

**T. C.**  
**DİCLE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji  
Anabilim Dalı Başkanı  
Prof. Dr. Ömer METE

99 219

**TÜBERKÜLOZ TANISINDA ERLICH ZIEHL-NEELSEN,  
FLUOROKROM BOYAMA YÖNTEMLERİ İLE  
BACTEC ve LOWENSTEIN-JENSEN KÜLTÜR YÖNTEMLERİNİN  
SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi  
DOKÜMANI SAĞLIK MERKEZİ

**UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Doç. Dr. Mahmut METE**

**Dr. Tuncer ÖZEKİNCİ**

**DİYARBAKIR - 2000**

## İÇİNDEKİLER

	SAYFA
GİRİŞ	2
GENEL BİLGİLER	4
GEREÇ VE YÖNTEM	32
BULGULAR	41
TARTIŞMA	55
SONUÇLAR	62
ÖZET	64
SUMMARY	65
KAYNAKLAR	66

## GİRİŞ

Tüberküloz, tanı ve tedavi yöntemlerindeki ilerlemelere karşın, bugün de bütün dünyada, özellikle gelişmekte olan ülkelerde, yaygın olarak bulunan insanlık tarihinin en eski ve en çok korkulan hastalıklarından biridir (1,2).

Bakterinin paleolitik çağda, insanları infekte etmeden önce, hayvanlar arasında yaygın olarak bulunduğu tahmin edilmektedir. Taş devrinden kalan iskeletler ve Mısır mumyaları üzerinde yapılan incelemelerde tüberkülozu düşündürülen kemik lezyonlarına (Pott hastalığı) ve aside dirençli basillere rastlanmıştır.

Eski Mısır ve Çin kayıtlarında, hastalığı tarif eden yazılar bulunmakla birlikte tüberkülozla ilgili ilk klinik ve patolojik gözlemler; hastalıktan ölen kişilerin akciğerlerinde kaviter lezyonlar olduğunu bildiren Vesalius (1478) ile başlamış, sonraki yıllarda Sylvius tarafından tüberküller tanımlanmıştır.

Hastalığın bulaşıcı karakterde olabileceği ilk kez Fracastorius tarafından ileri sürülmüştür. Willemin (1865) tüberkülozdan ölen kişilerin akciğer kavite örneklerini tavşanlara inoküle ederek hayvanlarda hastalık oluşturmayı başarmıştır. Robert Koch 1882 yılında bakteriyi mikroskopta göstermiş, 1884'de klinik örneklerde izole ettikten sonra saf kültürünü yapmış, deneysel olarak hayvanlarda hastalık oluşturmuştur. Koch ayrıca 1890'da old tüberkülin ile hastalığın özel immünite ve allerjisini ortaya koymuştur. 1921 yılında Calmette ve Guerin tüberküloz aşısı olan BCG'yi (Bacillus Calmette Guerin) geliştirmişlerdir. Tüberküloza karşı etkin bir ilaç olan streptomisin ise 1944 yılında Waksman tarafından geliştirilmiştir (1,2,3).

Bu yüzyılın ikinci yarısında tedavide etkili yeni ilaçların bulunmasıyla endüstrileşmiş ülkelerde tüberküloz morbidite ve mortalitesinde devamlı bir düşüş olmuştur. Bu azalma iyimserliğe yol açarak ABD'de 2010 yılına kadar tüberkülozun yok edilmesi amacıyla bir program hazırlanmıştır. Ancak 1985'den beri bu düşüş durmuş ve 1985-95 yılları arasındaki olgu sayısında yaklaşık %12'lik artış olmuştur. HIV'in yaygınlaşmaya başlamasından itibaren tüberküloz insidansında büyük bir artış olmuştur (4).

Ülkemizde geniş çaplı kitle taraması ve aşı çalışmaları 1953-1956 yılları arasında yapılmış ve bu dönemde taranan kişilerin %56'sının tüberküloz basilleri ile infekte olduğu saptanmıştır. Aynı oran 1980'li yıllarda %0.36'ya

düşmüştür. Mortalite oranı 1945'de yüzbinde 262; 1960'da yüzbinde 55 ve 1982'de yüzbinde 8 olarak tespit edilmiştir. 1950'li yıllarda ölüm nedenleri içinde ilk sırayı tüberküloz alırken günümüzde 9. sıraya düşmüştür. Hastaların sosyo-ekonomik durumu ülkemizde önemli bir faktördür. Bu nedenle bölgeler arası farklılıklar göstermektedir. Ege Bölgesi'nde tüberküloz prevalansı binde 1.86 olmasına karşın Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde binde 7.44'tür (1,4,5).

Son yıllarda tüberkülozdaki yeni tehlike, çoğul dirençli (Multidrug-Resistant = MDR) M.tuberculosis suşlarının artmasıdır. Bu suşlar en azından en önemli antitüberküloz ilaçlar olan rifampin ve isoniasid'e dirençlidir. Bu ikisine ek olarak diğer antitüberküloz ilaçlara da direnç olabilir. Bu durum, direnç sorununuda gündeme getirmiş ve hastalığın kontrol altına alınması için tüberküloz olgularının vakit geçirilmeden tanımlanması ve tedaviye mümkün olduğu kadar çabuk başlanması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır (4,6).

Çeşitli kaynaklarda fluorokrom boyama yönteminin, konvansiyonel Ziehl-Neelsen boyama yönteminden daha hassas olduğu bildirilmektedir. Ayrıca bu yöntemde preparasyon inceleme süresinin daha kısa olması, hem laboratuvar personeli hem de preparat pozitif olguların erken saptanması açısından avantaj olarak kabul edilmektedir (7,8,9,10,11,12).

Tüberküloz tanısında kullanılan kültür yöntemlerinin geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar son yıllarda hız kazanmıştır. Bu süreç içerisinde geliştirilen Bactec TB 460 sistemi ile mikobakterilerin izolasyonu, konvansiyonel yöntemlere göre iki-üç hafta daha erken yapılabilmekte ve pozitif kültürle uygulanan antitüberküloz ilaç duyarlılığı ile yine kısa sürede uygun ve etkili tedaviye başlanabilmektedir (7,8,9,10,12,13).

Bu çalışmada konvansiyonel olarak kullanılan Ziehl-Neelsen boyama ve Löwenstein-Jensen besiyerinde kültür yöntemi ile, hızlı tanı sağlayan fluorokrom boyama ve Bactec kültür yöntemi karşılaştırılmış ve izole edilen M.tuberculosis kompleks suşlarının antitüberküloz ilaçlara duyarlılığı incelenmiştir.

## GENEL BİLGİLER

Mikobakteriler, Mycobacteriaceae familyasına bağlı tek genus olan Mycobacteriumlar içinde yer almaktadır. Yüksek oranda G+C (%62-70) içermeleri ile mikolik asit içeren diğer bakterilere, Nocardia (%60-69), Rhodococcus (%59-69), ve Corynebacterium'lara (%51-59) benzerler (14).

1959'da Ranyon, M.tuberculosis ve M.bovis dışında, klinik örneklerden izole edilen diğer mikobakteriler için bir gruplama yapmıştır. Bu sınıflamada her grup değişik türleri içermektedir.

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

Grup II : Karanlıkta portakal rengi veya kırmızı pigment oluşturan skotokromojenik mikobakteriler (M.scrofoleceum , M.xenopi , M.gordonae ),

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

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

Runyon gruplandırmasında; pigmentasyon, koloni morfolojisi ve üreme hızı temel alınmıştır (15).

Yıllar sonra bütün mikobakteri türlerinin Runyon gruplamasına uymadığının farkına varılmış ve bunların dışında bir çok yeni tür tanımlanmıştır. Örneğin M.avium-intracellulare (MAI)'nin bazı izolatları yüksek oranda pigment oluşturdıkları ve M.szulgai'nin 25 °C'de fotokromojenik, 37 °C' skotokromojenik oldukları farkedilmiştir. Bu farklılıklar nedeniyle artık bütün mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanmaları tavsiye edilmektedir ve Runyon gruplandırılması laboratuvarlarda kullanılmıştır.

Runyon gruplandırmasındaki mikobakteriler 'atipik mikobakteriler' olarak adlandırılmışsa da son yıllarda bu türlerin atipik olmadıkları kabul edilmiş ve bu grup için 'MOTT (Mycobacteria other than tuberculosis)' veya 'non-tuberculosis mycobacteria' terimleri kullanılmıştır. Ancak bu terimlerin de mikobakteri türlerini tanımlamada yetersiz kaldığı görülmüştür. Klinik açıdan önemli çeşitli mikobakteri türlerinin oluşturduğu infeksiyonların tedavileri farklı olduğu için tüm mikobakterilerin tür adları ile belirtilmeleri gerekmektedir. Klinik mikrobiyoloji yönünden mikobakterilerin daha uygun sınıflandırılması Wollinski tarafından 1979 yılında yapılmış , Woods ve Washington tarafından yeniden düzenlenmiştir. Tablo 1, M.tuberculosis dışındaki mikobakterileri göstermektedir (1,15).

Tablo 1: M.tuberculosis dışındaki mikobakteriler (15)

Grup	Tür
İnsanlarda patojen olan türler	M.leprae
İnsanlarda potansiyel patojen olan türler	M.avium-intracellulare,M.kansasii, M.fortuitum-chelonae kompleks,M.xenopi
İnsanlarda nadiren hastalık oluşturan saprofit mikobakteriler	
-Yavaş üreyenler (>7 gün)	M.gordonae,M.asiaticum,M.terrae-triviale kompleks,M.gastri,M.nonchromogenicum M.paratuberculosis
-Orta sürede üreyenler (7-10 gün)	M.flavescens
-Çabuk üreyenler (<7 gün)	M.termoresistibile,M.smegmatis,M.vaccae, M.parafortuitum kompleks,M.phlei

### Mikobakterilerin genel özellikleri:

Mikobakteriler silindir şeklinde, uçları yuvarlak, 0.3-0.6 µm en ve 1-4 µm boyunda, düz veya hafif kıvrık, ince bir basildir. Hareketsiz, sporsuz ve kapsülsüzdür. Hücre duvar yapısının büyük bölümünü oluşturan lipidlerin hidrofobik özelliklerinden dolayı bakteriyolojik boyalarla zor boyanırlar. Yeni lezyonlardan ve genç kültürlerden gram ile hazırlanan preparatlarda bazen çok zayıf ve düzensiz olarak boyanabilirden gram boyanma özelliklerinden bahsedilmez. Mikobakteriler aside alkole dirençlidirler. Bakterinin aside dirençli boyanma özelliği, fiziki bütünlüğü yanında hücre duvarındaki mikolik asit ve lipid bariyer sisteme bağlıdır. Bazik fuksin boyası ile bir kez boyandıklarında, %3 asit-alkollün dekolarizasyonuna direnç gösterirler. Bu kuvvetli aside dirençlilik

özellikleri tüm mikobakteriyel hastalıkların laboratuvar tanısında kullanılan en önemli özellikleridir (1,16,17).

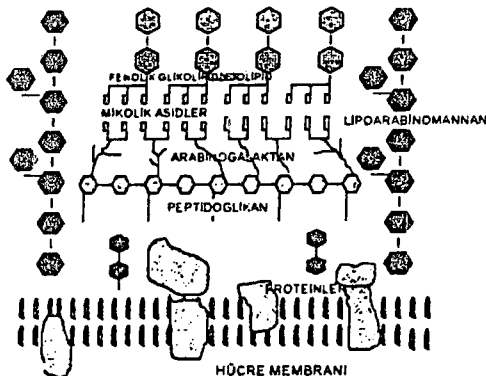
**Mikobakterilerin hücre yapısı:** Mikobakteriler sitoplazma, sitoplazmik zar ve bunları çevreleyen lipidlerce zengin bir hücre duvarından oluşmuşlardır.

Sitoplazmada çekirdek zarı ile çevrili olmayan tek bir kromozom bulunur. Bu nedenle prokaryotturlar. Bazı mikobakterilerin sitoplazmalarında diğer bakterilerde de sık olarak görülen, plasmid ve episom olarak adlandırılan küçük DNA halkaları bulunur. Elektron mikroskop çalışmaları sitoplazmik zarın iki elektron yoğun tabaka ve arada transparan bir bölge görüntüsü ile klasik iki tabakalı sitoplazmik zar görünümüne benzerlik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Elektron mikroskop görüntülerinde iki tabakanın simetrik olmadığı, dıştaki tabakanın daha kalın olduğu gözlenmiştir. Elektron sitokimyasal çalışmalara göre; bu kalınlığın karbonhidratlar, fosfatidil inazitol, mannozidler ve lipoarabinomannan moleküllerine bağlı olduğu düşünülmektedir. Sitoplazmik zarın lipid yapısı konusunda bilgiler azdır. Kardiolipin, fosfotidiletanolamin ve monofosfoinositollerin bulunduğu gösterilmiştir (17,18).

Hücre duvar yapısının ana iskeletini peptidoglikan oluşturmaktadır (Şekil 1). Bu yapıya arabinogalaktan molekülleri fosfodiester bağları ile bağlanmakta, ucunda da mikolik asitler yer almaktadır. Mikolik asitler ise değişik lipid, glikolipit ve bazı proteinler ile sonlanmaktadır.

Peptidoglikan tabaka diğer bakterilerde olduğu gibi, kısa peptid zincirleri ile çapraz bağlı, uzun polisakkarit zincirlerini içerir. Burada bulunan polisakkarit zincirleri, N-asetil glikozamin ve N-glikolil muramik asidden oluşmuştur. Glikolil yapısı nedeniyle bakteri lizozime dirençlidir.

Şekil 1 : Mikobakterilerin hücre duvar yapısının şematik görünümü.



Peptidoglikan tabakaya bitişik olan tabaka, arabinogalaktan tabakasıdır. Hücre duvar kitlesinin %35'ini oluşturur. Arabinogalaktan, arabinoz ve galaktozdan oluşan dallı bir polisakkarittir. Koruyucu bariyer görevi görür. Kuvvetle hidrofobiktir. Bu özelliği nedeniyle suda eriyen boyalar bakteriye penetre olamaz. Kuvvetli immunojenidir. Arabinogalaktanların yan zincirlerindeki uç arabinoz birimlerine mikolik asit diye adlandırılan bir grup zincirli yağ asitleri kovalent bağlarla bağlanırlar. Bu asitler hücre duvarının kalınlığından ve büyük oranda hücrenin aside dirençli oluşundan sorumludur.

En dış tabaka bir grup heterojen peptidoglikolipidler veya fenolik glikolipitlerden oluşmuştur ve "mikoizidler" olarak adlandırılır (17,18).

**A-Lipidler:** Mikobakterilerin pek çok özellikli komponentleri arasında, lipidlerin diğer bakteriler ile kıyaslandığında ayrı bir yeri olduğu görülür. Başlıca lipidleri; mikolik asit, balmumu (Waxes D), fosfolipidler, trehalozlar (kord faktörü, sülfolipidler, mikolipenik asit), glikolipidler, lipoglikan ve lipoproteinlerdir.

**Balmumu (Waxes D):** Mikobakteriyel hücre duvarında bulunan bir peptidoglikolipiddir. Mikolik asit moleküllerinin ucunda yer alır. Wax D, muramil dipeptid bileşikler içinde adjuvan etki göstermektedir. Aynı zamanda interferon yapımını da indüklediği gösterilmiştir. BCG aşısının, belli tümörlerde gerileme gösteren immünoteropatik etkisinde rolü vardır (1,18).

**Kord faktörü (6,6'-dimikolat- $\alpha$ -D trehaloz):** Middlebrook (1947) virulan tuberküloz basillerinin kord oluşturduğunu gözlemiş, bu yapının virulansla ilişkili olduğunu düşünmüştür (Resim 1). Adjuvan aktiviteyi de içeren, çok sayıda özelliğe sahiptir. Alternatif kompleman yolunu aktive eder. Polimorfonükleer lökosit göçünü önler. Granulom oluşumunda rol oynar. Antitümör özelliği vardır. Konak hücre mitokondri membranına tutunarak solunum ve oksidatif fosforilasyonda hasara yol açar. Farelerde karakteristik bir toksisiteye sahiptir. Bu bilgilere rağmen, kord faktörünün tuberküloz patogeneziindeki rolü tam olarak bilinmemektedir (1,17,18).

**Fosfolipidler:** Fosfatidik asit temel yapısındaki fosfodiasilgliserollerdir. Sitoplazmik membrana bağlıdır. Peptidoglikan ve hücre duvar polisakkaridinin sentezinde rol oynar (1).





**Resim 1 : Bactec 12B besiyerinde üreme sonrası yapılan preparasyonda kord faktörü ( x100).**

**Sülfatidler:** Basilin virulansından esas sorumlu neden olarak değerlendirilmiştir. Fagosom aktivasyonunu inhibe ederek, bakterinin intrasellüler yaşamını sürdürmesini sağlar. Ayrıca kord faktör toksisitesini de artırmaktadır(5,6).

**Mikolipenik asit:** Sadece virulan suşlar tarafından oluşturulur. Lökosit migrasyonunu önemli oranda azaltır (17).

**Lipoglikanlar,** lipid taşıyıcısı olarak işlev görerak uzun zincirli yağ asitlerinin sentezine olanak sağlarlar. Lipooligosakkaritler serovarların dominant epitoplarını oluşturur ve önemli yüzey antijenleridir. Fenoglikolipidler tür ve antijenik özelliğini verir (17).

**B-Proteinler:** Mikobakterilerde hücre duvarında proteinlerde yer almaktadır. Bunların başlıca işlevleri; hücre bölünmesinde rol alan enzimler ve duvar polimerlerinin sentezinde yer almak, atıkların hücre duvarından geçmesinde rol oynamak, porları oluşturmak ve antijenik özellik sağlamaktır. M.tuberculosis'de bulunan proteinler fiziksel, kimyasal özellikleri, fonksiyonları ve lokalizasyonlarına göre gruplandırılabilir. Isı şoku proteinleri, lipoproteinler, sitoplazmik membrana bağlı ve salgılanan proteinler başlıcalarıdır (17).

**C-Polisakkaritler (arabinogalaktan ve arabinomannan):** Duyarlı deney hayvanlarında anafilaktik tipte aşırı duyarlılık reaksiyonlarına neden olurlar. Gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonlarında rolleri yoktur. Konak hücre makrofajlarından TNF- $\alpha$  salınımını artırırlar. Nötrofillerin damardan dokuya geçmesini ve yangısal tepkimenin oluşmasını sağlarlar (1).

## **ANTİJENİK YAPI**

M.tuberculosis'in antijenik yapısı, bugüne kadar tam olarak aydınlatılamamıştır. Yapısında yer alan protein, lipid ve polisakkaridlerin tümü immunojeniktir. Bu komponentlerin, immünosupresyon, makrofaj aktivasyonu, granülom oluşturma, toksisite, alternatif yoldan kompleman aktivasyonu gibi bir çok değişik etkileri vardır. Proteinler, anahtar immunojen olarak kabul edilirler.

**Old tüberkülin (OT):** İlk kez Koch tarafından elde edilen OT'nin infekte bireylerde, basille karşılaşmamış olanlara nazaran daha çabuk ve daha belirgin reaksiyon oluşturduğu görülmüş ve tüberkuloz infeksiyonunun tanısında, intradermal cilt testi olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bileşimindeki proteinler,

karbonhidratlar ve besiyerine ait maddeler nedeniyle özgül olmayan reaksiyonlara neden olur.

Safılaştırılmış protein derivesi(Purified Protein Derivative:PPD): OT'nin kollodyen membranlardan süzülmesi ve amonyum sülfatla çöktürülmesi sonucu elde edilmiş, kısmen daha saf bir üründür. Bileşimindeki proteinler daha küçük olduğundan ve daha az karbonhidrat içerdiiğinden özgül olmayan reaksiyonlara daha az rastlanır. Dünya sağlık örgütü; 0.1 ml solüsyonda 5 tuberkülin ünitesi (TU) dozunda PPD, veya 0.0001 mgr standart tüberkülin(PPD-S)bulunmasını önermektedir. Tam olarak safılaştırılmamış olması ve diğer mikobakteri türleri ile oluşan infeksiyonlarda çapraz reaksiyonlara sık rastlanması gibi olumsuzluklara rağmen PPD, immünodiagnostik önemini hala korumaktadır.

Safılaştırılmış antijenler: Son yıllarda daha saf antijenlerin elde edilebilmesi amacıyla yapılan çalışmalar sonucu, sitoplazmik orjinli olduğu sanılan antijen 5 ve antijen 6 elde edilmiştir. Safılaştırılmış mikobakteriyel antijenler içinde en ilgi çekeni 65 kD antijendir. Isı çok proteinlerine çok benzer ve yüksek oranda immünojeniktir. Konak dokularda salındığı zaman otoimmün reaksiyonlara ve kazeifikasyon nekrozuna yolaçtığı gösterilmiştir. Bu antijene karşı oluşmuş antikolar ile, duyarlı T hücrelerinin varlığı gösterilmiştir (1).

### **Tüberkülin deri testi**

M.tuberculosis'e karşı oluşmuş geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonunun göstermek için yapılan intradermal bir testtir. Testin pozitif olması infeksiyonu gösterir, ancak tüberküloz tanısını koydurmaz. Hastalığın kontrolünde, ayırıcı tanısında, olguların ortaya çıkarılmasında ve hücresele immünitinin değerlendirilmesinde kullanılır. Daha önce basille karşılaşmış kişilere intradermal olarak tüberkülin verilmesi, enjeksiyon yerinde, eritemli veya eritemsiz bir endurasyon oluşmasına neden olur. Duyarlılığın derecesi, reaksiyon alanının çapı ölçülerek tayin edilebilir. Ancak ciltte meydana gelen reaksiyonun büyüklüğü ile hastalık derecesi arasında bir korelasyon yoktur (1).

Tüberkülin duyarlılığın araştırılmasında çeşitli deri testleri kullanılmıştır. Bugün en çok kullanılan standart PPD ile uygulanan Mantoux testidir.

Ön kolun ön yüzünün temizlenmiş derisi içine özel tüberkülin enjektörü kullanılarak 0.1 cc 5 TU tüberkülin enjeksiyonu ile yapılır. Doğru olarak uygulanmış bir enjeksiyonda, deride 6-10 mm çapında soluk renkte, bir kabarcık

oluşur. Test 48-72 saat sonra okunmalıdır. Eritem önemli olmayıp, asıl ölçülmesi gereken endürasyonun çapıdır (1,16).

10 mm veya daha fazla endürasyon pozitif, 5 mm'den büyük, fakat 10 mm'den küçük endürasyon şüpheli, endürasyon olmadan sadece eritem veya 5 mm'den küçük endürasyon negatif olarak kabul edilir.

Tüberküloz bakterileri ile hiç temas etmemiş kişilerde tüberkülin deneyleri negatif sonuç verir. Deneyin pozitif çıkması, kişinin daha önce bir tüberküloz enfeksiyonu geçirdiğini, halen tüberkülozlu olduğunu veya aşılanmış olduğunu gösterir.

## **PATOGENEZ**

Tüberkülozda en önemli bulaş yolu inhalasyondur. Bulaş sonrası infeksiyon oluşup oluşmaması veya hastalık meydana gelip gelmemesi konağın direnci ile bakteriyel virulans arasındaki dengeye bağlıdır. Aktif tüberkülozlu kişiler çevreye, içinde değişik sayılarda basil bulunan damlacık saçarlar. Sağlıklı kişiler tarafından solunan bu damlacıkların büyük olanları burun ve bronş yüzeyindeki silialar tarafından tutulurken, içinde 1-3 basil bulunan küçük partiküller kolaylıkla alveollere ulaşır ve alveoler makrofajlarca fagosite edilirler.

Mikobakteri taşıyan fagozum çoğunlukla lizozom ile birleşmez ve fagozomun pH'sı, proton-ATPaz veziküllerinin dışlanması nedeni ile daha fazla asidifiye olmaksızın 6.5 dolayında kalır. Bu mikobakterinin yaşaması için uygun pH'dır. Ayrıca mikobakterinin duvar yapısında yer alan komponentler, bakterinin, kendisini konağın immün saldırısına karşı korunmasında önemli rol oynamaktadır (19). Makrofaj aktivitesi yetersiz kalırsa basil, hücre içinde çoğalmaya başlar. İkiye bölünme süresi uzun olduğundan makrofaj içinde yavaş bir şekilde çoğalan M.tuberculosis, akciğerde vazodilatasyon, ödem, polimorfnüveli lökosit ve fibrinöz eksuda ile karakterize erken konak cevabına neden olur.

Konakta, basillerin belli bir sayıya ulaşması ve hücresel immün cevabın ortaya çıkmasına kadar 3-8 haftalık bir süre geçer. Hücresel immün cevap ile birlikte aktive olan T-lenfositler ve makrofajlar basilleri çevreleyerek, nonspesifik konak cevabının bir göstergesi olan granülamatöz inflamasyon gelişimine yol açarlar. CD4 T hücrelerinden salınan IFN  $\gamma$  ile lenfokinler, makrofaj ve monositleri aktive eder. Monositlerden köken alan doku makrofajları epitelooid

hücrelere, bunlarda birleşerek çok nukleuslu dev hücrelere dönüşür. Aktive makrofajlar fagozom içindeki basilleri superoksit anyon, radikal hidroksil ve hidrojen peroksit gibi serbest radikaller ile öldürür. Bakteri endozomal kompartımanda işlenerek MHC klas II molekülleri ile birleştikten sonra makrofajın yüzeyine yapışır (20). Mikobakteriyel hücresel cevapta dominant olan T lenfositlerinin %90'ı  $\alpha$  ve  $\beta$  zincirinden oluşan reseptörleri ile antijeni tanıyarak aktif hale geçer. Makrofajlar tarafından fagosite edilen, ancak öldürülemeyen bakteriler MHC klas I molekülleri ile birleşip CD8 T lenfositlerine sunulur. Ancak tüberküloz basilleri ile meydana gelen infeksiyonlarda aktivite CD8 T hücrelerinin rolü, henüz kesin olarak anlaşılamamıştır (1,19).

Hücresel immünite ve gecikmiş tip hipersensitivite T hücreleri ile oluşur. Her ikisinde de aynı immünolojik mekanizma söz konusudur. Hücresel immünite infeksiyon ajanını öldürmeyle ilgilidir. Gecikmiş tip hipersensitivite konak organizmanın infeksiyona verdiği immünolojik bir cevaptır. Gecikmiş tip hipersensitivite oluştuğunda lenfositlerden açığa çıkan lenfokinler sadece basilleri öldürmekle kalmaz granülomun merkezinde bulunan nekrotik dokularda pıhtılaşma mekanizmasını harekete geçirip, kan damarlarında iskemi ve tromboza neden olur. Sonuçta doku yıkımı meydana gelir. Lezyon bölgesindeki aktive makrofajlara ait proteinaz, lipaz, endonükleaz gibi enzimler granülomun ortasında bulunan kazeomu eritir ve likefaksiyona yol açar. Likefiye kazeomun bronşa açılması ile kavitasyon oluşur (1).

Tüberküloz primer veya sekonder olarak iki şekilde ortaya çıkar :

Primer tüberküloz, bireyin tüberküloz bakterileriyle ilk defa infekte olmasıdır. Solunum yoluyla alınan tüberküloz basilleri genellikle alt loblarda ve plevra altında yerleşirler. İlk yerleşim yerinde toplanmakta olan makrofajlar epitelooid hücrelere dönüşür. Bunlar birleşerek langhans tipi dev hücreleri oluştururlar, etrafları lenfositlerle çevrilir ve granülom meydana gelir. Bu yapıya Ghon odağı denir. Bölgesel lenf bezlerine yayılan basiller burada da aynı granülomatöz olaya neden olur. Akciğerdeki primer periferik lezyon ve beraberinde büyümüş lenf bezlerine "Ghon kompleksi veya primer kompleks" denir. Genellikle asemptomatiktir. Bölgesel lenf bezlerindeki basiller kan yoluyla vücuda yayılabilir ve menenjit, miliyer tüberküloz gibi hastalığın ağır şekilleri ortaya çıkabilir (21,22).

Sekonder tüberküloz (reinfeksiyon tüberkülozu, erişkin tüberkülozu), önceden primer infeksiyon geçirmiş bir kişide tüberkülozun reaktive olmasıyla oluşur. Çoğunlukla erişkinde görülmesi, başlangıç lezyonlarının üst zonlara yerleşmesi, bronş yolu ile yayılması, hiler lenfadenopatinin nadir görülmesi ve spontan şifanın nadir olmasıyla primer tüberkülozdan ayrılır.

Sekonder tüberküloz 3 şekilde ortaya çıkar:

1.Endojen reinfeksiyon: Primer infeksiyon sırasında lenfohemotojen yolla akciğerin apikal-subapikal bölgelerine yerleşen (Simon odağı) ve çoğalmadan burada canlılığını sürdüren basillerin (dorman halde) hayatın herhangi bir döneminde hücresel immün yanıtta meydana gelen supresyon nedeniyle aktif hale geçmesi ile meydana gelir.

2.Primer infeksiyonun ilerlemesi: Primer tüberküloz iyileşmez ve ilerlemeye devam ederse erişkin tipi tüberküloza dönüşebilir. Nadir bir durumdur. Özellikle ergenlik çağından sonra primer tüberküloz olanlarda görülür.

3.Eksojen reinfeksiyon: Primer infeksiyon geçirmiş bir kişinin dışarıdan tekrar tüberküloz bakterilerini almasıyla oluşur (1,7,21).

Tüberküloz hastalığında başlıca iki tipte lezyon oluşur:

1.Eksüdatif tip: Ödem sıvısı, polimorf nüveli lökositler ve daha sonra tüberküloz bakterilerinin çevresinde monositlerle akut iltihabi reaksiyonu içerir. Bu tip, özellikle akciğer dokusunda görülür. Tüm eksüda absorbe olduğu için lezyon iyileşebilir, doku nekrozu oluşabilir veya prodüktif lezyon gelişebilir. Eksüdatif faz boyunca tüberkülin deri deneyi pozitifdir.

2.Prodükatif tip: Geliştiğinde tüberküloz bakterilerini içeren multinükleer dev hücreler veya Langhans hücrelerinden oluşan geniş bir merkez bölge, genellikle radyal olarak yerleşmiş epiteloid hücrelerden oluşmuş bir merkez bölge, fibroblastlar, lenfositler ve monositlerden oluşmuş periferik bölgeden meydana gelen granüloma oluşur.

Lezyonun bulunduğu yerde periferiyal fibröz doku gelişerek merkez bölgede kazeöz nekroz oluşur. Bu lezyonlara tüberkül denir. Kazeöz tüberkül bir bronş içine doğru gelişirse, içeriğini buraya boşaltır ve kavite oluşur, buna kavern adı verilir. Daha sonra kalsifikasyon ve fibrinleşme ile iyileşebilir (7,9).

## TANI

Tüberküloz hastalarının erken tanı ve tedavisi bu hastalıktan toplumun korunmasında en etkili yoldur. Bu nedenle tüberküloza yakalandığı düşünülen hastaların tanılarını kanıtlayacak, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, hızlı sonuç veren, uygulaması kolay ve pahalı olmayan laboratuvar yöntemlerinin günlük kullanıma girmesi önemli bir gereksinimdir (23). Dünya sağlık örgütünün kararına göre bir hastaya kesin tüberküloz tanısı konabilmesi için uygun şekilde alınan klinik örneğin laboratuvara gönderilmesi, hazırlanan preparatlarda mikobakterilerin görülmesi ve ekim yapılan besiyerlerinde üretilmesi ile mümkün olur (24).

Tüberkülozun laboratuvar tanısındaki başarı; klinik örneğin uygunluğuna bağlıdır. Hastalık çok çeşitli organ ve dokuları tuttuğu için, materyal seçimine özen gösterilmeli; normal flora üyeleri ile kontamine örnekler incelenirken, dikkatli olunmalıdır. Tüberküloz tanısı için örneklerin alınma ve laboratuvara gönderilme koşulları vardır. (1,8,10,13,15,25).

**Balgam:** Hastadan 5-10 ml kadar tükürük içermeyen sabah balgamı alınması tercih edilir. Hasta önce eğitilmeli ve nasıl balgam çıkartılacağı öğretilmelidir. Öksürük derinden gelmeli, balgam koyu ve yapışkan olmamalıdır. Balgam çıkaramayanlarda ekspektoranlar verilebilir veya steril hipertonic tuzlu su inhalasyonu yaptırılır. Balgam kültürü birbirini takip eden üç günde, üç kez tekrarlamak mikobakterilerin izolasyon şansını arttırmaktadır. Başka bakterilerle kontaminasyon riski fazla olduğundan 24 saatlik balgam tüberküloz tanısı için uygun bulunmamaktadır.

**İdrar:** 50 ml sabah orta akım şeklinde alınan ilk idrar örneği yeterlidir. Birbirini takip eden üç günde kültür işleminin tekrarlanması başarıyı yükseltir. 24 saatlik idrar örneği kültür işlemi için uygun değildir.

**Açlık mide suyu:** Tüberküloz tanısı için uygun bir örnek değildir. Balgam çıkaramayan veya balgamını yutan hastalarda, koma nedeniyle tam öksüremeyen ve kooperasyonu tam olmayan hastalarda, balgam alımının zor olduğu küçük çocuklarda başvurulur. Bu gibi hastalarda en az 5-10 ml açlık mide suyu alınmalıdır. Uyku süresince yutulan balgamı toplayabilmek için, hasta uyanır uyanmaz, herhangi bir şey yemeden alınması önerilmektedir. Birbirini izleyen üç günde, kültür işlemini üç kez tekrarlamak izolasyonu kolaylaştırır.

Açlık mide suyunun yüksek asiditesi mikobakteriler için zararlıdır. Bu nedenle vakit geçirilmeden ekim yapılmalıdır. Ekim gecikecek ise tampon çözeltilerle muamele edilmelidir (anhidroz di sodyum hidrojen fosfat).

**BOS:** BOS'daki basil miktarı çok az olabilir. Bu nedenle santrifülemeyle elde edilen sedimentten ekim yapıldıktan sonra, lam üzerine bir damla konup havada kurutulur ve üzerine tekrar bir damla daha konur. Bu şekilde kat kat hazırlanan preparatlarda basillerin görülme şansı artar. Bazen, tüberküloz menenjitli hastaların BOS'ı oda ısısında bekletilirse, fibrin ağı oluşur. Aside dirençli basillerin, fibrin ağında görülme olasılığı daha fazladır.

**Abse materyali:** Derinin alkolle temizliği yapıldıktan sonra, steril enjektörle mümkün olduğu kadar çok miktarda abse örneği alınmalıdır. Eğer yeterli miktarda alınamıyorsa, az miktarda örnek eküvyonla alınmalı ve transport besiyerinde (7H9 buyyonu) laboratuvara gönderilmelidir.

**Kan:** Hastadan alınan kan örneği, besiyerine ekilmeden önce ve ekildikten sonra besiyerinin ağzı %70'lik alkolle silinmeli ve en fazla 5 ml kan Bactec 13A besiyerine direkt olarak ekilmelidir. Sodyum polyanetal sülfonat içeren kan tüplerine 10 ml kan örneği alınması önerilmektedir. EDTA çok az miktarlarda dahi mikobakterilerin üremesini inhibe ettiği için kullanılmamalıdır.

**Vücut sıvıları (plevra, perikard, periton, asit sıvısı, sinovyal sıvı, kemik iliği):** Seröz sıvılar tüberküloz tanısı için incelendiğinde büyük hacimlere gerek duyulur ve en az 10-15 ml, mümkünse 50 ml alınmalıdır. Bu tip klinik örnekler çok dilüe olduklarından aside dirençli bakterileri saptamak oldukça güçtür. Büyük hacimlerde alınan klinik örnekler santrifüj edilmeli, çökelti halindeki 10 ml örnek direkt olarak 13A besiyerine ekilmelidir.

**Biyopsi:** Koruyucu ve fiksatif içermeyen steril kaplarda 1 g doku örneği incelenmelidir. Steril olarak alınmalı ve vücut florası ile kontaminasyondan kaçınılmalıdır. Formalin ile gönderilmiş örnek uygun değildir.

**Bronkoalveoler lavaj sıvısı:** En az 5 ml örnek steril kaplara alınmalıdır. Bronşial fırçalama veya iğne aspirasyonları bovin serum albumin ve %0.5 Tween-80 ile zenginleştirilmiş yaklaşık 10 ml Middlebrook 7H9 buyyonu içeren steril tüplere alınmalıdır.



Deri lezyonu: Biyopsi örneği alınacaksa fiksatif ve koruyucu içermeyen kaplarda gönderilmeli, aspirasyon yapılacaksa enjektör kullanılmalıdır. Eğer biyopsi ve aspirasyon yapılamıyorsa eküvyonla alınacak örnek transport besiyerinde gönderilmelidir. Biyopsi örneği lezyonun periferinden alınmalıdır.

Dışkı: Son zamanlarda AIDS hastalarının dışkılarından *M.aviumintracellulare*'nin sıklıkla izole edilmesi nedeniyle dışkı örneklerinin aside dirençli bakteriler yönünden incelenmesi önem kazanmıştır. Rutin olarak kullanılmayan bir örnektir. Dışkıda saprofit mikobakteriler her zaman bulunabilir. Bu nedenle, kültür ; yaymada çok miktarda aside dirençli basil görüldüğünde yapılmalıdır.

#### **Mikobakterilerin boyanma özellikleri ve boyama yöntemleri :**

Aside dirençli bakteriler hücre duvarlarında yer alan yüksek miktardaki lipidler nedeniyle zor boyanırlar. Aside dirençli bakterilerde hücre duvarı bir kez boyayı aldıktan sonra, asit-alkolle dekolorize edilse bile bırakmaz. Klinik örnekteki diğer bakteriler boyayı geri verirler. Bu nedenle aside dirençli olarak adlandırılır. Boyama yöntemlerinde aside dirençli bakteriler ilk uygulanan boyanın rengini alırken, diğer bakteriler dekolarizasyondan sonra uygulanan zıt boyanın renginde görünürler. Örnekte basilin gösterilebilmesi için mililitrede 5000-50000 bakteri bulunmalıdır.

Lam üzerinde toz, kristal, elyaf veya çizik bulunması yanlış pozitif sonuçlara neden olabileceğinden, kullanılacak lamlar temiz ve çizilmemiş olmalıdır. Lamın bir ucuna hastanın adı veya protokol numarası yazılmalı ve örnek lamın üzerinde hazırlanan 2x2 veya 1x2 cm'lik bir alana yayılmalıdır. Havada kurutulduktan sonra 3-4 kez alevden geçirilerek tespit edilmelidir.

Hazırlanmış preparatlarda mikobakterileri görmek için iki tür boyama yöntemi kullanılır. Bazik fuksin (karbol fuksin) boyasının kullanıldığı Ziehl-Neelsen ve Kinyoun boyama yöntemlerinde mikobakteriler mavi zemin üzerinde kırmızı çomaklar şeklinde görülürken, fluorokrom yönteminde (Auromine O-Rhodamine B) kullanılan filtre sistemine göre sarı-portakal rengi fluoresans verirler. Bazik fuksin boyama yöntemlerinde, hazırlanan preparatlar 100x immersiyon objektifinde, fluorokrom boyama yöntemiyle hazırlanan preparatlar ise 25x veya 40x objektif ile incelenir. Bir preparata müsbet diyebilmek için 300 sahada en az 3 basil görmek gerekir. 1-2 basil şüphelidir. Bu durumda yeniden

numune istenir. Negatif sonuç vermek için en az 10 dakika veya 250-300 alan incelenmelidir (1,8,10,14,25,26).

Mikroskopik inceleme, yeni olguların tesbiti, tedaviye cevabın izlenmesi, ilaca dirençli vakaların ortaya konması ve hastaneden çıkarma gibi birçok konuda değerli ipuçları verir. Tedavi ile önce kültür, sonra yayma negatifleşir. Tedaviye rağmen preparattaki bakteri sayısında azalma olmaması, ilaç direncini düşündürür(1).

Mikobakterilerin aside dirençli olarak boyanmaları, klinik örnek tanımlamalarında kullanılan en basit ve en hızlı yöntem olarak bildirilmekle birlikte, dikkatli olunması gereken bazı durumlar bulunmaktadır. Bazı bakteri cinsleri (*Nocardia*, *Cornebacterium*, *Rhodococcus*) kısmi olarak aside dirençli boyanabilirler. Aside dirençli bir suş olan *M.phlei*'nin aside dirençli olmayan ancak biyokimyasal olarak orijinal suşun özelliklerini taşıyan bir mutanıtı izole edilmiştir. INH tedavisi gören hastalarda ölü mikobakteriler bazik fuksin boyası ile boyanma yeteneklerini kaybederken, fluorokrom boyası ile boyanabilmektedir. Bu durum yalancı pozitifliğe neden olabilmektedir. Çabuk üreyen bir çok mikobakteri fluorokrom yöntemiyle boyanamamaktadır. Bu olumsuzluklar nedeni ile mikobakteri infeksiyonlarının tanısında preparat ve kültür sonuçları birlikte yorumlanmalıdır(11).

#### **Klinik örneklerin işlenmesi:**

Klinik örneklerin işlenmesi ve bunu takip eden işlemler laboratuvar personeli ve diğer çalışanların sağlığı açısından biyolojik emniyet kabininde yapılmalıdır.

Balgam, dışkı, otopsi parçaları vb. gibi katı veya yarı katı örneklerde basiller homojen dağılım göstermez. Aynı zamanda bu tip numunelerde, tüberküloz etkenleri yanında, başka birçok bakteride bulunur. Bunlardan yapılan preparatlarda organizmalar her zaman görülmeyebilir. Diğer bakteriler daha kısa sürede ürediklerinden, besiyerinde *M.tuberculosis*'den önce üreyerek, ortamı elverişsiz hale getirirler. Homojenizasyon, dekontaminasyon ve konsantrasyon işlemindeki amaç, örneklerde bulunan tüberküloz bakterilerinin eşit dağılımını sağlamak, onlara zarar vermeden diğer bakterileri öldürmek ve aside dirençli bakterileri yoğunlaştırmaktır (1).

İdeal bir dekontaminasyon-homojenizasyon solüsyonu, klinik örnekteki organik kalıntıları, kontaminan olan bütün mantar ve bakterileri yok etmeli, mikobakterilere zarar vermemelidir. Bununla birlikte en iyi koşullarda bile dekontaminasyon işleminden sonra klinik örnekte ancak %10-20 kadar mikobakteri canlılığını sürdürebilmektedir. Bu nedenle dekontaminasyon işleminde, mikobakterilere en az zararı verecek yöntem seçilmelidir (8,11,15,26).

Çok sayıda dekontaminasyon-homojenizasyon yöntemi bulunmaktadır:

- 1-N-acetyl-L-Cystein-NaOH (NALC-NaOH) yöntemi
- 2-NaOH yöntemi
- 3-Zefiran-trisodyum-fosfat yöntemi
- 4-Oksalik asit yöntemi
- 5-Sefilpridinyum klorid-Sodyum klorid (CPC-NaCl) yöntemi
- 6-Sülfirik asit yöntemi.

Tüm yöntemlerde incelenecek örneğin bulunduğu tüplere, örneğin bir katı olacak şekilde dekontaminasyon solüsyonu ilave edilir. 15-20 dakika oda ısısında bekletilir. Bu süre içinde tüpler ara sıra el ile veya vorteks ile çalkalanır. Süre dolduğunda tüplere pH 6.8'de fosfat tamponu (PBS) ilave edilerek >3000xg'de santrifüj edilir. Klinik örneğin Pseudomonas cinsinden bakterilerle kontamine olduğu düşünülüyorsa, oksalik asit yöntemi tercih edilir. Normalde steril olduğu düşünülen beyin-omurilik sıvısı, vücut sıvıları ve kan gibi sıvılara dekontaminasyon işlemi uygulanmaz ve bu örnekler direkt olarak besiyerlerine ekilirler (1,8,11,15,19).

#### **Mikobakterilerin üretilmesinde kullanılan besiyerleri :**

Mikobakterilerin üretildiği besiyerlerinin esası genellikle yumurta-patetes temeli veya serum agar temelinde dayanmaktadır. Yumurta içeren besiyerleri gliserol, tuz, patetesunu, süt gibi çeşitli maddeleri, yumurtanın tümü veya sarısı ile birlikte içerirler. Bu besiyerlerinin çoğuna, kontaminasyonu minimuma indirmek için malaşit yeşili veya diğer anilin boyaları katılır.

Agar temelli besiyerleri mikobakterilerin üreme süresini kısaltmak için kullanılmaktadır. Klinik örneklerin ekildiği agar temelli besiyerleri incelendiğinde birçok pozitif mikobakteri kültüründe koloniler inkübasyondan 7-10 gün sonra

görülebilmektedir. Bu tip besiyerlerinin %5-10 CO<sub>2</sub>'li inkübasyon ortamının yumurta temelli besiyerlerindeki üremeyi de arttırdığı bilinmektedir (13,16,27).

Mikobakterileri üretmek için üç grup besiyeri kullanılmaktadır (1,7,10,16,28):

1-Sentetik besiyerleri: Long, Sauton, Beck, Proskauer, Lookeman besiyerleridir. Genellikle BCG aşısı hazırlamada ve tüberkülin elde edilmesinde kullanılır.

2-Yarı-sentetik besiyerleri: Dubos, Youmans, Kirschner, Middlebrook besiyerleridir. Bol miktarda bakteri üretmek için kullanılır.

3-Organik maddeler içeren yumurtalı besiyerleri: Löwenstein-Jensen, Petragani, Trudeau, Dorset, Besredka ve American Thorasic Society besiyerleri örnektir. Klinik örneklerden ilk izolasyonda kullanılır.

Mikobakteriler ilk izolasyonda içinde yumurta-patates veya serum-agar bulunan kompleks besiyerlerine ihtiyaç duyar, daha sonraki pasajlarda basit sentetik besiyerlerinde de üreyebilir. İlk izolasyonda en sık kullanılan besiyeri Löwenstein-Jensen (LJ)'dir. İçinde tam yumurta, patates unu, gliserol, çeşitli tuz-mineraller ve malaşit yeşili vardır. Malaşit yeşili, mikobakterileri etkilemeyen ancak bir çok bakterinin üremesini engelleyen bir madde olarak tüm besiyerlerinde bulunur. Yumurtasız besiyerleri içinde en sık kullanılan besiyeri Middlebrook'tur. 7H 9 sıvı, 7H 10, 7H11 ve 7H 12 ise katıdır. Katılaşma agarla sağlanır. Bu nedenle besiyeri saydamdır. Koloniler 12-14 gün içinde mikroskopla görülür hale gelir (1).

## **KÜLTÜR**

Mikobakteriyel infeksiyonların tanısı için laboratuvara gönderilen klinik örnekler, dekontaminasyon işlemi yapıp santrifüjlendikten sonra besiyerlerine direkt olarak ekilirler. Kültürler ekildikten sonra bir gün yatık olarak 37 °C'de bekletilir. Ertesi gün ağzı iyice kapatıldıktan sonra inkübasyona devam edilir. Mikobakteriler zorunlu aerob bir bakteridir. %5-10 CO<sub>2</sub> üremeyi artırır. Optimal ısı 37 °C ve pH 7'dir. Ancak pH 6.0-7.6 arasındada çoğalabilir. Yumurtalı besiyerinde kolonileri 2-3 hafta sonra görülmeye başlar ve ilk görünüşleri küçük, kuru, girintili-çıkıntılı, granüler ve kirli beyaz renktedir. Birkaç hafta sonra koloniler büyür basık, çevreleri düzensiz ve karnıbahara benzeyen merkezleri olan tipik koloniler oluşmaya başlar. Klinik örneklerden izole edilen

mikobakterilerin tür tanıları yapılırken üreme ısısı, koloni morfolojisi, pigmentasyon özellikleri incelenir ve çeşitli biyokimyasal deneyler uygulanır. Bunlar niasin, nitrat redüksiyonu, TCH (Thiophene-2 carboxylic acid hydrazide), demir alımı , 68°C'de katalaz, Tween-80 hidrolizi, tellurit redüksiyonu, %5 NaCl toleransı bağlama, arilsülfataz, üreaz, MacConkey agarda üreme ve pirazinamidazdır (1,8,11,15,24,28).

İdentifikasyonun 2-5 gün içinde gerçekleştirildiği Bactec 460 sistemi içinde yer alan NAP (P-nitro-alfa-asetil amino -beta-hidroksipropiofenon) ayırım deneyi ile *M.tuberculosis* complex ve MOTT suşlarının ayırımı ile gerçekleştirilir. *M.tuberculosis* complex suşları NAP varlığında üreme göstermezken, MOTT suşları üreme gösterir (13,24).

*M.tuberculosis* suşları katalaz pozitifdir, ancak 68°C'de 20 dakika ısıtıldıklarında katalaz oluşturmazlar. İzole edilen INH'e dirençli suşlar katalaz negatiftir. Bu suşlar yumurtalı besiyerinde S şeklinde koloni yaparlar. Nitrat redüksiyonu ve niasin pozitifdir. Nitrat redüksiyonu ve niasin deneyleri *M.tuberculosis* suşlarını *M.bovis* suşlarından ayırmak için kullanılan önemli deneylerdir.

*M.bovis*, yumurtalı besiyerlerinde, 37°C'de, 3. haftadan sonra küçük, ince, hafifce kabarık, daha düzgün kenarlı, beyazımsı saydam, şeffaf ve nemli koloniler oluşturur. Besiyeri içinde glisin bulunması süreyi uzatabilir veya üremeyi durdurur. *M.tuberculosis*'e nazaran daha geç ve güç ürediğinden *M.bovis*'e güç gelişen (disgonik) basillerde denir. Ayrıca mikroaerofiliktir. Niasin reaksiyonu ve nitrat redüksiyonu deneyleri negatiftir. TCH'a duyarlıdır ve bu özellikleri diğer mikobakteri türlerinden ayrılmaları için kullanılır(1,16).

*M.africanum*, ilk olarak Senegal'li bir hastanın balgamından izole edilmiştir. Görünüm ve boyanma özellikleri *M.tuberculosis*'e benzer. Yumurtalı besiyerindeki kolonileri basık mat ve R koloni görünümündedir. Besiyerlerinde sodyum piruvat bulunması üremeyi hızlandırır. Diğer özellikleri *M.tuberculosis* ile *M.bovis* arasında bir durum gösterir (16).

*M.haemophilum*, *M.marinum* veya *M.ulcerans* infeksiyonu şüphesi varsa inkübasyon sıcaklığı 30°C olmalıdır. Ayrıca *M.haemophilum* üremesi için ortama çikolata besiyeri gibi demir bileşikleri sağlayacak bir kaynak eklenmesi gerekir(27).

**Fotokromojen grup:** Bu gruptaki mikobakteriler karanlıkta üretildikleri zaman kolonileri pigmentsiz oldukları halde bir süre ışığa karşı bırakıldıklarında portakal sarısı renginde bir karatenoid pigment oluştururlar.

**M.kansasii**, direkt boyalı preparatlarda *M.tuberculosis*'den daha uzun ve daha kalın olarak görünür. Aside dirençli boyamada bazı bölgeleri koyu, bazı bölgeleri açık şekilde boyandığından boncuk dizisi veya tesbihi andırır biçimde izlenir. Bakterinin bu farklı morfolojik görüntüsü laboratuvar tanıda önemli bir ipucudur. İçinde gliserol ve yumurta bulunan besiyerlerinde, karanlık ortamda, 37°C'de, 10-21 günlük inkübasyondan sonra fildişi renkli, ortası kabarık, kenarları daha ince, ara formda (ne S, ne R) koloniler oluşturur. Koloniler uzun süre ışığa maruz kalırsa limon veya portakal sarısı renge dönüşür. Işıkla temas süresi uzarsa, renk kırmızılaşır ve hazırlanan preparatlarda basil üzerinde tipik, kırmızı β-karoten kristalleri görünür. İçinde oleik asit ve albumin bulunan besiyerlerinde meydana gelen kolonilerin kenarları daha düzgündür. İnsanlarda tüberküloza benzer nitelikte kronik bir akciğer enfeksiyonu oluşturur. Son yıllarda özellikle yüzme havuzu ile ilgili deri-yumuşak doku enfeksiyonları, artrit ve osteomyelitli olgulardan giderek artan sıklıkta izole edilmeye başlamıştır.

**M.marinum:** İlk izolasyonda optimal üreme ısısı 30-32°C'dir. Yumurtalı besiyerlerinde, karanlıkta 7-14 günde üstü sarımsı çizgili ve kırışık, grimsi beyaz renkli, R tipi koloniler oluşturur. Bu koloniler oda ısısında, ışıklı ortamda, portakal sarısı renge dönüşür ve zamanla kırmızılaşır. İçinde oleik asit ve albumin bulunan besiyerlerindeki koloniler nispeten daha düzgün kenarlı ve konvekstir. *M.kansasii*'den 25°C'de daha çabuk üremesi, negatif nitrat redüksiyonu ve zayıf katalaz oluşturmasıyla ayrılır. Yüzme havuzları ve akvaryumlardan soyutlanan bu bakteri buralarda yüzen veya çalışan insanlarda deride oluşan küçük travmatik yaralardan girerek yüzme havuzu granüloması adı verilen bir hastalık oluşturur. Daha nadir olarak sporotrichosis benzeri lezyon oluşturur.

**M.simiae:** İnsanlarda çok nadir enfeksiyona neden olur. Yumurtalı besiyerlerinde, 37°C'de, 7-14 günde, düzgün kenarlı, konveks, küçük koloniler oluşturur. Deve tüyü rengindeki koloniler uzun süre ışığa maruz kaldığında hafif sarıya döner. Klinik önemi olan mikobakteriler içinde *M.tuberculosis*'den sonra

niasin üreten en önemli bakteri *M.simiae*'dir. Kuvvetli katalaz aktivitesine sahiptir. Tween 80'i geç hidroliz eder.

**Skotokromojen mikobakteriler:** Hem aydınlıkta fakat özellikle karanlıkta pigment oluşturan bakteriler bulunur. Bu özelliklerini ortaya çıkarmak için kültürlerin incelenmesi sırasında uzun süre dışarıda gün ışığında kalmamasına dikkat etmek gerekir. Üremeleri nisbeten fazla olup 10-28 gündür.

***M.scrofulaceum:*** *M.tuberculosis*'den daha kalın ve uzun olan basil, sıklıkla, boncuk dizisi gibi görünür. Katı besiyerlerinde 37°C'de 10-28 gün içinde oldukça yoğun, düzgün, kubbe şeklinde, terayağı kıvamında ve S tipinde koloniler oluşturur. Karanlıkta sarımsı-portakal renginde olan koloniler ışığa maruz kalınca, tuğla kırmızısına döner. Tween hidrolizi oldukça zayıftır. Nitratları nitritlere indirgemez. Bu iki özellik skotokromojen diğer mikobakterilerden ayırımında kullanılır. Çocukluk çağı lenfadenitlerinden birinci dereceden sorumludur.

***M.szulgai:*** 37°C'de skotokromojen, 25°C'de fotokromojen karakter gösterir. Yumurtalı besiyerlerinde 12-28 gün içinde portakal sarısı renkli bazısı S, bazısı R tipinde koloniler oluşturur. Nitrat redüksiyonu, katalaz ve üreaz pozitifdir. Niasin negatifdir.

***M.gordonae:*** Katı besiyerlerinde 7-14 gün içinde koyu sarı, portakal renginde, düzgün koloniler oluşturur. Tween hidrolizi ve katalaz pozitifdir. Niasin ve üreaz negatifdir.

**Kromojen olmayan mikobakteriler:** Bu grup içinde yer alan mikobakteriler ışığa maruz bırakıldıklarında pigment oluşturmazlar. Kolonileri genellikle 7 günden daha sonra ortaya çıkar. Genellikle tüberküloz ilaçlarına karşı dirençli ve deney hayvanları için non-patojendir.

***M.avium-intracellulare:*** 37°C'de en az 10 günde ürer. Polimorfizm gösterirler. Kok şekillerinden uzun çomakcıklara kadar şekilleri vardır. Yumurtalı besiyerlerinde kubbe ve piramit yada küre biçimli koloniler yaparlar. Bazı suşlar kültürün yaşlanmasıyla sarı renkli pigment oluşturabilir. Bakterinin virulansı ile koloni morfolojisi arasında ilişki vardır. Düzgün şeffaf koloni oluşturan suşların konak hücre içinde daha hızlı replike olduğu ve anti-tüberküloz ilaçlara daha dirençli olduğu gösterilmiştir. Büyük bir çoğunluğu niasin negatifdir ve nitratı redükte etmezler. Az miktarda katalaz oluştururlar. Tween-80 hidrolizi 10

günden fazla sürer ve tellüriti 3 günde redükte ederler. Son yıllarda özellikle immün sistemi baskılanmış, kortikosteroid kullanan ve AIDS'li olgularda prevalansı gittikçe artmaktadır.

**M.ulcerans:** Optimal üreme ısısı 30-33°C arasındadır. Çok yavaş üreme gösterir. Deve tüyü renginde , üstü düz veya konveks, kenarları girintili çıkıntılı koloni oluşturur. Katalaz dışında diğer biyokimyasal testleri negatiftir. Genellikle kol ve bacakların ekstensör yüzlerinde deri ülserleri oluşturur.

**M.xenopi:** Optimal üreme ısısı 42-45°C'dir. Katı besiyerlerinde 37°C'de oldukça yavaş üreyerek küçük, granüler, kenarları düzensiz, kabarık koloniler oluşturur. Boyalı preparatlarda uçlara doğru incelen, uzun basiller şeklinde görülür, filamentöz yapıda olabilir. Kolonilerden havaya doğru hifalar çıkar. Koloni etrafından çevreye doğru yayılan dallanmalar M.xenopi için, önemli bir özelliktir. Klasik tüberküloza benzeyen, yavaş ilerleme gösteren, kronik pulmoner hastalığa neden olur.

**M.malmoense:** 37°C'de 2-3 haftada, 22°C'de 7-8 haftada ürer. Kolonileri renksiz, düzgün, grimsi beyaz, opak ve yuvarlak koloniler oluşturur. Niasin reaksiyonu ve nitrat redüksiyonu negatif, Tween-80 hidrolizi ve pirazinimidaz pozitifdir.

**M.haemophilum:** Üremesi için, hemoglobin veya hemine ihtiyaç duyarlar. Kısa, kıvrık ve kuvvetli aside dirençli boyanma özelliği gösteren bir bakteridir. X faktörü eklenmiş Middlebrook 7H10 agar, %2 ferrik amonyum sitratlı L-J, %5 koyun kanlı Colombia agar ve çikolatamsı agar ve çikolatamsı agar besiyerinde 28-32°C'de ürer. 2-4 haftada pigmentsiz, S veya R tipinde koloniler oluşturur. Pirazinamidaz dışında diğer biyokimyasal testleri negatiftir. Özellikle deri lezyonlarından izole edilmektedir.

**Çabuk üreyen mikobakteriler:** Genellikle 3-5 günde üreme gösterirler. Çoğunlukla saprofitler. Ancak özellikle M.fortuitum ve M.chelonae son yıllarda MOTT ile oluşan infeksiyonlarda, potensiyel patojen olarak sıkça izole edilmeye başlanmıştır. Difteroidlere benzeyen aside dirençli basillerdir.

**M.fortuitum ve M.chelonae,** pleomorfik bakterilerdir. Kısa veya uzun, ince veya kalın basil biçiminde olabileceği gibi, ince dallanmış flemanlar şeklinde de görülebilirler. Katı besiyerlerinde 2-4 gün içinde oluşan koloniler beyaz veya krem renginde, düzgün kenarlı ve konveksdir. M.fortuitum, diğer çabuk üreyen



saprofit mikobakterilerden, 3 günde arilsülfataz reaksiyonun pozitif oluşu ve MacConkey agarda 5 günde üremesiyle ayırt edilir. Nitrat redüksiyonu pozitif, penisilinaz ve trehaloz negatiftir. Ayrıca fruktozdan asit oluşturur. *M.chelonae*'den ayrılmasında bunlar kullanılır. *M.chelonae* NaCl'e olan dirençlerine göre iki alt gruba ayrılır. *M.chelonae* subsp *chelonae* NaCl'e dirençsiz, *M.chelonae* subsp *abscessus* NaCl'e dirençlidir. Genellikle deri lezyonu yaparlar.

*M.smegmatis*, *M.phlei* ve *M.vaccae* saprofitlerdir. *M.smegmatis* ve *M.phlei* pigmentli koloniler oluştururlar. Mısırunlu-gliserol agarda üretildiklerinde kolonilerde filamentöz uzantılar görülür.

*M.fallax*, katı besiyerinde kord faktör oluşturduğundan *M.tuberculosis*'e benzer. 30°C'de çabuk, 37°C'de yavaş ürer. Nitrat redüktaz pozitif, katalaz, arilsülfataz ve üreaz negatiftir (1,8,10,16,28).

**Deney hayvanlarına etki:** Tüberküloz bakterileri kobay, fare, tavşan gibi deney hayvanlarında hastalık oluşturabilirler. Ancak oluşan lezyonların karakteri ve hastalığın seyri kullanılan deney hayvanlarının cinsine, duyarlılığına, ve deneye alınan bakteri türüne göre farklılıklar gösterir. Kobaylar, *M.tuberculosis* ve *M.bovis*'e çok duyarlıdır. Tavşanlar, *M.bovis*'e çok duyarlı, *M.tuberculosis*'e dirençlidir. *M.tuberculosis* ve *M.bovis*'i ayırmak için tavşanın damarı içine 0.01 mg *M.bovis* verildiğinde, hayvan birkaç haftada genel bir tüberkülozdan öldüğü halde, *M.tuberculosis* verildiğinde ölmez. Deney hayvanlarına etkinin araştırılması günümüzde kullanılmamaktadır (16).

**Radyometrik yöntem(Bactec):** Bu yöntemde kültür şişeleri içerisindeki sıvı besiyerinde, karbon kaynağı olarak <sup>14</sup>C içeren palmitik asit bulunur. Mikobakteriler bu ortamda ürerken palmitik asidi kullanırlar ve bundan radyoaktif CO<sub>2</sub> oluştururlar. Şişedeki radyoaktif gazı saptayan okuyucu üremenin belirlenmesini sağlar. Bu yöntem ile *M.tuberculosis*'in klinik örneklerde varlığının gösterilmesi ortalama bir haftaya indirilmiştir. Yöntemin önemli bir olumlu yanı, hızlı ve kolay tiplendirme sağlamasıdır. NAP(p-nitro-α-asetil amino-β hidroksipropiofenon) testi, *M.tuberculosis* complex ve MOTT suşlarının ayırımında kullanılan 2-5 günde sonuç veren biyokimyasal bir deneydir. *M.tuberculosis* complex suşları NAP varlığında üreme göstermezken, MOTT suşları üreme gösterir ve <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, çıkarırlar <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>'ün üreme indeksi (GI) sayısal

olarak belirlenir. Bu yöntemle kısa sürede antibakteriyel duyarlılık incelemesi de yapılabilmektedir (2,811,13,25).

**Floresan yöntem:** Mikobakteri üremesi, ortamdaki oksijenin tüketilmesine bağlı olarak floresans veren bir madde içeren tüpte(Mycobacteria Growth Indicator Tube, MGIT), kültür yapılarak gösterilir. Tüp dibinde silikona gömülü floresan bir madde bulunur. Besiyerindeki oksijen floresanı engeller. Bakteri tarafından tüketilince floresans oluşur. Üremeye bağlı floresans 365 nm dalga boyundaki ultraviyole ışığı ile görülür. Üreme ortalama 10 günde saptanabilmektedir. Yapılan çalışmalarda duyarlılığı %76-95, özgüllüğü ise %76.9-100 olarak bildirilmiştir. Kontaminasyon oranı Bactec sistemine göre yüksektir (23,29,30,31).

**Haberci mikobakteriyofaj:** Haberci mikobakteriyofaj, mikobakterileri infekte edebilen ve basil içerisinde kolayca saptanabilen bir ürün oluşturan virüstür. Tüm mikobakterilerde ya da sadece M.tuberculosis'te çoğalabilen fajlar vardır. Ateş böceğinin ışık üretmesinden sorumlu lusiferaz enzim geninin bu fajlara klonlanması ile haberci fajlar elde edilmiştir. Bu enzim ATP varlığında luseferini oksitler ve bu sırada ışık oluşmasına yol açar. Klinik örneklerde bu faj ile infekte edilen basiller lusiferin eklendiğinde ışık oluşturarak karanlık alanda kolayca görünür duruma gelirler. Bu yöntem dört saat gibi kısa bir sürede tamamlanabildiğinden mikobakterilerde ilaç direncinin çabuk belirlenmesinde en umut veren yöntemler arasına girmiştir (23).

**Serolojik yöntemler:** Tüberküloz tanısı için kullanılmaya çalışılan en eski yöntemlerdendir. Günümüze kadar pek çok çalışma yapılmış ve olumlu sonuçlar alınamamıştır.Kullanımını kısıtlayan etken, özgüllüklerinin düşük olmasıdır. Bunun önemli nedeni, çevrede yaygın olarak bulunan M.tuberculosis dışındaki mikobakterilerin çapraz tepkimeye yol açan antijenleri ile sıklıkla karşılaşılmasıdır. En sık kullanılan serolojik yöntem ELISA ile yapılmaktadır. Serolojik testlerin duyarlılığı %60-80'dir. Özgüllüğü ise hücre yüzey antijenlerine özgü monoklonal antikor yanıtı arandığında %100'e yaklaşmaktadır. Serolojik tanı teknik açıdan mümkün görünmektedir, ancak genellikle olumlu sonuçlar, hastalığın ilerlemiş devrelerinde elde edilmektedir. Bu tür olgularda klasik mikroskopik ve kültür yöntemleri çoğunlukla pozitif sonuç verdiği için, serolojik yöntemlerin tanıya ek bir katkısı olmamaktadır (23,24).

**Adenozin deaminaz(ADA):** Pürin metabolizmasında işlevi olan bir enzimdir. Plevra, periton, perikard ve beyin-omurilik sıvılarında, bu boşluklarda tüberküloz bulunduğu zaman ADA düzeyinin yükselmiş olduğu belirlenmiştir. Tüberküloz menenjit olgularında, ADA anlamlı ölçüde artmış bulunurken, plevral sıvı örneklerinde tüm olgularda böyle kesin ayırım yapılabilmesini sağlayacak yeterli farklılık gösterilememiştir (1,23).

**Nükleik asit hibridizasyon yöntemleri:** Mikobakterilerin kromozomal DNA veya ribozomal RNA'larının, bunlara özgül olarak bağlanabilen DNA veya RNA probları yardımı ile, tür düzeyinde belirlenmesi günümüzde mümkün hale gelmiştir. Bu yöntemlerin özgüllüklerinin çok yüksek olmasına karşın duyarlılıkları için aynı şey söylenemez. Prob olarak kullanılan moleküllerin örneğe yeterince bağlanabilmesi için örnekte önemli miktarda nükleik asit bulunması gerekir. DNA hibridizasyon tekniğinde klinik örneklerdeki  $10^3$ - $10^4$ /ml gibi az miktardaki mikobakteri DNA'sını araştırmak mümkündür (23,24).

**Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR):** Klinik örneklerde proba bağlanamayacak kadar az hedef DNA bulunabilir. Prob tarafından tanınabilen küçük DNA'nın özgül nükleotid sıraları polimeraz enzimi kullanılarak çoğaltılır. Polimeraz enzimi uygun DNA zincirinin sentezlenmesi için ortamda bulunan nükleotidleri polimere eder. Ortamda bulunan hedef DNA parçaları üzerine tamamlayıcı zincir yapımında kullanılacak nükleotid ve araştırılacak her biri 20 nükleotidden oluşan mikobakteri türüne özgül oligonükleotid primeri koyulur. Hedef DNA'nın tek zinciri ile ilişkili olan primerler polimeraz reaksiyonun başlama noktasını oluştururlar. Bu karışım ısıtılarak önce hedef DNA'nın iki zinciri birbirinden ayrılır. Sonra ısı  $50^{\circ}\text{C}$ 'ye düşürülerek primerlerin her birinin zincirde bulunan özgül sıralara tutunmaları gerçekleştirilir, ısı  $75^{\circ}\text{C}$ 'ye yükseltilerek iki primerin özgül sıralarda tutunduğu noktalar arasında kalan hedef DNA zincirinin polimeraz enzimle birleşmesi sağlanır. Bu işlem 40 kere kadar tekrarlanarak kısa sürede 100 bine yakın DNA parçasının elde edilmesi gerçekleştirilir. Bazı çalışmalarda PCR'in duyarlılığı %94, özgüllüğü %99 olarak, Bazılarında ise duyarlılık %60, özgüllük ise %80'in altında bildirilmektedir. Klinik örnekte bulunan DNA parçalarını serbest hale getirmek, mikobakterileri eritmek, radyoaktiviteyi belirlemek, reaksiyonun çok pahalıya malolması ve yalancı pozitifliğin çok olması gibi nedenlerle uygulama alanı çok sınırlı kalmaktadır.

Tüberkülozun tanısında rutin olarak PCR yönteminin kullanılmasını öneren hiçbir yayın bulunmamaktadır (23,24,32,33).

**Zincir ayırma çoğaltması(strand displacement amplification,SDA):** PCR'a benzeyen bu yöntem Escherichia coli DNA polimerazı Klenow parçasının çift zincirli DNA üzerinde kesilmiş tek zincir varlığında, bu noktadan başlayarak, bir zinciri ayırıp diğeri üzerinde DNA sentezi yapabilme yeteneğine dayanır. Yöntemin özgüllüğü, aranan etkene özgü DNA dizilerini tanıyacak primerlerin kullanılmasına bağlıdır (23).

**Transkripsiyona bağlı çoğaltma(transcription mediated amplification):** Bu yöntemde çoğaltılan hedef nükleik asit ribozomal RNA'dır. Önce ribozomal RNA'nın "reverse transcriptase" ile DNA kopyası çıkarılır, sonra bundan RNA polimeraz ile yeniden birçok RNA kopyası yapılır. Tepkimelerin kendi kendini tekrarlaması ile ürün çoğaltılmış olur. M.tüberculosis'e özgül bir işaretli prob ile çoğaltılan ürünün varlığı belirlenir. Bin kopya RNA bu iş için yeterli olmaktadır. Bu da bir basilde bulunan ribozomal RNA'nın yarı miktarına eşdeğerdir (34).

**Gaz likid kromatografisi (GLC):** Hızlı ve yararlı bir tekniktir. Mikobakterinin hücre duvarında bulunan yağ asitleri ekstre edildikten sonra, yaklaşık olarak iki saat içinde gaz-sıvı kromatografi analizleri yapılabilmektedir. Avantajı mikobakterilerin hücre duvarında bol miktarda mikolik asit bulunması ve bu mikolik asitlerin türe özgü olmasıdır. Çok pahalı bir sistem olduğu için rutinde kullanılmamaktadır (8,35).

### **Tedavi ve Antitüberkülo İlaçlara Duyarlılık Deneyleri**

Tüberkülozda etkili bulunan ilaçlar sayesinde, tüberküloz hastalığı yeni olgularda başarıyla tedavi edilebilir hale gelmiştir. Tedavide iki temel amaç vardır: Birincisi kişinin sağlığına kavuşturulması, ikincisi ise balgamda tüberküloz bakterisinin çıkarılmasını sonlandırarak bulaşıcılığı önlemek ve böylece toplumu korumaktır. Tüberküloz tedavisinde en az iki ilaç kullanılmalıdır. Tedavide önemli bir noktada hastalığın klinik olarak düzenlenmesinden sonra yeterli bir süre tedavinin devamıdır. Böylece metabolik olarak inaktif olan persistan tüberküloz basillerinin yok edilmesi mümkün olur (6).

**Tüberküloz ilaçları iki grup altında incelenmektedir:**

**Primer ilaçlar:** İzoniazid, rifampin, pirazinamid, etambütol ve streptomisin'dir. Etambütol dışında diğerleri bakterisiddir.

**Sekonder ilaçlar:** Sikloserin, ethionamid, kanamisin, kapreomisin, PAS, aminoglikozidler, kinolonlar, klofazimin ve bete-laktam antibiyotikleridir.

Antimikobakteriyal ilaçlara direnç primer veya sekonder olabilir. Primer direnç, daha önce antimikobakteriyal tedavi aldığı bilinmeyen hastalarda ortaya çıkar. Sekonder ilaç direnci, geçmişte tüberküloz tedavisi uygulanmış hastalarda ortaya çıkar. Bu iki şekildeki direncin yaygınlığı büyük oranda tüberküloz tedavi oranlarının yetersizliğine bağlıdır. Yetersiz tedavi programları dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkmasını sağlayarak, tedavi edilmiş hastalarda sekonder direnç oluşturur. Bu bakteriler sonra diğer insanlara aktarılır ve hastalık ortaya çıkarsa infekte kişide primer dirençli hastalık bulunur (6).

Tüberküloz insidansının artmasıyla birlikte, çoğul dirençli tüberküloz (MDR-tb) ortaya çıkmıştır. Çoğul dirençli tüberküloz deyimi, tedavinin iki temel ilacı INH ve rifampine direncin varlığını belirtir. Bu ikisine ek olarak diğer anti-tüberküloz ilaçlara da direnç olabilir veya olmayabilir. MDR-tb suşlarının artan prevalansı, kısmi tedavi edilebilen ve sıklıkla ölümlü sonlanan durumlara neden olmaktadır. MDR-tb hastalarının tedavisi en az iki yıl sürdürülmelidir.

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

**Antimikobakteriyel duyarlılık testleri:**

**I-Geleneksel yöntemler**

**Absolü konsantrasyon yöntemi**

**Direnç-oran yöntemi**

**Agar-proporsiyon yöntemi**

**II-Yeni yöntemler**

**A-Kültür veya bakteri varlığına dayanan yöntemler**

**Radyometrik yöntem (Bactec)**

**Mikobakteri büyüme indikatör tüp yöntemi (MGIT)**

**Kolorimetrik yöntem**

**Modifiye agar-dilüsyon yöntemi(Mikrokoloni saptama)**

**Lusiferaz taşıyıcı faj yöntemi (LRF)**

**Biyoluminesans yöntem (Hücresel ATP ölçümü)**

**Flow sitometri yöntemi**

**E test**

**B-Moleküler yöntem**

**Tek zincir konformasyon polimorfizm**

**Revers hibridizasyon**

Bugün *M.tuberculosis*'in duyarlılık testlerinde, çoğu laboratuvarlar standardize edilmiş ve CDC tarafından önerilen, agar proporsiyon yöntemini veya Bactec metodunu kullanmaktadırlar. *M.tuberculosis*'in antibiyotik duyarlılığını saptayan bu yöntemler, mikroorganizmanın, belirli konsantrasyonlarda ilaç içeren sıvı veya katı besiyerinde üremesi baz alınarak geliştirilmişlerdir (36).

**Absolü konsantrasyon yöntemi:** Örnek, ilaçların belli konsantrasyonlarını içeren besiyerleri ile ilaçsız kontrol besiyerine ekilir. Spesifik ilaç konsantrasyonunda belli sayıda (genellikle 20) koloniden fazla üreme saptanması direnç olarak değerlendirilir.

**Direnç oran yöntemi:** Aynı genel prensipleri içerir. Farklı yanı, kontrol için standart bir suş olan H37Rv'nin de ilaçlı ve ilaçsız besiyerlerine ekilmesidir. Direnç; bilinmeyen suşun minimum inhibitör konsantrasyonunun, kontrol suşun MIC'e oranı olarak tanımlanır.

**Proporsiyon yöntemi:** Çeşitli modifikasyonları yapılan bu yöntem NCCLS tarafından standart bir yöntem olarak önerilmektedir. Besiyeri olarak oleik asit, albumin, dekstroz ve katalaz eklenmiş Middlebrook 7H10 veya 7H11 agar, antimikrobiyal ilaç olarak referans toz ilaçlar veya emdirilmiş diskler kullanılır. İnokulum ya ARB pozitif hasta örneğinden direkt olarak veya kültürden indirekt olarak hazırlanır. İnokulumun belli dilüsyonları ilaçlı ve ilaçsız kontrol besiyerine 0.1 ml inoküle edilir. Testin geçerli olabilmesi için kontrol suşun ilaçsız besiyerinde en az 50-150 koloni oluşturması gereklidir.

$$\text{Direnç yüzdesi} = \frac{\text{İlaçlı besiyerindeki koloni sayısı}}{\text{Kontrol besiyerindeki koloni sayısı}} \times 100$$

Elde edilen sayı %1'e eşit veya büyük ise, izolat test edilen konsantrasyondaki ilaca dirençli olarak rapor edilir (36,37).

**Radyometrik yöntem (Bactec):** Yapılan çeşitli düzenlemeler ve 10 yılı aşkın süredir klinik kullanımı bu testi hızlı ve güvenilir bir yöntem durumuna getirmiştir. NCCLS tarafından standart bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Yöntemde duyarlılığı yapılacak her suş için, 4 antibiyotikli (SM, INH, RMP, EMB) ve bir antibiyotiksiz olmak üzere 5 adet 12B (Middlebrook 7H12) besiyeri kullanılır. Besiyelerine her ilaçtan 0.1 ml ve denenecek suştan 0.1 ml ilave edilir. Kontrol şişesinin hazırlanması için, orijinal suş 1/100 oranında sulandırılır (%1 direnci saptamak için, bu şişe tüm popülasyonun sadece %1'ini içerir) ve bu süspansiyondan 12B besiyerine 0.1 ml ilave edilir. 37°C'de inkübe edilen besiyeleri Bactec cihazında günlük kontrole alınarak 4-12 gün boyunca kontrol şişesinin GI'i 30 oluncaya kadar takip edilir. Kontrol GI 30 olduğunda, her şişe için bir önceki güne göre GI farkı hesaplanır ve bu fark  $\Delta GI$  olarak değerlendirilir(37,38). Buna göre;

Kontrol  $\Delta GI >$  ilaçlı  $\Delta GI =$  Duyarlı

Kontrol  $\Delta GI <$  ilaçlı  $\Delta GI =$  Dirençlidir.

**Mikobakteri büyüme indikatör tüp yöntemi (MGIT):** Klinik örneklerden mikobakteri izolasyonunu gerçekleştiren hızlı ve duyarlı bir yöntemdir. Her MGIT tüpü 4 ml modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri ve %0.25 gliserol içerir. Tüpün dip kısmında ise oksijene duyarlı bir floresan indikatör bulunur. Klinik örnekler, içinde belli konsantrasyonlarda ilaç içeren tüplerle birlikte ilaçsız kontrol tüplere de inoküle edilir. İlaçlı tüplerde; duyarlı bakteriler inhibe olacak, dirençli bakteriler ise üreyerek floresans vereceklerdir. Oluşan floresans derecesi antibiyotiksiz negatif kontrol ve %0,4'lük sodyum sülfid içeren pozitif kontrol tüpleri ile karşılaştırılarak değerlendirilir (37).

**Kolorimetrik yöntem:** Pratik ve ucuz olan bu yöntemle, bakteriyel metabolizmanın varlığı indikatör olarak kullanılan Alamar mavisinin renginin pembeye dönüşmesiyle tespit edilir. M.tuberculosis'in ilaçlı ve ilaçsız 7H9 sıvı besiyerinde inkübasyonu sonrası, ortama Alamar mavisini eklenerek, kontrol ve ilaç içeren besiyerlerindeki renk değişimi kıyaslanır. Sonuçlar 7-10 gün içinde alınır (36).

**Lusiferaz taşıyıcı faj yöntemi:** Klonlanan lusiferaz geni, mikobakteriyofajlar aracılığı ile M.tuberculosis hücresine taşınabilir. M.tuberculosis'in ilaç duyarlılığını tespit etmek için, lusiferaz geni içeren mikobakteriler, ilaçlı ve ilaçsız ortamlarda 24 saat inkübe edilip, ortama lusiferaz eklenmiştir. İlaçsız ortamda, M.tuberculosis aktif olarak üremediği için, lusiferaz geninin ekspresyonuna ve ATP'nin varlığına bağlı olarak ışık üretilecektir. İlaç üremeyi baskılıyorsa ışık üretilmeyecektir (36).

**Biyoluminesans yöntemi:** Bu yöntemin esası, yaşayan hücrelerde ATP bulunması, ölü hücrelerde ATP bulunmaması prensibine dayanır. M.tuberculosis'in ilaçlı ve ilaçsız 7H9 besiyerinde 10 gün inkübasyonundan sonra ortama, ATP moniterize edici madde eklenir. Luminometre ile ilaçlı ve ilaçsız besiyerlerindeki ölçülen ışık şiddeti kıyaslanarak, ilaç duyarlılığı tespit edilir (36).

**Flow sitometri yöntemi:** Yöntemin esası, M.tuberculosis'in floresein diasetatı serbest floreseine hidrolize etmesi ve böylece oluşan floresent mikobakterilerin flow sitometrik analiz ile tespit edilmesi esasına dayanır. Antimikrobiyal ajanlara duyarlı mikobakteriler floresein diasetat'ı önemli ölçüde daha az hidrolize ederler. Bakteri üremesi gerekmediği için 24 saat gibi kısa bir sürede sonuç alınır (36,37).

**E test :** Daha çok hızlı üreyen mikobakteriler için kullanılmakta ise de son zamanlarda M.tuberculosis ve M.avium-intracellulare için de kullanılabilirliği gösterilmiştir. Besiyerinde üremiş ve McFarland 3'e göre bulanıklığı ayarlanmış bakteri süspansiyonu agar yüzeyine yayılır. Üzerine, değişen oranlarda antimikrobiyal ilaç içeren E test şeritleri konur. Plaklar 5-7 gün süre ile 37°C'de inkübe edilir. Üremenin kuvvetle inhibe olduğu çizginin E test şeridini



kestiği nokta, MIC değerini verir. Uygulaması kolay, ucuz ve ümit verici bir yöntemdir (37,38).

**Moleküler yöntemler :** M.tuberculosis suşlarında antimikobakteriyel ajanlara direnç, o ilaçların bağlandığı hedef bölgeleri kodlayan genlerde oluşan mutasyonlarla ilişkilidir. Moleküler tekniklerle bu mutasyonların gösterilmesi amaçlanmaktadır. Kısa zamanda sonuç vermeleri ve ümit verici olmalarına karşın, belirli bir ilaca karşı direncin olası mekanizmalarının hepsinin tespiti ve her mekanizmanın belirlenmesi için farklı bir yöntem gerekliliği yönünden dezavantaja sahiptirler (36,37).

### **Tüberküloz epidemiyolojisi**

**Dünyada durum:** Dünya Sağlık Örgütü(DSÖ)'nün Mayıs 1998'de 181 ülkeden elde edilen verilere göre (dünya nüfusunun %97'si), 1997 yılında tüberkülozlu hasta sayısının 3.368.879, bunların 1.292.884'ünün yeni yayma pozitif olduğu belirtilmektedir. Tahmin edilen hasta sayıları ise bütün hastalar 7.963.000, yeni yayma pozitif olgu sayısı 3.522.000'dir. Hastalık insidansı Avrupa ülkelerinin çoğunda yüz binde 20'den az iken, Hindistan, Bangladeş, Çin gibi ülkelerde yüz binde 100'ün üstündedir (39)

**Türkiye'de durum:** Ülkemizde tüberküloz'un durumu incelendiğinde, hastalık insidansı açısından başarılı kontrol programı uygulanmış ülkeler ile, hiç kontrol programı uygulanmamış ülkeler arasında bir konumumuz olduğu görülmektedir. Ülkemizde tüberküloz insidansı, 1997 yılında Verem Savaş Dispanserlerine kayıtlı hastalara göre hesaplandığında yüzbinde 33'tür. Bu rakamlar, SSK'lı bazı hastaları ve Verem Savaş Dispanseri dışında tedavi gören hastaları içermemektedir (39).

## GEREÇ VE YÖNTEM

Tüberküloz ön tanısı ile hastalardan alınan klinik örnekler, mikobakteriyolojik inceleme amacıyla, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'na gönderilmiştir. Gönderilen klinik örnekler, mikroskop ve kültür yöntemleri ile incelenmiş ve antitüberkülo ilaçlara duyarlılık deneyleri uygulanmıştır.

**1-Mikroskop incelemesi:** Ziehl-Neelsen ve fluorokrom yöntemleri ile ayrı ayrı boyanarak incelenen preparasyonlarda, klinik örneklerde mikobakterilerin varlığı araştırılmıştır.

Balgam, bronşlavaj sıvısı (BAL) ve abse/cerahat örneklerinden homojenizasyon sonrası, normalde steril olarak kabul edilen ve dekontaminizasyon-homojenizasyon işlemi uygulanmayan diğer klinik örneklerden ise, direkt örnekten ikiye tane preparat hazırlanmıştır.

### A-Ziehl-Neelsen Yöntemi (8,11,14)

Boyanın hazırlanması:

#### 1.çözelti:

Bazik fuksin 0.3 g  
Etil alkol (%95) 10 ml

#### 2.çözelti:

Fenol (ısıtılmış) 5 ml  
Distile su 95 ml

1. çözelti ile 2.çözeltiden 90 ml alınarak karıştırılmış ve karışım süzgeç kağıdından geçirilerek boya kristallerinden arındırılmıştır.

#### Asit alkol:

Etil alkol (%95) 97 ml  
HCl (konsantre) 3 ml

#### Zıt boyama çözeltisi:

Metilen mavisi (klorid) 0.3 g  
Distile su 100 ml

Preparatların Ziehl-Neelsen yöntemi ile boyanması:

Klinik örneklerden preparat hazırlanırken yeni ve temiz lamlar kullanılmış ve örnekler lamın üzerinde hazırlanan 1x2 cm'lik bir alana yayılmıştır. Beyin-omurilik sıvısı örneklerinden preparat hazırlanırken, mikobakterileri görme olasılığını arttırmak amacıyla lama öze ile bir damla örnek yayılmış, havada kuruması sağlanmış ve bu işlem iki kez daha tekrarlanmıştır. İşlem tekrarlanırken, her seferinde örneklerin üst üste gelmesine dikkat edilmiştir.

Klinik örneklerden bu şekilde hazırlanan preparatlar havada kurutulduktan sonra, üç kez alevden geçirilerek tespit edilmiştir.

1-Tespit edilen preparatların üzerine, lamı kaplayacak şekilde bazik fuksin ilave edilmiş ve alttan hafif şiddetteki alevle 3-5 dakika ısıtılmıştır. Bu işlem uygulanırken lamın üzerindeki boyanın azalmamasına ve boyanın kaynamamasına dikkat edilmiştir. Preparatın soğuması beklenilmiş ve soğuyunca üzerindeki boya boşaltılmıştır.

2-Boya döküldükten sonra preparatlar su ile dikkatlice yıkanmış ve boya tamamen akıncaya kadar %3'lük asit alkol ile dekolarize edilerek tekrar su ile yıkanmıştır.

3-Preparatların üzerindeki su akıtıldıktan sonra 30-60 saniye metilen mavisi ile boyanmış ve bu süre sonunda lamlar tekrar su ile yıkanarak, havada kurutulmuştur.

4-Kurutulan preparatlar immersiyon yağı damlatılarak, mikroskopta 100x objektif ile incelenmiştir (Resim 2).

### **B-Fluorokrom yöntemi (1,18)**

Boyanın hazırlanması:

Auramine-Rhodamine Boyası:

Auramine-O (Sigma A-1396, C.1.41000)	1.5 g
Rhodamine-B (Merk 7599)	0.75 g
Gliserol	75 ml
Fenol (ısıtılmış)	10 ml
Distile su	50 ml

Tüm maddeler karıştırılmış ve 24 saat karıştırıcıda bekletilmiştir. Daha sonra bu çözelti süzgeç kağıdından geçirilerek filtre edilmiştir. Bu karışım koyu renkli bir şişeye boşaltılarak +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Asit alkol:

Etil alkol (%70'lik)	100 ml
HCl (konsantre)	0.5 ml

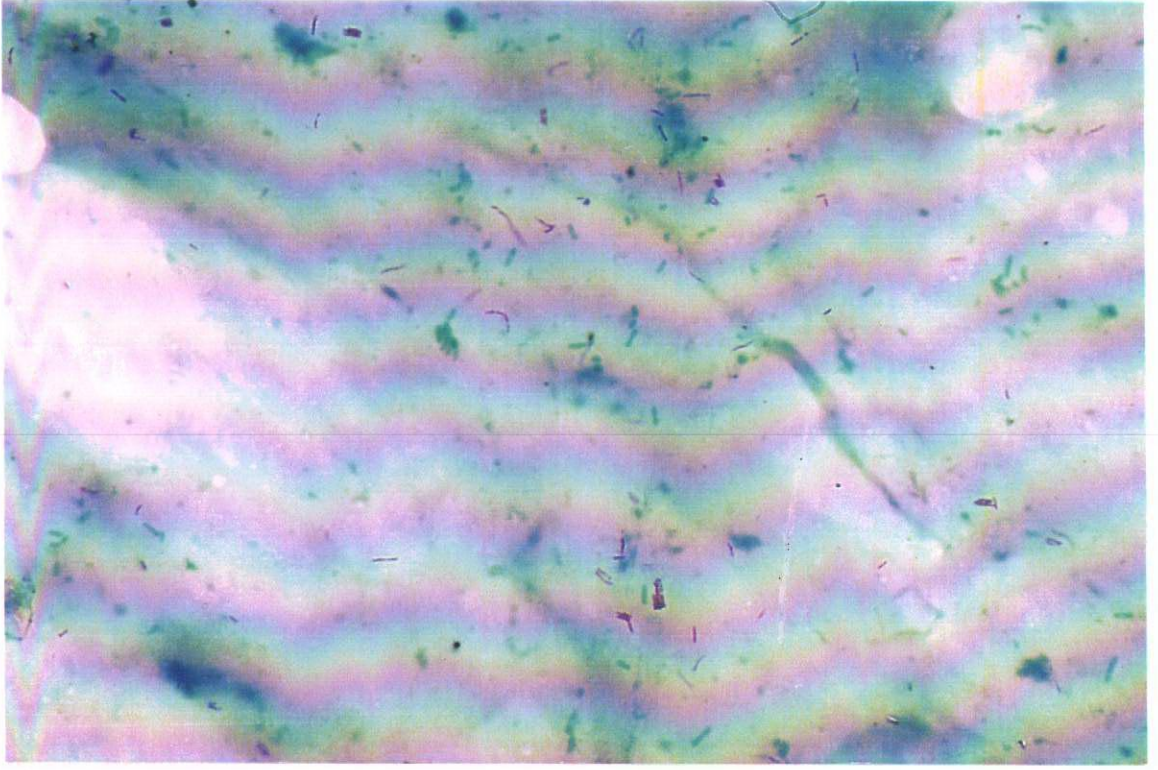
Zıt boyama çözeltisi:

Potasyum permanganat(KmnO <sub>4</sub> )	0.5 g
Distile su	100 ml

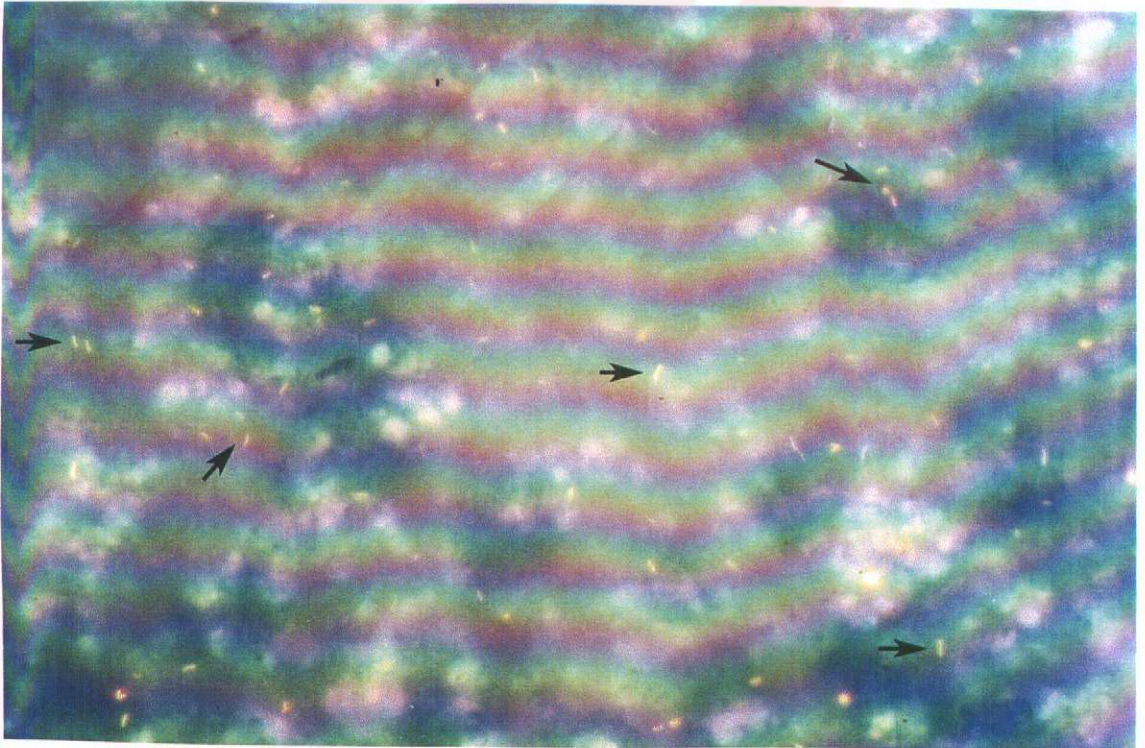
Preparatların fluorokrom yöntemi ile boyanması:

Klinik örneklerden hazırlanan preparatlar. Havada kurutulduktan sonra, üç kez alevden geçirilerek tespit edilmiştir.

1-Tespit edilen preparatların üzerine, lamı kaplayacak şekilde Auromine-O+ Rhodamine-B solüsyonu ilave edilmiş ve 15-20 dakika oda ısısında bekletilmiştir.



Resim 2 : Balgam örneğinde aside dirençli bakteriler  
(Erlich -Ziehl -Neelsen boyası, x100)



Resim 3 : Balgam örneğinde aside dirençli bakteriler  
(Fluorokrom boyası, x100)

2-Bu süre sonunda lamaların üzerinden boya solüsyonu dökülerek su ile yıkanmış ve daha sonra 2-3 dakika asit alkolle dekolarize edilmiştir.

3-Tekrar su ile yıkandıktan sonra preparatların üzerindeki su akıtılmış ve %0.5'lik potasyum permanganat ile 2-4 dakika boyanmıştır. Bu süre sonunda lamalar tekrar su ile yıkanmış ve havada kurutulmuştur.

4-Kurutulan preparatlar, kuru sistem objektif (25x veya 40X) ile incelenmiştir. Preparatların floresans mikroskobunda incelenmesinde BG12-0515 filtre sistemi kullanılmıştır (Resim 3).

### **Klinik Örneklerin Dekontaminasyon-Homojenizasyon ve Nötralizasyonu**

Klinik örneklerin dekontaminasyon ve homojenizasyonunda kullanılan %4'lük NaOH ve nötralizasyonda kullanılan fosfat tamponu (PBS) aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır (13,26):

#### %4'lük NaOH solüsyonu:

NaOH	40 g
Distile su	1000 ml

#### Fosfat tamponu (pH: 6.8, 0.067 M stok solüsyon) :

Çözelti 1-Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhidroz)	9.47 g
Distile su	1000 ml
Çözelti 2-KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9.07 g
Distile su	1000 ml

1 ve 2 no'lu çözeltilerden eşit miktarlarda karıştırılarak, kullanılacak fosfat tamponu hazırlanmıştır. pH dikkatlice kontrol edilmiş, düşük pH değeri elde edildiğinde 1 no'lu çözeltiden, yüksek pH değeri elde edildiğinde 2 no'lu çözeltiden ilave edilerek, pH 6.8'e ayarlanmıştır. Hazırlanan %4'lük NaOH çözeltisi ve fosfat tamponu 121°C'de otoklavda 15 dakika sterilize edilmiştir.

Mikobakteriler yönünden incelenmek amacıyla laboratuvara gönderilen balgam, bronş lavaj sıvısı ve abse/cerahat gibi klinik örnekler en fazla 10 ml olacak şekilde, 50 ml'lik steril santrifüj tüplerine aktarıldıktan sonra, üzerine bir katı kadar NaOH+ N-asetil-L-sistein+sodyum sitrat çözeltisi ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 15-20 dakika bekletilmiştir. Bu süre içinde tüpler 4-5 dakikada bir çalkalanarak,

örneklerin homojen hale gelmesi sağlanmıştır. NaOH çözeltisinin mikobakterilere de zarar verebileceği göz önünde tutularak bu sürenin aşılmasına özen gösterilmiştir. Bu süre sonunda dekontamine-homojenize edilen örneklerin bulunduğu tüplere nötralizasyon için tüpten taşmayacak şekilde PBS ilave edilmiş ve tüpler dengelenerek 3800x g'de 15 dakika sanrifüj edilmiştir. Üst sıvı, içinde dezenfektan bulunan bir kaba dikkatlice boşaltıldıktan sonra, çökelti halindeki örneğin üzerine 1-2 ml PBS ilave edilmiştir. Bu işlem sonunda homojenizasyon sonrası preparatlar hazırlanmış, Löwenstein-Jensen ve Bactec 12B besiyerine kültür işlemi uygulanmıştır (8,11,13). Homojenizasyon sonrası preparat hazırlanırken, örneğin yapışmasını sağlamak amacıyla bir öze protein içeren sıvı (örneğin, glikozlu buyyon) ilave edilmiş, daha sonra örnekten yayma yapılmıştır.

## **2-Kültür**

A )Löwenstein-Jensen Besiyeri: Dekontamine-homojenize ve nötralize edilen klinik örneklerden 0.5 ml alınarak, Löwestein-Jensen besiyerine ekilmiştir. Ekim yapılan besiyerleri 37°C'de bir gece yatık şekilde bırakıldıktan sonra, 40gün dik olarak bekletilmiştir. Bu süre içinde, besiyerleri haftada bir kez kontrol edilerek, üremenin olup olmadığı incelenmiştir.

B )Bactec 12B besiyeri: Kontaminasyonu önlemek amacıyla, Bactec 12B besiyerine kültür işlemi uygulanmadan önce ilave edilen ve liyofilize halde bulunan PANTA, 5 ml PANTA Reconstituting Fluid (PRF) ile antibiyotik çözeltisi haline getirilmiştir. Çeşitli antibiyotikleri bünyesinde bulduran bu çözelti kültür işleminden önce, besiyeri şişelerinin ağzı %70'lik alkolle silinerek, her Bactec 12B besiyerine 0.1 ml ilave edilmiştir. PANTA solüsyonu sulandırıldıktan sonra aşağıdaki antibiyotik konsantrasyonları elde edilmiştir:

Polimiksin B	50 ünite/ml
Azlosilin	10 mcg/ml
Nalidiksik asit	20 mcg/ml
Trimetoprim	5.0 mcg/ml
Amfoterisin B	5.0 mcg/ml

0.1 ml PANTA solüsyonu ilave edildikten sonra, dekontamine-homojenize ve nötralize edilmiş klinik örneklerden 0.4-0.5 ml alınarak Bactec 12B besiyerine ekilmiştir. Ekim işleminden sonra besiyerlerinin ağzı tekrar alkol ile temizlenmiştir.

Balgam, bronş lavajı, idrar ve abse/cerahat dışındaki klinik örneklere, dekontaminasyon-homojenizasyon-nötralizasyon işlemi uygulanmadan direkt olarak ekilmiştir. Bactec 12B besiyerinin (4 ml) içeriği aşağıdaki şekildedir:

7H9 buyyonu	%0.47 w/v
Kazein hidrolizat	%0.10 w/v
Bovin serum albumin	%0.50 w/v
Katalaz	192 ünite
<sup>14</sup> C-substrat	4 µC
Distile su	4 ml
PH	8.6± 0.2

Klinik örneklerin ekildiği Bactec 12B besiyerleri 37°C'de 6 hafta süre ile bekletilmiş ve ilk iki hafta, haftada iki kez, son dört hafta, haftada bir kez Bactec TB 460 otomasyon cihazında kontrol edilmiştir. Bu süre sonunda üreme göstermeyen kültürler negatif olarak bildirilmiştir.

Klinik örnek mikobakteri içeriyorsa, bu mikobakteriler 12B besiyerindeki <sup>14</sup>C işaretli substratı (Palmitik asit) kullanarak, besiyerinin üzerindeki atmosfere <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> çıkarırlar. Bactec TB 460 cihazında yapılan kontroller sırasında şişeden bu <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> çekilir ve radyoaktivitesi 0-999 sınırları içinde sayısal olarak belirlenir. Bu sayılar üreme indeksini (GI) gösterir ve otomatik olarak kaydedilir.

Bu sistemle kontrol edilen 12B besiyerlerinin GI değeri ≥ 10 olduğunda bu şişeler günlük kontrole alınmış ve GI değerleri her gün takip edilmiştir. GI değeri ≥50-100'e yükselen besiyerlerindeki üreme Ziehl-Neelsen yöntemiyle boyanarak incelenmiş ve kontaminasyon olup olmadığını kontrol etmek amacıyla kanlı jeloz besiyerine ekim yapılmıştır. Boyalı preparasyonda saf halde aside dirençli bakteri görülen ve kanlı jeloz besiyerinde üremeyen kültürlerle GI ≥ 50-100' yükseldiğinde NAP identifikasyon deneyi uygulanmıştır (13).

**NAP identifikasyon deneyi:** NAP (para-nitro-alfa-asetilamino-beta hidroksipropiyofenon) kloramfenikolün sentezi sırasında ortaya çıkan bir ara üründür. *M.tuberculosis* kompleks içinde yer alan türlerin (*M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.africanum*) üremesi bu madde varlığında inhibe olurken, diğer mikobakteriler üremelerini sürdürmektedir.

50-100 arasında GI değeri veren kültürlerle Bactec NAP deneyi uygulanmıştır. Bu amaçla, primer 12B besiyerinden 1 ml alınarak içinde 5 µg NAP maddesi emdirilmiş disk bulunan şişeye aktarılmıştır. Primer kültür şişesi pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Her iki şişenin ağzı alkolle temizlendikten sonra bu şişeler 2-6 gün süre ile 37°C'de bekletilmiş ve bu süre içinde her gün Bactec TB 460 cihazında GI değerleri takip edilmiş, sonuçlar kaydedilmiştir. GI değeri > 100 olan pozitif kültürler için aşağıdaki şekilde sulandırım yapıldıktan sonra NAP deneyi uygulanmıştır:

<u>Primer kültürde GI</u>	<u>Yeni 12B besiyerine aktarılan miktar</u>
101-200	0.8 ml
201-400	0.6 ml
401-600	0.4 ml
601-800	0.3 ml
801-999	0.2 ml
999 (bir günden fazla süre ile)	0.1 ml

Sulandırım yapılan 12B besiyerinden 1 ml alınmış ve NAP maddesi içeren şişeye aktarılmıştır. Sulandırım yapılan yeni 12B şişesi pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

NAP deneyi sonuçlarının yorumlanması: Kontrol şişesinin günlük GI değeri artış gösterirken, NAP şişesinin GI değerinde, mikobakterinin türüne göre azalma veya artış belirlenmiştir. *M.tuberculosis* kompleks içinde yer alan türlerin üremesi bu madde varlığında inhibe olurken, MOTT basilleri üremelerini sürdürmüştür. Sonuçlar aşağıdaki kriterler göz önünde tutularak yorumlanmıştır:



### **M.tuberculosis kompleks:**

- Yapılan günlük kontroller sırasında, iki gün üst üste GI değerinde önemli azalma (%20) olması,
- GI değerinde ilk iki gün önemsiz bir artış daha sonra azalma olması veya GI değerinde artış görülmemesi ile incelenen suş, M.tuberculosis kompleks olarak belirlenmiştir.

### **MOTT Basilleri:**

- Dört günde günlük GI değerlerinin  $\geq 400$ 'e ulaşması,
- İlk 1-3 gün GI değerinde önemsiz bir azalma olması veya artış olmaması, ancak birbirini takip eden iki günde, günlük GI değerinde önemli bir artış (%20) olması ile incelenen suş, MOTT basilleri olarak tanımlanmıştır.

**Antibiyotik duyarlılık deneyi:** Mikobakteriler açısından pozitif olduğu belirlenen ve GI değeri  $\geq 500-999$ 'a yükselen kültürlerle antibiyotik duyarlılık deneyi uygulanmıştır (15).

Duyarlılık deneyinde kullanılan ve liyofilize olarak hazırlanmış isoniazid ve rifampin 5 ml, streptomisin ve etambutol 15 ml distile su ile sulandırılarak, aşağıdaki belirtilen konsantrasyonlarda stok solüsyon hazırlanmıştır:

Streptomisin	80 µg/ml
Isoniazid	4 µg/ml
Rifampin	80 µg/ml
Etambutol	300 µg/ml

**GI  $\geq 50-800$  olan kültürlerin duyarlılık deneyi:** Duyarlılık yapılacak her deneyde, her ilaç konsantrasyonu için bir 12B besiyeri ve kontrol için ayrı bir 12B besiyeri kullanılmıştır (5 besiyeri). Duyarlılık deneyi yapılmadan önce tüm 12B besiyerlerine 0.1 ml PANTA solüsyonu ilave edilmiştir.

- Dört adet 12B besiyerine ayrı ayrı, antitüberküloz ilaçların stok solüsyonundan 0.1'er ml ilave edilmiş ve besiyerlerinde aşağıdaki son ilaç konsantrasyonları elde edilmiştir:

Streptomisin	2.0 µg/ml
Isoniazid	0.1 µg/ml
Rifampin	2.0 µg/ml
Etambütol	2.5 µg/ml

- Bu ilaçları içeren 12B besiyerlerinin her birine, GI değeri  $\geq 500-800$  olan primer 12B besiyerinden 0.1 ml ilave edilmiştir.
- Kontrol şişesinin hazırlanması için 9.9 ml özel dilüsyon sıvısına (DF) primer 12B besiyerinden 0.1 ml aktarılarak 1/100 oranında sulandırım yapılmıştır(%1 direnci belirlemek için).lyice karıştırıldıktan sonra bu sulandırmadan 12B kontrol besiyerine (ilaçsız) 0.1 ml aktarılmıştır.
- Ekim yapılan tüm besiyerlerinin ağzı, %70'lik alkolle silinmiştir.

#### **GI $\geq 999$ olan kültürlerin duyarlılık deneyi:**

- Her 12B besiyerine ayrı ayrı 0.1'er ml antitüberküloz ilaç ilave edilmiştir.
- GI  $\geq 999$  olan primer kültürden 0.5 ml alınarak, 0.5 ml özel dilüsyon sıvısı ile karıştırılmış ve 1/1 oranında sulandırım yapılmıştır. lyice karıştırıldıktan sonra bu sulandırmadan 12B kontrol besiyerine (ilaçsız) 0.1 ml aktarılmıştır.
- Ekim yapılan tüm besiyerlerinin ağzı %70'lik alkolle silinmiştir.

Ekimleri tamamlanmış olan 12B besiyerleri  $37\pm 1^\circ\text{C}$ 'lik etüve kaldırılmış ve Bactec 460 cihazında günlük kontrole alınarak, 4-12 gün süre ile GI'leri takip edilmiştir. Kontrol işleminin her gün aynı saatlerde ( $\pm 2$  saat) yapılmasına özen gösterilmiştir.

### Sonuçların yorumlanması:

Mikobakteriler besiyerinde bulunan antitüberküloz ilaca karşı duyarlı ise, üremeleri inhibe olur ve bu durumda  $^{14}\text{CO}_2$  oluşumu baskılanır. Bir önceki güne göre GI değerleri arasındaki fark delta GI ( $\Delta$  GI) olarak ifade edilir. Negatif  $\Delta$ GI değerleri üremedeki azalmayı, pozitif  $\Delta$ GI değerleri üremedeki artışı ifade eder. Bu tablo 2 deki örnekte gösterilmiştir. Kontrol şişesindeki GI değeri  $\geq 30$  olduğunda sonuçlar aşağıdaki şekilde yorumlanmıştır:

GI (kontrol) >GI (ilaç bulunan 12B besiyeri) = Duyarlı

GI (kontrol) >GI (ilaç bulunan 12B besiyeri) = Dirençli

GI (kontrol) = GI (ilaç bulunan 12B besiyeri) = Sınırdaki

Tablo 2 : İlaç duyarlılık deneyi sonuçlarına örnek.

	Günlük GI değerleri				$\Delta$ GI	Sonuçlar
	1	2	3	4		
Kontrol	3	10	23	48	+25	
Streptomisin	52	82	79	76	-3	Duyarlı
INH	41	92	215	581	+266	Dirençli
Rifampin	29	78	181	476	+295	Dirençli
Etambutol	75	82	68	72	+4	Duyarlı

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

## BULGULAR

Çalışma kapsamına alınan ve tüberküloz yönünden incelenmesi istenen 340 klinik örnek, mikroskop (Ziehl-Neelsen = ZN, Fluorokrom = FK) ve kültür (Löwenstein-Jensen = LJ, Bactec) yöntemleri ile incelenmiş, kültürü pozitif bulunan örneklerden izole edilen suşlar NAP identifikasyon deneyi ile tanımlanarak, M.tuberculosis kompleks olarak idantifiye edilen suşlara duyarlılık deneyi uygulanmıştır. İncelenen klinik örnekler ve bu klinik örneklerin hasta gruplarına göre dağılımı tablo 3'de belirtilmiştir.

Tablo 3 :İncelenen 340 klinik örnek ve bu örneklerin hasta gruplarına göre dağılımı

Klinik örnek	İncelenen örnek sayısı	Erişkin		Çocuk
		Erkek Sayı (%)	Kadın Sayı (%)	
- Balgam	166	113 (%68)	50 (%30.1)	3 (%1.8)
- Beyin-omurilik sıvısı (BOS)	62	2 (%3.2)	5 (%8.1)	55 (%88.7)
- İdrar	43	14 (%32.5)	26 (%60.4)	3 (%7)
- Bronkoalveolar lavaj sıvısı	13	8 (%61.5)	4 (%30.7)	1 (%7.7)
- Abse/cerahat	11	4 (%36.3)	6 (%54.5)	1 (%9.1)
- Plevra sıvısı	16	9 (%56.2)	3 (%18.8)	4 (%25)
- Biyopsi materyali	10	8 (%80)	2 (%20)	-
- Asitsıvısı	8	4	3	1
- Mide açlık suyu	5	2	-	3
- Perikard sıvısı	3	1	1	1
- Eklem sıvısı	1	-	-	1
- Torasentez sıvısı	1	-	1	-
- Periton sıvısı	1	-	-	1
<b>Toplam</b>	<b>340</b>	<b>165 (%48.5)</b>	<b>101 (%29.7)</b>	<b>74 (21.7)</b>

İncelenen 166 balgam örneklerinin tümü ZN ve FK boyama yöntemi ile boyanmış olup; 14'ü (%8.4) ZN boyama yöntemi, 16'sı (%9.6) FK boyama yöntemi ile; 11 abse/cerahat örneğinin 1'i (%9.1) ZN boyama yöntemi, 1'i (%9.1) FK boyama yöntemi ile; 43 idrar örneğinin 1'i (%2.3) sadece ZN boyama yöntemi ile; 16 plevral sıvı örneğinin 1'i (%6.2) sadece FK boyama yöntemi ile aside dirençli bakteriler

açısından pozitif bulunmuştur. Diğer klinik örnekler genellikle yeterli hacimde gönderilmediği için santrifüjde çevrilememiş, bu nedenle sadece direkt örnekten hazırlanan preparatlar ZN ve FK yöntemleri ile boyanmıştır. Bu klinik örneklerde her iki yöntemle de boyanan preparatlarda aside dirençli bakteri görülmemiştir.

Bütün klinik örnekler göz önünde bulundurulduğunda 340 örneğin, ZN boyama yöntemi ile 16'sı (%4.7), FK boyama yöntemi ile 18'i (%5.3) aside dirençli bakteriler yönünden pozitif bulunmuştur. Preparat sonuçları ile ilgili bulgular Tablo 4'de belirtilmiştir.

Tablo 4 : İncelenen klinik örneklerin preparat sonuçları.

Klinik örnek		ZN (+)		FK (+)	
		Sayı	(%)	Sayı	(%)
Balgam	n=166	14	8.4	16	9.6
Abse/cerahat	n=11	1	9.1	1	9.1
İdrar	n=43	1	2.3	-	-
Plevral mayi	n=16	-	-	1	6.2
BOS	n=62	-	-	-	-
BAL	n=13	-	-	-	-
Biyopsi	n=10	-	-	-	-
Asit sıvısı	n=8	-	-	-	-
Mide açlık sıvısı	n=5	-	-	-	-
Perikard sıvısı	n=3	-	-	-	-
Eklemler sıvısı	n=1	-	-	-	-
Torasentez	n=1	-	-	-	-
Periton sıvısı	n=1	-	-	-	-
<b>Toplam</b>	<b>n=340</b>	<b>16</b>	<b>4.7</b>	<b>18</b>	<b>5.3</b>

ZN ve FK yöntemleri, boyama ve inceleme süreleri açısından karşılaştırıldığında; ZN boyama yönteminde bir preparat için boyama süresi 8-10 dakika, FK yönteminde 20-25 dakika olarak belirlenmiştir. ZN yönteminde inceleme süresi 10-15 dakika, FK yönteminde 4-6 dakika olarak bulunmuştur.

Mikobakteriyolojik inceleme amacıyla laboratuvara gönderilen klinik örneklerin Löwenstein-Jensen ve Bactec besiyerinde kültürü yapılmıştır.

166 balgam örneğinin 22'sinin (%13.2) mikobakteriyolojik kültürü pozitif bulunmuştur. Kültürü pozitif 22 balgam örneğinin 13'ü (%7.8) sadece Bactec 12B besiyerinde, 2'si (%1.2) sadece Löwenstein-Jensen besiyerinde, 7'si (%4.2) hem Löwenstein-Jensen, hem Bactec 12B besiyerinde üretilmiştir.

62 BOS örneğinin 4'ünde (%6.4) üreme belirlenmiş ve bu örneklerin 3'ü (4.8) Bactec 12B besiyerinde, 1'i (%1.6) hem Löwenstein-Jensen, hem Bactec 12B besiyerinde üreme göstermiştir. Sadece Löwenstein-Jensen besiyerinde üreme gösteren klinik örnek belirlenmemiştir.

11 abse/cerahat örneğinin 3'ü (%27.2) kültürde üretilmiştir. Bu örneklerin 2'si (%18.1) sadece Bactec 12B besiyerinde, 1'i (%9.1) hem Löwenstein-Jensen, hem Bactec 12B besiyerinde üremiştir. Sadece Löwenstein-Jensen besiyerinde üreme gösteren örnek belirlenmemiştir.

10 biyopsi örneğinin 4'ü (%40) kültürde üretilmiştir. Bu örneklerin 3'ü (%30) sadece Bactec 12B besiyerinde, 1'i (%10) hem Löwenstein-Jensen, hem Bactec 12B besiyerinde üreme göstermiştir. Sadece Löwenstein-Jensen besiyerinde üreme gösteren örnek belirlenmemiştir.

Sonuç olarak, 34 kültür pozitif örneğin 21'i (%61.7) sadece Bactec 12B besiyerinde; 2'si (%5.9) Löwenstein-Jensen besiyerinde; 11'i (%32.3) hem Bactec, hem Löwenstein-Jensen besiyerinde üremiştir (Tablo 5).

Tablo 5: Kültür pozitifliği yönünden Bactec 12B ve L-J besiyerinden alınan sonuçların karşılaştırılması.

	Sadece Bactec 12B besiyeri	Sadece L-J besiyeri	Bactec 12B+ L-J besiyeri	Toplam
Balgam	13	2	7	22
BOS	3	-	1	4
Biyopsi materyali	3	-	1	4
Abse/cerahat	2	-	1	3
Plevral sıvı	-	-	1	1
<b>Toplam</b>	<b>21 (%61.7)</b>	<b>2 (%5.9)</b>	<b>11 (%32.3)</b>	<b>34</b>

Sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde 34 kültür pozitif örneğin 32'si (%94.1) Bactec sisteminde; 13'ü (%38.2) L-J besiyerinde üremiştir. Sadece 2 örnek (% 5.9) L-J besiyerinde ürediği halde Bactec sisteminde üretilmemiştir.

Bactec 12B ve Löwenstein-Jensen besiyeri üreme süreleri yönünden karşılaştırıldığında, L-J besiyerinde ortalama üreme süresi 24.3 gün; Bactec 12B besiyerinde 11.5 gün olarak belirlenmiştir.

Çalışma kapsamına alınan 340 klinik örnek kontaminasyon yönünden incelendiğinde Bactec 12B besiyerinde 22 (%6.4), L-J besiyerinde 25 (%7.3) kültür kontamine olmuştur.

Preparat ve kültür sonuçlarının değerlendirilmesinde metodolojik araştırmalar kullanılmıştır (Tablo 6).Bu tabloya göre sonuçlar birçok farklı değerlendirmeye tabi tutulabilir, ancak en sık kullanılan değerler sensitivite, spesifite, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değer'dir.Bu nedenle çalışmamızın sonuçları bildirilirken sadece bu değerler göz önüne alınmıştır(40).

Tablo 6 : Kültür ve preparat sonuçlarının karşılaştırılması.

YENİ TEST	GEÇERLİ(REFERANS) TEST	
	Hasta	Sağlam
Hasta	a Doğru pozitifler	b Yanlış pozitifler
Sağlam	c Yanlış negatifler	d Doğru negatifler
Toplam	a+c (Toplam hasta)	b+d (Toplam sağlam)

**a)Sensitivite (Duyarlılık):** Geçerliliği belirlenecek olan ölçüm yönteminin gerçekten hasta olanlardan ne kadarını hasta olarak saptayabildiğini gösterir. Kültürü pozitif bulunan hastalar 'gerçek hasta' olarak kabul edildiğinden, kültürün yanısıra kullanılan tanı deneyinin (bu çalışmada boyama yöntemleri) gerçek hastalar içindeki hastaları ayırd edebilme yeteneğidir.

$$\text{Sensitivite} = \frac{a}{a+c} \times 100 = \frac{\text{Yeni testin saptadığı hastalar(doğru pozitifler)}}{\text{Toplam hasta sayısı (Geçerli teste göre)}}$$

**b)Spesifite (Özgüllük):** Geçerliliği belirlenecek olan yeni yönteminin, sağlam olanlardan ne kadarını doğru olarak (sağlam) saptayabildiğini gösterir.Kültürü negatif hastalar 'gerçek sağlam' olarak kabul edilir ve spesifikite kullanılan tanı deneyinin gerçek sağlamlar içinden hastaları ayırd edebilme yeteneğidir.

$$\text{Spesifite} = \frac{d}{b+d} \times 100 = \frac{\text{Yeni testin saptadığı sağlamlar (doğru negatifler)}}{\text{Toplam sağlam sayısı (Geçerli teste göre)}}$$

**c)Gerçek pozitiflik (pozitif prediktif değer):** Kullanılan tanı değeri sonucu pozitif olan (preparatı + hasta) kişinin gerçekten hasta olma olasılığıdır ve infeksiyonun toplumdaki prevalansı ile yakından ilgilidir.

$$\text{Pozitif prediktif değer} = \frac{a}{a+b} = \frac{\text{Doğru pozitifler (Referans teste göre)}}{\text{Toplam pozitifler (Yeni teste göre)}}$$

**d)Gerçek negatiflik (negatif prediktif değer):** Uygulanan yeni tanı testine göre negatif sonuç veren kişilerin ne kadarının gerçekten sağlam (preparat - hasta) olduğunu gösterir.

$$\text{Negatif prediktif değer} = \frac{d}{c+d} = \frac{\text{Doğru negatifler (Referans teste göre)}}{\text{Toplam negatifler (Yeni teste göre)}}$$

Bu sistemle preparat ve kültür sonuçları karşılaştırıldığında, Bactec 12B besiyerinde kültürü pozitif bulunan 20 balgam örneğinin (n=166) 12'sinin (%7.2) preparatı ZN boyama yöntemi ile pozitif bulunmuştur. 2 örneğin preparatı pozitif bulunmuş, ancak kültürde ürememiştir. 8 balgam örneği ise preparatta negatif, kültürde pozitif sonuç vermiştir. 144 balgam örneğinin kültür ve preparat sonuçları birbirine paralel olarak negatif bulunmuştur (Tablo 7).



Bactec 12B besiyerinde belirlenen kültür pozitifliği ile FK boyama yöntemi karşılaştırıldığında, 20 kültür pozitif balgam örneğinin 14'ü (%8.4) FK boyama yöntemi ile pozitif bulunmuştur. 2 örnek preparatla pozitif sonuç verdiği halde, kültürde ürememiştir. 6 balgam örneği ise preparatta negatif, kültürde pozitif sonuç vermiştir. 144 balgam örneği ise hem preparat, hem de kültürde negatif sonuç vermiştir (Tablo 8).

Tablo 7 : Balgam örneklerinde Bactec 12B besiyeri, ZN boyama yöntemi sonuçlarının karşılaştırılması.

Preparat	Kültür		Toplam
	+	-	
+	12	2	14
-	8	144	152
Toplam	20	146	166

Duyarlık : %60

Özgüllük : %98.6

Gerçek pozitiflik : %85.7

Gerçek negatiflik : %94.7

Tablo 8 : Balgam örneklerinde Bactec 12B besiyeri ve FK boyama yöntemi sonuçlarının karşılaştırılması.

Preparat	Kültür		Toplam
	+	-	
+	14	2	16
-	6	144	150
Toplam	20	146	166

Duyarlık : %70

Özgüllük : %98.6

Gerçek pozitiflik : %87.5

Gerçeknegatiflik:%96

L-J besiyerinde üreme gösteren 9 balgam örneğinin 6'sı (%3.6) ZN boyama yöntemi ile pozitif olarak belirlenmiştir. 8 örnek preparatta pozitif sonuç verdiği halde kültürde üreme olmamıştır. 3 balgam örneği ise preparatta negatif sonuç verirken kültürleri pozitif olarak belirlenmiştir. 149 balgam örneğinin ise preparat ve kültür sonuçları negatif olarak bulunmuştur (Tablo 9).

L-J besiyerinde belirlenen kültür pozitifliği ile, FK boyama yöntemi karşılaştırıldığında, 9 kültür pozitif balgam örneğinin 8'i (%4.8) FK boyama yöntemi ile de pozitif olarak belirlenmiştir. 8 balgam örneği preparatta pozitif sonuç verirken, kültürde ürememiştir. 1 balgam örneği ise, preparatta negatif sonuç verdiği halde, L-J besiyerinde üremiştir. 149 balgam örneğinin preparat ve kültür sonuçları birbirine paralel olarak negatif bulunmuştur (Tablo 10).

Tablo 9 : Balgam örneklerinde L-J besiyeri ve ZN boyama yöntemi sonuçlarının karşılaştırılması.

Preparat	Kültür		Toplam
	+	-	
+	6	8	14
-	3	149	152
Toplam	9	157	166

Duyarlılık : %66

Özgüllük : %94.9

Gerçek pozitiflik : %42.8

Gerçek negatiflik : %98

**Tablo 10 : Balgam örneklerinde L-J besiyeri ve FK boyama yöntemi sonuçlarının karşılaştırılması.**

Preparat	Kültür		Toplam
	+	-	
+	8	8	16
-	1	149	150
Toplam	9	157	166

Duyarlık : %88.8

Özgüllük : %94.9

Gerçek pozitiflik : %50

Gerçek negatiflik:%99.3

Bactec 12B ve L-J besiyerinde kültürü yapılan 166 balgam, 62 BOS, 10 biyopsi ve 11 abse/cerahat olmak üzere 249 klinik örneğin Bactec 12B besiyerindeki kültür sonuçları ile ZN boyama yönteminden elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, Bactec 12B besiyerinde kültürü pozitif bulunan 31 klinik örneğin 13'ü (%5.2) ZN boyama yöntemi ile pozitif sonuç vermiştir. 2 örnek preparatta pozitif sonuç verdiği halde, kültürde üreme olmamıştır. 18 klinik örnek ise negatif preparat sonucu verdiği halde, kültürde üremiştir. 216 örneğin hem preparat, hem kültür sonucu negatif olarak belirlenmiştir (Tablo 11).

Bactec 12B besiyerindeki kültür sonucu ile FK boyama yöntemi karşılaştırıldığında kültürü pozitif bulunan 31 klinik örneğin 15'i (%6) FK yöntemi ile pozitif bulunmuştur. 2 örnek ise preparatta görüldüğü halde kültürde üreme olmamıştır. 16 klinik örnek preparatta negatif sonuç verirken kültürde üremiştir.216 örneğin hem preparat, hem kültür sonucu negatif olarak belirlenmiştir (Tablo 12).

Tablo 11 : 249 klinik örneğin Bactec 12B besiyeri ve ZN boyama yöntemi sonuçlarının karşılaştırılması.

Preparat	Kültür		Toplam
	+	-	
+	13	2	15
-	18	216	234
Toplam	31	218	249

Duyarlık : %41.9

Özgüllük : %99

Gerçek pozitiflik : %86.6

Gerçek negatiflik : %92.3

Tablo 12 : 249 klinik örneğin Bactec 12B besiyeri ve FK boyama yöntemi sonuçlarının karşılaştırılması.

Preparat	Kültür		Toplam
	+	-	
+	15	2	17
-	16	216	232
Toplam	31	218	249

Duyarlık : %48.3

Özgüllük : %99

Gerçek pozitiflik : %88.2

Gerçek negatiflik: %93.1

L-J besiyerinde kültürü pozitif bulunan 12 klinik örneğin 7'si (%2.8) ZN boyama yöntemi ile pozitif bulunmuştur. 8 örnek preparatta görüldüğü halde kültürlerinde üreme olmamış, 5 klinik örnek preparatta negatif sonuç verirken kültürde üremiştir. 229 klinik örneğin hem preparat, hem kültür sonucu negatif olarak belirlenmiştir (Tablo 13).

L-J besiyerinde kültürü pozitif bulunan 12 klinik örneğin 9'u (%3.6) FK boyama yöntemi ile pozitif bulunmuştur. 8 örnek preparatta görüldüğü halde kültürlerinde üreme olmamış, 3 örnek preparatta negatif sonuç verirken kültürde üremiştir. 229 klinik örneğin hem preparat, hem kültür sonucu negatif olarak belirlenmiştir (Tablo 14).

Tablo 13 : 249 klinik örneğin L-J besiyeri ve ZN boyama yöntemi sonuçlarının karşılaştırılması.

Preparat	Kültür		Toplam
	+	-	
+	7	8	15
-	5	229	234
Toplam	12	237	249

Duyarlık : %58.3

Özgüllük : %96.6

Gerçek pozitiflik : %46.6

Gerçek negatiflik : %97.8

**Tablo 14 : 249 klinik örneğin L-J besiyeri ve FK boyama yöntemi sonuçlarının karşılaştırılması.**

Preparat	Kültür		Toplam
	+	-	
+	9	8	17
-	3	229	232
Toplam	12	237	249

Duyarlık : %75

Özgüllük : %96.6

Gerçek pozitiflik : %52.9

Gerçek negatiflik : %98.7

16 plevral sıvı örneğinin 1'i preparatlarda negatif olmasına rağmen, kültürde üremiştir. İdrar örneklerinden 1'i ZN boyama yöntemi ile pozitif sonuç vermiş, ancak kültürde üreme olmamıştır. Tüm örnekler gözönünde bulundurulduğunda, 340 klinik örneğin 34'ü (%10) kültürde üremiş, bu 34 pozitif kültürün 13'i (%3.8) ZN boyama yöntemi ile, 18'i (%5.3) FK boyama yöntemi ile pozitif sonuç vermiştir. ZN boyama yönteminde 21, FK boyama yönteminde 16 örnekten preparat negatif sonucu alınmış, ancak bu örnekler kültürde üremiştir. ZN boyama yönteminde 3 örnek pozitif preparat sonucu verdiği halde, kültürde ürememiştir (Tablo 15, 16).

340 klinik örnekten izole edilen 34 (%10) mikobakteri suşuna NAP identifikasyon deneyi uygulanmış ve bu suşlar M.tuberculosis kompleks ve MOTT basilleri olarak tanımlanmıştır. 166 balgam örneğinden izole edilen 22 mikobakteri suşunun 20'si (%90.9) M.tuberculosis kompleks, 2'si (%9.1) MOTT basili olarak tanımlanmıştır. Diğer örneklerden izole edilen mikobakteri suşlarının tümü M.tuberculosis kompleks olarak tanımlanmıştır. Tüm klinik örnekler değerlendirildiğinde, izole edilen 34 mikobakteri suşunun 32'si (%94.1) M.tuberculosis kompleks, 2'si (%5.9) MOTT basilleri olarak tanımlanmıştır.

Tablo 15 :34 mikobakteri suşunun kültür ve ZN boyama yöntemi sonuçlarının karşılaştırılması.

Preparat	Kültür		Toplam
	+	-	
+	13	3	16
-	21	303	324
Toplam	34	306	340

Duyarlık : %38.2

Özgüllük : %99

Gerçek pozitiflik : %81

Gerçek negatiflik : %93.5

Tablo 16 : 34 mikobakteri suşunun kültür ve FK boyama yöntemi sonuçlarının karşılaştırılması.

Preparat	Kültür		Toplam
	+	-	
+	18	-	18
-	16	306	322
Toplam	34	306	340

Duyarlık : %52.9

Özgüllük : %100

Gerçek pozitiflik : %100

Gerçek negatiflik : %95

Tanımlanan 32 M.tuberculosis kompleks suşuna, Bactec tekniği ile duyarlılık deneyi uygulanmış ve deneyde primer antitüberkülo ilaçlar olan isoniazid (INH), etambutol (EMB), rifampin (RIF) ve streptomisin (SM) kullanılmıştır. Bactec tekniği MOTT basillerinin duyarlılık deneyi için önerilmediğinden bu suşların duyarlılığı yapılmamıştır.

Buna göre balgamdan izole edilen 20 M.tuberculosis kompleks suşunun 17'si (%85) streptomisine duyarlı, 3'ü (%15) dirençli; 15'i (%75) isoniazide duyarlı, 5'i (%25) dirençli; 17'i (%85) rifampine duyarlı, 3'si (%15) dirençli; 16'sı (%80) etambutole duyarlı, 4'ü (%20) dirençli olarak bulunmuştur.

BOS örneklerinden izole edilen 4 M.tuberculosis suşunun 2'si (%50) isoniazide ve rifampine duyarlı, 2'si(%) dirençli; 3'ü (%75) etambutole duyarlı, 1'i (%25) dirençli; tümü streptomisine duyarlı olarak bulunmuştur. BOS örneklerinden hem INH, hem rifampine dirençli 1(%25) suş izole edilmiştir.

Plevral biyopsi örneklerinden izole edilen 4 M.tuberculosis suşunun 3'ü (%75) isoniazid ve rifampine duyarlı, 1'i (%25) dirençli; tümü streptomisin ve etambutole duyarlı bulunmuştur. Bu örneklerden multipl dirençli suş izole edilmemiştir.

Abse/cerahat örneklerinden izole edilen M.tuberculosis kompleks suşlarının tümü (%100) antitüberkülo ilaçlara duyarlı bulunmuştur.

Plevra sıvısından izole edilen 1 M.tuberculosis kompleks suşu tüm ilaçlara dirençli bulunmuştur.

Tüm suşlar değerlendirildiğinde izole edilen 32 M.tuberculosis kompleks suşunun 28'i (%87.5) streptomisine duyarlı, 4'ü (%12.5) dirençli; 23'ü (%71.9) isoniazide duyarlı, 9'u (%28.1) dirençli; 25'si (%78.1) rifampine duyarlı, 7'si (%21.8) dirençli; 26'sı %81.2 etambutole duyarlı, 6'sı (%18.7) dirençli olarak bulunmuştur (Tablo 17). 32 suşun 14'ü (%43.7) en az bir ilaca dirençli bulunmuştur. 6 suş (%18.7) bir ilaca, 5 suş (% 15.6) iki ilaca, 2 suş (%6.2) üç ilaca ve 1suş (%3.1) dört ilaca dirençli bulunmuştur.



Tablo 17 : 32 M.tuberculosis kompleks suşunun anti-tüberküloz ilaçlara duyarlılığı.

Antitüberküloz ilaçlar

Klinik örnek	n	SM		INH		RIF		EMB	
		Du	Di	Du	Di	Du	Di	Du	Di
Balgam	n=20	17 (%85)	3 (%15)	15 (%75)	5 (%25)	17 (%85)	3 (%15)	16 (%80)	4 (%20)
BOS	n=4	4	-	2 (%50)	2 (%50)	2 (%50)	2 (%50)	3 (%75)	1 (%25)
Plevral biyopsi	n=4	4	-	3 (%75)	1 (%25)	3 (%75)	1 (%25)	4	-
Abse/cerahat	n=3	3	-	3	-	3	-	3	-
Plevral sıvı	n=1	-	1	-	1	-	1	-	1
<b>Toplam</b>	<b>n=32</b>	<b>28 (%87.5)</b>	<b>4 (%12.5)</b>	<b>23(%71.9)</b>	<b>9(%28.1)</b>	<b>25(%78.1)</b>	<b>7(%21.8)</b>	<b>26(%81.2)</b>	<b>6(%18.7)</b>

## TARTIŞMA

Tüberküloz, tanı ve tedavi yöntemdeki ilerlemelere karşın, bütün dünyada özellikle gelişmekte olan ülkelerde, yaygın olarak bulunan infeksiyonlardan biridir. Özellikle son yıllarda immünsüprese hasta popülasyonunun artışına paralel olarak tüberküloz olgu sayısında da artış olmuştur.

Tüberküloz hastalarının erken tanı ve tedavisi bu hastalıktan toplumun korunmasında en etkili yoldur. Bu nedenle tüberküloza yakalandığı düşünülen hastaların tanılarını kanıtlayacak, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, hızlı sonuç veren, uygulaması kolay ve pahalı olmayan laboratuvar yöntemlerinin günlük kullanıma girmesi önemli bir gereksinimdir.

Tüberküloz olgularının zaman geçirilmeden tanımlanması için konvensiyonel yöntemlerle karşılaştırmalı araştırmalar yapılmakta ve daha kısa sürede sonuç veren teknikler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda şu sonuçlar alınmıştır.

Abe ve ark (41), 245 balgam örneğinden 86 mikobakteri suşu (%35.1) izole etmişler ve bu suşların %93'ünün Bactec sisteminde, %75.6'sının yumurtalı Ogawa besiyerinde ürediğini belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar Bactec sisteminde en erken üreme süresini ortalama 13.4 gün, yumurtalı Ogawa besiyerinde 21.7 gün olarak bulmuşlardır.

Luguin ve ark (42), 1840 klinik örnekten 257 mikobakteri suşu izole etmişler ve bu suşların 225'ini (%87.5) Bactec sisteminde, 165'ini (%64.2) L-J besiyerinde izole ettiklerini bildirmişlerdir. Bactec sisteminde üreme süresini ortalama 11.8 gün, L-J besiyerinde 24.6 gün olarak bulmuşlardır. Bactec sisteminde %2.1, L-J besiyerinde %7.3 oranında kontaminasyon bulmuşlardır.

Wilson ve ark (43) 5399 klinik örnekten 580 mikobakteri suşu izole etmişler ve bu suşların 506'sını (%87) Bactec sisteminde, 230'unu (% 40) L-J besiyerinde izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Roggenkamp ve ark (44) 3700 klinik örnekten 123 (%3.3) mikobakteri suşu izole etmişler ve bu suşların 112'sini (%91) Bactec sisteminde, 66'sını (%53) L-J besiyerinde izole etmişlerdir. Bactec sisteminde üreme süresini ortalama 15.4, L-J besiyerinde 29.8 gün olarak bulmuşlardır.

Somoskövi ve ark (45) 357 klinik örnekten 57 (%15.9) mikobakteri suşu izole etmişler ve bu suşların 53'ünü (%93) Bactec sisteminde, 46'sını (%80.7) L-J besiyerinde izole ettiklerini bildirmişlerdir. Ortalama üreme süresini preparat pozitif örneklerde Bactec sisteminde 13.8 gün, L-J besiyerinde 20.1 gün; preparat negatif örneklerde Bactec sisteminde 17.7 gün, L-J besiyerinde 42.2 gün olarak bulmuşlardır. Bactec sisteminde %2.9, L-J besiyerinde %1.2 oranında kontaminasyon bulmuşlardır (43).

Uzun (12), 346 klinik örnekten 36 (%10.4) mikobakteri suşu izole etmiş ve bu suşların 34'ünü (%94.4) Bactec sisteminde, 17'sini (%47.2) L-J besiyerinde üretmiştir. Bactec sisteminde üreme süresini preparatı pozitif örneklerde 10 gün, negatif örneklerde 15 gün, L-J besiyerinde 24 gün olarak bulmuştur. Bactec sisteminde %6, L-J besiyerinde %7 kontaminasyon bulmuştur.

Koç ve ark (46) 2254 klinik örnekten 102 mikobakteri suşu izole etmişler ve bu suşların 78'ini (%76.5) Bactec sisteminde, 50'sini (%49) L-J besiyerinde ürediğini bulmuşlardır. Bactec sisteminde üreme süresini ortalama 11.6 gün, L-J besiyerinde 21.7 gün olarak bulmuşlardır. Bactec sisteminde %8, L-J besiyerinde %4.3 kontaminasyon bulmuşlardır.

Yaman ve ark (47). İzole ettikleri 112 M.tuberculosis suşun 100'ünü (%89.9) Bactec sisteminde, 76'sını (%67.9) L-J besiyerinde izole etmişlerdir. Bactec sisteminde ortalama üreme süresini 11.5 gün, L-J besiyerinde 22.4 gün olarak bulmuşlardır.

Çalışmamızda incelenen 340 örnekte alınan sonuçlar birlikte ele alındığında, kültürü pozitif bulunan 34 örneğin %94.1'i Bactec 12B besiyerinde, %38.2'si L-J besiyerinde üremiştir. Bactec sisteminde üreme süresi ortalama 11.6 gün, L-J besiyerinde 24.3 gün olarak belirlenmiş ve 340 örnek kontaminasyon yönünden incelendiğinde Bactec besiyerinde %6.4, L-J besiyerinde %7.3 örnek kontamine olmuştur.

Çalışmamızın Bactec kültür sonuçları ile araştırmacıların elde ettiği sonuçlar karşılaştırıldığında sonuçlar birbirine yakın bulunmuş, L-J besiyerindeki üreme oranı (%38.2) diğer çalışmalara göre daha düşük bulunmuştur. Üreme süreleri göz önüne alındığında, sonuçlarımız ile Roggenkamp'ın (44) sonuçları arasında uyumsuzluk belirlenmiş ve Roggenkamp'ın çalışmasında üretme süresinin daha uzun olması kullandığı inokülom miktarının daha düşük olmasına bağlanmıştır. Somoskövi'nin (45) Bactec sistemi ve L-J'deki, Luquin'nin (42) Bactec sistemindeki kontaminasyon oranı, çalışmamızdaki oranlara göre daha düşük bulunmuş ve bu uyumsuzluğun, bizim kullandığımız inokülom miktarının daha yüksek olmasına, kullandığımız NaOH son konsantrasyonunun düşük olmasına ve klinik örneklerin laboratuvara genelde uygun koşullarda gönderilmemesinden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Tüberküloz tanısında mikroskop incelemesi uygulama kolaylığı, düşük maliyet, çabuk sonuç verme ve klinik örnekte bulunan mikobakterilerin inceleme alanındaki sıklığını belirleme gibi özellikleri nedeniyle özellikle akciğer tüberkülozu tanısında kullanılmakla birlikte, enfeksiyona karar verme açısından mikroskop bulgusu kültür ile desteklenmelidir. Kullanılan boyama yönteminin kültür ile uyumlu sonuç vermesi, preparasyonun tanıdaki değeri hakkında bilgi vermektedir.

Tüberkülozun tanısında kullanılabilecek hızlı ve duyarlı bir yöntem arayışları sürmekle birlikte direkt mikroskopi ve kültür yaygın olarak kullanılmakta, preparasyon uygulamasının tanıda yararlı olduğu üzerinde önemle durulmaktadır (27,48).

Rickman ve moyer (49) 14509 klinik örnekte yaptıkları çalışmada L-J kültür ve fluorokrom boyama yöntemi kullanmışlar ve duyarlılığı %82.4, özgüllüğü %99, pozitif prediktif değeri %98.9, negatif prediktif değeri %97.7 olarak bulmuşlardır.

Durupınar ve ark (50) 383 klinik örnekle yaptıkları çalışmada kültürü referans yöntem olarak ZN için duyarlılığı %57.1, FK için %73.6; özgüllüğü ZN için %99.6, FK için %97.6 olarak bildirmişlerdir. Balgam örneklerinde duyarlılık %56.9, özgüllük %98.7; FK için duyarlılık %80.6, özgüllük %92.4 olarak bulmuşlardır.

Öztürkeri ve ark (51) 208 balgam örneği çalışmışlar, kültür referans yöntem olarak alındığında FK boyama yöntemi için duyarlılık %72.3, özgüllük %88.8, pozitif prediktif değer %95.9, negatif prediktif değer %47; ZN için duyarlılık %49, özgüllük %100, pozitif prediktif değer %100 ve negatif prediktif değeri %35.1 olarak bulmuşlardır.

Bekiroğlu ve ark (52) 220 balgam örneği çalışmışlar, FK boyama yöntemi için duyarlılık %86.7, özgüllük %94.3, pozitif prediktif değer %79.6, negatif prediktif değer %96.5; ZN için duyarlılık %68.9, özgüllük % 100, pozitif prediktif değer %100, negatif prediktif değeri %92.5 bulmuşlardır.

Yıldıran ve ark (53) yedi yıllık bir süre içerisinde mikobakteriyoloji laboratuvarına gönderilen 27519 klinik örneğin ZN boyama yöntemi ve kültür sonuçlarını değerlendirmişlerdir. Duyarlılığı %71.8, özgüllüğü %98.8, pozitif prediktif değeri %79.6 ve negatif prediktif değeri %98.2 olarak bulmuşlardır.

Uzun (12) 346 klinik örnek çalışmış, FK boyama yöntemi için duyarlılık %50, özgüllük%99.3, pozitif prediktif değer %92.3, negatif prediktif değer %92.5; ZN için duyarlılık%41.6, özgüllük %98.9, pozitif prediktif değer %86.9, negatif prediktif değer %91.3 olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda FK boyama yöntemi için duyarlık %52.9, özgüllük %100, gerçek pozitiflik %100 ve gerçek negatiflik %95; ZN boyama yöntemi için duyarlık %38.2, özgüllük %99, gerçek pozitiflik %81 ve gerçek negatiflik %93.5 olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda kullanılan ZN ve FK yönteminin duyarlılığı Uzun'un (12) bulduğu değerlere yakın, diğer araştırmacıların bulduğu duyarlık değerlerinden daha düşük bulunmuştur. Bu durumda kullandığımız ZN boyama yöntemi kültürü pozitif bulunan gerçek hastaların %38.2'sini, FK yöntemi %52.9'unu önceden doğru olarak tanımlayabilmektedir. Yapılan çalışmalarda duyarlılık değerleri aralığının çok fazla olduğu (ZN için %41.6-71.8, FK için %50-86.7), özgüllük değerlerinin ise birbirine çok yakın olduğu görülmektedir. Duyarlılık değerlerindeki aralığın çok fazla olması, yayma duyarlılığını etkilemesi nedeniyle; örneğin cinsi, dekontaminasyon, konsantrasyon ve dekolarizasyon işlemleri, yayma kalınlıkları, örnekteki basil sayısı ve değerlendiren kişinin deneyimi gibi faktörlerle açıklanabilir.

Çalışmamızda kültüründe üreme olan toplam 34 örneğin 21'inde (%61.7) ZN boyama yöntemiyle, 16'sında (%47) FK boyama yöntemiyle aside dirençli basil görülmemiştir. İncelenen balgam, bronko-alveoler lavaj sıvısı, idrar ve abse/cerahat örnekleri dışında kalan 107 örnek, yeterli hacimde gönderilmediğinden santrifüj edilememiş ve bu örneklerin preparatları homojenizasyon yapılmadan hazırlanmıştır. Bu nedenle 107 örnekten 9'u'da üreme olmasına rağmen (4'ü BOS, 4'ü biyopsi materyali 1'i plevra sıvısı) bunlardan sadece plevral sıvıda FK yöntemiyle pozitif sonuç alınmış, diğer örnekler preparatta negatif sonuç vermiştir. Az sayıda mikobakteri içeren ve preparatı negatif bulunan klinik örneklerin pozitif sonuç vermesi kültür sistemi duyarlılığın yüksek oluşuna bağlanmıştır.

Tüberküloz hastalığının kontrol altına alınması ve hastaların etkili bir şekilde tedavi edilebilmesi için, erken tanı ve antitüberküloz ilaçlara duyarlılık önem taşımaktadır. Tüberküloz tanısının ve ilaç duyarlılık test sonuçlarının gecikmesi tüberküloz direncinin gelişmesine katkıda bulunan önemli bir faktördür. Dirençli bir olgunun uzun süre uygun olmayan bir tedavi görmesi, çevredeki insanları enfekte etmesi açısından son derece önemlidir. Bu nedenle izolasyon, identifikasyon ve duyarlılık test sonuçlarının daha çabuk elde edilmesi önem kazanmıştır.

Lazslo ve ark (54), 245 M.tuberculosis kompleks suşunun konvensiyonel ve radyometrik yöntemle duyarlılığını yapmışlar ve konvensiyonel yöntem ile 134 suşun (%55) en az bir ilaca, 88 suşun (%36) INH'a, 76 suşun (%31) SM'e, 22 suşun (%9) RIF'e ve 21 suşun (%8.5) EMB'e dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Radyometrik sistemde ise 73 suşun (%30) SM'e, 84 suşun (%34) INH'a, 22 suşun (%9) RIF'e, 4 suşun (% 1.6) EMB'e dirençli olduğunu belirlemişlerdir.

Gül (55) izole ettiği 45 mikobakteri suşunun proporsiyon yöntemi ile direnç oranlarını incelemiş ve %30.8 INH'a, %15.3 RIF'e, %29 SM'e, %2.3 EMB'e dirençli olarak bulmuştur.

Arseven ve ark (56), Doğu Karadeniz bölgesinde 1985-1990 yılları arasında balgam kültürü pozitif 1388 hastanın ilaç direncini araştırmışlardır. 252 olguda (%18.2) bir ilaca, 162 olguda (%11.7) iki ilaca, 95 olguda (%6.8) üç ilaca ve 54 olguda (%3.9) dört ilaca birden direnç bulmuşlardır. 1388 olguda ilaçların her birine karşı toplam direnç oranları, INH, RIF, SM, ve EMB için sırasıyla %29.6,

17.1, 23.3 ve 8.8 olarak bulmuşlardır. Aynı araştırmacılar 1994 yılında 333 kültür pozitif tüberkülozlu hastada INH, RIF, SM ve EMB'e karşı toplam ilaç direncini sırasıyla %34.8, 25.2, 29.4 ve 10.5 olarak belirlemişlerdir. Aynı grupta herhangi bir ilaca karşı direnç %45.6, bir ilaca direnç %15, iki ilaca birden direnç %12.9,  ilaca birden diren%10.5 ve dört ilaca birden direnç %7.8 oranında bulunmuştur.

Taşova ve ark (57), kültürü pozitif 393 klinik örnekten ilaç direncini araştırmışlardır. İlaçların her birine karşı toplam direnç oranlarını, INH, RIF, SM ve EMB için sırasıyla %22.6, 20.6, 8.6ve 10.1 olarak bulmuşlardır. 127 olgu (%32.3) bir ve daha fazla ilaca dirençli saptanmıştır. 57 olguda (%14.9) bir ilaca, 26 olguda (%6.6) iki ilaca, 41 olguda (%10.4)  ilaca ve 3 olguda (%0.7) dört ilaca birden direnç bulmuşlardır.

Karabay ve ark (58), 214 M.tuberculosis suşunun 105'ini (%49.1) en az bir ilaca karşı dirençli bulmuşlardır. INH'e %27.1, RIF'e %21.5, SM'e %29 ve EMB'e %10.3 toplam direnç saptamışlardır. %20.1 bir ilaca, %22.4 iki ilaca, %6.4  ilaca ve %0.5 dört ilaca direnç bulmuşlardır.

ztrkeri H ve ark (59), 206 M.tuberculosis suşunun 102'sini (%49.5) en az bir ilaca karşı dirençli bulmuşlardır. INH'e %33.9, RIF'e %20.3, SM'e %13.5 ve EMB'e %19.9 oranında direnç saptamışlardır. %24.3 bir ilaca, %14.2 iki ilaca, %9.2  ilaca ve %1.9 dört ilaca direnç bulmuşlardır.

Balcı ve ark (60), 199 suşun 90'nını (%45.2) en az bir ilaca karşı dirençli bulmuşlardır. INH'e %37.2, RIF'e %21.1, SM'e % 9 ve EMB'e %17.5 oranında direnç saptamışlardır. Sadece bir ilaca direnç %17.6, iki ilaca birlikte direnç %15.6,  ilaca birlikte direnç ise %12 bulmuşlardır. İlaçların tümüne birden direnç gösteren suş saptamamışlardır.

Uzun (12), 42 M.tuberculosis kompleks suşunu INH, RIF, SM ve EMB'e sırasıyla %14.2, 4.8, 7.2 ve 4.8 olarak bulmuştur. Sadece 3 olguda (%7) iki ilaca direnç saptamıştır.

Çalışmamızda izole edilen 32 M.tuberculosis kompleks suşunun 28'i (%87.5) streptomisine duyarlı, 4'ü (%12.5) dirençli; 23'ü (%71.9) isoniazide duyarlı, 9'u (%28.1) dirençli; 25'si (%78.1) rifampine duyarlı, 7'si (%21.8) dirençli; 26'sı %81.2 etambütöle duyarlı, 6'sı (%18.7) dirençli olarak bulunmuştur. 32 suşun 14'ü (%43.7) en az bir ilaca dirençli bulunmuştur. 6 suş (%18.7) bir ilaca, 5 suş (%15.6) iki ilaca, 2 suş (%6.2) üç ilaca ve 1suş (%3.1) dört ilaca dirençli bulunmuştur.

Ülkemizde antibiyotik duyarlılık testleri karşılaştırmalı olarak incelendiğinde araştırmacılar en yüksek direnç oranını isoniazide karşı bulmuşlardır. Çalışmamızda da %28.1'lik direnç oranı ile isoniazid, direnç oranı en yüksek antitüberküloz olarak bulunmuştur. Direnç oranı en düşük antitüberküloz olarak incelendiğinde ise; Arseven ve ark (56), Karabay ve ark(58), Uzun (12) ile Gül (55) direnç oranları %1.6 – 10.5 arasında değişmek üzere etambütölü, Taşova ve ark (57), Öztürkeri ve ark (59) ile Balcı ve ark (60) oranları %8.6 – 13.5 arasında değişmek üzere streptomisini direnç oranı en düşük antitüberküloz olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda %12.5 direnç oranıyla streptomisin , direnç oranı en düşük antitüberküloz olarak bulunmuştur. Gül'ün (55) 1981 yılında Diyarbakır ilinde yaptığı çalışmada rifampine %15.3, etambütöle %2.3 oranında direnç bulmuştur. Çalışmamızda rifampine %21.8, etambütöle %18.7 direnç bulunmuştur. Bölgemizde son yıllarda direnç oranı düşük antitüberküloidlere karşı da direnç gelişiminin arttığı görülmektedir.

Yapılan çalışmalarda multipl direnç oranı %17.7 –30.2 arasında değişmektedir. Çalışmamızda multipl dirençli suş oranı %24.9 olarak diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur. Bu direnç sonuçları, ülkemizde tüberküloz suşlarına yüksek sıklıkta multipl direnç olduğunu göstermektedir. Bu durum tüberküloz olgularında direncin araştırılması ve tedavinin alınacak sonuca göre yönlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.



## SONUÇLAR

- 1- 340 klinik örneğin ZN (Ziehl-Neelsen), FK (Fluorokrom) boyama ve Bactec, LJ (Löwenstein-Jensen) kültür yöntemleri ile incelendiği çalışmada, 166 balgam örneğinin 14'ü (%8.4) ZN boyama yöntemi, 16'sı (%9.6) FK yöntemi ile; 11 abse/cerahat örneğinin 1'i (%9.1) ZN boyama yöntemi, 1'i (%9.1) FK boyama yöntemi ile; 43 idrar örneğinin 1'i sadece ZN boyama yöntemi ile; 16 plevral sıvı örneğinin 1'i (%6.2) sadece FK boyama yöntemi ile aside dirençli bakteriler açısından pozitif bulunmuştur. Bütün klinik örnekler göz önünde bulundurulduğunda 340 örneğin, ZN boyama yöntemi ile 16'sı (%4.7), FK boyama yöntemi ile 18'i (%5.3) aside bakteriler yönünden pozitif bulunmuştur.
- 2- Preparat boyama süresi ZN yönteminde daha kısa bulunurken, mikroskopta inceleme süresi FK yönteminde daha kısa bulunmuştur.
- 3- 166 balgam örneğinin 22'sinin (%13.2), 62 BOS örneğinin 4'ünün (%6.4), 10 biyopsi örneğinin 4'ünün (%40), 11 abse/cerahat örneğinin 3'ü (%27.7), 16 plevral sıvı örneğinin 1'inin (%6.2) kültüründe üreme olmuştur. Sonuç olarak 340 klinik örneğin 34'ünde (%10) üreme olmuştur.
- 4- 34 kültür pozitif örneğin 21'i (%61.7) sadece Bactec 12B besiyerinde; 2'si (%5.9) Löwenstein-Jensen besiyerinde; 11'i (%32.3) hem Bactec, hem Löwenstein-Jensen besiyerinde üremiştir. Sonuç olarak 34 kültür pozitif örneğin 32'si (%94.1) Bactec sisteminde; 13'ü (%38.2) L-J besiyerinde üremiştir.
- 5- Bactec 12B ve L-J besiyeri üreme süreleri yönünden karşılaştırıldığında, L-J besiyerinde ortalama üreme süresi 24.3 gün, Bactec 12B besiyerinde 11.5 gün olarak belirlenmiştir.  
Çalışma kapsamına alınan 340 klinik örnek kontaminasyon yönünden incelendiğinde Bactec 12B besiyerinde %6.4, L-J besiyerinde %7.3 kültür kontamine olmuştur.
- 6- Genel bir değerlendirme yapıldığında, gerek üretimdeki yüzdesinin yüksek oluşu, gerekse erken sonuç vermesi açısından Bactec 12B besiyerinin L-J besiyerine göre daha üstün olduğu sonucuna varılmıştır.

- 7- ZN-FK boyama , Bactec 12B ve L-J kültür yöntemleri karşılaştırıldığında, kültürde üreme gösteren 34 örneğin 13'ü (%38.2) ZN; 18'i (%52.9)FK boyama yöntemi ile de pozitif bulunmuştur.
- 8- 340 örnekten izole edilen 34 mikobakteri suşuna NP identifikasyon deneyi uygulanmış ve suşların 32'si (%94.1) M.tuberculosis kompleks, 2'si (5.9) MOTT basilleri olarak tanımlanmıştır.
- 9- İzole edilen 32 M.tuberculosis kompleks suşunun Bactec tekniği ile duyarlılığı yapılmış ve bu suşların 28'i (%87.5) streptomisine duyarlı, 4'ü (%12.5) dirençli; 23'ü (%71.9) isoniazide duyarlı, 9'u (%28.1) dirençli; 25'si (%78.1) rifampine duyarlı, 7'si (%21.8) dirençli; 26'sı %81.2 etambutole duyarlı, 6'sı (%18.7) dirençli olarak bulunmuştur . 32 suşun 14'ü (%43.7) en az bir ilaca dirençli bulunmuştur. 6 suş (%18.7) bir ilaca, 5 suş (% 15.6) iki ilaca, 2 suş (%6.2) üç ilaca ve 1suş (%3.1) dört ilaca dirençli bulunmuştur.

## ÖZET

Bu çalışmada 340 klinik örnek, tüberküloz yönünden Ziehl-Neelsen, fluorokrom boyama ve Bactec, Löwenstein-Jensen kültür yöntemleri ile incelenmiş ve fluorokrom yönteminin tanıdaki değeri araştırılmıştır.

İncelenen 340 klinik örneğin 34'ünden (%10) pozitif kültür sonucu alınmış ve 34 kültür pozitif örneğin 13'ü (%3,8) Ziehl-Neelsen ile; 18'i (%5.3) fluorokrom boyama yöntemi ile pozitif olarak bulunmuştur.

Uygulanan NAP idantifikasyon deneyi sonucunda 34 suşun 32'si (94.1) M.tuberculosis kompleks, 2'si (%5.9) MOTT basilleri olarak tanımlanmıştır.

İzole edilen 32 M.tuberculosis complex suşunun streptomisin, INH, rifampin ve etambutole duyarlılıkları Bactec sistemi ile değerlendirilmiştir. Bu suşların 4'ü (%12.5) streptomisine dirençli, 9'u (%28.1) INH'a dirençli, 7'si (%21.8) rifampine dirençli 6'sı (%18.7) etambutole dirençli olarak bulunmuştur. Total ilaç direnci %43.7 olarak bulunmuştur. 6 suş (%18.7) bir ilaca, 5 suş (% 15.6) iki ilaca, 2 suş (%6.2) üç ilaca ve 1 suş (%3.1) dört ilaca dirençli bulunmuştur.

## **SUMMARY**

In this study, 340 clinic specimens were investigated for assignment of tuberculosis by Ziehl –Neelsen, fluorochrome stain and Bactec, Löwenstein – Jensen culture method. In addition, the sensitivity of fluorochrome method for determination of tuberculosis was evaluated.

34 of 340 clinic specimens (10%) were found to be positive in culture. Thirteen (3.8%) of these positive cultures were found to be positive also by Ziehl –Neelsen and 18 (5.3%) by fluorochrome stain.

Bactec NAP identification test was applied for Mycobacterium strains. 32 (94.1%) of 34 isolates were identified as M.tuberculosis complex and 2 (5.9%) were as MOTT bacilli.

The sensitivity of isolated 32 M.tuberculosis complex strains to streptomycin, INH, rifampin and etambutol were evaluated by Bactec system. Four (12.5%) of the strains were resistant to streptomycin, 9 (28.1%) to INH, 7 (21.8%) to rifampin and 6 (18.7%) to etambutol. Total drug resistance was 43.7 %. Six (18.7%) of the 32 strains were resistant to one of the drugs, 5 (15.6%) to two of the drugs, 2 (6.2%) to three of the drugs and 1 (3.1%) to four of the drugs.

## KAYNAKLAR

1. Kıyan M. Mycobacteriaceae. Ustaçelebi Ş, ed. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 419-437.
2. Saniç A, Çoban AY. Mikobakteriler ve Laboratuvar Tanı. Samsun, 1999: 1-2.
3. Eraksoy H. Tüberküloz, Geçmişten Günümüze. İnfeksiyon Bülteni 1996; 1(1): 38-40.
4. Anğ Ö, Erturan Z, Uzun M. Dünyada ve Türkiye'de Tüberküloz. İnfeksiyon Derg 1997; 11 (4:Ek yayın): 1-5.
5. Aşcıoğlu SA, Hayran M. Tüberküloz. İnfeksiyon Bülteni 1996; 1(1): 5-8.
6. Anğ Ö, Erturan Z. Tüberkülozun dönüşü ve direnç sorunu. Anğ Ö, Uzun M, eds. Tüberküloz tanı, direnç, tedavi. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, No:26, 1996: 17-25.
7. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA, Brooks GF, Butel JS, Ornston LN. Medical Microbiology. 20<sup>th</sup> eds. Connecticut: Prentice-Hall International Inc, 1995: 263.
8. Roberts GD, Koneman EW, Kim YK. Mycobacterium. In: Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, ShadomyHJ, eds. Manuel of Clinical Microbiology. 5<sup>th</sup> ed. Washington DC: American Society for Microbiology, 1991: 304-332.
9. Murray PR, Drew WC, Kobayashi GS, Thompson JH. Medical Microbiology. Wolfe Medical Publication Ltd, Mosby Company, 1990: 218.
10. Keleşoğlu N. Tüberküloz tanısında bakteriyolojik yöntemler. Kocabaş A ed. Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü. Ankara: Emel Matbaası, 1991: 211-217.
11. Berlin OGW. Mycobacteria. Baron EJ, Finegold SM, eds. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 8th ed. St louis, Philadelphia, Toronto Baltimore: The CV Mosby Company, 1990: 597.
12. Uzun M. Tüberküloz tanısında Erlich-Ziehl-Neelsen, Fluorokrom boyama yöntemleri ile Bactec ve Löwenstein-Jensen kültür yöntemlerinin sonuçlarının değerlendirilmesi. İst. Üniv. Sağ. Bil. Enst. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi, 1994.

13. Siddiqi SH. Bactec TB System, Product and Procedure Manual. Becton Dickinson, 1989.
14. Gümüşlü F, Ceyhan İ, Kocagöz T, Sönmez N. Tüberküloz laboratuvar rehberi. Ankara: T.C Sağlık Bakanlığı, 1998: 1-20.
15. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Mycobacteria. Color Atlas and Textbook of Diagnostik Microbiology. 5th ed. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1997: 703.
16. Bilgehan H. Klinik mikrobiyoloji, özel bakteriyoloji ve bakteri enfeksiyonları. Mycobacteriaceae. İzmir: Barış Yayınları, 1994: 343-379.
17. Gedikoğlu S. Mycobacterium tuberculosis'in hücre yapısı. İnfeksiyon Derg 1997; 11(4:Ek yayın): 13-17.
18. Kocabaş A. Mikobakterilerin yapısal ve antijenik özellikleri. Kocabaş A ed. Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü. Ankara: Emel Matbaası, 1991: 47.
19. Kılıçturgay K. Tüberkülozda immünopatogenez. İnfeksiyon Derg 1997; 11(4:Ek yayın) : 7-10.
20. Samuelson J. Infectious Diseases. Cotran RS, Kumar V, Collins T, eds. Robbins Pathologic Basis of Disease. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia, 1999: 349-351.
21. Bayındır Ü. Solunum Sistemi Hastalıkları. Öbek A, ed. İç Hastalıkları, 3.baskı . Atlas Ofset, 1988: 427.
22. Balcı K . Göğüs hastalıkları: Plevra hastalıkları. 3. Baskı. Konya: Atlas Kitabevi, 1993: 495-525.
23. Kocagöz T. Yeni laboratuvar yöntemleri ile tüberküloz tanısı. infeksiyon Derg 1997; 11(4:Ek yayın): 29-33.
24. Kasımoğlu Ö. Tüberküloz tanısında yeni gelişmeler. Anđ Ö, Uzun M eds. Tüberküloz tanı, direnç, tedavi. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No:26, 1996: 11-15.
25. Witebsky FG, Conville PS. The laboratory diagnosis of Mycobacterial diseases. Infec Dis Clin North Amer 1993; 7 (2): 359.

26. Bilgehan H. Klinik mikrobiyolojik tanı: Mycobacteriumlar. 2.Baskı. İzmir: Barış yayınları, 1995: 567-584.
27. Arıkan S. Tüberküloz tanısında direkt mikroskopik inceleme ve kültür. İnfeksiyon Bülteni 1996; 1 (1): 9-12.
28. Kasımoğlu Ö. Tüberküloz mikrobiyolojisi. Klimik Dergisi 1989; 2: 3.
29. Palaci M, Uleki SYM, Sato DN et al. Evaluation of mycobacteria growth indicator tube for recovery and drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis isolates from respiratory specimens. J Clin Microbiol 1996; 34:762.
30. Badak FZ, Kiska DL, Setterquist S et al. Comparison of mycobacteria growth indicator tube with BACTEC 460 for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. J Clin Microbiol 1996; 34:2236-2239.
31. Cornfield DB, Beavis KG, Greene JA, Bojak M, Bondi J. Mycobacterial growth and bacterial contamination in the Mycobacteria Growth Indicator Tube and BACTEC 460 culture systems. J Clin Microbiol 1997; 35: 2068-2071.
32. Bennedson J, Thomsen VO, Pfyffer GE et al. Utility of PCR in diagnosis pulmonary tüberkülozis. J Clin Microbiol 1996; 34: 1407-1411.
33. Clarridge JE, Shawar RM, Shinnick TM et al. Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of Mycobacterium tuberculosis in a routine mycobacteriology laboratory. J Clin Microbiol 1993; 31: 2049-2056.
34. Jonas V, AldenMJ, Curry JI, et al. Detection and identification of Mycobacterium tuberculosis directly from induced spatum specimens using amplification of RNA. J Clin Microbiol 1993; 31:2410.
35. Kocabaş A. Günümüzde ve gelecekte tüberküloz tanısı. Kocabaş A ed. Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü. Ankara: Emel Matbaası, 1991: 243.
36. Över U. Antitüberküloz duyarlılık testleri. Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyon Toplantısı. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No:33, 1997: 115.

37. Yüce A. Mikobakterilerde antibiyotik duyarlılık testleri. *İnfeksiyon Derg* 1997; 11(4: Ek yayın): 47.
38. Casal M. Laboratory approaches to mycobacterial susceptibility to antibiotics. *Rev Esp Quiminterap* 1995; 8(3): 184-189.
39. Global Tubercülozis Control. WHO Report . Cenava WHO/CD S/CPC/TB/ 99, 1999: 259.
40. Tezcan S. Epidemiyoloji, Tıbbi araştırmalar yöntemi bilimi: Metodolojik Araştırmalar. Ankara: Hacettepe Halk Sağlığı Vakfı, 1992: 114-124.
41. Abe C, Hosojima S, Fukasawa Y, Kazumi Y, Takahashi M, Hirano K . Comparison of MB-Check, Bactec and Egg-Based media for recovery of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 878.
42. Luquin M, Gamboa F, Barcelo MG, Manterola M, Matas L, Gimenez M : Comparison of biphasic non-radiometric system with lowenstein-Jensen and Bactec-460 system for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Tuber Lung Disease* 1996; 77: 449-453.
43. Wilson ML, Stone BL, Hildred MV, Reves RR . Comparision of recovery rates for mycobacteria from Bactec 12B vials, Middlebrook 7H11-selective 7H11 biplates, and Lowenstein-Jensen slants in a public healt mycobacteriology laboratory. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2516-2518.
44. Roggenkamp A, Hornef MW, Masch A, Aigner B, Autenrieth IB, Heesemann J . Comparision of MB/Bact and Bactec 460 TB system for recovery of mycobacteria in a routine diagnostic laboratory. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3711-3712.
45. Somoskövi A, Ködmön C, Lantos A et al. Comparison of recoveries of *Mycobacterium tuberculosis* using the automated Bactec MGIT 960 sistem, the Bactec 460 TB sistem and Löwenstein-Jensen medium. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2395-2397.
46. Koç AN, Özcan M, Özbal Y, Fazlı ŞA . Comparison of Bactec TB system and conventional methods for recovery of *Mycobacterium tuberculosis* from clinical specimens. *İnfeksiyon Derg* 1996; 10 (1): 65-67.



47. Yaman A, Dündar İH, Aksungur P, Apan TZ. Comparison of the Bactec system and Löwenstein-Jensen medium for the isolation of Mycobacterium tuberculosis and determination of drug sensitivity with Bactec. Bull Microbiol 1994; 28: 189-198.
48. World Health Organization. Tuberculosis surveillance and monitoring. Report of a WHO Workshop. WHO /TB/91, Geneva, 1991; 163.
49. Rickman TW, Moyer NP. Increased sensitivity of acid-fast smears. J clin Microbiol 1980; 11:618.
50. Durupınar B, Birinci A, Günaydın M, Saniç A. Tüberküloz tanısında Auramine-Rhodamine boyama yönteminin güvenilirliği. Mikrobiyol Bült 1997; 31:369-374.
51. Öztürkeri H, Demir MA, Ballı S, Aydılek R, Kocabeyoğlu Ö, Yenen OŞ. Tüberküloz tanısında farklı boyama yöntemlerinin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bült 1997; 31: 231-236.
52. Bekiroğlu N, Baysallar M, Gün H. Mikobakterilerin mikroskopik tanısında kullanılan iki aside dirençli boyama yönteminin karşılaştırılması. İnfeksiyon Derg 1998; 12 (1) : 69-73.
53. Yıldırım ŞT, Özyurt M, Saraçlı MA, Gün H. Yedi yıllık bir dönemde mikobakteriyolojik örnekler için smear ve kültür sonuçlarının değerlendirilmesi: Retrospektif bir çalışma. İnfeksiyon Derg 1998; 12 (2): 151-155.
54. Laszlo A, Gill B, Handzel V, Hodgkin M, Helbecque DM . Conventional and radiometric drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis complex. J Clin Microbiol 1983; 18: 1335-1339.
55. Gül K. Tüberküloz ön tanılı hastalarda izole edilen Mycobacterium tuberculosis suşlarının bakteriyolojik özellikleri ve antitüberküloidlere karşı direnç durumları. Dicle Üni. Tıp Fak. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 1981.
56. Arseven O, Eraksoy H, Uzun Y, Sepkin C, Kalaycıoğlu A, Özmenoğlu M, Bölükbaşı O. Doğu Karadeniz bölgesinde tüberküloz ilaçlarına direnç durumu. Klimik Derg 1995; 8(2): 63-67.

57. Taşova Y, Yaman A, Saltoğlu N, Erdurak Ö, İnal S, Dündar İH. Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda tüberküloz ilaçlarına karşı saptanan direnç oranları. İnfeksiyon Derg 1997; 11 (2): 97-101.
58. Karabay O, Otkun M, Akata F, Karlıkaya C, Tuğrul M, Dündar V. Trakya bölgesinde antitüberküloz ilaç direnci ve ilişkili risk faktörleri. İnfeksiyon Derg 1999; 13(1): 43-50.
59. Öztürkeri H, Emekdaş G, Kocabeyoğlu Ö, Gözüaçık A. Isoniazid, rifampin, streptomisin ve ethambutolün tüberküloz basillerine in-vitro etkinlikleri: Bactec test yöntemi ile alınan sonuçlar. Türk Mikrobiyol Cem Derg 1999; 29: 58-60.
60. Balcı İ, Bayram A, Filiz A. Mycobacterium tuberculosis'de birinci seçenek ilaçlara direnç. İnfeksiyon Derg 1999; 13(4): 521-525.

