, 2011 Bangladeş (35)	150 balgam	%95.3	%94.1	%56.1	%97.6
Cattamanchi A et al, 2011 Uganda (36)	233 balgam	%64.0	%97.0	%56.0	%97.0
Whitelaw A et al, 2011 Güney Afrika (37)	354 balgam	%46.0		%39.0	
Bhalla M. et al, 2013 Hindistan (38)	200 balgam	%83.1	%82.4	%81.6	%83.5
Chaidir L et al, 2013 Endonezya (39)	660 balgam	%75.5	%90	%54.9	%96.6
Imaz M et al, 2017 Arjantin (40)	6968 solunum örneği	%87.7	%99.9	%76.3	%99.9
Gizaw W et al, 2019 Etiyopya (41)	346 balgam	%71.8		%44.5	
Bu araştırma, 2020 Manisa, Türkiye	1499 solunum örneği	%64.2	%96.0	%51.5	%99.9

Buna karşın LED FM'nin EZN ile incelemeye göre tanıya katkısının olmadığını bildiren çalışmalar da vardır (42). Ruanda'da yapılan bir araştırmada dört orta düzey ve dört periferik laboratuvarında toplam 648 örnek her iki yöntemle ve Xpert ile değerlendirilmiştir (42). EZN'nin duyarlılığı periferik laboratuvarlarda %55.1 iken, LED FM'nin %37 olarak bulunmuştur. Orta düzey laboratuvarlarda ise bu oranlar sırası ile %58.3 ve %62.5'tur. Xpert'in tanıya katkısı ise %32 olarak belirlenmiştir. Bu nedenle LED FM'nin EZN incelemeye üstünlüğü olmadığı bildirilmiştir. Araştırmamızda LED FM'nin duyarlılığı %64.2, EZN boyama yönteminin duyarlılığı %51.5 bulunmuştur. Bu değerler yukarıda verilmiş olan çalışmalardan elde edilen sonuçlara benzer veya daha düşüktür. Diyarbakır'da Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yapılan bir uzmanlık tezi araştırmasında da kültür altın standart alınarak 758 klinik örnek LED FM ve EZN ile değerlendirilmiştir. EZN boyama yöntemi ve LED FM için duyarlılık ve özgüllükler sırasıyla %49.02, %99.85 ve %64.7, %96.3 olarak saptanmıştır (43). Bu değerler bizim sonuçlarımıza benzerlik göstermektedir. Mikroskopik incelemenin duyarlılığını etkileyen birçok faktör vardır. Çalışılan popülasyondaki hastalık prevalansı, çalışma yöntemi, hastaların klinik tablosu ve değerlendiren kişinin deneyimi bu faktörler arasındadır. Çalışmaların çoğu yüksek olgu yükü olan ülkelerde yapılmıştır. Ülkemizde TB insidansı DSÖ 2019 raporuna göre yüz binde 16'dır (1). Bu oran Hindistan'da yüz binde 199, Uganda'da yüz binde 200, Bangladeş'te yüz binde 221'dir. Araştırmamızda her iki yöntemin özgüllük değerleri benzer (%99.9 ve %96.0) ve literatür sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Çalıştığımız örnek sayısı bildirilen çalışmaların çoğundan fazladır. Bu nedenle elde ettiğimiz performans değerlerinin ülkemiz verisi olarak önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Araştırmamızda mikroskopik inceleme sonuçları kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Kantitatif değerlendirme sonuçları her iki yöntem arasında uyumlu bulunmuştur. Ancak şüpheli sonuçlar açısından iki yöntem arasında belirgin bir fark vardır. EZN incelemede sadece iki örnekte şüpheli sonuç verilmiş ve bu örneklerin kültüründe üreme olmuştur. LED FM de ise şüpheli sonuç verilen örnek sayısı 68'dir. Bu örneklerin 16'sında kültürde üreme

olmuştur. Dünya Sağlık Örgütü Stop TB Partnership tarafından 2013 yılında yayınlanan Tüberküloz Tanısında Balgam Mikroskopisi El Kitabında floresan mikroskopi ile şüpheli pozitif saptanan yaymaların EZN ile tekrar boyanmaması gerektiği vurgulanmıştır (44). Bu nedenle araştırmamızda LED FM ile şüpheli pozitif yaymalar tekrar boyanmamıştır. Mikroskopik inceleme sonucunun şüpheli pozitif olması örnekteki basil yükünün düşük olmasına bağlı olabildiği gibi yanlış pozitifliğe de bağlı olabilir. Basil yükü düşük olan HIV pozitif hastalarda LED FM'nin duyarlılığının daha yüksek olduğunu bildiren araştırmalar vardır. Hindistan'da HIV ile enfekte akciğer TB kuşku hastalarda yapılan bir araştırmada 800 balgam örneği incelenmiş, 130 örnek LED FM ile, 33 örnek EZN ile pozitif bulunmuştur (45). Kültür altın standart alınarak LED FM in duyarlılığı %67.5, özgüllüğü %88.7 olarak hesaplanmıştır. Araştırmada kültür negatif, LED FM şüpheli pozitif 78 hasta bulunmuştur. Bu olgulardan 15'i antitüberküloz tedaviye yanıt vermiş ve tanı TB olarak doğrulanmıştır. Hindistan'da yapılan geriye dönük bir kohort çalışmada da 2011-2012 yıllarında LED FM'nin kullanıma girmesi ile periferdeki mikroskopi laboratuvarlarında şüpheli sonuç sıklığında %9 artış olduğu bildirilmiştir. (46). Araştırmamızda 52 örnekte LED FM şüpheli pozitif, kültür negatif bulunmuştur. LED FM ile yanlış pozitif sonuç alınmasının bir nedeni örnekteki inorganik materyallerin florokrom boya ile boyanmaları olabilir. Bu sonuç testin özgüllüğünü etkilemektedir. Ancak araştırmamızda yanlış pozitif örnek sayısının beklenenden fazla olmasının en önemli nedeninin okuyucuların LED FM konusunda deneyimlerinin az olmasına bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Floresan mikroskoplar ile yanlış pozitif sonuçların alınabileceği ve bu nedenle okuyucuların deneyimlerinin önemli olduğu vurgulanmaktadır (40, 47). Arjantin'de yapılan bir araştırmada daha önce KFM konusunda deneyimi olmayan TB laboratuvarı çalışanları LED floresan mikroskop konusunda eğitim programına alınmış ve yeterlilikleri değerlendirilmiştir (40). Araştırmada teknisyenler önce üç gün teorik ve teknik bilgi almış, daha sonra iki ay kendi laboratuvarlarında eğitmen olmaksızın örnekleri hem EZN hem de LED FM ile incelemişlerdir. Performansı iyi bulunan teknisyenler üçüncü aşamada kör eğitim ile izlenmiştir. İlk üç günlük

eğitim sonrası panel sonuçları teknisyenlerin %70'nin yanlış pozitif sonuç verdiğini göstermiştir. Diğer iki eğitim döneminde ise yanlış pozitif sonuçlarda anlamlı azalma olduğu gözlenmiş, duyarlılık %96.8, özgüllük %99.8'e ulaşmıştır. Yeterli performans değeri için günde en az üç, yılda en az 750 örneğin incelenmesinin gerekli olduğu gösterilmiştir. Araştırmamızda deneyim eksikliğinin giderilmesi amacı ile her iki okuyucu araştırma başlamadan önce florokrom boyama ve LED floresan mikroskop kullanımı için iki hafta süreli eğitim almıştır. Araştırmacıların okuma süreleri arasında anlamlı fark bulunmakla birlikte araştırma sonunda her iki okuyucunun sonuçları uyumlu bulunmuştur. Ancak LED FM ile şüpheli pozitif sonuçların fazla bulunması iki haftalık eğitim süresinin bizim laboratuvarımız gibi örnek sayısı az olan laboratuvarlar için yeterli olmadığını, eğitim süresinin uzatılması ile şüpheli pozitif sonuçların sayısında azalma olabileceğini düşündürmektedir.

Araştırmamızda LED FM için okuma süresi ortalama 94 saniye, EZN inceleme için 300 saniye bulunmuş, LED FM ile %69 zaman tasarrufu sağlandığı görülmüştür. İnceleme süresinin kısa olması LED FM'nin önemli avantajlarından biridir. Dünya Sağlık Örgütü de yayınladığı politikada LED FM'nin %50 daha hızlı sonuç verdiği bildirilmiştir (4). Hindistan'da yapılan bir araştırmada EZN inceleme süresi beş dakika iken, LED FM'nin iki dakika olduğu bildirilmiştir (38).

Her iki inceleme yönteminin maliyetleri değerlendirildiğinde LED floresan mikroskop ışık mikroskobuna oranla yaklaşık üç kat daha pahalı bulunmuştur. Boyaların maliyetleri karşılaştırıldığında ise lam başına ortalama maliyet florokrom boya için 0.09 TL, EZN için 0.22 TL'dir. Araştırmada florokrom boyanın ticari kitler yerine laboratuvar yapımı olarak kullanılması maliyeti belirgin ölçüde düşürmüştür. Güney Afrika'da yapılan bir araştırmada da maliyetler lam başına EZN için 2.10 USD, LED FM için 1.63 USD olarak bulunmuştur (37). LED floresan mikroskopların daha pahalı olması tüberküloz laboratuvarlarında kullanımını kısıtlayabilir. Ancak KFM'lere oranla daha ucuz olması ve kullanım avantajları dikkate alınmalıdır.

Ayrıca LED floresan mikroskopların TB tanısı dışında malarya, tripanozomiyaz ve koksidiyoz gibi hastalıkların tanısında da kullanılabilmesi entegre laboratuvarlar için avantaj oluşturmakta ve maliyet etkinliğe katkı sağlamaktadır (48). Tayland'da yapılan kapsamlı bir maliyet etkinlik analizinde, bina ve personel giderleri, cihaz ve ekipmanlar, sarf malzemelerinin tümü analize dahil edilmiş ve sonuçta LED FM'nin maliyeti 1.03 USD, EZN'nin maliyeti 1.16 USD olarak hesaplanmıştır (49). LED FM'nin kullanıcı dostu olması da önemli bir avantaj olarak bildirilmektedir (50). Mikroskobun açıldığı anda kullanılabilmesi, sık bakım gerektirmemesi, pille çalışabilmesi, karanlık oda gerektirmemesi, inceleme süresinin kısa olması kullanıcılar için tercih nedeni olmaktadır. Araştırmamızda uyguladığımız anket sonuçları da EZN inceleme yerine LED FM yönteminin tercih edileceğini göstermiştir.

Sonuç olarak araştırmamızda akciğer TB tanısında LED FM'nin duyarlılığı EZN incelemeye göre %12.7 fazla bulunmuştur. Araştırmamızda LED FM duyarlılığı bazı çalışmalardan düşük bulunmuştur. Çalışılan popülasyondaki hastalık prevalansı, çalışma yöntemi, hastaların klinik tablosu ve değerlendiren kişinin deneyimi bunu etkilemiş olabilir. Araştırmamızda LED FM ile şüpheli pozitif sonuç oranı beklenenden yüksektir. Okuyucuların LED FM konusunda deneyimsiz olması bu konuda etkili olabilir. Bu nedenle LED FM'nin rutin kullanıma girmeden önce kullanıcıların en az iki ay süreli eğitim almaları gerektiği düşünülmüştür. LED FM ile okuma süresi EZN'den daha kısa bulunmuş, %69 zaman tasarrufu sağlanmıştır. LED floresan mikroskoplar ışık mikroskoplarından daha pahalı olmakla birlikte olgu yükü yüksek olan laboratuvarlarda kullanılmaları durumunda maliyet etkin olabilirler. Araştırmalarda bir teknisyenin uygun şekilde günde ancak 30-40 EZN incelemesi yapabileceği bildirilmiştir (47). Floresan mikroskop kullanıldığında ise bu sayı 100'ün üzerindedir. Bu nedenle olgu yükü düşük olan ülkemizde LED FM'nin öncelikle göğüs hastalıkları hastanelerinin laboratuvarlarında ve büyük ölçekli diğer laboratuvarlarda kullanımının yararlı olacağı düşünülmüştür.

VI. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sonuç olarak arařtırmamızda akciğer TB tanısında LED FM'nin duyarlılıđı EZN incelemeye göre %12.7 fazla bulunmuřtur. Arařtırmamızda LED FM duyarlılıđı bazı çalıřmalardan dūřuk bulunmuřtur. Çalıřılan popūlasyondaki hastalık prevalansı, çalıřma yōntemi, hastaların klinik tablosu ve deđerlendiren kiřinin deneyimi bunu etkilemiř olabilir. Arařtırmamızda LED FM ile řūpheli pozitif sonuç oranı beklenenden yūksektir. Okuyucuların LED FM konusunda deneyimsiz olması bu konuda etkili olabilir. Bu nedenle LED FM'nin rutin kullanıma girmeden Őnce kullanıcıların en az iki ay sūreli eđitim almaları gerektiđi dūřūnūlmūřtur. LED FM ile okuma sūresi EZN'den daha kısa bulunmuř, %69 zaman tasarrufu sađlanmıřtır. LED floresan mikroskoplar iřık mikroskoplarından daha pahalı olmakla birlikte olgu yūkū yūsek olan laboratuvarlarda kullanılmaları durumunda maliyet etkin olabilirler. Bu nedenle olgu yūkū dūřuk olan Őlkemizde LED FM'nin Őncelikle gōđū hastalıkları hastanelerinin laboratuvarlarında ve būyūk Őlekli diđer laboratuvarlarda kullanımının yararlı olacađı dūřūnūlmūřtur.

VII. ÖZET

TÜBERKÜLOZ TANISINDA LED FLORESAN MİKROSKOPİNİN PERFORMANSININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Amaç: Projenin amacı akciğer tüberkülozu kuşkusu olan hastaların solunum yolu örneklerinin mikroskopik incelemesinde LED floresan mikroskopi (LED FM) ile Erlich Ziehl Nelseen (EZN) boyama yöntemini karşılaştırmak ve kültür sonuçları referans alınarak LED FM'nin performansını araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Araştırmada Şubat 2018-Aralık 2019 döneminde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Hafsa Sultan Hastanesi Tüberküloz Laboratuvarında akciğer tüberkülozu ön tanılı hastalardan alınan solunum yolu örnekleri incelenmiştir. NALC-NaOH yöntemi ile işlenen örneklerden ikişer yayma hazırlanmış ve yaymalar iki okuyucu tarafından kör olarak hem EZN hem de LED FM ile incelenmiştir. Performans değerlendirmesinde kültür sonuçları referans alınmıştır.

Bulgular: Araştırmada 1499 solunum yolu örneği değerlendirilmiştir. Örneklerin 134'ünün (%8.9) kültüründe mikobakteri üremiştir. Kültür sonuçları referans alındığında LED FM'nin duyarlılığı %64,2, özgüllüğü %96, pozitif prediktif değeri %61.4 ve negatif prediktif değeri %96.5 bulunmuştur. EZN yönteminin duyarlılığı ise %51.5, özgüllüğü %99.9, pozitif prediktif değeri %97.2 ve negatif prediktif değeri %95.4'dir. Ancak LED FM'de yayma şüpheli, kültür negatif (54/1365) sonuçlar EZN'den (0/1365) anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bunun nedeninin okuyucuların deneyim eksikliğine bağlı olduğu düşünülmüştür. LED FM inceleme süresi %69 zaman tasarrufu

sağlanmıştır. LED floresan mikroskopların maliyetleri yüksek olmakla birlikte florokrom boyama maliyeti EZN boyama yönteminden ucuz bulunmuştur. Okuyucular arasındaki uyum iyi derecede bulunmuş ve okuyuculara yapılan anket sonucu rutin incelemede LED FM tercih edilebileceği belirlenmiştir.

Sonuç: LED FM'nin duyarlılığı EZN'den %12.7 daha yüksek bulunmuştur. Ancak yanlış pozitif sonuç oranının yüksek olması nedeni ile LED FM'nin okuyuculara gerekli eğitim verildikten sonra kullanıma girmesi gereklidir. LED FM'nin ülkemizde büyük ölçekli laboratuvarlarda kullanılmasının maliyet etkin olacağı düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Tüberküloz, tanı, LED floresan mikroskopi, florokrom boyama, karbol fuksin boyama, kültür

VIII. İNGİLİZCE ÖZET

EVALUATION OF THE PERFORMANCE OF LED FLUORESCENT MICROSCOPY IN DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS

Aim: The aim of the Project is to compare of the results of LED fluorescent microscopy (LED FM) and Erlich Ziehl Nelseen (EZN) staining in the examination of the respiratory specimens and to evaluate the performance of LED fluorescent microscopy with culture.

Materials and Methods: In the study, the respiratory specimens obtained from patients prediagnosed with pulmonary tuberculosis were examined in the Tuberculosis Laboratory of Manisa Celal Bayar University Hafsa Sultan Hospital between February 2018 and November 2019. Two smears from each specimen processed with NALC-NaOH method were prepared and they were evaluated both EZN and LED FM by blind readers. The results of culture were used as reference for determination of the performance of LED FM.

Results: In the study 1499 respiratory specimens were evaluated with LED FM. Mycobacteria were grown in the culture of 134 specimens (8.9%). When the culture was accepted as reference method, the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of LED FM were found as 64.2%, 96%, 61.4% and 96.5%, respectively. However scarce positive-culture negative results (54/1365) with LED FM were obtained significantly higher than the results with EZN (0/1365). The reason of this was thought to be due to the lack of the experience of the readers. The

reading time of LED FM was 69% time saving. While the costs of LED fluorescent microscopes are high, the cost of fluorescent stains found to be cheaper than the EZN staining method. The consistency between the readers was found to be good and it was determined that LED FM could be preferred in routine examination as a result of the survey conducted to the readers.

Conclusions: The sensitivity of LED FM was found 12.7% higher than the sensitivity of EZN. However, because of the high rate of false positive results, the introduction of LED-FM should be accompanied by appropriate training of the readers. It is also thought that the use of LED FM will be cost-effective in large-scale laboratories in our country.

Key words: Tuberculosis, diagnosis, LED fluorescence microscopy, fluorochrome staining, carbol fuchsin staining, culture

IX. KAYNAKLAR

1. World Health Organization, Global Tuberculosis Report, 2019. https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
2. Somöskovi A, Hotaling JE, Fitzgerald M, et al. Lessons form a proficiency testing event for acid fast microscopy. Chest 2001;120(1):250-7.
3. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds), [Başustaoğlu A (çev. editörü)]. Klinik Mikrobiyoloji Kitabı'nda (Manual of Clinical Microbiology) 2009, Cilt 1(543-601).
4. World Health Organization, Fluorescent light-emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis policy Policy statement, 2011 https://www.who.int/tb/publications/2011/led_microscopy_diagnosis_9_789241501613/en/
5. <https://www.klimud.org/content/128/2-ulusal-klinik-mikrobiyoloji-kongresi-sunumlari>

6. Kılıçarslan Z. Dünyada tüberküloz epidemiyolojisi. *Mycobacterium tuberculosis* ve tüberküloz Kitabı'nda. Yüce A, Özyurt M, Sürücüoğlu S, uzun M, Sarıgüzel N (eds), Anka Kitapçılık, 1. Baskı, 2016, 1-9.
7. TC Sağlık Bakanlığı Tüberküloz Tanı ve Tedavi Rehberi, 2. Baskı Ankara, Mayıs 2019.
8. WHO. The End TB Strategy, 2015. WHO/HTM/TB/2015.19
9. Forbes BA, Hall GS, Miller MB, et al. Practice guidelines for clinical microbiology laboratories: Mycobacteria. Clin Microbiol Rev 2018; 31(2):e00038-17.
10. Kocagöz T. Mycobacterium türlerinin genel özellikleri. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (editörler). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi 3. Baskı. İstanbul: Nobel Kitapevleri; 2008: 2277-2283.
11. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Mycobacteria. Bailey&Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. St. Louis, Mosby, 2007; 478-510.
12. Winn W, Allen S, Janda W. Mycobacteria. Konemans'color atlas and textbook of diagnostic microbiology 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 2006; 19: 1064-150.
13. Aktaş AE. Tüberküloz tanısında kullanılan geleneksel yöntemler. *Mycobacterium tuberculosis* ve Tüberküloz Kitabı'nda. Yüce A, Özyurt M, Sürücüoğlu S, Uzun M, Sarıgüzel N (eds), Anka Kitapçılık, 1. Baskı, 2016, 54-67.
14. Özkara Ş, Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H. Türkiye'de Tüberkülozun Kontrolü İçin Başvuru Kitabı. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Dairesi Başkanlığı Yayınları, Ankara, 2003.
15. Woods GL. The Mycobacteriology Laboratory and New Diagnostic Techniques. "Moellering RC (ed) Infect Dis Clin North Am Saunders Company Pennsylvania 16: 127 (2002).
16. Mase SR, Ramsay A, Ng V, et al. Yield of serial sputum specimen examinations in the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review. Int J Tuberc Lung Dis 2007;11:485-495.

17. Noeske J, Dopico E, Torrea G, et al. Two vs. three sputum samples for microscopic detection of tuberculosis in a high HIV prevalence population. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13(7):842–847.
18. Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi (TR0802.16) Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi Ulusal Mikrobiyoloji Standartları 01.01.2014 / Sürüm: 1.1 / Belge No: UTTR-2 / Örnek Yönetimi /Tüberküloz 4-10/20
19. Avkan VO. Auramine rhodamine floresan boyama. Klimik Derneği Tüberküloz Çalışma Grubu. VI. Tüberküloz Sempozyumu ve IX. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kursu Kitabı. Manisa. 2011.
20. Steingart KR, Henry M, Ng V. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review [published correction appears in *Lancet Infect Dis*. 2006 Oct;6(10):628]. *Lancet Infect Dis*. 2006;6(9):570–581. doi:10.1016/S1473-3099(06)70578-3.
21. Sürücüoğlu S. Tüberküloz basilinin identifikasyonu. Klimik Derneği Tüberküloz Çalışma Grubu. VI. Tüberküloz Sempozyumu ve IX. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kursu Kitabı. Manisa. 2011.
22. Özel DD, İğci N, Peker S, ve ark. 2014, Temel Proteomik Stratejiler, Ankara Üniversitesi Yayınevi, ISBN: 978-605-136-148-2, 2014
23. Butler WR, O'Connor SP, Yakrus MA, Gross WM. Cross-reactivity of genetic probe for detection of *Mycobacterium tuberculosis* with newly described species *Mycobacterium celatum*. *J Clin Microbiol* 1994;32:536–538.
24. Ford EG, Snead SJ, Todd J, et al. Strains of *Mycobacterium terrae* complex which react with DNA probes for *M. tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 1993;31:2805–2806.
25. Clarridge JE. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious

- diseases. Clin Microbiol Rev 2004;17:840–862. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>.
26. Centers for Disease Control and Prevention. 2009. Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 58(1):7–10.
 27. WHO. Definitions and reporting framework for tuberculosis – 2013 revision. Geneva, 2003. WHO/HTM/TB/2013.
 28. Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi (TR0802.16) Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi Ulusal Mikrobiyoloji Standartları 01.01.2014 / Sürüm: 1.1 / Belge no: UTTR-2 / Örnek Yönetimi / Tüberküloz 10-19/20
 29. Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi (TR0802.16) Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi Ulusal Mikrobiyoloji Standartları 01.01.2014 / Sürüm: 1.1 / Belge no: UTTR-3 / Mikroskopi / Tüberküloz 3-21/22
 30. Chang EW, Page AL, Bonnet M. Light-emitting diode fluorescence microscopy for tuberculosis diagnosis: a meta-analysis. Eur Respir J. 2016;47(3):929–937. doi:10.1183/13993003.00978-2015
 31. Thapa B, Reza LW, Kumar AM, et al. Light Emitting Diode Fluorescence Microscopy increased the detection of smear-positives during follow-up of Tuberculosis patients in India: program implications. BMC Res Notes. 2015;8:596. Published 2015 Oct 23. doi:10.1186/s13104-015-1584-z
 32. Marais BJ, Brittle W, Painczyk K, et al. Use of light-emitting diode fluorescence microscopy to detect acid-fast bacilli in sputum. Clin Infect Dis. 2008;47(2):203–207. doi:10.1086/589248
 33. Reza LW, Satyanarayana S, Enarson DA, et al. LED-fluorescence microscopy for diagnosis of pulmonary tuberculosis under programmatic conditions in India. PLoS One. 2013;8(10):e75566. Published 2013 Oct 9. doi:10.1371/journal.pone.0075566
 34. Albert H, Manabe Y, Lukyamuzi G, et al. Performance of three LED-based fluorescence microscopy systems for detection of tuberculosis

- in Uganda. PLoS One. 2010;5(12):e15206. Published 2010 Dec 28. doi:10.1371/journal.pone.0015206
35. Khatun Z, Kamal M, Roy CK, et al. Usefulness of light emitting diode (LED) fluorescent microscopy as a tool for rapid and effective method for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Bangladesh Med Res Counc Bull. 2011;37(1):7–10. doi:10.3329/bmrcb.v37i1.7792
 36. Cattamanchi A, Huang L, Worodria W, et al. Integrated strategies to optimize sputum smear microscopy: a prospective observational study. Am J Respir Crit Care Med. 2011;183(4):547–551. doi:10.1164/rccm.201008-1207OC
 37. Whitelaw A, Peter J, Sohn H, et al. Comparative cost and performance of light-emitting diode microscopy in HIV-tuberculosis-co-infected patients. Eur Respir J. 2011;38(6):1393–1397. doi:10.1183/09031936.00023211
 38. Bhalla M, Sidiq Z, Sharma PP, et al. Performance of light-emitting diode fluorescence microscope for diagnosis of tuberculosis. Int J Mycobacteriol. 2013;2(3):174–178. doi:10.1016/j.ijmyco.2013.05.001
 39. Chaidir L, Parwati I, Annisa J, et al. Implementation of LED fluorescence microscopy for diagnosis of pulmonary and HIV-associated tuberculosis in a hospital setting in Indonesia. PLoS One. 2013;8(4):e61727. Published 2013 Apr 19. doi:10.1371/journal.pone.0061727
 40. Imaz M, Allassia S, Aranibar M, et al. Biomedica. 2017;37(2):164–174. Published 2017 Jun 1. doi:10.7705/biomedica.v37i2.3276
 41. Gizaw N, Abera A, Sisay S, et al. The yield of Auramine O staining using led microscopy with bleach treated sputum samples for detection of pulmonary tuberculosis at St. Peter tuberculosis specialized hospital, Addis Ababa, Ethiopia. J Clin Tuberc Other Mycobact Dis. 2019;18:100140. Published 2019 Dec 12. doi:10.1016/j.jctube.2019.100140
 42. Ngabonziza JC, Ssengooba W, Mutua F, et al. Diagnostic performance of smear microscopy and incremental yield of Xpert in

- detection of pulmonary tuberculosis in Rwanda. *BMC Infect Dis.* 2016;16(1):660. Published 2016 Nov 8. doi:10.1186/s12879-016-2009-x
43. Şükran Can. Tüberküloz tanısında LED floresan mikroskop yöntemi ile Ziehl Neelsen yönteminin karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tez Danışmanı: Prof. Dr. Selahattin Atmaca, Diyarbakır, 2013.
44. http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/TB%20MICROSCOPY%20HANDBOOK_FINAL.pdf
45. Bhadade A, Mehta P, Kanade S, et al. Utility of light-emitting diode microscopy for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in HIV infected patients. *Int J Mycobacteriol.* 2015;4(1):31–35. doi:10.1016/j.ijmyco.2015.01.002
46. Goel S, Pandey R, Kumar M, et al. Impact of introducing light-emitting diode fluorescence microscopy services for diagnosis of pulmonary tuberculosis under Revised National Tuberculosis Control Program India. *Lung India.* 2018;35(4):307–311. doi:10.4103/lungindia.lungindia_475_17
47. Toman's tuberculosis case detection, treatment, and monitoring: questions and answers. Toman Frieden (ed), 2nd ed. WHO/HTM/TB/2004.334
48. Sagili KD, Muniyandi M, Nilgiriwala KS, et al. Cost-effectiveness of GeneXpert and LED-FM for diagnosis of pulmonary tuberculosis: A systematic review. *PLoS One.* 2018;13(10):e0205233. Published 2018 Oct 29. doi:10.1371/journal.pone.0205233
49. Sohn H, Sinthuwattanawibool C, Rienthong S, et al. Fluorescence microscopy is less expensive than Ziehl-Neelsen microscopy in Thailand. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2009;13(2):266–268.
50. Van Deun A, Chonde TM, Gumusboga M, et al. Performance and acceptability of the FluoLED Easy module for tuberculosis fluorescence microscopy. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008;12(9):1009–1014.

