



T.C.SAĞLIK BAKANLIĞI

İZMİR ATATÜRK EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Eğitim Sorumlusu: Prof. Dr. Selçuk KAYA

**MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS KOMPLEKS
SUŞLARININ BACTEC MGIT 960 SİSTEMİYLE PRİMER
ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA DİRENCİNİN
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. YUSUF SAĞLAM

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. İLHAN AFŞAR

İZMİR – 2015

T.C.SAĞLIK BAKANLIĞI
İZMİR ATATÜRK EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS KOMPLEKS
SUŞLARININ BACTEC MGIT 960 SİSTEMİYLE PRİMER
ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA DİRENCİNİN
ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. YUSUF SAĞLAM

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. İLHAN AFŞAR

İZMİR - 2015

T.C.SAĞLIK BAKANLIĞI
İZMİR ATATÜRK EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS KOMPLEKS
SUŞLARININ
BACTEC MGIT 960 SİSTEMİYLE PRİMER
ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA DİRENCİNİN
ARAŞTIRILMASI

TEZİ HAZIRLAYAN

Dr. YUSUF SAĞLAM

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ Anabilim Dalı Uzmanlık Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma tarafımızca incelenerek her yönü ile ‘‘Tıpta Uzmanlık’’ tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

Tez Danışmanı : Doç. Dr. İlhan AFŞAR
T.C. Sağlık Bakanlığı İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof.Dr. Selçuk Kaya
T.C. Sağlık Bakanlığı İzmir Katip Çelebi Üniversitesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof.Dr. Cengiz Çavuşoğlu
Ege Üniv. Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. M. Ali Malas

Tıp Fakültesi Dekanı

I.ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım süresince bilgi ve desteğini esirgemeyen, beni büyük bir ilgiyle destekleyen, titizliği ile bize her zaman örnek olan değerli Tez Danışmanı hocam Doç. Dr. İlhan Afşar 'a, uzmanlık eğitimimizde büyük katkısı bulunan Anabilim Dalı Başkanı hocamız Sayın Prof. Dr. Selçuk Kaya'ya ve diğer hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim. Asistanlık süresi boyunca birlikte çalıştığımız teknisyen arkadaşlarıma da teşekkür ederim.

Tez çalışmamda büyük desteğini gördüğüm İzmir Dr. Suat Seren Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Lab.' da görevli Uzm . Dr. Can Biçmen ve teknisyen Erol Demirel' e teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca beni destekleyen, maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen aileme özellikle de anneme teşekkür ederim.

Yusuf SAĞLAM

Ocak 2015

II. İÇİNDEKİLER

| | Sayfa No |
|---|-------------|
| ÖNSÖZ | i |
| İÇİNDEKİLER | ii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | vi |
| TABLolar DİZİNİ | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | viii |
| 1.GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| 2.GENEL BİLGİLER | 2 |
| 2.1. Dünyada Tüberküloz | 2 |
| 2.2. Türkiye’de Tüberküloz | 4 |
| 2.3. Mikobakterilerin sınıflandırılması | 7 |
| 2.4. Mikobakterilerin Bakteriyolojik Özellikleri | 8 |
| 2.5. Mycobacterium Tuberculosis Kompleksin mikrobiyolojik özellikleri | 10 |
| 2.5.1. Mycobacterium tuberculosis | 11 |
| 2.5.2. Mycobacterium bovis | 11 |
| 2.5.3. Mycobacterium africanum | 11 |
| 2.5.4. Mycobacterium microti | 11 |
| 2.5.5. Mycobacterium canettii | 11 |
| 2.6. Virulans | 11 |
| 2.6.1.Mikobakteriel lipidler | 12 |
| 2.6.2.Mikobakteriyel polisakkaritler | 12 |
| 2.6.3. Mikobakteriyel proteinler | 13 |
| 2.7. İmmunopatogenez | 13 |
| | iii |

| | |
|--|----|
| 2.8.Laboratuvar Tanı | 15 |
| 2.8.1. Klinik Materyalin Hastadan Alınıp laboratuvara Gönderilmesi | 15 |
| 2.8.2. Klinik Örneklerin İşlenmesi | 17 |
| 2.8.3. Mikroskopik İnceleme | 18 |
| 2.8.4. Kültür Yöntemleri | 19 |
| 2.8.4.1.Konvansiyonel Kültür Yöntemleri ve Besiyerleri | 20 |
| 2.8.4.2.Hızlı Kültür Yöntemleri | 21 |
| 2.8.5. İdentifikasyon | 21 |
| 2.8.5.1 <i>M.tuberculosis</i> kompleks'in Fenotipik İdentifikasyonu | 21 |
| 2.8.5.2. <i>M. tuberculosis</i> kompleks'in Genotipik İdentifikasyonu | 22 |
| 2.8.5.3. <i>M.tuberculosis</i> kompleks'in Tanısında Moleküler Yöntemler | 22 |
| 2.8.6. Antibiyotik Duyarlılık Testleri | 22 |
| 2.8.6.1. Klasik Kültür Yöntemleri ile Yapılan Duyarlılık Testleri | 24 |
| - Orantı (Proporsiyon) Yöntemi | 24 |
| - Mutlak Konsantrasyon Yöntemi | 24 |
| - Direnç Oranı Yöntemi | 24 |
| 2.8.6.2. Hızlı Kültür Yöntemleri ile Yapılan Duyarlılık Testleri | 25 |
| - BACTEC 460 TB (Radyometrik) Kültür Sistemi | 25 |
| - MGIT 960 (Florometrik) Kültür Sistemi | 25 |
| - MB /BacT /ALERT 3D MB Kolorimetrik Kültür Sistemi (BioMe'rieux) | 27 |
| - Karbondioksit Oluşumunu Saptayan Sistem; ESP Culture | |

| | |
|--|-----------|
| System II (Accumed)(Versa TREK sistemi) | 27 |
| - TK Kùltür Sistemi (Salubris İnc.) | 27 |
| 2.8.6.3. Kùltür Dışı Yöntemler | 28 |
| 2.8.6.4. E-test | 29 |
| 2.8.6.5. Mikobakteri Antimikrobiyal Duyarlılık Belirlenmesinde Kullanılan Genotipik Yöntemler | 30 |
| 2.9.Tedavi | 29 |
| 2.9.1.Birinci Seçenek Antitüberküloz İlaçlar | 30 |
| 2.10. <i>M. Tuberculosis</i> ve İlaç Direnci | 31 |
| 2.10.1. İlaç Direnci İle İlgili Tanımlar | 32 |
| 2.10.2. Dünyada İlaç Direnci | 32 |
| 2.10.3. Türkiye’de İlaç Direnci | 33 |
| 3.GEREÇ VE YÖNTEM | 36 |
| 3.1. İdentifikasyon Teyidi | 36 |
| 3.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri | 36 |
| 3.3. Kullanılan Malzemeler | 36 |
| 3.4. İnokulum Hazırlanması (L-J ‘den Middlebrook 7H9 ‘a pasajlayarak BACTEC MGIT 960 Cihazında üretme) | 37 |
| 3.5.Antibiyotik Solüsyonlarının Hazırlanması | 37 |
| 3.6. Antibiyogram işlemleri | 38 |
| 3.7. Sonuçların Değerlendirilmesi | 39 |
| 3.8.Kalite Kontrol | 39 |

| | |
|--|-----------|
| 4.BULGULAR | 40 |
| 4.1. Hastaların Yaş Dağılımı | 40 |
| 4.2. İzole edilen MTBC suşlarının geldiği kliniklere göre dağılımı | 41 |
| 4.3. İzole edilen MTBC suşlarının klinik örneklerle göre dağılımı | 41 |
| 4.4. Her bir ilacın toplam direnç oranları | 42 |
| 4.5. İzole edilen MTBC suşlarının ilaç direnç dağılımı | 43 |
| | |
| 5.TARTIŞMA | 44 |
| SONUÇLAR | 52 |
| ÖZET | 53 |
| SUMMARY | 54 |
| KAYNAKLAR | 56 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|--------------------|--|
| TB | T überk \ddot{u} loz |
| DSÖ | D ünya Sağlık Örgütü |
| ÇİD-TB | Ç ok ilaç dirençli t \ddot{u} berk \ddot{u} loz |
| MTBC | M ycobacterium T uberculosis C ompleks |
| ARB | A side dirençli (r esistan) basil |
| PCR | P olimeraz C hain R eaction |
| IS6110-RFLP | İ nsertion S equence 6110-R estriction F ragment L ength P olimorfizm |
| STR | S treptomisin |
| INH | İ zoniyazid |
| EMB | E tambutol |
| RIF | R ifampisin |
| PZA | P irazinamid |
| PAS | P araaminosalisilikasit |
| HIV | H uman İ mmun Deficieny V irus |
| MGIT | M ycobacteria g rowth i ndicator t ube |
| DGTS | D oğrudan G özetimli T edavi S tratejisi |
| DNA | D eoksiriboN \ddot{u} kleik A sit |
| TNF | T ümör nekroze edici faktör |
| PPD | P urifiye P rotein D erivesi |
| EZN | E rlich Z iehl N eelsen |
| BCG | B acille C almette G uerin |
| BOS | B eyin O murilik S ıvısı |

| | |
|--------------|---|
| CDC | Centers for Diseases Control and Prevention |
| NALC | N-Asetil-L-Sistein |
| L-J | Löweinstein - Jensen |
| NaOH | Sodyum hidroksit |
| OADC | Oleik Asit, Albümin, Dekstroz, Katalaz |
| GI | Growth Indeks(Üreme İndeksi) |
| VSD | Verem Savaş Dispanseri |
| GU | Growth Unit |
| HPLC | High Performance Liquid Chromotograpy |
| MB | Middlebrook |
| PANTA | Polimiksin B, Amfoterisin B, Nalidiksik asit, Trimetoprim, Azlosilin |

TABLolar DİZİNİ

| | | |
|------------------|--|----|
| Tablo 1. | Woods ve Washington sınıflandırılması | 8 |
| Tablo 2. | Mikobakterilerin genel üretim besiyerleri | 20 |
| Tablo 3. | Antitüberküloz ilaçlarda dirençten sorumlu olan mekanizmalar | 31 |
| Tablo 4. | İlaç Duyarlılık Testi (İDT) Çalışılan Hastalarda Olgu Tanımına Göre Tekli ve Çoklu İlaç Direnç Dağılımları, 2010 | 34 |
| Tablo 5. | İlaç Duyarlılık Testi (İDT) Çalışılan Hastalarda Olgu Tanımına Göre Her Bir TB İlacı İçin Toplam Direnç Sonuçları, 2005-2010 | 35 |
| Tablo 6. | MGIT tüplerine eklenen ilaç konsantrasyonları | 38 |
| Tablo 7. | İzole edilen MTBC suşlarının yaş ve cinsiyete göre dağılımı | 40 |
| Tablo 8. | İzole edilen MTBC suşlarının geldiği kliniklere göre dağılımı | 41 |
| Tablo 9. | İzole edilen MTBC suşlarının klinik örneklerle göre dağılımı | 42 |
| Tablo 10. | Her bir ilaca göre toplam direnç oranları | 42 |
| Tablo 11. | Suşların tek başına primer antitüberküloz ilaçlara direnç oranları | 43 |
| Tablo 12. | Ülkemizde antitüberküloz ilaçlara karşı saptanan direnç oranları | 47 |
| Tablo 13. | Dünyanın farklı bölgelerinde yapılan çalışmalarda primer tanı alan hastalarda direnç oranları | 50 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | | |
|-----------------|---|---|
| Şekil 1. | Türkiye ve Dünya Sağlık Örgütü(DSÖ) Avrupa Bölgesi'nde 2002-2010 yılları arasında TB İnsidans Hızları | 5 |
| Şekil 2. | Türkiye ve DSÖ Avrupa Bölgesi'nde 2002-2010 yılları arasında TB Nokta Prevalans Hızları | 6 |
| Şekil 3. | Mikobakteri Hücre Duvarı | 9 |

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tüberküloz (TB); mikrobik, bulaşıcı, sosyoekonomik koşullarla yakından ilişkili, akut veya kronik seyirli, lokal veya yaygın olabilen, değişik klinik ve radyolojik belirtiler gösteren granümatöz bir hastalıktır (1).

Hastaların %80'inden fazlasını 15-49 yaş arasında, üretkenlik yaşındaki hastalar oluşturmaktadır. Fakir ülkeler daha fazla etkilenmekte ve dünyada özellikle Afrika ülkelerinde sık görülmektedir. Halk sağlığı altyapısının yetersizliği, yetersiz tüberküloz enfeksiyonu kontrolü, insan immün yetmezlik virüsü (HIV)'nün eş zamanlı epidemisi ve gelişmiş ülkelere göç gibi nedenler tüberkülozun dünyada artışına yol açmaktadır (2,3).

M.tuberculosis kompleks (MTBC)'nin antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılığını belirlemek amacıyla çok sayıda duyarlılık test yöntemi bulunmaktadır. Bu yöntemleri fenotipik ve genotipik yöntemler olarak ayırmak mümkündür. Fenotipik yöntemlerde antibiyotik varlığında *M. tuberculosis kompleks* üremesi esas alınır ve katı veya sıvı besiyerleri kullanılmaktadır. Genotipik yöntemlerde ilaç direncine neden olan mutasyonlar moleküler yöntemler kullanılarak saptanmaktadır (4,5).

Centers for Diseases Control and Prevention (CDC), kültürde MTBC saptanan her hastaya, üç aylık tedavi sonrası yayma ve kültür pozitifliği devam eden ve tedaviye yanıtı olmayan tüm hastalara duyarlılık testi yapılmasını önermektedir (6).

Bu çalışmada İzmir ili Kâtip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi (AEAH)'nde 2010-2014 yılları arasında izole edilen toplam 59 MTBC suşunun primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılıklarının BACTEC MGIT (Mycobacteria growth indicator tube) 960 (Becton Dickinson, USA) sistemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dünyada Tüberküloz

Tüberküloz hastalığının tarihi eskilere dayanmaktadır. Mısır'da firavunlar döneminden kalma Thebus bölgesinde bulunan 85 mumyadan alınan organik materyallerde tüberküloz varlığı aside dirençli (resistan) basil (ARB) boyama, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve İnsertion Sequence Restriction Fragment Length Polimorfizm (IS6110-RFLP) ile ispatlanmış, genotipleme ile de suş tayini yapılabilmektedir. Bu dönemdeki kemik kalıntılarında Pott's hastalığına bağlı kemik lezyonları gösterilmiş, sanat eserleri üzerinde bulunan figürlerde bu hastalığa ait kemik lezyonlu hastalar resmedilmiştir (7-9).

Robert Koch, 1882 yılında tüberkülozdan ölen hastanın akciğer lezyonlarında basili göstermiş ve kültürde üretmiş, deney hayvanlarında bu basille hastalık oluşturmuştur (8).

Streptomisin (STR)'in 1940'larda Amerika Birleşik Devletleri'nde keşfi tüberkülozda kemoterapi dönemini başlatmıştır. Antibiyotikle tedavi direnç problemini de beraberinde getirdiği için kombine ilaçla tedavi dönemine geçilmiştir. Tedavi başarısızlığına karşı ilk olarak STR ile birlikte para amino salisilik asit (PAS) kullanılmıştır ancak dirençli vakaların % 10'unda tedavi sağlanabilmiştir. Bu da kombinasyonun yetersizliğini göstermiştir (10).

İzoniazid (INH)(1951)'in çoğalan dönem TB basilleri için bakterisidal, dinlenme dönemindekiler için bakteriyostatik etkinliği fark edilince bu ilaç TB tedavisine monoterapi ajanı olarak girmiştir. Ancak tedavi başlangıcını takip eden 4-6. haftalar içerisinde boyalı balgam preparatlarda bu ilaca da direnç geliştiği gösterilmiştir. INH, bir nikotinamid analogu olan pirazinamid (PZA) ile kombine edilerek kullanılmaya başlandı. Başarılı olan bu kombinasyon tekrarları büyük ölçüde engelledi. Tedavi başarısızlığı, sikloserin (1955), Etambutol (ETB) (1962) ve Rifampisin (RIF) (1972) gibi ajanların, tedaviye eklenmeleri ile çözülmeye çalışıldı. Bakterisidal olan bu ajanlardan özellikle RIF ve INH kombinasyonu, tedavi süresini 6 aya indirdi. Gelişmiş ülkelerde 1970'li yıllarda duyarlı suşlar süratle azaldı, direnç

gelişimi durdu ve bu yüzden TB kontrol programlarında bir gevşeme oldu. Bu ülkelerde ilaçların hatalı reçete edilmesi, kullanım sürelerinin yanlışlığı, hasta uyumsuzluğuna bağlı kromozomal mutasyonların birikimine bağlı çoklu ilaç dirençli *M. tuberculosis* suşlarının klonal yayılımına yol açtı (10).

HIV/AIDS birlikteliği, 1980’li yıllarda tüberküloz hastalarının daha önce almış oldukları tüberküloz basilinin aktive olmasına veya yeni enfeksiyonlara karşı hassas bir duruma sokarak dünya çapında tüberküloz olgularında büyük bir artışa yol açmıştır (11).

Avrupa ve Afrika’da 1990’larda tüberküloz insidansı artmaya başlayınca DSÖ, 1993 yılında tüberküloz için acil durum ilan etti ve bütün ülkelere Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi (DGTS)’ ni önerdi. Bu strateji temeli, balgamın mikroskopik incelenmesinin yaygınlaştırılması ile bulaştırıcı olguların yakalanması ve doğrudan gözetimli tedavi ile tedavi oranlarının artırılmasını amaçlamaktadır. DGTS 184 ülkede kurulmuştur. Ülkemizde 2006 yılında uygulanmaya başlanmıştır (3).

Dünya, 1990’ lı yıllarda insan eli ile yaratılmış, birinci seçenek ilaçlara cevap vermeyen çoklu ilaç dirençli tüberküloz (ÇİD-TB) ile tekrar yüz yüze geldi. Sorunun seviyesini tespit için Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 1994 yılından başlayarak iki yılda bir 35 coğrafi bölgeden topladığı örneklerle “global project on drug-resistance surveyansı projesi”ni başlattı. Proje sonucu, yeni tedavi alan hasta örneklerinden izole edilen suşlarda % 1.4 (0-14) olan direnç oranının daha önce tedavi almış tekrarlayan olgu örneklerinden izole edilen suşlarda % 13 (0-54) olduğunu ve problemin global bir problem olduğunu gösterdi (10).

DSÖ, 2005 yılı için TBC insidansını 9.1 milyon olarak bildirirken, 2013 yılı için tahmini prevalans oranını 11.0 milyon (159/100.000), insidans oranını 9 milyon (126/100.000) olarak bildirmiştir. Muhtemelen aynı yıl içinde İnsan İmmün Yetmezlik Virusü ile ko-enfekte hastaların da (1.1 milyon) içinde bulunduğu 1.46 milyon insan tüberkülozdan ölmüştür (12).

Epidemiyolojik trend araştırmaları global olarak yeni vaka sayılarının 2000-2013 yılları arasında her yıl %1.5 azaldığını (2012-2013'te % 0.6) , daha fazla sayıda insanın tedavi edildiğini ve ölüm oranlarının azaldığını göstermektedir (12).

TB dünyada özellikle Batı Afrika ülkelerinde yaygın görölmektedir. Bu yüksek insidansın bölgede görölen HIV epidemisine bağlı olduğuna inanılmaktadır. Endüstrileşmiş ülkelerde de HIV'li genç yetişkinler problemin kaynağını oluşturmaktadır (13).

HIV enfeksiyonu ABD gibi gelişmiş ülkelerde tüberkülozun daha genç hastalarda rastlanması, reaktivasyona göre primer tüberküloz olgularının artması ve çoklu ilaca dirençli tüberküloz sayısında artış gibi tüberküloz epidemiyolojisinde önemli değişimlere neden olmuştur. Amerika ve Afrika'dan sonra Güney Doğu Asya ve Eski Sovyetler Birliği ülkelerinde de bu iki hastalığın birlikteliği artış göstermiştir (14).

Dünya genelinde 2013 yılında 9 milyon tüberküloz vakasının tahminen 1.1 milyonu (%13) HIV pozitifdir. Güney Afrika bölgesinde bu oran %50'den fazladır. Antiretroviral tedavi TB'un yaygın olduğu bölgelerde HIV'li hastalarda TB'dan korunmanın en etkili yöntemidir. DSÖ 2014 yılı raporunda aktif olmayan TB'lu HIV hastalarında TB yayılımını önlemek için antiretroviral tedaviye ek olarak trimetoprim-sulfometoksazol ve INH önleyici tedavinin de eklenmesini önermektedir (12).

2.2. Türkiye' de Tüberküloz

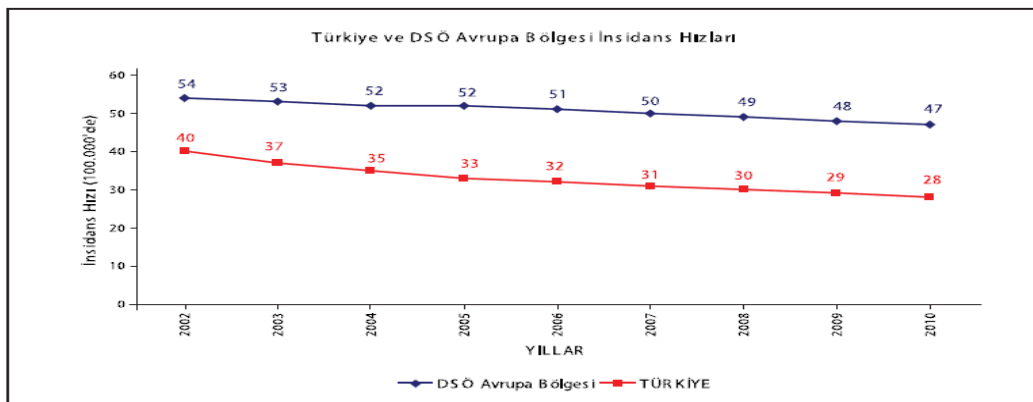
Osmanlı İmparatorluğu'nda 19. yüzyılın sonlarına doğru büyük bir tüberküloz salgını görölmüştür. Balkan Savaşları ve 1. Dünya Savaşı'ndaki yoksulluk şartlarında Anadolu'ya hızla yayılmaya başlayan hastalık, 1940'ların sonunda en yüksek düzeyine ulaşmış ve bu dönemde en sık görölen ölüm nedeni olmuştur (7).

Veremle Savaş Cemiyeti'nin 1918 yılında kurulduğu Türkiye'de, Cumhuriyet'in ilk yıllarından beri tüberkülozla mücadele edilmektedir. Ülkemizde

TB ile etkin mücadele 1950'li yıllarda başlatılmıştır. 1960 yılında Verem Savaş Dispanserleri (VSD) kurulmuştur. 1950'lerde %0.25 olan hastalık prevalansı 1975'te %0.1'e düşmüş, bu yıllar arasında yıllık enfeksiyon risk oranında % 10'luk azalma görülmüştür. Fakat 1970'li yılların başında tüberkülozun artık kontrol altına alındığı şeklindeki resmi açıklamalar, bu yıllardan sonra kamuoyunun ve devletin konuya ilgisinin giderek azalmasına neden olmuş ve 1977'den sonra yapılan çalışmalarda enfeksiyonun arttığı görülmüştür (8,15).

Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı'nca, Avrupa Tüberküloz Sürveyansı'nın veri standartları esas alınarak hazırlanan, Türkiye'de Verem Savaşı 2012 Raporu'na göre kayıtlı tüberküloz hastalarının toplam sayısı 2006 yılında 20.526 iken 2010 yılında 16.551 olmuştur ve dört yılda % 19.4 düşüş görülmüştür. Kayıtlı 16.551 hastanın 15.183 (%91.7)'ü yeni olgu, 1.368 (%8.3)'i tedavi görmüş olgudur. Hastaların 9.84 (%59.5)'i erkek, 6.710'ü (%40.5) kadın hastadır. Akciğer tüberkülozu olan 10.740 hastadan 9.510 (%88.5)'una mikroskopi yapılmış, mikroskopi yapılanlar içinde mikroskopi pozitiflik oranı %67.8 (6.452); kültür yapılma oranı %69.4 (7.453), kültür yapılanlar içinde kültür pozitiflik oranı %80.2 (5.979); kültür pozitif olgularda ilaç duyarlılık testi yapılma oranı ise %79.2 (4.734) bulunmuştur (16).

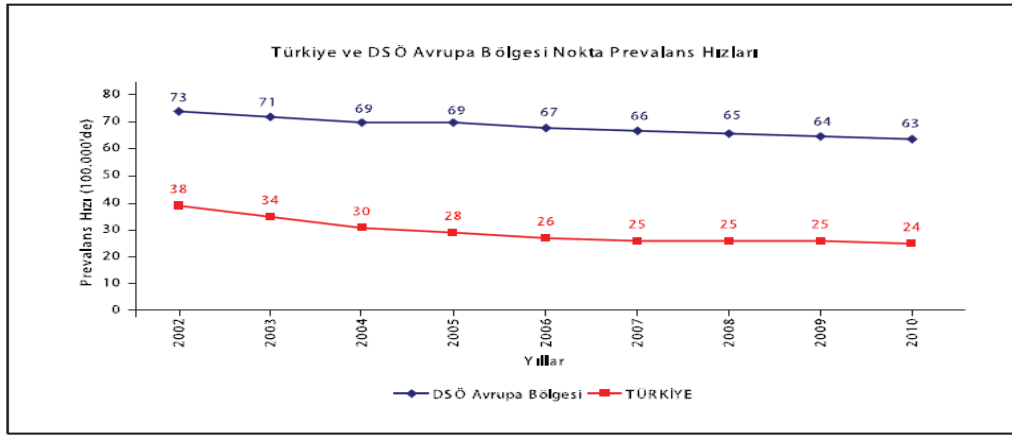
Türkiye'de TB insidans hızı 2002 yılında yüz binde 40 iken 2010 yılında yüz binde 28'e düşmüştür. Türkiye'nin içinde yer aldığı DSÖ-Avrupa Bölgesi'nde ise 2010 yılı insidans hızı yüz binde 47'dir (16).



Şekil 1. Türkiye ve DSÖ Avrupa Bölgesi'nde TB İnsidans Hızları, 2002-2010 (16).

Dünya Sağlık Örgütü Küresel Tüberküloz Kontrolü 2014 Raporu verilerine göre ülkemizin de içinde yer aldığı Avrupa Bölgesi'nde 2013 yılı tüberküloz insidansı yüz binde 39 iken, Türkiye'nin tüberküloz insidansı yüz binde 28'in altındadır (12).

Türkiye'nin TB nokta prevalans hızı 2002 yılında yüz binde 38 iken 2010 yılında yüz binde 24'e düşmüştür. Türkiye'nin içinde yer aldığı DSÖ-Avrupa Bölgesi'nde ise 2010 yılı nokta prevalans hızı yüz binde 63'tür (16).



Şekil 2. Türkiye ve DSÖ Avrupa Bölgesi'nde TB Nokta Prevalans Hızları, 2002-2010 (16).

Ülkemiz tüberküloz insidansının orta düzeyde olduğu ülkeler arasında yer almaktadır. Bölgelere göre bakıldığında, olgu hızı 100.000/34.6 ile Marmara Bölgesi'nde en fazla görülmektedir. Bunu, Karadeniz Bölgesi izlemektedir. Bunun nedeni, Marmara Bölgesi'nin, düşük gelirli bölgelerden çok fazla göç alması ile açıklanmaktadır (16).

Sağlık Bakanlığı'nın verilerine göre, 2010'da bölgelere göre insidans ise, (1/ 100.000);

-Karadeniz Bölgesi'nde 23.8

-Marmara Bölgesi'nde 34.6

-Ege Bölgesi'nde 19.4

-İç Anadolu Bölgesi'nde 14.1

-Doğu Anadolu Bölgesi'nde 13.7

-Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde 18.1

-Akdeniz Bölgesi'nde 14.7

Türkiye genelinde yüz binde 22.5 olarak hesaplanmıştır (16).

İllere göre bakıldığında, nüfusa göre tüberküloz olgu hızı sırasıyla en fazla 100.000/44.6 ile Edirne'de, ardından 100.000/44.2 ile Bartın ve 100.000/39.3 ile İstanbul'da görülmektedir. İzmir'de ise bu oran 100.000/19.4 ile Türkiye ortalamasının altında bulunmaktadır (16).

2.3. Mikobakterilerin Sınıflandırılması

Mycobacterium cinsi *Actinomycetales* takımında sınıflandırılmış olup *Mycobacteriaceae* ailesinde yer alan tek cinistir. *Mycobacterium* 'lar yüksek G + C : (% 61-71 mol) içeren Deoksiribonükleik asit (DNA)'ten dolayı diğer mikolik asit içeren *Tsukamurella*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Rhodococcus* ile birlikte *Actinomycetales* takımında sınıflandırılmıştır (9,17).

Genomlarında yer alan 20 farklı değişken bölgedeki insersiyon ve delesyonları dikkate alarak yapılan çalışmalarda yaklaşık 100 farklı mikobakteri türü olduğu tespit edilmiştir (18).

Mycobacterium tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti* ve *Mycobacterium canettii*'nin bakteriyolojik özellikleri ve DNA benzerlikleri temel alınarak bu türler "*M. tuberculosis complex*" adı altında toplanmışlardır (19).

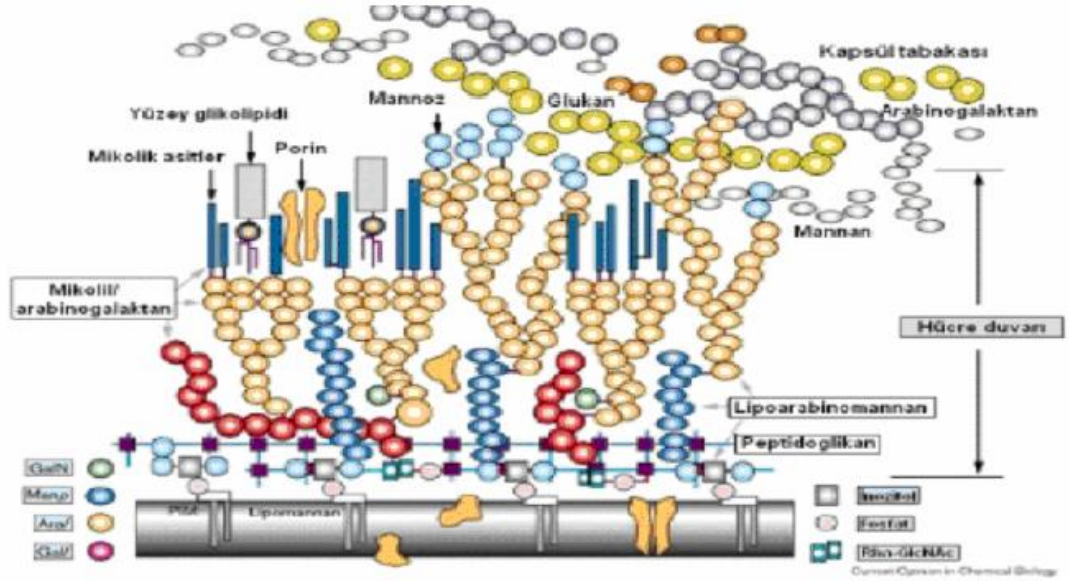
Tablo1. Woods ve Washington sınıflandırması (19).

| | | | |
|---|--|---|---|
| Klinik önemi olan mikobakteriler | <i>M. tuberculosis</i> kompleks <i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis (M. bovis BCG)</i> <i>M. africanum</i> <i>M. microti</i> <i>M. canetti</i> | | |
| İnsanda potansiyel patojen olan mikobakteriler | <i>M. avium-intracellulare</i> kompleks <i>M. kansasii</i> <i>M. fortuitum-chelonae</i> kompleks <i>M. scrofloceum</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. szulgari</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. simiae</i> <i>M. genavense</i> <i>M. marinum</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. celatum</i> | | |
| İnsanda nadiren hastalık yapan saprofitik türler | Yavaş üreyenler <i>M. gordonae</i> <i>M. asiaticum</i> <i>M. terrae-triviale</i> komp. <i>M. shimoidei</i> <i>M. gastri</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. paratuberculosis</i> | Orta hızda Üreyenler <i>M. flavescens</i> | Hızlı üreyenler <i>M. thermoresistible</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. vaccae</i> <i>M. phlei</i> <i>M. paraafortuitum</i> kompleks |

2.4. Mikobakterilerin Bakteriyolojik Özellikleri

Mikobakteriler; aerop, hareketsiz , kapsülsüz, sporsuz, katalaz üreten, hafif kıvrık veya düzgün çomak şeklinde, dallanabilen, 0.2- 0.6 µm eninde, 1.0- 4.0 µm boyunda mikroorganizmalardır. Yavaş üreme hızına sahip olan mikobakteriler 18-24 saatte ikiye bölünmektedir. Kültürde üreme süresi 8 hafta kadar sürebilir. Optimum üremesi için gerekli ortam pH'sı 6.5-6.8 ve CO2 oranı %5-10'dur. Üreme için uygun ısı ortalama 37 °C, türden türe 30-45°C arasında değişmektedir. Tüberküloz basilleri kuruluğa ve kimyasal dezenfektanlara dirençlidirler. Direkt güneş ışığında iki saatte ölürleri (1, 17,20).

Hücre duvarı: Oldukça farklı, kompleks bir yapıdır (Şekil 3). En iç tabaka, plazma membranıdır. Orta tabakayı yani duvarın iskeletini peptidoglikan arabinogalaktanın mikolik asit esterinden oluşan mikolilarabinogalaktan peptidoglikan oluşturur. Mikolik asitlerin dışında çok sayıda farklı polar veya apolar yapıda nonkovalent bağlı lipid ve glikolipidler hücre duvarında yer alır (21,22).



Şekil 3. Mikobakteri hücre duvarı yapısı (22)

Plazma membranı: Membran tipik olarak protein ve fosfolipidlerden oluşan çift katmanlı bir yapıdadır. Periplazmik boşluk sayesinde peptidoglikandan ayrılır (21).

Orta tabaka: Hücre duvarının orta tabakasında peptidoglikan, arabinogalaktan, mikolik asitler, açıl trehalozlar, oligosakkarid içeren lipidler ve fosfotidilinozitolün glikozil derivatları yer almaktadır. Bu yapılara antijenik özelliğe sahip glikoproteinler ile porin yapıları da katılmaktadır (21,22).

Peptidoglikan yapısı: Mikobakterilerde hücre duvarının en önemli karakteristiği kemotip-IV peptidoglikan yapısıdır. Klasik bakteriyel peptidoglikandan farklı olan bu yapı N-asetil-glukozamin ve N-glikozilmuramik asidin, beta-glikozid ve fosfodiester bağlarla bağlanmasından oluşan bir heteropolimerdir. Kemotip-IV peptidoglikanda iki önemli farklılık görülmektedir. Bunların ilki muramik asidin

asetillenmiş yapısı yerine glikolik asitle glikozillenmiş formunun yapıda yer alması, diğeri de tetrapeptit yan zincirler diaminopimelik asidin yer almasıdır (21,22).

Mikolik asitler tüm hücre duvarı kuru ağırlığının % 50'sini, hücre lipidlerinin % 60'ını oluştururlar. Mikolilarabinogalakattan peptidoglikan kompleksinde en fazla bulunan mikolik asit türü, D-mikolik asitlerdir. Tetrapeptit yapıda yer alan diaminopimelik asit nedeni ile lizozimlere karşı dirençlidir (21,23).

Koloni morfolojisi türler arasında değişmekle birlikte S (smooth) ya da R (rough), pigmentli veya pigmentsiz olabilir. Bazı türler pigment oluşturmak için ışığa gereksinim duyarken (fotokromojen) diğerleri ışıkta da karanlıkta da pigment oluşturabilir (skotokromojen) (21,24).

Hücre duvarları lipit içeriği bakımından zengindir. Bu nedenle alkol, asit, alkali ve kuru ortama karşı direnç gösterirler. Mikobakteriler fenol içinde çözündürülen bazik fuksinin yoğun eriyikleri ile [Kinyoun veya Erlich Ziehl Neelsen (EZN)yöntemleri ile] boyandıklarında aldıkları boyayı % 3'lük asit alkolle renksizleştirme işleminden sonra bırakmazlar. Bu özelliklerinden dolayı ARB olarak da adlandırılırlar. Kinyoun veya EZN boyama yönteminde renk giderme işleminden sonra zeminin boyanabilmesi için zıt boya olarak metilen mavisi kullanılır ve mikroskopik incelemede tüberküloz basilleri mavi zeminde kırmızı çomakçıklar şeklinde görülürler. Tek tek küçük zincirler veya demetler halinde bulunabildiği gibi klinik örneklerde X, V, L harfleri oluşturacak biçimde de bulunurlar (17).

2.5. *M. tuberculosis* kompleks'in Mikrobiyolojik Özellikleri

M. tuberculosis kompleks, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M.africanum*, *M. microti* ve *M. canettii* türlerinden oluşur. *M.tuberculosis* zorunlu aerobdur. Optimal üreme ısısı 37 °C, pH ise 7'dir. İlk izolasyonda içinde patates, yumurta veya serum bulunan kompleks besiyerlerine gereksinim duyar, sonraki pasajlarında sentetik besiyerlerinde de üreyebilirler. Amonyum tuzları ve amino asitleri nitrojen kaynağı olarak kullanılabilir ancak asparajinli besiyerlerinde daha fazla üremektedirler, eser element olarak demir önemlidir. Rutin besiyerindeki ilk kültürlerinde onbeş günden önce üredikleri görülmez. İyi bir üreme için ortalama 4-6 hafta gereklidir (20,25).

2.5.1 *Mycobacterium tuberculosis*; Tüm dünyada hastalık etkeni olarak en sık izole edilen mikobakteridir. 37°C'de 2-4 haftada, R koloni yaparak ürer. Niasin biriktirir, nitratları nitrite indirger. Pirazinamidaz aktivitesi pozitifdir. Katalaz aktivitesi yoktur. Esas konağı insandır. Mikrokolonilerinin gözleendiği kültürleri boyanınca kord faktörünü oluşturduğu görülür (19).

2.5.2. *Mycobacterium bovis*; Esas olarak sığırlarda infeksiyon yapar, insan az da olsa konak olabilir. Aerobik, 6-8 haftada R yada S koloni yaparak ürer. Niasin reaksiyonu vermez. Nitratları nitrite indirgemez. Pirazinamidaz aktivitesi yoktur. Katalaz aktivitesi vardır. *M. bovis* BCG 1924 yılında Calmette ve Guerin tarafından *M. bovis*' in 10 yıl boyunca 233 kez pasaj edilmesiyle elde edilmiş aşı kökenidir (19,26).

2.5.3. *Mycobacterium africanum*; Genel olarak Afrika'da insan tüberkülozuna yol açar. Mikroaerofilik ortamda iyi ürer. Nitratı indirgeyemez. Pirazinamidaz aktivitesi pozitifdir (19,26).

2.5.4. *Mycobacterium microti*; Tarla faresi gibi kemiricilerden izole edilmiştir. Hem immunkompetan hem de immunsupresif hastalarda infeksiyon oluşturabilir. EZN boyamasında ay çöreği görüntüsü tipiktir. Kültürde üretilmesi zordur (27).

2.5.5. *Mycobacterium canettii*; Asıl konağı bilinmez ancak bildirilen vakalar insan infeksiyonlarıdır. Düz,yuvarlak kolonileriyle kompleks üyelerinden ayrılır (27).

2.6. Virulans

M.tuberculosis'in virulansında rol oynayan kesin bir faktör gösterilememiştir. Kord faktör ve sülfatidler gibi bazı immunoreaktif komponentlerin virulanstan sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Bakterinin bilinen histolitik enzimleri, endo ya da ekzotoksinleri yoktur. Ancak duvarda bulunan bazı yapıların toksik olduğu gösterilmiştir. *M.tuberculosis*'de hiç bir yapı, antijen veya mekanizma organizmanın virulansını açıklamak için yeterli değildir (20).

2.6.1. Mikobakteriyel lipidler

Trehaloz-6,6, dimikolat (Kord faktör): Tüberküloz basillerine küme oluşturma kabiliyeti kazandırdığı için kord faktör olarak da bilinir. Adjuvan etkiye sahiptir ve alternatif kompleman yolunu aktive eder. Önemli bir virulans faktörüdür. Granülom oluşumunda rol oynar ve tümör geriletici etkiye sahiptir (20).

Muramildipeptit (MDP) : Tek başına etkisi olmadığı halde trehaloz dimikolatla birleşince bağışıklık sistemini uyarır. İmmün sistemi uyarır ve tümör geriletici etkisi vardır (20).

Sülfolipidler (Sülfatidler): Sülfür içeren glikolipidlerdir Kord faktörün toksik etkisini artırır ve makrofaj içinde fagozom-lizozom füzyonunu engelleyerek, basili lizozomal enzimlerin etkisinden koruduğu gösterilmiştir (20).

Fosfatidler: Epitel hücrelerini dev hücrelere dönüştürür ve tüberkül oluşturur (20).

Wax D: Peptidoglikolipid yapısındadır. Freud adjuvanının etkisini artırıcı özelliğe sahiptir (20).

Lipoarabinomannan: *M. tuberculosis*'in major hücre duvarı lipoglikanıdır (28).

Mikotiyol: Antioksidan etkili glutatyon analogudur. Basilin oksidatif strese verdiği yanıt ve detoksifikasyon enzimlerinin sentezi için gerekli kofaktördür (29).

Fosfatidil inozitol mannozid (PIM): Hapten özelliği gösterir (20).

2.6.2 . Mikobakteriyel polisakkaridler:

Arabinogalaktan ve Arabinomannan: Konak hücre makrofajlarından tümör nekroz faktörü (TNF:Tümör nekroze edici faktör)-alfa salınımını artırır. Nötrofillerin damardan dokuya geçmesini ve yangısal tepkimenin oluşmasını sağlarlar (20).

2.6.3. Mikobakteriyel proteinler

En önemli görevleri, basile antijenik özellik kazandırmak, duvar polimerleri sentezinde rol almak, porları oluşturarak atık maddelerin dışarı transportunu sağlamaktır (30).

Old tüberkülin (OT): *M.tuberculosis* ve *M.bovis*' in sıvı besiyerinde 37 °C' de 6-8 hafta üretilmesini takiben akım halindeki buharla öldürülmesi, ilk hacminin 1/10'u kalıncaya kadar ısıyla yoğunlaştırılması ve filtrasyonla sterilize edilmesi sonucu elde edilen, saf olmayan bir üründür. Tüberküloz enfeksiyonunun tanısında intradermal cilt testi olarak kullanılmıştır (20).

Purifiye Protein Derivesi (PPD): Sentetik besiyerlerinde hazırlanmış OT'nin kollodyen membranlardan süzülmesi ve amonyum sülfatla çöktürülmesi sonucu elde edilmiş daha saf bir üründür. OT'ye nazaran içerdiği proteinler daha küçük ve karbonhidratı az olduğundan daha az özgül olmayan reaksiyona neden olur. DSÖ 0.1 ml solüsyonda 5 TU(Tuberculin Unit) (0.0001 mg PPD-S proteini) dozunda PPD bulunmasını önermektedir (20).

2.7. Immunopatogenez

Basil solunum, sindirim, deri, genitoüriner sistem ya da konjunktivadan girebilir. En önemli bulaş yolu inhalasyondur. İlk yerleştiği organ farklı olsada, meydana gelen patolojik olaylar daima aynıdır. İnfeksiyon oluşup oluşmaması ve hastalık meydana gelip gelmemesi konağın direnci ile bakteriyel virulans arasındaki dengeye bağlıdır (20).

Konağın tüberküloza karşı yanıtında hem doğal hem de kazanılan immünite rol oynamaktadır. Alveollere ulaşan basil doğal savunma yolları ile yok edilebilir veya çoğalarak hastalığın klinik görünümünü oluşturabilir. Doğal savunmada üst solunum yolu fiziksel engeli, fagositoz, inflamatuvar hücreler ve salgıladıkları sitokinler, alveolar makrofajlar, apoptoz ve genetik faktörler rol oynar (31).

Ancak bakterinin virulans faktörleri (kord faktör, sülfatidler ve diğer asidik lipidler gibi) daha ağır basar ve makrofaj aktivitesi yetersiz kalırsa basil, hücre içinde

çoğalmaya başlar ve makrofajları parçalar ve alveoler boşluğa geçer. Parçalanmış makrofajlardan salınan kemotaktik faktörler, monositlerin ve diğer inflamatuvar hücrelerin infeksiyon bölgesine gelmesini sağlar ve granülom oluşumunu başlatır. Alveolar boşluğa geçen basiller, yeni makrofajlarca fagosite edilseler bile makrofajlar henüz aktive edilmedikleri için çoğalmaya devam ederler (28).

M. tuberculosis inhalasyonundan 2-6 hafta sonra etkene özgül hücresel immün yanıt gelişir. Lezyon bölgesinde çoğalan basillerin tüberkülin benzeri proteinleri, doku hasarı yapan gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonuna yol açar. Gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu tüberkülin testi pozitifliğine ve kazeifikasyon, likeifikasyon, kavitasyona neden olur. Böylece inaktif makrofajlar içindeki basillerin çoğalması durdurulur ve granülom merkezinde kazeöz nekroz alanları oluşturulur. Kazeöz nekroz alanları içinde basiller daha fazla çoğalamaz ve yaşam boyu dormant kalır. Primer infeksiyon ve primer odakların (Ghon odağı) olduğu bu evrede tüberkülin testi pozitiftir. Bu dönemin nasıl ilerleyeceği, bakterinin virulansı ve konağın immün durumu arasındaki dengeye bağlıdır (28,32).

Tüberkülozda immün yanıt, *M.tuberculosis*' e ait antijenlerin, makrofaj veya dendritik hücrelerin MHC-I / MHC-II veya CD 1 molekülleri üzerinden T lenfositlere sunulmasıyla başlar. Tüberküloprotein ve lipitler tarafından uyarılan makrofajlardan salınan IL-12 ve INF- γ , CD4 T helper hücrelerinin proliferasyon ve farklılaşmasına neden olur. Akciğer tüberkülozunda yerel hücresel immünite T helper 1 hücreleri ile sağlanır. Enfeksiyonun başlamasından 2-6 hafta sonra, efektör ve bellek fenotipinde CD4 + Th ve CD8+ Tc lenfositlerinin iki tipi de bulunur. Efektör T lenfositlerden sağlanan yeterli hücresel yanıt ilk enfeksiyonu durdurur (20,31).

Antijene özgül olarak uyarılan CD4 + Th 1 lenfositleri tarafından ölü ya da canlı aynı antijenle karşılaşma durumunda INF- γ , lenfotoksin, GM-CSF gibi inflamasyon mediatörleri salınır. Bu mediatörlerin salınmasıyla gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu oluşmakta ve durumun ilerlemesiyle de granümatöz tip reaksiyon gelişmektedir. Hücresel immün yanıtı takip eden bu yanıt pasif olarak aktarılamayan bir reaksiyondur. PPD reaksiyonu tipik bir gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonudur. Sonuçta doku hasarı ve nekroz gelişecektir. Tüberkülozda akciğerde gözlenen kazeifikasyon, likefaksiyon ve kavitasyonlar gecikmiş tip aşırı duyarlılık

reaksiyonu sonucu ortaya çıkmaktadır. Hücrel immun yanıt, makrofaj aktivasyonu ile fagosite olan basilleri öldürmek; gecikmiş aşırı duyarlılık reaksiyonu ise basil içeren aktive olmamış makrofajları ve komşu dokuları hasarlayıp, basillerin üremesi için uygun ortamları ortadan kaldırmak için uğraşırlar (20,33).

2.8. Laboratuvar Tanı

Tüberküloz'un kesin tanısı, uygun klinik örneklerden basilin izole edilmesiyle olur. Basillerin gözle görülebilen koloniler meydana getirmesi için, 2 haftadan daha uzun bir süreye ihtiyacı vardır. Bu nedenle örneklerden hazırlanan direkt boyalı preparatlarda aside dirençli basillerin gösterilmesi ön tanıda önemlidir (20).

2.8.1. Klinik Materyalin Hastadan Alınması ve Laboratuvara

Gönderilmesi

Örnekler temiz, steril, sızdırmaz, burgulu kapaklı ve tek kullanımlık kaplar içerisine yeterli miktarda alınmalıdır. Kabın üzerine hasta ve alınan örnekle ilgili bilgiler yazılmalıdır. İlk örnek antimikrobiyal tedaviden önce alınmalıdır. Örneğin bekleme süresi 1 saati aşacaksa örnek 2-8 °C'de buzdolabında saklanmalıdır. Sürüntü örnekleri kabul edilmez (34).

Tüberküloz değişik organ ve sistem tutulumları ile seyrettiğinden, hastalığın tanısında balgam, mide lavaj sıvısı, bronşial lavaj sıvısı, laringeal sürüntü, BOS, plevral sıvı, idrar, gaita, cilt ve yumuşak doku biyopsi örnekleri, lenf dokusu gibi çok çeşitli klinik örnekler kullanılabilir. Hastalardan alındıktan sonra mikobakteriyoloji laboratuvarına gönderilen klinik örnekler, steril örnekler (kan, kemik iliği, BOS, suprapubik aspirasyon, diğer vücut sıvıları ve biyopsi örnekleri) veya farklı mikroorganizmaların bulunduğu vücudun çeşitli bölgelerinden alınmış örnekler (balgam, abse, bronko alveoler lavaj sıvısı, açlık mide suyu, laringeal sürüntü, idrar, gaita, cilt ve yumuşak doku) olmak üzere iki grup altında toplanmaktadır (35).

Balgam ; Akciğer tüberkülozlu olgularda en sık kullanılan örnektir. 5-10 ml, derin prodüktif bir öksürükle, akciğerlerden gelen koyu eksüdatif sabah balgamı

tercih edilir. Tedavi takibi için gönderilecek balgamın ilki tedavi başlamasından üç hafta sonra olmalı, bunu izleyen örnekler, birer hafta ara ile gönderilmelidir.

İndüklenmiş balgam: Hastanın balgam çıkaramadığı durumlarda nebulizatör yardımıyla, %10 NaCl içeren steril ılık su inhalasyonu yaptırılarak alınan balgam örneğidir. Örnek en az 10 ml olmalıdır.

Bronkoalveoler lavaj: Bronkoskop steril olmalı, örnek en az 5 ml olmalıdır.

Transtrekeal aspirat: Steril kaplarda laboratuvara gönderilmesi uygundur.

Mide açlık sıvısı: Kooperasyonu tam olmayan, istenen özellikte balgam çıkaramayan hastalarda(özellikle çocuklarda) sabah aç karna alınan mide yıkama suyuna başvurulabilir. Ardışık üç gün boyunca aç karnına sabah 5-10 ml alınmalıdır.

İdrar: Üriner sistem tüberkülozundan şüpheleniliyorsa; sabah idrarı, orta idrar tekniği ve 3 gün üst üste alınması uygundur.

Steril vücut sıvıları [plevral, perikardial, peritonel sıvılar ve beyin omurilik sıvısı(BOS)]: Miktarı mümkün olan en fazla miktarda olmalıdır. Miktar az ise bir sıvı besiyerine ekim yapılmalıdır (Middlebrook 7H9 gibi).

Biyopsi örnekleri: En az 1 gr ağırlığında olacak şekilde steril kaplarda gönderilmelidir. Formol içinde veya gazlı beze sarılan kabul edilmemelidir.

Kan: Aseptik koşullarda alınan kan örneği direk hasta başında en az 5 ml olacak şekilde 10 ml'lik isolatör tüpe veya BACTEC 13A şişesine ve bu amaçla kullanılan tüplere aktarılır. Ekim hasta başında yapılamayacaksa 10 ml. kan, içinde heparin bulunan tüplere konulur.

Gaita: İntestinal TB veya M.avium-intracellulare enfeksiyonundan şüphelenilen AIDS'li hastalarda incelenmekte. Mikobakteri kültürü için rektal swaplar kabul edilmemeli (34,36).

2.8.2. Klinik Örneklerin İşlenmesi

Tüberküloz etkeni bakterilerin izolasyonu için klinik örneklerin kan hücrelerinden, vücut sıvıları ve doku parçaları gibi organik kalıntılardan, kontaminant bakterilerden ve mantarlardan arındırılmaları gerekir. Bu amaçla homojenizasyon / dekontaminasyon ve örnekteki bakteri konsantrasyonunu arttırmak için konsantrasyon işlemi uygulanır. Dört farklı işlemden oluşur (37).

1.Konsantrasyon: İdrar ve steril vücut sıvılarında (BOS, plevra sıvısı, asit sıvısı vb.) balgam örneklerine göre daha az sayıda basil bulunur. Bu nedenle izolasyon şansını arttırmak için, büyük hacimde laboratuvara gelen bu örnekleri daha küçük hacimlere indirgemek gerekir. Bu amaçla örnekler 3000-4000 devirde, 15-20 dakika santrifüjlenir. Sonraki işlemler elde edilen bu çökelti üzerinden yürütülür (37,38).

2.Homojenizasyon: Bu yöntem balgam, mide açlık suyu ve biyopsi örnekleri gibi mukus, epitelyum ve şekilli elemanları içeren örneklerde, bu yapılar arasında gizlenmiş olan basilleri ortaya çıkarmak için uygulanır. Homojenizasyon işlemi için genellikle N-asetil-L-sistein (NALC) gibi kimyasal maddeler kullanılır. Bu maddeler sayesinde yoğun yapılar erir, bu yapılar arasına hapsolmuş basiller ortaya çıkar (37,38).

3.Dekontaminasyon: Steril olmayan klinik örnekler, izole edilmeye çalışılan mikobakteriler yanında alındıkları anatomik bölgeye ait flora üyelerini(bakteri, maya hücreleri vb.) de barındırırlar. Bu nedenle, klinik örnekler NaOH, oksalik asit vb. kimyasal maddelerle muamele edilerek kontaminant mikroorganizmalar uzaklaştırılmaya ya da oranları azaltılmaya çalışılır (37,38).

4.Nötralizasyon: Mikobakteriler pH 6.8 de iyi ürerler. Bazı örnekler genel yapı itibarı ile asidik bir yapıya sahipken, bazıları ise homojenizasyon-dekontaminasyon işlemleri sırasında kullanılan kimyasal maddelerden dolayı asidik ya da alkali bir yapı kazanırlar. Bu nedenle fosfat tampon çözeltisi ya da brom-timol, fenol kırmızısı gibi indikatör eşliğinde asit (hidroklorik asit, sülfürik asit vb.) ve alkali çözeltiler (NaOH vb.) kullanılır (37,38).

Homojenizasyon ve dekontaminasyon işlemi için en çok NALC-NaOH yöntemi tercih edilmektedir. Bu yöntemde kullanılan kimyasallardan NALC mukolitik, % 4 lük NaOH dekontaminant olup; %2.9 luk sodyum sitrat klinik örnekte bulunabilecek ağır metal iyonlarını bağlayarak NALC'in inaktive olmasını önlemektedir. Klinik örneğin *P.aeruginosa* ile kontamine olduğu düşünüldüğünde oksalik asit yöntemi tercih edilir. İdrar örneklerinin kontaminasyonu diğer yöntemlerle önlenemiyorsa sülfirik asit yöntemi kullanılabilir. Steril vücut sıvılarında dekontaminasyon yapılmasına gerek yoktur (38,39).

2.8.3. Mikroskopik İnceleme

Doğrudan mikroskopik boyama ve inceleme, tüberkülozun laboratuvar tanısında en hızlı, basit ve ucuz bir yöntemdir. Tüberküloz bakterilerinin bu teknik ile gösterilmesi ilk kez 1882 yılında Ehrlich ve Ziehl'in önerdiği ve 1883 yılında Ziehl tarafından modifiye edilen EZN ya da daha yaygın olarak kullanılan ifadesi ile ARB boyama ile mümkün olmaktadır (40).

Basilin direkt mikroskopi ile görülebilmesi için, balgamın her ml'de 5.000 ile 10.000 basil bulunması gereklidir. Tüberküloz dışı mikobakteriler, yalancı pozitif sonuçlara neden olabilmektedirler (41,42).

Boyama için iki tip boya tercih edilir:

1- Karbol fuksin boyları:

o Ehrlich- Ziehl-Neelsen (sıcak boya)

o Kinyoun (soğuk boya)

2- Florokrom boya: Auramin - rodaminle hazırlanır.

Hücre duvarının lipit yönünden zengin olması , kullanılan boyların hem içeri girmesini hem de dışarı çıkmasını zorlaştırır. Bu özellik, mikobakterileri diğer bakterilerden ayırt edilmesini sağlayan ARB boya yöntemlerinin temelini oluşturur. Ülkemizde de en yaygın kullanılan boya yöntemi EZN'dir. Direkt yayma ya da homojenizasyon-dekontaminasyondan sonra hazırlanan yayma preparat, karbol

fuksin boyalarla boyandığında basiller ilk aldığı boyayı asit – alkol dekolorizasyonuna rağmen bırakmazlar. Zıt boya metilen mavisi ile boyanmayıp ışık mikroskopunda mavi zeminde pembe - kırmızı basiller şeklinde görünürler. Işık mikroskopunda en az 100-300 alan taranması gerekir (17,43).

Auromin- rhodamine yöntemiyle boyanan aside dirençli organizmalar sarı turuncu renkte floresans verirler. Auromin - rhodamine boyama yönteminin EZN ye kıyasla daha hassas olduğu ve kısa zamanda geniş bir tarama imkanı verdiği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (44).

ARB boya skortlama:

| | |
|----------------------------|------------------------------|
| 300 alanda basil yok | Negatif |
| 300 alanda 1- 2 basil | Şüpheli (test tekrarlanmalı) |
| 100 alanda 1- 9 basil | (1 pozitif sonuç) + |
| 10 alanda 1- 9 basil | (2 pozitif sonuç) ++ |
| 1 alanda 1- 9 basil | (3 pozitif sonuç) +++ |
| 1 alanda 10 ve üzeri basil | (4 pozitif sonuç) ++++ |

Direkt preparat hazırlama aerosol oluşturan bir işlem olduğu için çalışan personel ve çevreyi korumak için güvenlik kabini içinde yapılmalıdır (45).

2.8.4 Kültür Yöntemleri

Tüm mikobakteri türleri aside dirençli olduğu için, balgamda ve diğer klinik örneklerde aside dirençli basillerin saptanması, basilin tipi ve canlılığı konusunda bilgi vermez. O nedenle, yayma incelemede ARB pozitifliğinin saptanması kesin tüberküloz tanısı sağlamaz (41).

Kültür yöntemleri geç sonuç vermesine rağmen, tür düzeyinde identifikasyon işlemleri için gerekli izolatların elde edilmesine, bakterilerin canlılıklarının doğrudan gösterilebilmesine, ilaç duyarlılık testlerinin yapılarak hastaların doğru tedavi edilebilmesine olanak sağlamaları açısından tüberküloz tanısında halen altın standarttır (39).

2.8.4.1 Konvansiyonel Kültür Yöntemleri ve Besiyerleri

Katı ve sıvı olmak üzere iki tiptir. Tüp ya da petri kabı kullanarak hazırlanan katı besiyerinde karışık kolonilerin ve kontaminatların tesbiti mümkündür. Katı özellikteki besiyerlerini ise yumurta bazlı ve agar bazlı olmak üzere iki bölümde incelemek mümkündür. Yumurta bazlı besiyerleri arasında bugün en yaygın kullanılanı Löwenstein-Jensen(L-J) besiyeridir. Ancak Petragnani ve American Trudeau Society Medium gibi besiyerleri de tercih edilmektedir. Tipik koloni morfolojisi oluşturmaları ve daha bol üremeleri nedeniyle özellikle primer izolasyonda L-J besiyerinin kullanılması önerilmektedir. Yumurta bazlı besiyerlerinin opak görünümlü olmasına karşın, agar bazlı besiyerleri şeffaftır. Bu nedenle, ekim yapılan besiyerleri 10-12 gün sonra mikroskop altında incelenirse, oluşan kolonileri görmek mümkün olmaktadır (39).

Middle Brook(MB)-7H10 ve MB-7H11 en çok tercih edilen agar bazlı besiyerleridir. Sıvı besiyerleri olan MB-7H9 ve Dubos- tween albumin, mikobakterilerin stok suşlarının subkültürlerinin yapılması, duyarlılık deneyleri ve diğer invitro deneylerde inokulum hazırlanması amacıyla kullanılır. Ayrıca bakteri sayısının az olduğu steril bölgelerden alınan klinik örneklerde, bakteriyi çoğaltmak ve dolayısıyla izolasyon şansını artırmak amacıyla da kullanılmaktadır. MB-7H9 sıvı besiyeri, çoğu hızlı kültür sisteminde temel besiyeri olarak kullanılmaktadır (19).

Tablo 2. Mikobakterilerin genel üretim besiyerleri (19).

| Besiyeri | İçerik | İnhibitör ajan |
|--|--|----------------------------------|
| Löwenstein-jensen | Koagüle tam yumurta, bazı tuzlar, gliserol, patates unu | Malaşit yeşili 0.0259/100 ml. |
| Petragnani | Koagüle tam yumurta, yumurta sarısı, süt, gliserol, patates unu | Malaşit yeşili 0.052/100ml |
| Middlebrook 7H10 | Bazı tuzlar, vitaminler, kofaktör, oleik asit, albümin, katalaz, gliserol, dextroz | Malaşit yeşili 0.0025/100ml |
| Middlebrook 7H11 | Bazı tuzlar, vitaminler, kofaktör, oleik asit, albümin, katalaz, gliserol, dextroz%0.1 kazein hidrozilat | Malaşit yeşili 0.0025/100ml |
| American Thoracic Society Medium(ATSM) | Koagüle taze yumurta sarısı, bazı tuzlar, gliserol, patates unu | Malaşit yeşili 0.01/ 100ml |

Günümüzde yaygın olarak kullanılan L-J besiyerinin avantajları uygun saklama koşullarında uzun süre korunabilmesi, içerdiği fosfolipidler sayesinde besiyeri veya inokulum içindeki toksik maddeleri bağlayarak etkisizleştirilmesi, içerdiği malaşit yeşili sayesinde kontaminant mikroorganizmaların üremesini engellemesi, ucuz olması ve birçok mikobakteri türünü üretebilmesidir (17).

2.8.4.2 Hızlı Kültür Yöntemleri

Bu sistemlerde zengin içerikli besiyerleri kullanılarak hem mikobakterilerin izolasyon şansı arttırılmakta hem de mikobakterilerin üremesi erken dönemde sağlanmaktadır. Bu sistemler, Radyometrik Kültür Sistemi (BACTEC 460 TB), Bifazik Sistem (Septi-Check AFB sistemi), Kolorimetrik Kültür Sistemleri (BacT/Alert 3D, TK Kültür Sistemi), Gaz Basınç Değişimini Saptayan Kültür Sistemi (Versa TREK), Floresans Kültür Sistemi(BACTEC MGIT 960) ve manuel sistemler (MB-Redoks) olarak sıralanmaktadır (46).

Sistemler arasında izolasyon oranı açısından önemli bir fark olmamakla birlikte, konvansiyonel katı besiyerlerine göre daha yüksek oranda izolasyon sağladıkları bildirilmektedir (42).

Primer izolasyonda sıvı besiyerlerine ilave olarak bir de katı besiyeri kullanılması Amerika CDC tarafından önerilmiştir ve bu kombinasyonla mikobakterilerin izolasyon şansının arttığı bilinmektedir (39).

2.8.5. İdentifikasyon

2.8.5.1 *M.tuberculosis* complex'in Fenotipik İdentifikasyonu

Mikobakterilerin yaygın görülen türlerinin fenotipik özelliklerinin belirlenmesinde koloni morfolojisi, üreme zamanı, üreme ısısı, kord faktör oluşumu karanlıkta yada ışıkta pigment oluşumunun gözlenmesi; aril sülfataz testi, katalaz aktivitesi tayini, nitrat redüksiyonu, niasin birikimi testi, pirazinamidaz, tellürit redüksiyonu, para-nitro benzoik asit(PNB) içeren besiyerinde üreme, tiyofen-2 karboksilik asit hidrazid (T2H) ile üremenin inhibe edilmesi ve tween 80 hidrolizi gibi biyokimyasal yöntemler kullanılır (47).

2.8.5.2. *M. tuberculosis* kompleks'in Genotipik İdentifikasyonu

Mycobacterium tuberculosis genomunun bütün baz dizilimi çıkarılmıştır. Oldukça yüksek oranda guanin - sitozin (% 62-70) içermektedir. doğru şekilde Tiplendirme için en ideal yöntem tüm genomun dizi analizini yapmaktır. Ancak bunun zaman alıcı ve maliyetinin yüksek olması kullanımını sınırlamıştır . Bu nedenle mikobakteri DNA'sını direkt restriksiyon enzimi ile kesimi, özgül bir bölgenin restriksiyon enzimi ile kesimi, genom üzerinde bulunan tekrarlayan bölgeleri ya da bunların arasındaki boşlukların polimorfizmini hedefleyen yöntemler geliştirilmiş ve yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Başlıca tiplendirme metodları; Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), RFLP, IS6110-RFLP, Polymorphic G/C-rich Sequence (PGRS)-RFLP, Spoligotiplendirme, Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number Tandem Repeat (MIRU- VNTR), 16S ve 23S rRNA'dır (48).

2.8.5.3. *M.tuberculosis* kompleks'in Tanısında Moleküler Yöntemler

İnsanda infeksiyon yapan mikobakteri çeşitliliğinin artması nedeniyle tanımlamada çeşitli moleküler yöntemler kullanıma girmiştir. Ticari direkt amplifikasyon kitleri başta PCR ve transkripsiyon aracılı amplifikasyon (TMA) olmak üzere “strand displacement amplification” (SDA) ve ligaz zincir reaksiyonu (LCR) gibi çeşitli amplifikasyon yöntemleri kullanılmaktadır (49).

İlaç direncini saptamada Inno-LIPA RIF TB (Innogenetics NV, Zwijndrecht, Belgium) ve GenoType MTBDR (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany) gibi revers hibridizasyon testleri kullanılmaktadır (50).

2.8.6. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Klinikte tedavi kararlarının temelini oluşturacak olan duyarlılık testleri aynı zamanda direnç süreyansının yapılması bakımından da gereklidir. Amerika Birleşik Devletleri Tüberküloz Eliminasyonu Danışma Konseyi(CDC), ilaca dirençli mikroorganizmaların oluşumunu önlemek için *M.tuberculosis* complex'in izole edildiği tüm tüberküloz hastalarında ilk izolata antimikrobiyal duyarlılık testlerinin mutlaka yapılması gerektiğini bildirmektedir. Antimikrobiyal duyarlılık testlerinin tedavinin başlamasından üç ay sonra kültürleri negatif hale dönüşmeyen ya da

tedaviye yanıt yetersizliği olduğuna dair klinik delilleri olan hastalardan izole edilen sonraki izolatlar için de yapılması önerilmektedir (6). Amerika Birleşik Devletleri CDC, tüberküloz düşünülen bir hastanın örneği laboratuvara kabul edildikten sonra ortalama 28-30 gün içinde *M. tuberculosis* kompleks için duyarlılık testlerinin sonuçlanmasını önermektedir (6).

Mikobakterilerin antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesinde fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılmaktadır. Fenotipik yöntemlerde ilaç ilave edilmiş besiyerinde *M. tuberculosis complex* suşlarının inhibisyonu araştırılmaktadır. Genotipik yöntemlerde ise ilaç direncinde rol oynayan genlerde oluşan mutasyonlar moleküler yöntemlerle belirlenmektedir (50,51).

Direkt yöntem: Gelen klinik materyal, homojenizasyon-dekontaminasyon işlemleri sonrasında ilaçlı ve ilaçsız besiyerlerine ekilir (52).

İndirekt yöntem: Klinik örneklerden saf kültür halinde aside dirençli bakteri izole edilir, uygun inokulum hazırlanarak ilaçlı ve ilaçsız besiyerlerine ekim yapılır. Duyarlılık yöntemleri arasında orantılama yöntemini temel alan, kültüre dayalı klasik testler en yaygın kullanılanlarıdır. Katı besiyeri olarak L-J, agar bazlı besiyeri olarak da MB-7H10, MB-7H11 kullanılmaktadır. Modifiye MB-7H9 sıvı besiyerinin kullanıldığı BACTEC 460 TB ve MGIT 960 gibi hızlı ticari sistemler de yaygın olarak kullanılmaktadır. E test yöntemi de kullanılabilir alternatif bir yöntemdir (52).

İlacın kritik konsantrasyonu: Daha önce ilaçla karşılaşmamış *M. tuberculosis*' in mutasyon içermeyen klinik izolatlarının (sokak suşu) % 95' ini inhibe eden, ancak aynı zamanda ilaca cevap vermemiş hastalardan alınan türleri inhibe etmeyen en düşük konsantrasyondur (52).

Duyarlılık testleri yapılırken mikobakteri topluluğu içinde dirençli bakteri yüzdesini de ortaya çıkaracak yöntemler tanımlanmıştır:

2.8.6.1. Klasik Kültür Yöntemleri ile Yapılan Duyarlılık Testleri

a) Orantı (proporsiyon) yöntemi (direkt – indirekt): Klasik yöntemler içinde en çok kullanılan olup, *M.tuberculosis complex* izolatlarının PZA dışındaki tüm antimikobakteryel ilaçlara karşı duyarlılığını saptamak için standart yöntem olarak kullanılmaktadır. PZA için referans yöntem BACTEC 460 TB yöntemidir. Proporsiyon yönteminde; belli bir ilaç konsantrasyonunda (Kritik Konsantrasyon) dirençli olan organizmaların oranı saptanır. Bu yöntemde basiller ilaç içeren ve ilaç içermeyen agar temelli besiyerlerine ekilip 3 hafta inkübasyona bırakılmaktadır. İnkübasyon sonunda ilaç içeren besiyerindeki koloni sayısının, ilaç içermeyen besiyerindeki koloni sayısına oranı dirençli basillerin oranını gösterir. Test edilen suşlarda hesaplanan direnç yüzdesi 1 veya daha fazla ise o suşun test edilen antibiyotiğe dirençli olduğu kabul edilir. Uygulama koşullarından en az etkilenen, sonuçları en kabul gören yöntemdir (53).

b) Mutlak konsantrasyon yöntemi: Test edilen organizmaya karşı her bir ilacın Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerini tespit etme temeline dayanır. 2×10^3 veya 1×10^4 koloni oluşturan birim/mililitre (cfu/ml) bakteri içeren mikobakteri solüsyonu, hem belirli konsantrasyonlarda ilaç içeren hem de ilaçsız kontrol besiyerlerine ekilir. İlaçlı besiyerinde 20 cfu' dan daha fazla koloni gözlenmesi bakterinin o ilaca karşı dirençli olduğunu gösterir. Testin yorumlanması 4 haftalık bir inkübasyon sonucunda veya yeterli üreme yoksa 5-6 hafta sonra yapılır. Metodolojik çalışmalar yapılmadığından hata oranı yüksektir. Üreme olmayan besiyerindeki ilaçkonsantrasyonu o suşun MİK değeri olarak kabul edilir (4,54).

c) Nisbi direnç yöntemi (Direnç Oranı Yöntemi): Mutlak konsantrasyon yöntemi ile aynı temel prensibe dayanır. Farkı bu yöntemde standart H37Rv *M. tuberculosis* suşu ile denenen suşa paralel bir seri hazırlanmasıdır. Denenen mikobakteri suşunun MİK değeri, standart suşun MİK değerine bölünerek direnç belirlenir. Bu oran ≥ 8 ise suş denenen ilaca dirençli, ≤ 2 ise duyarlıdır (53).

2.8.6.2. Hızlı Kültür Yöntemleri ile Yapılan Duyarlılık Testleri

a) BACTEC 460 TB (Radyometrik) Kültür Sistemi:

İzolasyon, identifikasyon ve duyarlılık deneylerinin uygulandığı bir sistem olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır. Sistemde izolasyonun yanısıra, MTBC ile tüberküloz dışı mikobakterilerin ayırımı yapılabilmekte ve MTBC'i suşlarının primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılığı çalışılmaktadır. BACTEC 12B (MB-7H12) ve BACTEC 13A (MB-7H13) olmak üzere iki tip besiyeri içeren bu sistem, besiyerlerinde bulunan 14C işaretli palmitik asitin kullanılması ve metabolizma sonucu oluşan 14CO₂ in 0-999 sayısal değerleri arasında üreme indeksi (GI) olarak ölçülmesi prensibi ile çalışmaktadır. Ekim işleminden önce besiyerlerine PANTA içeren antibiyotik karışımı ilave edilmelidir. Şişeler günlük olarak BACTEC 460 cihazında okunur. Duyarlılık çalışılırken ise mikobakteriler antibiyotik içeren ve içermeyen BACTEC 12B ve 13A şişelerine ekilir, 37°C'de inkübe edilir. Kontrol şişesine ekilen mikroorganizma konsantrasyonu ilaç içeren şişeye göre 100 kat azdır. Duyarlılık sonuçları, kontrol ve ilaç içeren şişelerin günlük GI değeri artışlarının karşılaştırılmasıyla yorumlanır. Antitüberküloz ilaç içeren besiyerinde, duyarlı mikobakterilerin üremesi inhibe olur ve bu GI okumalarıyla kaydedilen günlük 14CO₂ üretiminde artmama veya azalmayla sonuçlanır. Günlük GI değerindeki artış, test kültürünün dirençlilik derecesiyle orantılıdır. Başarı ile kullanılmakla beraber, sistemde yer alan besiyerlerinin radyoaktif madde içermesi ve cihazda yapılan rutin kontroller sırasında meydana gelen çapraz kontaminasyon sorun oluşturmaktadır.(4, 19,27,54).

b) MGIT 960 (Florometrik) Kültür Sistemi:

Nonradyometrik bir kültür sistemidir. Kullanılan tüplerde, 7 ml Modifiye MB-7H9 broth besiyeri ve kazein peptonu, dip kısımlarında oksijen kullanımına duyarlı rutenyum metal kompleksi içeren silikon bulunur. Tüpün pH'sı 6.7'dir ve

%10 CO₂ içermektedir. Klinik örnekler ekilmeden önce besiyerlerine Growth Supplement ve PANTA(Polimiksin B, Amfoterisin B, Nalidiksik asit, Trimetoprim, Azlosilin) ilave edilir. Growth Supplement içerisinde OADC(Oleik asit, Albümin, Dekstroz, Katalaz) bulunur. Oleik asit mikobakteriyel metabolizmada kullanılır, albümin mikobakteriler için toksik olabilecek yağ asitlerini bağlar, dekstroz enerji kaynağı olarak kullanılır ve katalaz toksik peroksitleri parçalar ve bu sistemde kullanılan PANTA ise antimikrobial karışım içermektedir. Mikobakteriler ürediği zaman tüpteki oksijenin tüketilmesine bağlı olarak indikatör maddenin serbest kalması sonucunda floresans açığa çıkmakta ve floresans cihaz tarafından otomatik olarak ölçülmektedir. Oluşan floresans miktarı, üreme indeksi olarak değerlendirilmektedir. Kullanılan besiyerlerinde herhangi bir üreme olmadığında oksijen varlığına bağlı olarak silikon tabakaya gönderilen ultraviole ışınına karşı floresan oluşmazken; mikobakteri veya diğer mikroorganizmalar ürediğinde oksijenin kullanılması sonucunda ultraviole ışınına karşı floresan oluşur ve oluşan floresan miktarı üreme indeksi olarak değerlendirilir. Tam otomatize bir sistem olmakla birlikte, ultraviole ışığı altında makroskobik olarak da değerlendirme yapılabildiğinden manuel olarak kullanılmaya da uygundur. Kan dışındaki diğer tüm klinik örnekler için kullanılabilir (19,27,55).

Sistemde üremenin saptanması yanı sıra, INH, RIF, EMB, STR ve PZA duyarlılık testleri de yapılabilir. İlaç içeren tüpün floresansı, ilaç içermeyen kontrol tüpü ile karşılaştırılır. İlaçlı tüp ile ilaç içermeyen tüp arasındaki relatif üreme oranı, bilgisayar yazılım algoritmaları tarafından belirlenir. İlaç tüpündeki relatif üreme, kontrol tüpüne eşit veya daha fazla ise organizma ilaca dirençli kabul edilir. Yapılan çalışmalarda BACTEC 460 TB ve proporsiyon yöntemi ile uyumlu bulunmuştur. Üreme oranı ve saptama süresi BACTEC 460 ile aynıdır. MGIT 960 sistemi ile PZA duyarlılık testi, pH'sı düşürülerek modifiye edilmiş 7 ml MGIT sıvı besiyeri içeren MGIT PZA tüpü kullanılarak yapılabilir (4,54).

c) MB /BacT /ALERT 3D MB Kolorimetrik Kùltür Sistemi

(BioMe'rieux)

Kolorimetrik olarak besiyerinde oluşan CO₂ düzeyini ölçerek mikobakteri üremesini değerlendirmektedir. Sistemde dip kısmında pH değişikliğine duyarlı sensör bulunan Middlebrook 7H9 içeren şişeler kullanılır. Üreme esnasında oluşan CO₂, pH' yı düşürerek şişenin dibindeki sensörün rengini değiştirir. Optik okuyucu tarafından renk değişimi rakamsal değere çevrilerek üreme indeksi çıkarılır (4,54). Steril örnekler ekilmeden önce besiyerlerine reconstitution sıvısı ilave edilirken; steril olmayan örneklerin ekiminden önce antibiyotik karışımı eklemek gereklidir. Sistem kan dışındaki tüm örnekler için uygundur (27).

Bakteri ilaçlı ve ilaçsız Middlebrook besiyerlerine ekilerek 10-14 gün inkübe edilmektedir. Kontrol tüpüne alamar mavisi eklenip, 50°C' de 2 saat bekletilir. Rengin maviden pembeye dönmesi üreme olduğunun göstergesidir. Üreme saptanmışsa aynı işlem ilaçlı tüplere uygulanır (4,54).

d) Karbondioksit Oluşumunu Saptayan Sistem; ESP Culture System II

(Accumed)(Versa TREK sistemi)

Modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içeren şişelerde mikobakterilerin oluşturduğu gaz ve oluşan basıncı ölçerek üreme değerlendirmesi yapan, tam otomatik, radyoaktif olmayan, bilgisayar destekli bir sistemdir. Primer antitüberküloz ilaçlar test edilebilmektedir (56). Besiyerlerine ekim yapılmadan önce, mikobakterilerin üremesini destekleyen OADC ve kontaminasyonu engellemek amacıyla antibiyotik karışımı ilave edilir. Sistem tüm klinik örnekler için uygundur (19,27)

e) TK Kùltür Sistemi (Salubris Aç. İstanbul)

Kolorimetrik bir sistem olup katı besiyeri içerir. İnkübasyon süresince asıl rengi kırmızı olan besiyerleri mikobakteri üremesi durumunda sarı renge dönüşmektedir. Herhangi mantar ya da bakteri kontaminasyonunda ise renk yeşil olmaktadır (39,57).TK kùltür sistemi, izolasyon için kullanılan TK Medium, TK

SLC(selektif), tür ayrımı için kullanılan TK PNB (p-nitro-benzoik asit) anti-TB ilaçlara duyarlılığın saptanması için kullanılan TK INH, TK RIF, TK STR, TK EMB katı besiyerleri ile MYCOLOR TK adı verilen otomatik okuyucu inkübatörden oluşmaktadır (4,54).

2.8.6.3. Kültür Dışı Yöntemler

a) Lüsiferaz Genli Bakteriyofaj Sistemleri

Bu sistemde canlı mikobakteri varlığını saptamak amacı ile mikobakterilerde çoğalabilen lusiferaz geni klonlanmış mikobakteriyofajlar kullanılmaktadır. Bu fajlar ile mikobakteriler infekte edildiğinde, bakteri içerisinde lusiferaz enzimi üretilmekte, ortama lusiferin bulunduğu ATP kullanılarak ışık üretilmektedir. Duyarlılık testi yapılması için mikobakteriler kısa süre ilaçlı ve ilaçsız besiyerlerinde inkübe edilmekte, daha sonra mikobakteriyofajlarla enfekte edilip ışık üretimi araştırılmaktadır. İlaçsız kontrol ile birlikte ışıldayan ilaçlı tüplerden alınan örnekler, bakterinin ilaca rağmen çoğaldığını yani o ilaca dirençli olduğunu gösterir (58,59).

b) Faj Çoğalma Sistemleri

Bu sistemde hem *M. tuberculosis*, hem de hızlı üreyen *M. smegmatis* içinde çoğalabilen bir mikobakteriyofaj kullanılmaktadır. Önce duyarlılığı araştırılacak *M. tuberculosis* suşu ilaçsız ve ilaçlı besiyerlerinde inkübe edilir. Daha sonra bunlara mikobakteriyofajlar eklenir. Mikobakteriyofajlar sadece canlı mikobakteriler içerisine girebilir ve çoğalmaya başlar. Dışarıda kalan mikobakteriyofajlar tüpe eklenen ferröz amonyum sülfat ile nötralize edilir. İlaçlı tüplerde ilaca dirençli ne kadar canlı bakteri varsa, o kadar bakteriyofaj korunmuş olur. Sonra tüplere *M. smegmatis* eklenir ve agarlı bir besiyeri ile birlikte petri kutularına dökülür. *M. tuberculosis* içinde korunmuş fajlar bu kez *M. smegmatis* içerisinde çoğalarak faj plakları oluşturulur. İlaçlı tüplerden belli bir oranın üzerinde faj plağı elde edilirse bakterinin o ilaca dirençli olduğu anlaşılır (60,61).

c) Akım Hücre Ölçerinde (Flow Cytometry) Duyarlılık Belirleme

Canlı mikobakteriler florosein asetat ile işaretlenip hücre ölçerinde sayılabilmektedir. İlaçlı ve ilaçsız ortamda üç gün inkübe edilen mikobakteriler işaretlendikten sonra akım hücre ölçerinden geçirilirler ve ilaçlı tüplerden gelen örneklerden sayımda azalma olup olmadığı incelenir. Yarıdan fazla düşmeye neden olan ilaçların etkili olduğu kabul edilir (62).

2.8.6.4. E Test

Koloniler, L-J besiyerinde üremiş ortalama 2 haftalık taze kültürden sıvı besiyeri içine alınıp emülsifiye edilir. Bulanıklığı Mac Farland no 3'e ayarlanır. Eküvyonlu çubuk yardımıyla MB-7H10,11 besiyerine üç yönlü sürülüp % 5-10 CO₂'li ortamda inkübe edilir. 24 saat sonra E test (AB Biomeriux , France) şeritleri yerleştirilir. Yine aynı ortamda inkübasyona bırakılır. Ortalama 5-7 gün sonra yeterli üreme varsa okunur (63).

2.8.6.5. Mikobakteri Antimikrobiyal Duyarlılığının Belirlenmesinde Kullanılan Genotipik Yöntemler

DNA dizi analizi, line probe assay (solid faz hibridizasyon), RNA/RNA mismatch analiz, PCR-single-strand conformation polymorphism (SSCP), heterodubleks analiz, real-time PCR, DNA microarray bu yöntemlerdendir. Minimal bakteriyel üreme gerektirmesi ve saatler içinde sonuç verebilmesi moleküler yöntemlerin avantajlarıdır. Birden fazla gen bölgesinin sorumlu olduğu durumlarda, dirence yol açmayan mutasyonlarda yanlış sonuçlar verebilmesi dezavantajdır. Pratik uygulamalarda moleküler yöntemler RIF direncini saptamak için kullanılmaktadır (50,64).

2.9. Tedavi

Etkili tüberküloz tedavisi hızlı üreyen basillere karşı erken bakterisidal etkili ve dormant basilleri de ortadan kaldırmaya yönelik olmalıdır (65).

Tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlar birinci seçenek (primer, majör) ve ikinci seçenek (sekonder, minör) olarak iki grup altında incelenebilir:

2.9.1. Birinci Seçenek Antitüberküloz İlaçlar:

Tüberküloz tedavisinde kullanılan primer ilaçlar; INH, RIF, PZA, EMB ve STR'dir. EMB dışındaki primer ilaçlar bakterisidal etkinlik göstermektedir.

İzoniazid: Antitüberküloz ilaçların en güçlüsüdür. Klinik dozlarla oluşan konsantrasyonlarda dormant basiller üzerinde bakteriyostatik, hızlı çoğalanlar üzerinde bakterisit etki yapar. Ayrıca makrofajlar ve kazeöz lezyonlar içine girebilmesi, iyi absorbe edilmesi, kolay alınması ve ucuz olması bu ilacı en önemli antitüberküloz ilaç yapar. Etki mekanizması bir görüşe göre bakteri içine giren izoniazid orada bir peroksidazın etkisi altında hidrazin ve izonikotinic aside dönüşür. Sonucu madde bakteride nikotinic asidin antimetaboliti olarak etki yapar ve bir koenzim A türünün sentezini bozar. Sonuçta hücrede hidrojen peroksid yıkımı yapılamaz ve fazla miktarda biriken bu madde letal etki yapar (66).

Rifampisin: Hem hızlı çoğalan, hem de dormant duruma geçmiş mikobakterilere etkilidir. Hücre dışındaki ve içindeki mikobakterilere bakterisit etki yapar. Mikobakterilerin RNA polimeraz enzimini inhibe eder. Tek doz halinde alınabilmesi, bütün tüberküloz ilaçları içinde etki gücü bakımından izoniazide en yakın ilaç olması, yan etkilerinin ondan daha az olması ve diğer ilaçlara dirençli suşlara karşı etkili bulunması bu ilacın değerini artırır (66).

Pirazinamid: Nikotinamidin sentetik pirazin analogudur. Oldukça güçlü bakterisit etkisi vardır. Asit ortamda etkilidir, örneğin makrofajlar içinde iken etkilidir. Bu etkisini hem çoğalma halindeki, hem de dormant duruma geçmiş mikobakteriler üzerinde gösterir. Monositler ve makrofajlar içindeki yavaş çoğalan mikobakteriler üzerinde en etkili bakterisittir (66,67).

Streptomisin: Streptomisin parenteral olarak kullanılan, hücre dışı alkali ortamlarda etkili bir ilaçtır. Bakterinin 30S ribozomuna irreversibl olarak bağlanır, böylece protein sentezini inhibe eder. Klinikte kullanılan dozlarda, esas itibariyle bakteriyostatik etkilidir (66,67).

Etambütol: Tüberkülostatik bir ilaçtır ve etkinliği izoniazid ve rifampisine göre düşüktür, kendisine karşı yavaş direnç gelişmesi teröpatik değerini artırır (66).

Sekonder ilaçlar sikloserin, etiyonamid, kanamisin, kapreomisin ve PAS gibi daha toksik ve daha az tolere edilebilen ilaçlardır (67,68).

2.10. *M.tuberculosis* ve İlaç Direnci

M. tuberculosis'de ilaç direnci her antibiyotik için farklı sıklıkta olmak üzere tek basamaklı, rastgele, spontan kromozomal mutasyonlar sonucu oluşmaktadır. Mutant basillerin oluşumu tamamen rastlantısal ve geri dönüşümsüzdür. Birçok bakteride görülen aksine *M. tuberculosis*'de plazmid veya transpozon aracılığı ile oluşan horizontal gen transferine bağlı direnç görülmemektedir. Spontan direnç oranları sırasıyla INH, RIF, EMB ve STR için 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-6} ve 10^{-5} olarak gerçekleşmektedir. Kromozomlar üzerindeki direnç bölgeleri birbirleriyle bağlantılı olmadıklarından, bakterinin iki ilaca birden spontan direnç geliştirmesi, her bir ilaç için mevcut olan olasılıkların çarpımına eşittir. Örneğin INH ve RIF direncinin birlikte görülme olasılığı 10^{-14} dür (69-71).

M. tuberculosis'de direnç aktarılabılır özellikle olmadığından, direncin yayılması ancak dirençli izolatlarla infekte kişiler aracılığı ile olmaktadır. MTBC 'de antitüberküloz ilaçlara karşı direnç, tedavide ve TB kontrol programında yapılan hatalara bağlıdır. HIV ile infekte kişiler de TB'nin yayılımında ve direnç gelişiminde önemli rol oynamaktadır (67,72)

Tablo 3. Antitüberküloz ilaçlarda dirençten sorumlu olan mekanizmalar (64,69,71).

| İlaç | Direnç geni | Mekanizma |
|---------------------|------------------|---|
| Rifampisin | <i>rpoB</i> | RNA polimeraz inhibisyonu |
| İzoniyazid | <i>katC</i> | Katalaz-peroksidaz enzim inhibisyonu |
| | <i>inhA</i> | Enoil redüktaz enzim inhibisyonu |
| | <i>ahpC</i> | Alkil hidroperoksidaz enzim inhibisyonu |
| Streptomisin | <i>rrs</i> | 16S rRNA inhibisyonu |
| | <i>rpsL</i> | Ribozomal S 12 proteini inhibisyonu |
| Pirazinamid | <i>pncA</i> | Pirazinamidaz enzim inhibisyonu |
| | IS6110 insertion | |
| Etambutol | <i>embB</i> | Arabinozil transferaz inhibisyonu |

2.10.1.İlaç Direnciyle İlgili Tanımlar

Dirençli olgu: En az bir tüberküloz ilacına dirençli olan hastalardır (73).

Primer direnç: Henüz tüberküloz ilaçlarını kullanmamış veya bir aydan kısa süre içinde ilaç almış yeni tüberkülozlu hastada tedaviye başlamadan önce belirlenen ilaç direncidir. Primer direnç, basilin alındığı kaynağa ait olan dirençtir (73)

Sekonder direnç: Başlangıçta duyarlı olan basillerle enfekte olan tüberküloz hastasında, uygun olmayan tedaviye (yanlış ilaç seçimi, ilacı erken kesme, tedaviye uyumsuzluk) bağlı olarak dirençli mutantların artması sonucunda gelişen dirençtir (73).

Artmış primer ve sekonder direnç, uygulanmakta olan tüberküloz tedavi protokolünün yetersizliğinin göstergesidir (73).

Tek ilaca direnç: İlk grup beş ilaçtan (INH, RIF, EMB, PZA, STR) sadece birine dirençli olma durumudur (73).

Bileşik direnç: INH ve RIF dirençli olma koşulu olmaksızın iki ya da daha fazla ilaca dirençli olma durumudur (73).

Çoklu ilaca direnç (ÇİD-Multi drug resistance; MDR): En az INH ve RIF' in ikisine birlikte direncin olmasıdır (73).

Artmış ilaç direnci (AİD- Extensively drug resistance; XDR): RIF ve INH direnciyle birlikte herhangi bir kinolon ve parenteral ilaçlardan birine (amikasin, kapreomisin, klofazimin) direncin olmasıdır (73).

2.10.2. Dünyada İlaç Direnci

Primer tüberküloz ilaçlarına direnç tüm dünyada hızla artmaktadır. En sık direnç saptanan ülkeler Hindistan, Çin, Kazakistan, Azerbeycan, Belarus' tur (5). Direnç oranlarında kıtalar ve ülkeler arasında ciddi farklılıklar mevcuttur. ÇİD-TB olguları büyük bir sorun haline gelmiştir. 2013 yılında saptanan 9 milyon yeni olgunun % 3.5' inin ÇİD-TB olduğu düşünülmektedir. Daha önce tanı almış

olgularda bu oran % 20.5 olduğu düşünölmekte. DSÖ 2013 teki yeni olguların yaklaşık 480 bininin ÇİD-TB suşları ile enfekte olduğunu tahmin etmektedir. DSÖ'nün yayınladığı 1995-2013 yılları arasını kapsayan raporda 5 kıtadaki 154 ülkenin sonuçları değerlendirilmiş ve sadece INH direnci yeni tanı almış olgularda ortalama % 8.1 (% 6.5 - % 9.7), tedavi görmüş olgularda ise %14 (% 11.6-% 16.3) olarak belirlenmiştir. HIV enfeksiyonu varlığı Afrika ve Güneydoğu Asya'da ÇİD-TB olgularının artmasına yol açmıştır (13).

2.10.3.Türkiye'de İlaç Direnci

Türkiye'de 2012 Verem Savaş Raporu'na göre yaklaşık ilaç direnci oranları; yeni hastalarda izoniazid direnci % 10.3 ; rifampisin direnci % 4.1 ; etambutol direnci % 3.5 ; streptomisin direnci % 7.6 ÇİD TB % 2.5' tir. Tedavi görmüş olgularda ise INH direnci % 34.1 ; rifampisin direnci % 25.9 ; etambutol direnci % 16.9 ; streptomisin direnci % 20.2 ; ÇİD TB % 22.8 bulunmuştur (16).

İlaç duyarlılık testi yapılan 4.965 hastanın (yeni ve eski hastalar) (4.734 akciğer + 231 akciğer dışı) % 19.5'inde en az bir ilaç direnci tespit edilirken, 250 (% 5,0) çoklu ilaca dirençli tüberküloz hastası bulunmuştur. Bu oranlar diğer ülkeler ile karşılaştırıldığında azımsanmayacak bir değerdir ancak ülkemizde hasta bildirimleri ve kayıtlama sistemlerinde önemli sorunlar olması nedeniyle gerçek tüberküloz görülme sıklığının daha fazla olması gerektiği de göz ardı edilmemelidir (16).

Tablo 4. İlaç Duyarlılık Testi (İDT) Çalışılan Hastalarda Olgu Tanımına Göre Tekli ve Çoklu İlaç Direnç Dağılımları 2010* (16)

| DİRENÇ DURUMU | Yeni Olgular | | Önceden Tedavi Görmüş Olgular | | Tüm Olgular | |
|------------------------|--------------|-------------|-------------------------------|-------------|--------------|-------------|
| | n=4.350 | | n=615 | | n=4.965 | |
| | Sayı | %** | Sayı | %** | Sayı | %** |
| TOPLAM DUYARLI | 3.633 | 83,6 | 357 | 58,3 | 3.990 | 80,5 |
| TOPLAM DİRENÇLİ | 717 | 16,4 | 258 | 41,7 | 975 | 19,5 |
| H dirençli | 230 | 5,3 | 38 | 6,2 | 268 | 5,4 |
| R dirençli | 52 | 1,2 | 15 | 2,5 | 67 | 1,4 |
| E dirençli | 40 | 0,9 | 7 | 1,1 | 47 | 1,0 |
| S dirençli | 153 | 3,5 | 21 | 3,4 | 174 | 3,5 |
| TOPLAM TEK İLAÇ | 475 | 11,0 | 81 | 13,3 | 556 | 11,3 |
| HR dirençli | 22 | 0,5 | 36 | 5,9 | 58 | 1,2 |
| HS dirençli | 75 | 1,7 | 15 | 2,5 | 90 | 1,8 |
| HE dirençli | 16 | 0,4 | 11 | 1,8 | 27 | 0,5 |
| RS dirençli | 5 | 0,1 | - | - | 5 | 0,1 |
| RE dirençli | 8 | 0,2 | 3 | 0,5 | 11 | 0,2 |
| ES dirençli | 5 | 0,1 | 1 | 0,2 | 6 | 0,1 |
| TOPLAM İKİ İLAÇ | 131 | 3,0 | 66 | 10,8 | 197 | 4,0 |
| HRS dirençli | 24 | 0,6 | 26 | 4,3 | 50 | 1,0 |
| HRE dirençli | 13 | 0,3 | 20 | 3,3 | 33 | 0,7 |
| HSE dirençli | 15 | 0,3 | 6 | 1,0 | 21 | 0,4 |
| RSE dirençli | 1 | 0,02 | - | - | 1 | 0,02 |
| TOPLAM ÜÇ İLAÇ | 53 | 1,2 | 52 | 8,5 | 105 | 2,1 |
| HRSE DİRENÇLİ | 50 | 1,2 | 55 | 9,0 | 105 | 2,1 |

n: Duyarlılık testi yapılan hasta sayısı

* Dört ilaç için de duyarlılık testi yapılmış olup, hastaların dirençli olduğu ilaç ya da ilaçlar dışında kalan diğer ilaçlara duyarlı olduğu gösterilmiştir.

**Toplam duyarlı ve toplam dirençli dışındaki yüzdeler dört ilaç için de duyarlılık testi yapılan hasta sayısı üzerinden alınmıştır (4.323/609/4.932)

Tablo 5. İlaç Duyarlılık Testi (İDT) Çalışılan Hastalarda Olgu Tanımına Göre Her Bir TB İlacı İçin Toplam Direnç Sonuçları, 2005-2010* (16)

| | 2005 | | 2006 | | 2007 | | 2008 | | 2009 | | 2010 | |
|------------------------------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|
| | Dirençli | % | Dirençli | % | Dirençli | % | Dirençli | % | Dirençli | % | Dirençli | % |
| Yeni | n=3.237 | | n=4.135 | | n=4.142 | | n=4.221 | | n=3.720 | | n=4.350 | |
| İzoniyasid | 291 | 9,0 | 444 | 10,7 | 492 | 11,9 | 479 | 11,3 | 381 | 10,2 | 450 | 10,3 |
| Rifampisin | 144 | 4,4 | 185 | 4,5 | 202 | 4,9 | 166 | 3,9 | 143 | 3,8 | 177 | 4,1 |
| Etambutol | 97 | 3,0 | 147 | 3,6 | 115 | 2,8 | 143 | 3,4 | 131 | 3,5 | 152 | 3,5 |
| Streptomisin | 227 | 7,0 | 348 | 8,4 | 296 | 7,1 | 275 | 6,5 | 259 | 7,0 | 329 | 7,6 |
| ÇİD | 101 | 3,1 | 131 | 3,2 | 120 | 2,9 | 125 | 3,0 | 99 | 2,7 | 110 | 2,5 |
| Önceden tedavi görmüş | n=508 | | n=711 | | n=775 | | n=742 | | n=600 | | n=615 | |
| İzoniyasid | 139 | 27,4 | 169 | 23,8 | 214 | 27,6 | 207 | 27,9 | 183 | 30,5 | 210 | 34,1 |
| Rifampisin | 107 | 21,1 | 141 | 19,8 | 145 | 18,7 | 162 | 21,8 | 139 | 23,2 | 159 | 25,9 |
| Etambutol | 51 | 10,0 | 94 | 13,2 | 64 | 8,3 | 71 | 9,6 | 71 | 11,8 | 104 | 16,9 |
| Streptomisin | 77 | 15,2 | 121 | 17,0 | 107 | 13,8 | 96 | 12,9 | 110 | 18,3 | 124 | 20,2 |
| ÇİD | 90 | 17,7 | 118 | 16,6 | 120 | 15,5 | 138 | 18,6 | 123 | 20,5 | 140 | 22,8 |
| Tüm hastalar | n=3.745 | | n=4.846 | | n=4.917 | | n=4.963 | | n=4.320 | | n=4.965 | |
| İzoniyasid | 430 | 11,5 | 613 | 12,6 | 706 | 14,4 | 686 | 13,8 | 564 | 13,1 | 660 | 13,3 |
| Rifampisin | 251 | 6,7 | 326 | 6,7 | 347 | 7,1 | 328 | 6,6 | 282 | 6,5 | 336 | 6,8 |
| Etambutol | 148 | 4,0 | 241 | 5,0 | 179 | 3,6 | 214 | 4,3 | 202 | 4,7 | 256 | 5,2 |
| Streptomisin | 304 | 8,1 | 469 | 9,7 | 403 | 8,2 | 371 | 7,5 | 369 | 8,5 | 453 | 9,1 |
| ÇİD | 191 | 5,1 | 249 | 5,1 | 240 | 4,9 | 263 | 5,3 | 222 | 5,1 | 250 | 5,0 |

*Her bir ilaç için toplam dirençli hasta sayısı belirtilirken, diğer ilaçlara dirençli ya da duyarlı olması dikeyte alınmamıştır.
n: Duyarlılık testi yapılan toplam hasta sayısı (Akciğer olguları+AC dışı olgular).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Ocak 2010- Ekim 2014 yılları arasında Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilimdalı Tüberküloz Laboratuvarına tüberküloz ön tanılı hastalardan gönderilen pulmoner ve extrapulmoner örneklerden izole edilen 59 *M.tuberculosis* suş çalışıldı. Kültür işleminde pozitif MGIT tüpleri kullanıldı. Bu 59 suştan 30 tanesi 2010-2012 yıllarında yeni tanı alan hastaların -80 °C' de saklanan ve canlandırılan suşlar iken, 29 tanesi 2013-2014 yıllarında tez çalışması sırasında üreyip yeni tanı alan hasta suşlarıdır. Antibiyogram yapılacak olan suşlar, L-J besiyerine pasajları yapıldıktan sonra, Mikobakteriyoloji Laboratuvarımızda primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılıkları BACTEC MGIT 960(Becton-Dickinson) sistemi ile araştırıldı.

3.1. İdentifikasyon Teyidi

Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilimdalı Tüberküloz Laboratuvarında klinik örneklerden izole edilen mikobakteriler, Laboratuvarımızda TBC Identification Test ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilimdalı Tüberküloz Laboratuvarında High Performance Liquid Chromotography (HPLC) testi yapılarak MTBC olarak tanımlandı.

3.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Antibiyotik duyarlılık testi üretici firma önerileri (Becton- Dickinson, USA) doğrultusunda gerçekleştirildi.

3.3. Kullanılan Malzemeler

Steril 7 ml'lik tüpler

BACTEC MGIT Growth Supplement (OADC)

BACTEC MGIT 960 SIRE Growth Supplement (OADC)

7 ml Middlebrook 7H9 besiyeri

Mc Farland cihazı

Kanlı agar besiyeri

3.4. İnokulum Hazırlanması (L- J' den Middlebrook 7H9' a Pasajlayarak BACTEC MGIT 960 Cihazında Üretme)

1. – 80°C' de bulunan pozitif MB tüplerinden L-J besiyerine ekim yapıldı. L-J besiyerinde üretilen şuşlar, steril bir öze ile serum fizyolojik içeren steril tüplere alındı. Bu işlem sırasında katı besi yeri alınmamasına ve bakteri bulanıklığının 1 McFarland standardını geçmemesine dikkat edildi.

2. Bakteri süspansiyonunu homojenize etmek amacıyla 2-3 kez vortekslendi ve 20 dakika beklemeye bırakıldı.

3. Üstte kalan kısım başka bir steril tüpe aktarıldı. Sedimentin alınmamasına dikkat edildi. Tekrar 20 dakika bekletilerek, üstte kalan kısım başka bir steril tüpe aktarıldı.

4. Bu süspansiyon 0.5 McFarland standardına ayarlandı. Süspansiyondan 1ml. alınarak 4 ml steril serum fizyolojik ile 1/5 dilüsyon yapıldı.

5. Dilüe edilen süspansiyondan steril pastör pipeti ile 0.5 ml alınarak, 0.8 ml BACTEC MGIT Growt Supplement (oleik asid, dekstroz, katalaz, sığır albümin) eklenmiş BBL MGIT 7 ml tüpüne aktarıldı. Bu tüp cihaza konularak inkübe edildi.

Cihaz pozitif sinyal verdikten sonra steril bir pastör pipeti ile aside dirençli boyama için örnek alındı. Bakteri kontaminasyonunu kontrol etmek amacıyla bir kanlı agar besiyerine ekim yapıldı. 48 saatlik inübasyondan sonra kanlı agar basiyerinde üreme yoksa antibiyogram işlemine geçildi. Kanlı agarda üreme olması durumunda dekontaminasyon işlemi tekrarlandı.

3.5. Antibiyotik Solüsyonlarının Hazırlanması

Antibiyotikler STR, INH, RIF, EMB BACTEC MGIT SIRE kiti (Becton Dickinson, USA) içinde liyofilize halde üretici firma tarafından sağlandı. Her liyofilize antibiyotik şişesine 4 ml steril distile su eklendi ve tamamen çözünene

kadar çalkalandı. Liyofilize antibiyotik şeması ve MGIT 7 ml besiyerindeki son konsantrasyonları Tablo 6’ da belirtilmiştir.

Tablo 6. MGIT tüplerine eklenen ilaç konsantrasyonları

| İlaç | Liyofilize antibiyotik içeren flakon | Sulandırım sonrası konsantrasyon | MGIT tüpüne eklenmesi gereken volüm | MGIT tüpündeki son konsantrasyon |
|----------|--------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| MGIT STR | 332 µg | 83 µg/ml | 100 µl | 1,0 µg/ml |
| MGIT INH | 33,2 µg | 8,3 µg/ml | 100 µl | 0,1 µg/ml |
| MGIT RIF | 332 µg | 83 µg/ml | 100 µl | 1,0 µg/ml |
| MGIT EMB | 1660 µg | 415 µg/ml | 100 µl | 5,0 µg/ml |

3.6. Antibiyogram İşlemi

1- Her test için 5 adet 7 ml’lik MGIT tüpü, ilk tüp kontrol tüpü (GC- Growth Control) olacak şekilde sırasıyla STR, INH, RIF ve EMB şeklinde işaretlendi.

2- Her birine aseptik şartlarda 0,8 ml BACTEC MGIT 960 SIRE Growth Supplement (Becton Dickinson, USA) (OADC) eklendi.

3- Aseptik koşullar altında, firma önerileri doğrultusunda sulandırılmış liyofilize ilaç solusyonlarından (Tablo.3.2) 0.1 ml alınarak daha önce işaretlenmiş olan uygun tüplere eklendi.

4- Kontrol tüpü hazırlamak için yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan inokulumdan 0.1 ml alınarak 10 ml steril serum fizyolojik içinde 1/100 dilüe edildi. Bu süspansiyondan 0.5 ml, ilaç konulmamış kontrol tüpüne ekim yapıldı.

5- İlaçlı tüplere ise inokulumdan 0.5 ml eklendi. Tüplerin kapakları sıkıca kapatılarak antibiyotik duyarlılık test seti cihaza yüklendi.

3.7. Sonuçların Değerlendirilmesi

Antibiyotik içeren tüplerin değerlendirmesi kontrol tüpünde üreme 400 reme İndeksi (Growth Unit:GU' ne ulaşıldığında yapıldı. Üreme gözlenmesi durumunda bakteri o antibiyotiğe dirençli kabul edildi. Kontrol tüpünde 4 günden önce 400 GU reme gözlenmesi kontaminasyon veya bakteri miktarının fazlalığı şeklinde yorumlandı. Ondört günden sonra üreme gözlenmeyen (400 GU) kontrol tüpleri ise bakteri yoğunluğu yetersiz olarak değerlendirilerek ilgili izolat için antibiyogram tekrarı yapıldı.

3.8. Kalite Kontrol

Duyarlılık testlerinde kalite kontrol olarak, denenen ilaçlara duyarlı olduğu bilinen *M. tuberculosis* (H37Rv) suşu kullanıldı.

4. BULGULAR

2010-2014 yılları arasında İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına başvuran tüberküloz şüphesi olan hastaların klinik örneklerinden 59' unda MTBC suşu izole edilmiştir. Primer tüberküloz tanısı alan bu hastalarda primer antitüberküloz ilaçlara direnç dağılımı değerlendirilmiştir.

4.1. Hastaların Yaş Dağılımı

Hastaların yaş ortalaması 55.5, en küçük yaş 19 ve en büyük yaş 88 olarak saptanmıştır. Her hastaya ait tek bir örnek çalışmaya alınmıştır (Tablo 7). 59 *M.tuberculosis* kompleks suşunun 22' ü (% 37.3) kadın hastalardan, 37' i (% 62.7) erkek hastalardan izole edilmiştir (Tablo 7). İzole edilen suşların yaş grupları ve cinsiyet dağılımına bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Tablo 7. İzole edilen MTBC suşlarının yaş ve cinsiyete göre dağılımı

| Yaş | Kadın | | Erkek | |
|---------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
| | n | % | n | % |
| 20-35 | 4 | 6.8 | 7 | 11.9 |
| 36-50 | 3 | 5 | 6 | 10.2 |
| 51- 65 | 9 | 15.3 | 15 | 25.4 |
| ≥ 66 | 6 | 10.2 | 9 | 15.2 |
| Toplam | 22 | 37.3 | 37 | 62.7 |

4.2. İzole edilen MTBC suşlarının geldiği kliniklere göre dağılımı

Numunelerin geldikleri klinlere baktığımızda en fazla % 35.5 oranında Göğüs Hastalıkları kliniğinden sonra da % 7 oranında Dahiliye kliniğinden gelmiştir.

Tablo 8. İzole edilen MTBC suşlarının geldiği klinlere göre dağılımı

| Geldiği klinik | Numune sayısı | Oran % |
|--------------------------------|---------------|--------|
| Göğüs Hastalıkları | 21 | 35.5 |
| Dahiliye | 7 | 11.9 |
| Beyin Cerrahisi | 6 | 10.2 |
| Enfeksiyon hastalıkları | 5 | 8.5 |
| Nöroloji | 5 | 8.5 |
| Dermatoloji | 4 | 6.8 |
| Genel Cerrahi | 3 | 5.0 |
| Gastroenteroloji | 2 | 3.4 |
| Nefroloji | 2 | 3.4 |
| Romatoloji | 1 | 1.7 |
| Ortopedi | 1 | 1.7 |
| KBB | 1 | 1.7 |
| FTR | 1 | 1.7 |
| Toplam | 59 | 100 |

4.3. İzole edilen MTBC suşlarının klinik örneklerle göre dağılımı

Çalışmaya alınan 59 MTBC suşunun 33 (% 56.0)' ü balgam, 7 (% 11.9)'si ameliyat materyali, 6 (% 10.1)'si idrar, 5 (% 8.5)'i biyopsi materyali, 2 (% 3.4)'si bronşial lavaj sıvısı, 2 (% 3.4)'si periton sıvısı, 2 (% 3.4)'si eklem sıvısı, 1 (% 1.7)'i mide açlık sıvısı (MAS) ve 1 (%1.7)'i yaradan izole edilmiştir. Örnek dağılımına bakıldığında; % 55.9 gibi büyük bir çoğunluğunun balgamdan izole edilen suşlar olduğu görülmüştür (Tablo 9).

Tablo 9. İzole edilen MTBC suşlarının klinik örneklerle göre dağılımı

| Klinik Örnekler | | n | % |
|------------------------|-------------------------|----|------|
| Solunum yolu örnekleri | Balgam | 33 | 56 |
| | BAL | 2 | 3.4 |
| Solunum dışı örnekler | Ameliyat Materyali | 7 | 11.9 |
| | İdrar | 6 | 10.2 |
| | Biyopsi materyali | 5 | 8.5 |
| | Periton sıvısı | 2 | 3.4 |
| | Ekleme sıvısı | 2 | 3.4 |
| | Yara ,mide açlık sıvısı | 2 | 3.4 |

4.4. Her bir ilacın toplam direnç oranları

STR için 2 suş (% 3.4), INH için 2 suş (% 3.4), RIF için 2 suş (% 3.4) ve EMB için 1 suş (% 1.7) olarak tesbit edilmiştir (Tablo 10).

Tablo 10. Herbir ilaca göre toplam direnç oranları

| İlaçlar | Suş Sayısı | Direnç (%) |
|---------|------------|------------|
| STR | 2 | 3.4 |
| INH | 2 | 3.4 |
| RIF | 2 | 3.4 |
| ETB | 1 | 1.7 |

4.5. İzole edilen MTBC suşlarının ilaç direnç dağılımı

Tek ilaca karşı değerlendirdiğimizde STR dirençli 1 suş (% 1.7), İNH dirençli 1 suş (% 1.7), RİF dirençli 2 suş (% 3.4) tespit edilmiş, EMB dirençli suş saptanmamıştır. İki ilaca karşı dirençli suş saptanmamıştır. Üç ilaca direnç, STR + RİF +EMB dirençli sadece 1 suş tesbit edilmiştir (Tablo 11)

Tablo 11. Suşların tek başına primer antitüberküloz ilaçlara direnç oranları

| | İlaçlar | Sayı | % | Materyal |
|-------------------------|----------------------------------|------|-----|----------------------------|
| Tek ilaca direnç | STR | 1 | 1.7 | Ameliyat materyali |
| | INH | 1 | 1.7 | Balgam |
| | RIF | 2 | 3.4 | Biyopsi,ameliyat materyali |
| | EMB | --- | --- | |
| | Toplam tek ilaca direnç | | 4 | 6.8 |
| İki ilaca direnç | STR +INH | --- | --- | |
| | INH + RIF | --- | --- | |
| | RIF+ EMB | --- | --- | |
| | Toplam iki ilaca direnç | | --- | --- |
| Üç ilaca direnç | STR + INH + EMB | 1 | 1.7 | Balgam |
| | Toplam birden fazla ilaç direnci | 1 | 1.7 | |

Tartışma

Tüberküloz, dünyada HIV/AIDS' den sonra erişkinlerde en çok ölüme yol açan ikinci enfeksiyon hastalığı olarak hala ciddi derecede önemini korumaktadır. Tüberkülozun 1970' li ve 1980' li yıllarda kontrol altına alındığı sanılıyordu. Bu durum Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nin epidemiyolojik verilerine dayanan bir yanılgıydı. 1990' lı yıllar ile birlikte, tüberkülozun önemli bir sağlık sorunu olduğu yeniden hatırlandı çünkü dünya nüfusunun üçte biri *M. tuberculosis* ile hala enfekteydi ve yılda 8 milyon insan tüberküloz hastalığına yakalanıyor, 3 milyon kişi bu hastalıktan ölüyordu (74,75).

Son 30 yıl içinde sosyo-ekonomik sorunlar, göçler, savaşlar, tüberküloz kontrol programlarının ihmal edilmesi ve özellikle HIV/AIDS salgınının ortaya çıkması ile tüberküloz insidansında birçok ülkede artış olmuştur. Kötü kontrol programları sonucu ilaç direnci yaygınlaşmış, özellikle de ÇİD TB insan sağlığı için önemli bir tehdit niteliğini kazanmıştır (75).

Dünya genelinde tüberküloz hastalığının artışı konusunda DSÖ, dört önemli unsur üzerinde durmuştur:

1. Hükümetlerin hastalığı ihmal etmeleri sonucunda TB kontrol sistemleri kötüleşmiş ve hatta birçok yerde kaybolmuştur.
2. Kötü yönetilen ya da doğru yaklaşımların uygulanmadığı TB kontrol programları, hastalığın artışı yanında ilaca dirençli tüberkülozun artışına yol açmıştır.
3. Tüberküloz ve HIV'in birlikte olduğu hallerde, HIV'in endemik olduğu yerlerde TB belirgin artış yapmıştır.
4. Nüfus artışı, TB olgularının sayılarında artışa yol açmıştır. Hastalık insidansının yüksek olduğu ülkelerden göçlerle gelen TB olguları, sanayileşmiş ülkelerde artış nedenlerinden birisini oluşturmaktadır (76).

Bütün bu sorunların ortaya çıkması nedeniyle DSÖ 1993 yılında tüberküloz konusunda acil durum ilan etmiş ve bütün ülkelere “Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi” ni (DGTS) önermiştir. Bu stratejide amaçlar; hükümetlerin politik kararlılık göstermesi, balgamın mikroskopik muayenesinin yaygınlaştırılması, gerekli tüberküloz ilaçlarının kesintisiz ve ücretsiz temini, standart kısa süreli tedavi rejimlerini direk gözetim altında uygulamak ve standart kayıt ve rapor sistemi ile tüberküloz kontrol programının değerlendirilmesi olarak belirlenmiştir. Günümüzde 190 ülkede uygulanan DGTS ile bakteriyolojik tanı oranları ve tedavi başarısı dünya çapında artmıştır (74,75).

Duyarlılık sonuçları olmaksızın yapılan tedaviler, beraberinde direnç sorununu ve tedavi başarısızlıklarını da getirmektedir. DSÖ, tüberküloz tedavi programlarının etkilerinin takip edilebilmesi için, standart tedavi rejimlerine ilaveten ilaç duyarlılık testlerinin de sürveyansını önermektedir (4,77).

Dünya Sağlık Örgütü 1997 yılından beri her yıl, tüberkülozun kontrolüne dair yıllık rapor yayınlamaktadır. Raporun ana amacı, tüberküloz epidemisinin geniş kapsamlı ve güncel bir değerlendirmesini yapmak ve tüberküloz tedavi ve kontrolündeki global, bölgesel ve ülkeler seviyesindeki ilerlemeyi görmektir (78).

TB hastalarının erken tespiti, hastalara uygun tedavinin verilmesi ve takibi, tüberküloz kontrol programlarının en önemli unsurlarındandır. Bu yüzden MTBC grubu bakterilerin üretilmesi ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması, uygun MTBC tedavisinin belirlenmesinde büyük öneme sahiptir (79).

CDC, TB düşünülen bir hastanın örneğinin laboratuvara geldikten sonra ortalama 28-30 gün içinde MTBC için duyarlılık testlerinin sonuçlandırılmasını önermektedir. Klasik antibiyotik duyarlılık testlerinde iş yükü fazlalığı, antibiyotik içeren klasik besiyerlerinin hazırlanması ve saklanmaları sırasında antibiyotiğin inaktive olmasıyla yanlış sonuçlar alınabilmektedir (45).

Bu testlerde suşların duyarlılık sonuçlarının 21 günlük inkübasyon süresi sonunda değerlendirilmesi tedaviyi geciktirebilmektedir. Hızlı sonuç almak için moleküler yöntemler kullanılarak, ilaç direncinden sorumlu gen bölgeleri gösterilmektedir. Bu yöntemlerde ise, birden fazla gen bölgesinin dirençten sorumlu

olduğu durumlarda her bir direnç geni için ayrı işlem yapılması gerekmektedir. Dirençli olduğu saptanan, fakat mutasyonların gösterilemediği olgular, dirençte başka gen bölge mutasyonlarının olabileceğini düşündürmektedir. Kullanılan ekipmanın da pahalı olması bu yöntemlerin pratikte uygulanmasını kısıtlamaktadır (50).

BACTEC MGIT 960 sistemi ile alınan sonuçlar uzun dönemde yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda referans yöntemlerle alınan sonuçlar ile uyumlu bulunmuştur. Clinical Laboratory Standards İnstitue (CLSI) tarafından fenotipik antitüberküloz ilaç duyarlılığını saptamada önerilen testler arasında bildirilmiştir (CLSI-2003). BACTEC MGIT 960 sistemi tam otomatize ve kolay uygulanabilir olması, 4-13 gün gibi kısa sürede sonuç verebilmesi açısından önemli avantajlar sağlamaktadır. Bu sistemin en önemli dezavantajının, kültür -işlemleri sırasında karşılaşılan kontaminasyon sorunu olduğu bildirilmektedir (80-82).

Bir toplumda primer direncin yüksek bulunması, uygulanan tedavi programının yetersizliğini göstermektedir. Direncin %5 ve daha düşük olduğu ülkelerde iyi bir ulusal tüberküloz kontrol programının uygulandığı söylenebilir. Primer ilaç direnci varlığının %15 ve daha fazla olması uygulanan programın başarılı olmadığı ve yeni bir kontrol programının uygulanması gerektiğini göstermektedir (83,84).

Tablo 12. Ülkemizde antitüberküloz ilaçlara karşı saptanan direnç oranları

| Çalışan | Suş sayısı | Yöntem | İl | Yıl | STR (%) | INH (%) | RIF (%) | ETB (%) | 2 İlaç Direnci | ≥ 3 İlaç Direnci |
|------------------------------------|------------|-----------------------------|----------|-----------|---------|---------|---------|---------|----------------|------------------|
| Alışkan ve ark. ⁸⁵ | 373 | Bactec 460 | Adana | 2005-2010 | 3.5 | 7.7 | 2.9 | 7.0 | 3.8 | 1.6 |
| Aydın F. ve ark. ⁸⁶ | 212 | Bactec 960 | Trabzon | 2005-2010 | 13.7 | 17.5 | 5.7 | 5.7 | 8.0 | 3.7 |
| Altıntop ve ark. ⁸⁷ | 33 | Proporsion | Kayseri | 2005 | -- | 6.0 | 6.0 | -- | 6.0 | 6.0 |
| Aydın O. ve ark. ^{*88} | 99 | Bactec 960 | Zongldak | 2003-2005 | 13.1 | 18,2 | 2.0 | 3.0 | 2.0 | -- |
| Balbay ve ark. ^{*89} | 52 | L-J | Düzce | 2000-2004 | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| Baylan ve ark. ⁹⁰ | 115 | Bactec 460 | Ankara | 1998 | 3.5 | 6.1 | 1.7 | 3.5 | 2.6 | -- |
| Baylan ve ark. ⁹⁰ | 63 | Bactec 460 | Ankara | 2002 | 4.8 | 11.1 | 1.6 | 1.6 | 3.2 | -- |
| Bilgin ve ark. ^{*91} | 623 | Bactec 460 | Samsun | 2004-2006 | 3.7 | 13.2 | 2.9 | 2.4 | 3.6 | 0.7 |
| Çelik ve ark. ⁹² | 189 | Bactec 960 | Sivas | 2006-2010 | 9.5 | 10.6 | 2.7 | 0.5 | 6.4 | 0.5 |
| Esen ve ark. ⁹³ | 237 | 7H10 | İzmir | 2000-2002 | 5.1 | 6.8 | 9.3 | 4.2 | 1.7 | -- |
| Göçmen ve ark. ^{*94} | 94 | 7H10 | Kırkkale | 2001-2006 | -- | 6.4 | 3.2 | 2.1 | 4.2 | -- |
| Karagöz ve ark. ^{*95} | 1277 | L-J | İstanbul | 2005 | 8.8 | 8.8 | 5.1 | 3.6 | 3.3 | 2.4 |
| Kayhan ve ark. ⁹⁶ | 1607 | Bactec 960 | Samsun | 2005-2010 | 6.84 | 17.1 | 5.28 | 4.1 | 49 | 2.28 |
| Kömürcüoğlu ve ark. ^{*97} | 231 | Bactec 960 | İzmir | 1999-2004 | 3.4 | 4.3 | 4.2 | 2.6 | 3.0 | 1.9 |
| Saniç ve ark. ⁹⁸ | 50 | Bactec 460 | Samsun | 2002 | 4.0 | 16.0 | 4.0 | 4.0 | 6.0 | 2.0 |
| Talay ve ark. ^{*99} | 135 | | İstanbul | 1997-2000 | 13.3 | 8.8 | 3.0 | 2.2 | 2.3 | 3.0 |
| Yaylı ve ark. ^{*100} | 84 | Bactec 960 | Isparta | 2003 | 2.4 | 9.5 | 2.4 | -- | 2.4 | -- |
| Sağlık Bakanlığı ^{*16} | 23805 | Türkiye geneli VSD verileri | | 2005-2010 | 7.3 | 10.6 | 4.3 | 3.3 | 3.0 | 2.4 |
| Bizim çalışmamız* | 59 | Bactec 960 | İzmir | 2010-2014 | 3.4 | 3.4 | 3.4 | 1.7 | -- | 1.7 |

*: Yeni tanı almış hastalarda yapılan çalışmalar

2010-2014 yılları arasında izole edilip yeni tüberküloz tanısı alan MTBC suşlarında primer antitüberküloz ilaçlara direnci belirlemek amacıyla yaptığımız çalışmada herhangi bir ilaca direncin saptanmadığı oran % 91.5, bir ilaca direnç oranı % 6.8 ve birden fazla ilaca direnç oranı % 1.7 (üçlü ilaç direnci)' dir. Çoklu ilaç direnci , iki ilaca dirençli suşa ve dördü ilaç direncine rastlanmamıştır.

Bunlardan 2 suş (% 3.4) STR' ye, 2 suş (% 3.4) INH' ye, 2 suş (% 3.4) RIF' e, 1 suş (% 1.7) ETB' ye dirençli bulunmuştur (Tablo 10).

Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığının Türkiye genelinde VSD' lerden toplanan verilerle oluşturduğu Türkiye' de Verem Savaşı 2012 Raporu' nda 2005-2010 yılları arası 23805 yeni tanı alan hastada STR direnci % 7.3, INH direnci % 10.6, RF direnci % 4.3, ETB direnci % 3.3 bulunmuştur (17). Herhangi iki ilaca direnç oranı % 3.0, ÇİD % 2.5, herhangi üç ve üzeri ilaç direnci % 2.4 tür. Çalışmamızda bulduğumuz değerler Türkiye ortalamasının altındadır (Tablo 5).

Adana ilinde Alışkan ve ark (85), Bactec 460 sistemiyle yaptığı 373 suşluk çalışmada yeni veya eski tanı almış hasta bilgisi verilmemesine rağmen STR direnci % 3.5 ve RF direnci % 2.9 ile bizim bulduğumuz değerlere yakın, Türkiye ortalamasından düşüktür. INH ve ETB direnci ise sırasıyla % 7.7 ve % 7.0 ile çalışmamızdan daha yüksek değerlerde, INH direnci Türkiye ortalamasından düşük ETB direnci ise yüksektir (Tablo 12).

Aydın O. ve ark. (88), 2003-2005 yılları arasında Zonguldakta yeni tanı alan 99 hastada BACTEC 960 ile yaptıkları duyarlılık çalışmasında STR direnci % 13.1 INH direnci % 18.2 RF direnci % 2.0 ETB direnci % 3.0 bulunmuştur. STR ve INH direnci bizim çalışmamızdan ve Türkiye ortalamasından yüksek, RIF ve ETB direnci ise yakın değerlerdedir (Tablo 12).

Bilgin ve ark. (91), Samsun'da BACTEC 460 sistemiyle 2004-2006 yılları arasında elde edilen suşlardan yaptıkları çalışmada, yeni tanı alan 623 hastada STR direnci % 3.7 ; RF direnci % 2.9 ; ETB direnci % 2.4 ile Türkiye ortalamasının altında bizim çalışmamıza yakın değerlerdedir. INH direnci % 13.2 ile Türkiye ortalaması ve bizim çalışmamızdan yüksektir (Tablo 12).

Göçmen ve ark. (94) Kırıkkale'de 2001-2006 yılları arası elde edilen yeni tanı almış 94 hasta suşuyla 7H10 agar proporsiyon yöntemiyle yaptıkları çalışmada RF direnci % 3.2 ; ETB direnci % 2.1 ile Türkiye ortalamasının altında bizim çalışmamıza yakın değerlerdedir. STR direnci saptanmamıştır. INH direnci % 6.4 ile çalışmamızdan yüksek, Türkiye ortalamasının altındadır (Tablo 12).

Karagöz ve ark. (95) İstanbul’ da 2005 yılında L-J proporsiyon metoduyla 1233 yeni tanı almış hasta suşuyla yaptıkları çalışmada STR direnci % 8.8 ; RF direnci % 5.1 ve ETB direnci % 3.6 ile Türkiye ortalamasına yakın değerlerde INH direnci ise % 8.8 ile Türkiye ortalaması olan %10.6 değerine yakın çıkmıştır. Bizim çalışmamızdaki direnç oranı daha düşüktür (Tablo 12).

Yaylı ve ark. (100) Isparta ve yöresinde MGIT sistemi ile primer antitüberküloz ilaçlara karşı direnç oranları ise STR, INH, RIF ve EMB için sıra ile % 2.4, % 9.5, % 2.4, % 0.0’dır. Bu oranlar INH hariç hem bizim çalışmamızdaki oranlardan düşük, hem de genel olarak Türkiye ortalamalarının altında bulunmuştur. INH direnci ise Türkiye ortalamalarına yakın iken bizim oranımızdan yüksek saptanmıştır (Tablo 12).

Esen ve ark. (93) İzmir’de 2000-2002 yıllarında toplanan 237 suşta 7H10 proporsiyon yöntemiyle yaptıkları çalışmada primer antitüberküloz ilaçlara karşı direnç oranları ise STR, INH, RIF ve EMB için sıra ile % 5.1, % 6.8, % 9.3, % 4.2’dır. STR ve INH için direnç oranları Türkiye ortalamasından düşük, RIF ve ETB direnç oranları ise yüksektir. Bizim çalışmamız ile kıyaslandığında ise Esen ve ark. nın saptadığı direnç oranları daha yüksektir (Tablo 12).

Kömürcüoğlu ve ark. (97) İzmir Suat Seren Göğüs Hastalıkları hastanesinde 1999-2004 yıllarında toplanan 231 yeni tanı almış hasta suşlarını kullanarak BACTEC 960 cihazıyla yapılan çalışmada primer antitüberküloz ilaçlara direnç oranları ise STR, INH, RIF ve EMB için sıra ile % 3.4, % 4.3, % 4.2, % 2.6’dır. STR ve INH için direnç oranları Türkiye ortalamasının altında, RIF ve ETB için direnç oranları ise Türkiye ortalaması ile benzerdir. Bizim çalışmamız ile kıyaslandığında STR direnç oranı % 3.4 ile aynı, INH direnç oranı Türkiye ortalamasının belirgin altında iken bizim çalışmamızdaki INH direnç oranı olan % 3.4 ile arasında belirgin fark yoktur. RIF ve ETB direnç oranı ile bizim çalışmamız % 3.4 ve % 1.7 ile yine yakın değerlerdedir (Tablo 12).

Ülkemizin sosyo-ekonomik durumu, gelişmişlik düzeyi bölgeler arasında farklılıklar gösterdiğinden coğrafi bölgeler arasındaki direnç değerlerinde de önemli farklılıklar görülmektedir (Tablo 12).

Özellikle sosyoekonomik düzeyi düşük bireylerde tedaviyi terk sonrası sekonder direnç ve ÇİD olgularının saptanması da yüksek olacağından bunlarla temas eden yakınlarında primer direnç doğal olarak daha yüksek oranda saptanabilecektir.

Bizim çalışmamızda direnç oranlarının düşük olmasının nedeni İzmir ve çevresinin sosyoekonomik olarak ülkemizin diğer bölgelerinden daha iyi olmasıdır. İzmir’de bulunan ve tüberküloz hastaları için bölge hastanesi olarak hizmet veren Suat Seren Göğüs Hastanesinde Kömürcüoğlu ve ark. (97)’nin da primer tanıli hasta suşlarıyla yaptığı çalışmada primer ilaç direnç oranları bizim çalışmamız ile benzer bulunmuştur.

Primer tüberküloz direncinde ikili, üçlü ve dördü ilaç dirençli suşların oranları beklendiği gibi sekonder tüberküloz direnci olan hastalardan düşük orandadır. Çalışmamızda ÇİD-TB bulunmazken, Türkiye ortalaması % 2.5’ tir.Üçlü ilaç direnci % 1.7 ile Türkiye ortalamasının altında olmasına rağmen Kömürcüoğlu ve ark. nin yaptıkları çalışma ile aynıdır.

Tablo 13. Dünyanın farklı bölgelerinde yapılan çalışmalarda primer tanı alan hastalarda direnç oranları.

| Çalışan | Suş sayısı | Yöntem | Ülke | Yıl | STR (%) | INH (%) | RIF (%) | ETB (%) | 2 İlaç Direnci | ≥ 3 İlaç Direnci |
|--|------------|--------|--------------|-----------|---------|---------|---------|---------|----------------|------------------|
| Mendes JM. al. ¹⁰¹ | 63 | L-J | Brezilya | 2000-2002 | 6,6 | 6,5 | 2,6 | 1,3 | 1,3 | 2,6 |
| van der Werf MJ. et al. ¹⁰² | 261925 | | Avrupa | 2007-2012 | 5.7 | 5.4 | 0.4 | 0.6 | | |
| Demissie M. et al. ¹⁰³ | 99 | | Etiyopya | 1994 | 10.2 | 8.4 | 1.8 | -- | | |
| Churcyard GJ. et al. ¹⁰⁴ | 1633 | | Güney Afrika | 1993-1997 | 1.1 | 7.3 | 1.2 | 0.5 | 1.8 | 0.2 |
| Liu O. et al. ¹⁰⁵ | 816 | L-J | Çin | 2011-2012 | 11.0 | 11.2 | 5.9 | 3.7 | 0.6 | 3.3 |
| Haar CH. et al. ¹⁰⁶ | 308 | 7H10 | Hollanda | 1993-2001 | 10.1 | 9.4 | 1.6 | 0.3 | 0.6 | 1.6 |

Dünya’ da yapılan çalışmalara baktığımızda direnç oranlarını Türkiye ortalamalarıyla kıyasladığımızda Avrupa bölgesi, Güney Afrika ve Brezilya’ da direnç oranları Türkiye ortalamasından düşüktür.

Güney Afrika ‘da Churchyard ve ark. (104)’ nın primer tanı 1633 hasta suşunda yaptığı çalışmada STR, INH ve ETB için direnç oranları % 1.1, % 1.2, ve % 0.5 olup bizim çalışmamızdan daha düşük oranlara sahiptir. INH direnci ise % 7.3 ile bizim bulduğumuz % 3.4 INH direnç oranından yüksektir.

Gelişmiş ülkelerde 1980’ lerden sonra TB’un tamamen kontrol altına alınmasını önleyen neden HIV ile TB’un birlikteliğidir. Özellikle Afrika’da 1990’ lı yıllarda HIV’ li hastalarda TB sıklığı artmıştır ve bu da tedavi sorunlarına neden olarak hastalarda ÇİD-TB vakalarında artışa neden olduğu düşünülmektedir.

| Çalışan | Hasta sayısı | | Yöntem | Ülke | Yıl | STR (%) | INH (%) | RIF (%) | ETB (%) | ÇİD (%) |
|---------------------------------|--------------|-----|--------------|------------|-------------|----------------------|---------|---------|---------|---------|
| Sethi S. et al. ¹⁰⁷ | HIV + | 44 | Propor-siyon | Hindis-tan | 2006 - 2010 | 29.5 | 45.5 | 27.3 | 16 | 27.3 |
| | HIV - | 175 | | | | 31.5 | 33 | 15.4 | 26 | 15.4 |
| Oluwaseun et al. ¹⁰⁸ | HIV + | 25 | Propor-siyon | Nijerya | 2011 | Monorezistans : 16 | | | | 32.0 |
| | HIV - | 44 | | | | Monorezistans : 11.5 | | | | 2.2 |

Sethi ve ark. (107)’ nın Hindistan’ da 2006-2010 yılları arası, Oluwaseun ve ark. (108)’ nın 2011 yılı hasta verileriyle yaptıkları çalışmalarda ÇİD-TB vakaları ile HIV seropozitifliği arasında önemli bir ilişki olduğu saptanmıştır.

SONUÇLAR

1. Çalışmamızda değerlendirilen suşlar, primer tüberküloz tanısı alan hastalardan elde edilmiştir. Hastanemizde yapılan ilk duyarlılık çalışmasıdır.
2. Değerlendirilen suşlarda herhangi bir primer antitüberküloz ilaca dirençli olma olasılığı % 8.6 olarak bulunmuştur. 2 balgam, 2 ameliyat materyali ve 1 biyopsi örneği dirençli saptanmıştır.
3. Değerlendirilen suşlarda SM, INH, RIF, ETB için primer ilaç direnci sırasıyla % 3.4, % 3.4, % 3.4, % 1.7 olarak bulunmuştur. Ülkemizde yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında primer ilaç direncinin düşük olduğu gözlenmiştir.
4. Değerlendirilen suşlarda en yüksek direnç STR, INH, RIF için % 3.4 çıkmıştır. Türkiye ortalaması için en yüksek direnç ise INH için % 10.6 dır.
5. BACTEC MGIT 960 sistemi tam otomatize ve kolay uygulanabilir olması, 4-13 gün gibi kısa sürede sonuç verebilmesi nedeniyle, ilaca dirençli TB hastalarının erken tanısı ve tedavisi açısından önemli avantajlar sağlayacağı sonucuna varılmıştır.
6. DSÖ Dış Kalite Kontrol değerlendirme kriterlerine göre BACTEC MGIT 960 sisteminin SM, INH, RIF için yeterliliği kabul edilebilir düzeyde (minimum % 90), ancak EMB için yeterliliğinin düşük (% 85) olduğu belirlenmiştir.
7. 2006 yılından itibaren uygulanan DGTS'nin etkilerini Türkiye' de yeni tanı alan hasta grubunda yapılan yayınlarda ve bizim çalışmamızda direnç oranlarında azalma ile görmekteyiz.
8. Diğer ülkelerde yapılan çalışmalar ile ülkemizi ve çalışmamızı karşılaştırdığımızda sosyoekonomik gelişmişliğin tüberkülozda primer ilaç direncini belirleyen en önemli etken olduğunu düşünmekteyiz.

ÖZET

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS KOMPLEKS SUŞLARININ BACTEC MGIT 960 SİSTEMİYLE PRİMER ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI

Tüberkülozun halen önemini koruyan bir hastalıktır. Dünyada infeksiyöz nedenlere bağlı ölümler arasında ilk sıradadır. Çalışmamızda İzmir ilinde, Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilimdalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarında 2010-2014 yılları arasında MTBC suşu izole edilip primer tüberküloz tanısı alan 59 hastanın primer antitüberküloz ilaçlara direncinin BACTEC MGIT 960 sistemiyle belirlenmesi amaçlandı.

Suşların izole edildikleri hastaların yaş ortalaması $54.2 \pm$ (18- 88yaş) olarak bulundu. Suşların %55.9'u balgamdan, %11.9'u ameliyat materyalinden, % 10.1'i idrardan, % 8.5' i biyopsi materyalinden, 2' si (% 3,4) bronşial lavaj sıvısı, 2' si (% 3,4) periton sıvısı, 2' si(% 3,4) eklem sıvısı, 1'i (% 1,7) mide açlık sıvısı (MAS) ve 1' i (% 1,7) yaradan izole edildi.

Çalışmamızda 54 suş (% 91.5) primer antitüberküloz ilaçların tümüne duyarlı iken, 5' i (% 8.5) en az bir ve daha fazla antitüberküloz ilaca dirençli bulundu. Duyarlılık testi yapılan suşlar için direnç oranları sadece streptomisine 1 (% 1.7), sadece izoniyazide 1(% 1.7) , sadece rifampisine 2(% 3.4), sadece etambutole 0 (% 0.0) ve toplam tek ilaca direnç 4 (%6.8) olarak bulundu. Çoklu ilaç dirençli ve 2 ilaca dirençli suş tespit edilmedi. Üç ilaca dirençli 1 (% 1.7) suş tespit edildi. Genel direnç ise streptomisine dirençli suş 2 (% 3.4), izoniyazide dirençli suş 2 (% 3.4), rifampisine dirençli suş 2 (% 3.4) ve etambutole dirençli suş 1 (% 1.7) tane tesbit edildi.Suşların direnç oranları Türkiye ortalamasının altında saptanmıştır.

Çalışmamızın amacı; İzmirde tespit edilen *M.tuberculosis* kompleks suşlarının, tedavide ilk seçilecek ilaçlar olan dört major anti-tüberküloz ilaca karşı direnç profillerini ortaya koymaktır.

Anahtar kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis* kompleks, primer antitüberküloz ilaçları, tekli ilaç direnci, çoklu ilaç direnci, BACTEC MGIT 960 sistemi.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF PRIMARY ANTITUBERCULOSIS DRUG RESISTANCE USING BACTEC MGIT 960 SYSTEM IN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX STRAINS

Tuberculosis is a disease which is still keeping its importance. It is on the first place of disease causing death among infectious deaths in all over the world. In our study it aims to determine primary antituberculosis drug resistance of 59 patients diagnosed with primary tuberculosis from isolated *Mycobacterium tuberculosis complex* strains by using BACTEC MGIT 960 system in Izmir Atatürk Training and Research Hospital Microbiology Department between 2010 and 2014.

The average age of the patients whose strains were isolated was 54.2 (18-88 age). 55.9 % of the strains were isolated from sputum, 11.9 % from surgery materials, 10.1 % from urine, 8.5 % from biopsy materials, 3.4 % from bronchoalveolar lavage fluid, 3.4 % from the peritoneal fluid, 3.4 % from joint fluid, 1.7 % from the fasting gastric fluid and 1.7 % from the wound.

In our study, 54 (91.5 %) strains were sensitive to all primary antituberculosis drugs, whereas 5 (8.5 %) strains were found to be resistant to one or more antituberculosis drugs.

Ratio of resistance for the strains tested for sensitivity was detected 1 (1.7 %) only for streptomycin, 1 (1.7 %) only for isoniazid and 2 (3.4 %) only for rifampicin. Resistance for ethambutol wasn't detected. Total resistance for single drug was detected 4 (6.8 %). The strains for multidrug resistance (resistance for rifampicin and isoniazid) and any two drugs resistance were not detected. The strain of three drugs resistance was detected 1 (1.7 %). General resistance of strains to streptomycin, isoniazid, rifampicin and ethambutol were detected to be 2 (3.4 %), 2

(% 3.4), 2 (% 3.4), 1 (% 1.7) respectively. The average resistance of strains was detected below of Turkey's resistance ratio.

The aim of our study is to investigate the resistance profiles of 4 major primer antituberculosis drugs for primer diagnosed tuberculosis patients in İzmir.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis* kompleks, primary antituberculosis drugs, single drugs resistant, multidrug resistant, BACTEC MGIT 960 systems.

KAYNAKLAR

1. Grange JM, Zumla AI. Tuberculosis. Manson's Tropical Disease, 22. Edition, 2009;56(8):1-56
2. Kochi A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. Tubercle. 1991 ;72(1):1-6
3. Global Tuberculosis Control Surveillance, Planing, Financing WHO Report 2008. WHO/HTM/TB/2008; 393.
4. Tansel Ö. Klasik Antibiyotik Duyarlılık Test Yöntemleri. 21.yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve 2. Tüberküloz Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı, s347-351. Samsun, 2003
5. Çavuşoğlu C. Mycobacterium Tuberculosis'de Moleküler Antibiyotik Duyarlılık Test Yöntemleri. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve 2. Tüberküloz Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı, s369-386. Samsun, 2003
6. Roper LW, Hinman RA, Castro KG, et al. Initial Therapy for Tuberculosis in the Era of Multidrug resistance. Recommendations of the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Mortal Morbid Weekly Rep.* 1993; 42(RR-7):4
7. Barış İY. Dünyada Tüberkülozun Tarihçesi. *Toraks Dergisi*, 2002;3(3): 338- 340.
8. Barış İY. Çağlar Boyu Tüberküloz. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı, s1-7. Samsun, 2003
9. Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. From basic science to patient care Tuberculosis 2007
10. Köksal F. Mycobacterium tuberculosis'te direnç problemi. I.Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, s92-94, Antalya, 2011
11. *Global Tuberculosis Control Surveillance, Planning, Financing. WHO Report 2002.* Geneva, Switzerland, WHO/CDS/TB/2002.295
<http://www.who.int/gtb/publications/globrep02/index.html>
12. World Health Organization. Global Tuberculosis Report, 2014
13. Groenheit R. Molecular Epidemiology of Tuberculosis. Karolinska Institutet, Sweden, 2009.
14. Iseman MD. Klinisyenler için Tüberküloz Kılavuzu. Çeviren: Ş. Özkara. [İnsan immünyetmezlik Virüsü (HIV) ve Edinsel İmmünyetmezlik Sendromu (AIDS)

ile ilişkili Tüberküloz]. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. 2002:199-252.

15. Seber E. Tüberkülozun Dünü, *ANKEM Derg.* 2010;24(2):52-60
16. T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Dairesi Başkanlığı: Türkiye’de Verem Savaşı 2012 Raporu. Ankara, 2012.
17. Murray PR, (editor in chief) *Manual of Clinical Microbiology* Nolte FS, Metchock, B. ninth edition Asm Press Washington D.C. 2009; 543- 588. <http://www.tuberculosistextbook.com>
18. Zeytinli Ü, Köksal F. Çukurova Bölgesinde Akciğer Tüberkülozlu Hastalardan İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* Suşlarının Spolygotyping ve MIRU-VNTR Yöntemiyle Tiplendirilmesi. *Mikrobiyol Bul.* 2012; 46(2): 202-210
19. Wayne LG, Kubica GP. Mycobacteria In: P.H.A.Sneath, (ed), Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. 1986; 1435-1457.
20. Kıyan M. Mycobacteriaceae. Cengiz AT, Ustaçelebi Ş (Editör). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, s419-457. Güneş Kitabevi, Ankara, 1999
21. Köksal F, Yaman A. Farklı bir bakteri topluluğu mikobakterilerde hücre duvarı yapısı. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı, s34-47. Samsun, 2003
22. Chatterjee D. The mycobacterial cell wall: Structure, biosynthesis and site of drug action. *Current opinion in Chemical Biology*, 1997;1(4):579-588
23. Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M : *Mycobacterium*, Mikrobiyoloji 2000, Ed. Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M ,174-183, Asya Tıp Yayıncılık, İzmir, 1998
24. Köksal F. Tüberküloz basilinın kaynak ve evrimi. IV. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kurs Kitabı, s15-22. Malatya, 8-11 Aralık 2005
25. Bilgehan H: *Mycobacteriumlar* Klinik Mikrobiyolojik Tanı Ed. Bilgehan H 3. Basım, 571 - 593, Fakülteler Kitapevi Barış Yayınları, İzmir, 2002.
26. Haas DW. Mycobacterial Diseases In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (ed). *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 5th ed, Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000; 2596-2608.
27. Pfyffer GE, Brown-Elliot BA, Wallace RJ, et al. Mycobacterium In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. Washington DC: 2003; 532-559, 1156-1164.

28. Özbal Y. Tüberküloz immünolojisi. *Erciyes Tıp Dergisi*, 2006; 28 (1): 25-34.
29. Babacan F, Över U. Mikobakterilerin Genel Özellikleri ve *Mycobacterium tuberculosis* Kompleksi, In:Topçu A W, Söyletir G, Doğanay M (ed), *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji*, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2002; 538-591.
30. Freedman AG, Martin JM, Riska PF, et al. Monoclonal antibodies to surface antigens of *Mycobacterium tuberculosis* and their use in a modified enzymelinked immune sorbent spot assay for detection of Mycobacteria. *J Clin. Microbiol* 1996; 34 (11): 2795- 2802
31. Kılıçaslan Z. Tüberkülozda Patogenez, Bulaşma ve Tanı. *Türk Toraks Derneği* , 1. Kış Okulu Eğitim Kitabı, s83-94. Adana, 2002.
32. Esen N. Tüberkülozda Mikobakteriyel Persistans Mekanizmaları. 4. Tüberküloz Sempozyumu Kitabı, s58-64. Malatya, 2005.
33. Dannenberg AM: Immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis, *Hospital Practise*;15:51-58,1993.
34. Uzun M. Klinik Materyalin Hastadan Alınması ve Laboratuvara Gönderilmesi. 5. Tüberküloz Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kurs Kitabı, s15-21. Diyarbakır, 2006
35. Aslan G. Hasta örneklerinin işlenmesi ve kültürü III. Tüberküloz sempozyumu ve III. Tüberküloz Tanı Yöntemleri Uygulama Kurs Kitabı, s10-18. Adana, 2004
36. Master RN: Mycobacteriology, In „Clinical Microbiology procedures Handbook. Ed. Isenberg HD, Washington DC, ASM, 1992.
37. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Kurumu Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi Ankara, 2014. ISBN: 978-975-590-486-3
38. Teksif: Homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemleri, [www. rshm. gov.tr](http://www.rshm.gov.tr)
39. Uzun M. Örneklerin İşlenmesi ve Kültür Yöntemleri, 21.yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve 2. Tüberküloz Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı, s285-290. Samsun, 2003
40. Ceyhan İ, Saygan BM, Saniç A, et al. Tüberkülozda Bakteriyolojik Tanı, Ed. Ceyhan İ, 56-63, Laboratuvar Teknikleri serisi, Mikobakteriyolojik Teknik Seri RSHM. LAB. TB. 2005.
41. Köksal İ. Tüberkülozda tanı, *Sürekli Tıp Eğitim Dergisi*; 2000.
42. Sarıgüzel Sar N. Direk Mikroskopi Teknikleri ve Değerlendirilmesi, V. Tüberküloz Labaratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kurs Kitabı, s27- 33. Diyarbakır, 2006.

43. Özkara Ş, Akteş Z, Özkan S, Ecevit H. Türkiye’de tüberkülozun kontrolü için başvuru kitabı. 1. baskı, Ankara, 2003.
44. Ulukanligil M, Aslan G, Taşçi S. A Comparative study on the Different Staining Methods and Number of Specimens for the Detection of Acid Fast Bacilli. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 2000; 95(6): 855-858
45. Özakin C, Gediklioğlu S: Tüberküloz Tanısında Tüberküloz Laboratuvarının Rolü: Tanı ve ilaç duyarlılık testlerinde rutin laboratuvar yöntemlerinin değeri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı, s397-401. Samsun, 2003.
46. Baylan O. Tüberkülozun Kültüre dayalı Tanı yöntemleri. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 2005;39(1):107-24
47. Sürücüoğlu S. Tüberküloz basilinin identifikasyonu. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kitabı, s300-310. Samsun, 2003
48. Durmaz R. Tüberkülozun Epidemiyolojik Araştırmalarında Laboratuvarın Yeri. 21 Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı, s443-446. Samsun, 2003.
49. Piersimoni C, Scarparo C, Piccol P, et al. Performance Assessment of Two Commercial Amplification Assays for Direct Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex from Respiratory and Extrapulmonary Specimens *J. Clin. Microbiol*, 2002; 41(11): 4138–42
50. Çavusoğlu C. *Mycobacterium tuberculosis*’ de Moleküler Antibiyotik Duyarlılık Test yöntemleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı, s369-386. Samsun, 2003.
51. Ganguly NK, Medappa N, Singh P et al. What is new diagnosis in tuberculosis? Part I: Techniques For Diagnosis of Tuberculosis. *ICMR Bulletin* 2002; 32(8) ISSN 0377-4910
52. CLSI. Susceptibility Testing of *Mycobacteria*, *Nocardia* and Other Aerobic *Actinomycetes*: Approved Standard. CLSI document M24-A [ISBN 1- 56238-500-3]. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003
53. Seber E, Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Löwenstein Jensen Besiyeri ile Antitüberküloz Duyarlılık Testi (Modifiye Orantılama Dilüsyon Testi). 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı, s467-477. Samsun, 2003.

54. Hindler J, Antimicrobial susceptibility testing In: Isenberg HD (ed). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, Washington DC: ASM 1993:5.14.
55. Saragias M. BACTEC MGIT 960 Automated System. Section7: *Mycobacteriology and Antimycobacteriel Suspectibility Testing*. In: Isenberg HD. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. Vol 2 washington:ASM Pres, 2004:7.4.2.1-7.4.2.4.
56. Yajko DM, Madej JJ, Lancaster MV, et al. Colorimetric Method for Determining MICs of Antimicrobial Agents for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 1995; 33(9):2324-2327.
57. O. Baylan, O. Kisa, A. Albay, L. Doganci: Evaluation of a new automated, rapid, colorimetric culture system using solid medium for laboratuary diagnosis of tuberculosis and determination of anti-tuberculosis drug susceptibility. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8(6)772-777
58. Banaiee N, Bobadilla-del-Valle M, Riska PF, Bardarov S, et al. Rapid identification and susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from MGIT cultures with luciferase reporter mycobacteriophages. *J Med. Microbiol*, 2003;52(7):557-561
59. Hazbon MH, Guarin N, Ferro BE, et al. Photographic and luminometric detection of luciferase reporter phages for drug susceptibility testing of clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin. Microbiol*, 2003;41(10):4765-4869
60. Dornbiewski F. Antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *EUCAST Discussion Document*, 2001;8(1):7
61. Eltringham IJ, Wilson SM, Drobniwski FA, Evaluation of a bacteriophage-based assay (phage amplified biologically assay) as a rapid screen for resistance to isoniazid, ethambutol, streptomycin, pyrazinamide, and ciprofloxacin among clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin. Microbiol*. 1999;37 (11): 3528-3532
62. Moore AV, Kirk SM, Callister SM, et al. Safe Determination of Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Antimycobacterial Agents by Flow Cytometry. *J Clin. Microbiol*. 1999;37(3): 479-483
63. Wanger A, Mills K. Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Susceptibility to Ethambutol, Isoniazid, Rifampin, Streptomycin by Using Etest. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1672-1676.
64. Cockerill FR. Genetic Methods for Assessing Antimicrobial Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999; 43(2):199-212

65. Özkara Ş. Dünyada ve Türkiye’de çoklu ilaca dirençli tüberküloz. 6. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu kitabı, s197-204. Kızılcahamam, 2006
66. Oğuz Kayaalp. Tüberküloz ve diğer mikobakteri infeksiyonlarında kullanılan ilaçlar In: Tıbbi Farmakoloji, 2002: 306-312.
67. Oktun M. Tüberküloz Tedavisinde Temel İlkeler ve Direnç Sorunu, *Klimik Dergisi*, 2001; 14 (2): 71-82.
68. Murray JF, A century of tuberculosis. *Am J Respir. Crit Care Med*, 2004; 169(11): 1181-1186.
69. Musser JM, Antimicrobial Agent Resistance in *Mycobacteria*: Molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev*, 1995;8(4):496-514.
70. Giellespie SH. Evolution of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Clinical and Molecular Perspective. *Antimicrob Agents and Chemotherapy* 2002; 46:267- 77.
71. Kiraz N, Antitüberküloz İlaçlara Direnç Mekanizmaları ve Yeni İlaçlar. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı, s173-177. Samsun, 2003
72. Anti-tuberculosis Drug Resistance in the World. Fourth Global Report. World Health Organization Geneva, 2008 Available from: http://www.who.int/tb/publications/2008/drs_report4_26feb08.pdf
73. Durmaz R. *Mycobacterium tuberculosis*’de Direnç Sorunu. *ANKEM Dergisi*, 2005;19 (2): 107-110.
74. Özkara Ş. Tüberkülozda güncel durum. XXXVI. Hematoloji Kongresi Bildiri Özetleri Kitabı , s34-39. Belek-Antalya, 2010
75. Kılıçaslan Z. Dünyada ve Türkiye’de tüberküloz. *ANKEM Derg* 2007; 21(2): 76-80.
76. Bilgiç H. Türkiye’de tüberkülozun durumu ve eradikasyon (kontrol) programı. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı, s18-33. Samsun, 2003.
77. Treatment of Tuberculosis Guidelines. Fourth Edition. WHO/HTM/TB/2009.420.
78. WHO global tuberculosis control. WHO report 2010. WHO/HTM/TB/2010.7
79. Bicmen C, Gunduz AT, Coskun M, et al. Molecular identification and characterization of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by line probe assay: an approach for rapid diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis. *Letters in Applied Microbiology* ISSN 0266-8254, 2008; 47(3): 214-20.

80. Sarıbaşı S, Bağdatlı Y, Yıldız N. BACTEC MGIT 960 Sistemi ile Tüberküloz tanısı. *İnfeksiyon dergisi*, 2004;18 (2): 149-153
81. Saitoh H, Yamane N. [Comparative evaluation of BACTEC MGIT 960 system with MB/Bact and egg-based media for recovery of mycobacteria]. *Rinsho Biseibutshu Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi*. 2000;11(1):19-26,
82. Lee JJ, Suo J, Lin CB, et al. Comparative evaluation of the BACTEC MGIT 960 system with solid medium for isolation of mycobacteria. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2003; 7(6): 569-574.
83. Okutan O. Hastanelerde tanı konulan tüberküloz hastalarının bildirim ve izlenmesi. XXIII. Ulusal Tüberküloz ve Göğüs Hastalıkları Kongre Kitabı, s52-60. Malatya, 2003
84. Kocabaşı A, Topçu A, Söyletir G, et al. Akciğer tüberkülozu. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji Kitabı*, s538-99. İstanbul: *Nobel Tıp Kitabevi*, 2002
85. Alışkan HE, Bostanoğlu E, Turunç T, et al. The Six-Year Retrospective Results of Tuberculosis Laboratory and Anti-mycobacterial Drug-Resistance Rates. *Türk Toraks Derg* 2013; 14: 53-58.
86. Aydın F, Kaklıkkaya N, Bayramoğlu G, et al. Resistance Rates of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains Isolated from Clinical Specimens. *Mikrobiyol Bul*, 2011;45(1):36-42.
87. Altıntop YA, Perçin D. Investigation of Drug Susceptibility of *Mycobacterium Tuberculosis* Complex Strains Isolated from Mycobacteriology Laboratory by Agar Proportion. *Erciyes Tıp Dergisi*, 2009;31(3):226-230.
88. Aydın O, Cömert FB, Külah C, Aktaş E, et al. Determination of susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Zonguldak to primary antituberculosis drugs by BACTEC MGIT 960 system. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 2008;38(2):61-70.
89. Çelik C, Dayı F, Kaygusuz R, Bakıcı M Z, et al. The Resistance to Major Antituberculous Drugs of *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated from the Respiratory System Specimens of Tuberculosis Patients in Duzce, Turkey. *Jpn J Infect Dis*, 2005; 58:47-49.
90. Baylan O, Kısa Ö, Albay A, et al. Mikobakteriyoloji Laboratuvarımızda 2002 Yılında Tüberküloz Olgularından İzole Edilen *Mycobacterium Tuberculosis* Complex Suşları ve Antitüberküloz İlaç Duyarlılık Sonuçları. *Gülhane Tıp Dergisi*, 2003;45 (3) : 256-262.
91. Bılgın S, Unsal M, Cebı HH, Akgunes S. Resistance for Anti-Tuberculosis Drugs in Central Black Sea Region of Turkey. *Polish Journal of Microbiology* 2010;59 (2): 125-128.

92. Çelik C, Dayı F, Kaygusuz R, Bakıcı MZ. Sivas İlinde Klinik Örneklerden İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks Suşlarının Primer Anti-tüberküloz İlaçlara Direnç Oranları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 2011;41(1):37-41.
93. Esen N, Gündüz AT. Dokuz Eylül Üniversitesi'nde İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarında ilaç Direnci (2000 - 2002). *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 2003; 33:337-342.
94. Göçmen JS, Aksoy A, APAN TZ, et al. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Tüberküloz Laboratuvarında 2001-2006 yılları Arasında İzole Edilmiş *Mycobacterium Tuberculosis* Suşlarında İlaç Direnci. *KÜ Tıp Fak Derg*, 2008; 10(3): 1302-3314.
95. Karagoz T, Pazarlı P, Mocin OY, et al. Evaluation of drug resistance in pulmonary tuberculosis patients at Sureyyapasa Chest Diseases Hospital, Istanbul, Turkey. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2008;12(6):631–635.
96. Kayhan S, Akgunes A, Tereci H, Tutar U. Primary resistance rates of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains isolated from new tuberculosis cases: A 6-year observation. *African Journal of Microbiology Research* 2011;5(16): 2304-2310 Available online DOI: 10.5897/AJMR11.619
97. Komurcuoglu B, Senol G, Balci G, et al. Drug resistance in pulmonary tuberculosis in new and previously treated cases: Experience from Turkey. *Journal of Infection and Public Health*, 2013; 6: 276-282.
98. Karadağ A, Tokaç M, Güvenli A, et al. Klinik Örneklerden İzole Edilen Tüberküloz Basili Kompleksinin Majör Antitüberküloz İlaçlara Direnç Oranları. *ANKEM Derg* 2004;18(4):189-192.
99. Talay F, Altın S, Karasulu L, et al. İstanbul Eyüp Verem Savaş Dispanserinde 1997-2000 Yıllarında Belirlenen İlaç Direnç Oranları. *Van Tıp Dergisi*, 2003; 10(1):10-15.
100. Yaylı G, Sözen H, Ağalar C. Isparta Yöresinden izole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* Suşlarının Antitüberküloz ilaçlara Duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 2003; 33:24-30.
101. Mendes JM, Lourenço MC, Ferreira RMC, et al. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from sputum samples from symptomatic outpatients – Complexo de Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil. *J Bras Pneumol*, 2007;33:579-582.
102. van der Werf MJ, Ködmön C, Hollo V. et al. Drug resistance among tuberculosis cases in the European Union and European Economic Area,

2007 to 2012. Surveillance and outbreak reports, Sweden
2014;19(10):pii=20733

103. Demissie M, Gebeyehu M, Berhane Y. Primary resistance to anti-tuberculosis drugs in Addis Ababa, Ethiopia. *Int J Tuberc Lung Dis*, 1997;1(1):64-67.
104. Churchyard GJ, Corbett EL, Kleinschmidt I, et al. Drug-resistant tuberculosis in South African gold miners: incidence and associated factors. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2000;4 (5):433-440.
105. Liu O, Zhu L, Shao Y, et al. Rates and risk factors for drug resistance tuberculosis in Northeastern China. *BMC Public Health*, 2013;13:1171.
106. Haar CH, Cobelens FGJ, Kalisvaart NA, et al. Tuberculosis Drug Resistance and HIV Infection, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, 2007; 13(5):776-778.
107. Sethi S, Mewara A, Dhatwalia SK, et al. Prevalence of multidrug resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates from HIV seropositive and seronegative patients with pulmonary tuberculosis in north India 2013. *BMC Infectious Diseases* 2013;13(137): 2-8.
108. Oluwaseun E, Akinniyi PA, Afolabi O. Primary multi-drug resistant tuberculosis among HIV seropositive and seronegative patients in Abeokuta, Southwestern Nigeria. *American Journal of Research Communication* 2013;1(10) :224-237.