

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* İZOLASYONU
ÖNCESİNDE UYGULANAN İKİ FARKLI
DEKONTAMİNASYON, HOMOJENİZASYON İŞLEMİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Bio. Meltem ÖZDEN

**Mikrobiyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2019

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS İZOLASYONU
ÖNCESİNDE UYGULANAN İKİ FARKLI
DEKONTAMİNASYON, HOMOJENİZASYON İŞLEMİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI

Bio. Meltem ÖZDEN

Mikrobiyoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Yakut Akyön YILMAZ

ANKARA

2019

**MYCOBACTERIUM TUBERKULOSIS İZOLASYONU ÖNCESİNDE UYGULANAN İKİ
FARKLI DEKONTAMİNASYON, HOMOJENİZASYON İŞLEMİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Öğrenci: Meltem Özden

Danışman: Prof. Dr. Yakut Akyön Yılmaz

Bu tez çalışması 28 Aralık 2018 tarihinde jürimiz tarafından “ Mikrobiyoloji Programı” nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Cumhuri Özkuyumcu
(Hacettepe Üniversitesi)

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Yakut Akyön Yılmaz
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: Prof. Dr. Zeynep Sarıbaş
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: Prof. Dr. Ebru Us
(Ankara Üniversitesi)

Üye: Doç. Dr. Dolunay Gülmez Kıvanç
(Hacettepe Üniversitesi)

(Handwritten signatures of the jury members: Cumhuri Özkuyumcu, Yakut Akyön Yılmaz, Zeynep Sarıbaş, Ebru Us, Dolunay Gülmez Kıvanç)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

18 Ocak 2019

(Handwritten signature of Prof. Dr. Diclehan Orhan Y.)
Prof. Dr. Diclehan Orhan Y.
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

28.11.2019
Meltem Özden

¹“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir
 - Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Yakut Akyön Yılmaz danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.



(İmza)
Meltem ÖZDEN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde desteğini hiç esirgemeyen Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı saygıdeğer Prof. Dr. Cumhuri ÖZKUYUMCU'ya,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilimsel açıdan beni destekleyen, değerli bilgi birikimiyle yolumu aydınlatan ve kullandığı her kelimenin hayatıma kattığı önemini asla unutmayacağım sevgili danışman hocam Prof. Dr. Yakut AKYÖN YILMAZ'a,

Mikrobiyoloji eğitimimin her aşamasında büyük katkı sağlayan Prof. Dr. Zeynep SARIBAŞ, Doç. Dr. Alparslan ALP ve diğer bölüm hocalarıma,

Her zaman yanımda olan, beni her konuda destekleyen ve yalnız bırakmayan sevgili eşim Salih ÖZDEN ve aileme,

Çok teşekkür ederim.

ÖZET

Özden, M., *Mycobacterium tuberculosis* İzolasyonu Öncesinde Uygulanan İki Farklı Dekontaminasyon, Homojenizasyon İşleminin Karşılaştırılması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2019. Bu çalışmanın amacı, iki farklı dekontaminasyon yöntemi olan, N-asetil-L-sistein-sodyum hidroksit (NALC-NaOH) ve Decomics homojenizasyon-dekontaminasyon kitinin etkinliğini, *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra suşu eklenerek hazırlanan balgam örneklerinde boyama, kültür ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile değerlendirmektir. *M. tuberculosis* H37Ra suşu kullanılarak içerisinde 10^8 - 10^1 /ml yoğunluğunda bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Bu süspansiyonlardan üç ml balgam bulunan 50 ml'lik steril tüpün içerisine 0,5 ml eklenmiştir. Otuzyedide defa İki set şeklinde hazırlanan örnekler NALC-NaOH yöntemi ve Decomics kiti kullanılarak homojenize-dekontamine edilmiştir. Dekontaminasyon sonrası sıvılardan aside dirençli boyama (ARB) yapılarak mikroskopta incelenmiş, Löwenstein – Jensen (LJ) ve Middlebrook (MB) 7H10 besiyerlerine ekilmiş ve PZR yapılmıştır. ARB ve PZR incelemelerinde 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^3 , 10^2 ve 10^1 /ml yoğunluklarda NALC-NaOH yöntemi ve Decomics kitinin sonuçları arasında anlamlı bir fark yokken; 10^5 , 10^4 /ml oranında bakteri bulunan örneklerin ARB boyama ve PZR'larında NALC-NaOH yöntemi, Decomics kitine göre daha başarılı bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır, [ARB boyama (10^5 /ml) $p=0,016$ ve PZR (10^5 /ml) $p=0,5$; ARB boyama (10^4 /ml) $p=0,012$ ve PZR (10^4 /ml) $p=0,016$]. MB ve LJ besiyerlerinde yapılan kültür sonunda, 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^3 , 10^2 ve 10^1 /ml'de iki yöntem arasında fark bulunmamıştır. Ancak 10^4 /ml oranında bakteri bulunan örneğin ekimlerinde iki yöntem arasında farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak Decomics kiti balgamı etkin olarak dekontamine edebilmekte ve 10^5 - 10^8 /ml yoğunlukta bakteri içeren örneklerde izolasyon başarılı olmaktadır. Decomics kitinin özellikle balgamında yoğun bir şekilde tüberküloz basili bulunan hastalarda, çok fazla ekipman ve santrifüj gerektirmediği için, kısıtlı olanakları olan laboratuvarlarda kullanılabileceğini söyleyebilmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis* kompleks, homojenizasyon dekontaminasyon, izolasyon

ABSTRACT

Özden, M., Comparison Of Two Different Decontamination, Homogenization Procedures Applied Before The *Mycobacterium tuberculosis* Isolation, Hacettepe University Graduate School Of Health Sciences Microbiology Master's Degree, Ankara, 2019. The aim of this study is to compare the homogenization and decontamination efficiency of two methods, namely n-acetyl-l-cysteine-sodium hydroxide (NALC-NaOH) decontamination method and Decomics decontamination kit, in sputum samples spiked with *Mycobacterium tuberculosis* H37 Ra, by using staining, culture and PCR methods. Two series of spiked bacterial suspensions were prepared from *M. tuberculosis* H37Ra strain. Serial dilutions were made in three ml sputum containing sterile tubes, by adding 0.5 ml bacteria to the concentrations of 10^8 /ml- 10^1 /ml. One of the series was used for decontamination with NALC-NaOH method and the other for Decomics decontamination kit. The study was carried out 37 times. After decontamination, samples were stained; inoculated in Löwenstein Jensen (LJ) medium and Middlebrook (MB) 7H10 medium and PCR was performed. There was no significant difference between the results of the NALC-NaOH method and Decomics method in acid-fast bacilli (AFB) staining and PCR examinations at 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^3 , 10^2 and 10^1 /ml. However, in the rest of the concentrations, significant differences were found between the NALC-NaOH method and the Decomics method. (AFB staining (10^5 /ml) $p=0.016$ and PCR (10^5 /ml) $p=0.5$, AFB staining (10^4 /ml) $p=0.012$ and PCR (10^4 /ml) $p=0.016$). There was no significant difference between the results of NALC-NaOH method and Decomics method at 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^3 , 10^2 and 10^1 /ml in cultures on MB and LJ media. However, a significant difference was found between the NALC-NaOH method and the Decomics method in cultures with 10^4 /ml bacteria. As a result, it can be said that, Decomics efficiently decontaminates sputum and bacilli can be detected in the concentrations of approximately 10^5 - 10^8 /ml. Usage of Decomics decontamination kit can be helpful where tuberculosis is endemic and in areas where the laboratory facilities are inadequate since Decomics kit does not require centrifugation.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis* complex, homogenization decontamination, isolation

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Epidemiyoloji	4
2.2.1. Dünyada Tüberküloz	4
2.2.2. Türkiye'de Tüberküloz	5
2.3. Mikobakterilerin Genel Özellikleri	5
2.3.1. Taksonomi	5
2.3.2. Mikobakterilerin Bakteriyolojik Özellikleri	6
2.3.3. Hücre Duvarı	6
2.4. Tüberküloz	8
2.5. Tüberküloz'un Tanısı	8
2.5.1. Örneklerin Toplanması	9
2.5.2. Mikroskopik İnceleme	10
2.5.3. Kültür Temelli Yöntemler	11
2.5.4. Moleküler Yöntemler	16
2.5.5. İmmünojenik Yöntemler	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Bakterinin Canlandırılması	20
3.2. Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar	20
3.2.1. Besiyerleri	20
3.2.2. Kimyasal Maddeler	20
3.3. Besiyerlerinin Hazırlanması	21

3.4. Kinyoun Boyama için Boyaların Hazırlanması	21
3.4.1. Karbolfuksin'in Hazırlanması	21
3.4.2. Asit Alkol Çözeltisinin Hazırlanması	21
3.4.3. Metilen Mavisinin Hazırlanması	22
3.5. NALC-NaOH ile Dekontaminasyon İçin Solüsyonların Hazırlanması	22
3.5.1. %2'lik NALC-NaOH Solüsyonunun Hazırlanması	22
3.5.2. Fosfat Tamponu Hazırlığı	22
3.6. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması	22
3.7. Homojenizasyon ve Dekontaminasyonların Yapılması	22
3.7.1. NALC-NaOH ile Dekontaminasyon	23
3.7.2. Decomics Kiti ile Dekontaminasyon	23
3.8. Ekim ve Yayma İşleminin Yapılması	23
3.9. Aside Dirençli Boyamaların ve Mikroskopik İncelemelerin Yapılması	23
3.10. Real-time PCR İşleminin Yapılması	24
3.10.1. DNA İzolasyonu	24
3.10.2. Real-time PCR'in Yapılması	24
3.11. İstatistiksel Analiz	25
4. BULGULAR	26
4.1. ARB Bulguları	26
4.2. Kültür Bulguları	28
4.2.1. LJ Besiyerindeki Üreme Sonuçları	28
4.2.2. MB Besiyerindeki Üreme Sonuçları	30
4.3. RT-PZR Bulguları	33
4.4. İstatistiksel Veriler	35
5. TARTIŞMA	36
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	43
7. KAYNAKLAR	45
8. EKLER	50
EK.1 Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler ve Yayınlar	50
EK.2 Orjinallik Raporu ve Dijital Makbuz	51
9. ÖZGEÇMİŞ	53

SİMGELER ve KISALTMALAR

AD-TB	Akciğer dışı tüberküloz
AC-TB	Akciğer tüberkülozu
AMS	Açlık mide suyu
ARB	Aside dirençli boyama
BAL	Bronkoalveolar lavaj
BOS	Beyin omurilik sıvısı
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
ÇİD-TB	Çok ilaca dirençli tüberküloz
DAP	Diaminopimelik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DTA	Derin trakeal sspirasyon
EZN	Ehrlich- ziehl neelsen boyama
FM	Floresan mikroskop
IGST	İnterferon-gamma salınım testi
LJ	Löwenstein – Jensen besiyeri
HIV	İnsan bağışıklık yetmezlik virüsü
MB	Middlebrooke agar
MTB	<i>M. tuberculosis</i>
MTBK	<i>M. tuberculosis</i> kompleks
NALC-NaOH	N-asetil-L-sistein sodyum hidroksit
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PPD	Purified protein derivative
TDM	Tüberküloz dışı mikobakteri

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Decomics kitinin içinde bulunan malzemeler.	14
4.1. NALC-NaOH yöntemi ve Decomics kiti ile homojenizasyon-dekontaminasyon sonrası yapılan yaymaların ARB verilerinin grafik ile gösterimi.	28
4.2. NALC-NaOH yöntemi ve Decomics kiti ile homojenizasyon-dekontaminasyon sonrası yapılan LJ besiyerine ekilen balgamların üreyen, üremeyen ve kontamine olan kültür sayılarının grafik ile gösterimi.	29
4.3. NALC-NaOH yöntemi ve Decomics kiti ile homojenizasyon-dekontaminasyon sonrası yapılan MB 7H10 besiyerine ekilen balgamların üreyen, üremeyen ve kontamine olan kültür sayılarının grafik ile gösterimi.	31
4.4. NALC-NaOH yöntemi ve Decomics kiti ile dekontaminasyon sonrası RT-PZR sonuçlarının kıyaslanma verileri.	35

TABLolar

Tablo	Sayfa
3.1. LJ besiyerinin içeriği.	22
3.2. PZR döngüleri.	25
4.1. ARB sonuçlarını sayısal ve yüzde olarak gösterimi.	27
4.2. LJ besiyerindeki kültür sonuçlarının sayısal ve yüzde değeri.	29
4.3. MB 7H10 besiyerindeki kültür sonuçlarının sayısal ve yüzde değeri.	31
4.4. MB 7H10 besiyerindeki koloni sayıları.	32
4.5. RT-PZR sonuçlarını sayısal ve yüzde olarak gösterimi.	34

1. GİRİŞ

Tüberküloz, *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTBK) olarak isimlendirilen bir bakteri grubunun yol açtığı bir enfeksiyon hastalığıdır. Bu grupta *M. tuberculosis* (MTB), *Mycobacterium bovis*, *M. bovis* BCG, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium canetti* ve *Mycobacterium pinnipedi* türleri yer almaktadır. Hastalıktan %97-99 oranında MTB sorumludur (1,2). İnsanlık tarihinin en eski hastalıklarından biridir. Günümüzde ise dünya çapında ölüm nedenleri arasında dokuzuncu sıradadır (3).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2018 tüberküloz raporunda bildirilen verilere göre 2017'de % 90'ı 15 yaş üstü olan 10 milyon yeni vaka olduğu, 558.000 rifampin dirençli tüberküloz olduğu bunların %82'sinin çok ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD-TB), %8'inin de yaygın ilaç dirençli tüberküloz (YİD-TB) olduğu tahmin edildiği bildirildi. Bu raporda tedavide %82'lik bir küresel başarı olduğunu bildirilmiştir. 2017 yılında 1,6 milyon kişi öldüğü bunların 300.000'inin insan bağışık yetmezlik virüsü (HIV) pozitif hastalar olduğu ve ölümlerin %95'inin düşük ve orta gelirli ülkelerde olduğu bildirildi. Dünya nüfusunun %23'ünde latent enfeksiyon görüldüğü bildirilmiştir. Türkiye'nin 2017 verilerine göre ise olgu hızı 100.000'de 15,7'dir. Tüberkülozun insidansı 10 yılda ülkemizde düşme eğiliminde olsa da hala önemli bir halk sağlığı problemi olarak yer almaktadır (3).

Tüberküloz 1944 yılından bu yana tedavi edilebilir bir hastalıktır. Bu tedavi ile 2000-2016 yılları arasında etkili tanı ve tedavi yoluyla 53 milyon kişinin hayatı kurtarılmıştır (3). Ancak hala dakikada bir kişinin enfekte olduğu ve yılda 1,3 milyon ölüm olduğu bildirilmektedir. Tedavi edilmeyen aktif tüberkülozlu hastalar ise her yıl 10-15 kişiye tüberküloz basilini bulaştırmaktadır (4). Tüberkülozun önlenmesi için hastalara hızlı bir şekilde tanı koyulması ve etkin tedaviye başlanması gerekmektedir.

Tüberküloz tanısında umutla kullanılmaya başlanan moleküler yöntemler beklentileri karşılamadığı için klasik kültür yöntemi altın standart olarak yerini korumaktadır. Kültür yöntemi bakterinin yavaş üremesi nedeniyle hızlı ve kolay değildir. Kültür için balgam gibi steril olmayan örnekler homojenizasyon-dekontaminasyon işlemleri uygulandıktan sonra ekimleri yapılır. Steril vücut sıvıları ise bakterinin üreme şansını arttırmak için bu işlemler yapılmadan ekilir. Örneklerin homojenizasyon-dekontaminasyon aşaması, mikroskopik inceleme ve kültür

yöntemleri için duyarlılık belirleyici bir aşamadır. Her ne kadar ileri teknoloji kültür ve boyama yöntemi kullanılıyorsa kullanılsın kültür öncesinde yapılan homojenizasyon-dekontaminasyon aşaması gerektiği şekilde yapılmazsa, alınacak sonuçların kalitesi düşecektir. Başlıca homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemleri; NALC-NaOH, NaOH Ogawa, NaOH Modifiye Petroff yöntemidir. Dekontaminasyonun temel amacı örneğin mikrobiyota üyelerinden arındırılarak dekontamine edilmesi, olası basillerin yoğunlaştırılmasıdır. En sık kullanılan ve CLSI tarafından önerilen yöntem NALC-NaOH yöntemidir. Bu yöntem de kontaminasyon oranı %5'ten fazla ise NaOH Modifiye Petroff yöntemi, santrifüjün olmadığı laboratuvarlarda ise NaOH Ogawa yönteminin kullanılması Türkiye Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü'nce önerilmektedir. Örnekler dekontaminasyon sonrası bir katı bir de sıvı besiyerine ekilmelidir (5).

Bu çalışmanın amacı, iki farklı homojenizasyon-dekontaminasyon yönteminin başarısını, *M. tuberculosis* H37 Ra suşu belirli oranda eklenerek hazırlanan balgam örneklerinde mikroskopik, kültür ve moleküler yöntemler ile karşılaştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Tüberküloz hastalığı bilinen en eski hastalıklarındandır. Eski Mısırlılar'ın tıbbi kayıtlarda lenf tüberkülozunu tanımlayan bilgiler yer almaktadır. Çin kaynaklarında da tüberkülozu düşündüren tanımlamalar vardır (6). Hippocrates kitabında erime tükenme anlamına gelen “phtisis” deyimini kullanmıştır (7). Roma İmparatorluğu döneminde hekimlik yapan Aretaus hastalığı “kısık sesli, boyunları az bükük ve sert, parmakları silindirik ama şiş, kemikleri belirgin, tırnakları eğri, burunları silindirik, yanakları pembe skapulaları kuşun kanadına benzer” şeklinde tanımlamıştır.

Halk sağlığı ile ilgili kayıtların tutulmaya başlanmasıyla birlikte İngiltere’de 1667’de bütün ölümlerin %25’inin tüberküloz yüzünden olduğu bildirilmiştir. Sanayi devrimi ile birlikte 17. ve 18. yy.’da yoksul ve yetersiz beslenen insanların sayısının artması tüberkülozun insidansının artmasına sebep olmuştur. Hastalık İngiltere’den tüm Batı Avrupa’ya yayılmıştır. Batı Avrupalılar ile birlikte tüm dünyaya yayılmıştır (8,9). On dokuzuncu yüzyılın başlarında Avrupa’nın %70’inin tüberküloz olduğu bildirilmiştir (10).

Osmanlı İmparatorluğu’nda ise 19. yy ortalarında etkileri görülmüş ve 1839 yılında Sultan II. Mahmut ve 1861 yılında oğlu Sultan Abdülmecit tüberküloz nedeniyle ölmüştür. Birinci Dünya Savaşının sonucu olarak ekonomik açıdan yıpranan ve yoksullaşan Anadolu’ya yayılmıştır (12).

Robert Koch 24 Mart 1882’de tüberkülozun MTB tarafından oluşturulan bir enfeksiyon hastalığı olduğunu göstermiştir (8). 1903 yılında Von Pirgued, tüberkülinin tüberküloz hastalarında gösterdiği reaksiyonlar için ‘allerji’ kavramını ileri sürmüş ve 1907’de tıbbi olarak kullanılabilir hale getirmiştir. Charles Mantoux ve diğerleri tüberkülin uygulamasında değişiklikler yapmışlardır. 1921’de Calmette-Guerin tarafından BCG aşısı bulunmuştur (12). Florence Seibert 1934’de tüberkülinden saflaştırılmış protein türevi (PPD) elde etmiş ve PPD tüberküloz enfeksiyon hastalığını saptamada kullanılmaya başlanmıştır (11). Waksman’ın 20 Kasım 1944’de streptomisini bulması ile tüberkülozlu hastalar tedavi edilmeye başlanmıştır. Tekli antibiyotik kullanıldığı için kısa sürede bu ilaca karşı direnç gelişmiştir. 1946’da para-amino salisilik asit’in (PAS) MTB’ye etkisi gösterilmiş, 1952’de izoniazid (INH)

bulunarak, 18-24 ay boyunca üçlü antibiyotik tedavisi uygulanmıştır. Sonunda tüberküloz tedavi edilebilir bir enfeksiyon hastalığı haline gelmiştir. Daha sonraki yıllarda pirazinamid (PZA), etambutol (EMB) ve rifampisin (RIF) bulunarak tedaviye eklenmiş ve tedavi süresi altı aya düşürülmüştür (12,13).

2.2. Epidemiyoloji

2.2.1. Dünyada Tüberküloz

Yüksek refah seviyesine sahip ülkelerde 1970’li yıllarda tüberkülozun eradike edileceği öngörülürken, 1985 yılından itibaren insidansın tekrar artmaya başladığı görülmüştür (11). Gelişmekte olan ülkelerde, tüberküloz hakkında 1950’den önce yeterli veri bulunmamaktadır. DSÖ’nün planladığı tüberküloz kontrol programları gelişmekte olan ülkelerde 1960’dan sonra uygulanmaya başlanmıştır. Ancak 1990’da uygulanan programlarının ülkelerin tüberküloz sorununu çözmediği görülmüştür (14). “Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi” programı DSÖ tarafından 1993 yılında başlatılarak tüberküloz ile mücadele edilmeye çalışılmıştır, ancak 2000’li yıllarda amaca ulaşamadığı görülmüştür. DSÖ daha sonra 2015 yılına kadar sürecek olan Tüberküloz Durdurma Stratejisi programını hazırlamıştır. Bu programın amacı 2050 yılına gelindiğinde yıllık olguların 1/1.000.000’in altına düşürülmesidir.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2018 tüberküloz raporunda bildirilen verilere göre 2017’de %90’ı 15 yaş üstü olan 10 milyon yeni vaka olduğu, bunların 5,8 milyonun erkek, 3,2 milyonun kadın, 1 milyonun ise çocuk olduğu bildirilmiştir. 558.000 RD-TB olduğu bunların %82’sinin ÇİD-TB, %8’ininde YİD-TB olduğu tahmin edildiği bildirildi. Bu raporda tedavide %82’lik bir küresel başarı olduğunu bildirilmiştir. 2017 yılında 1,6 milyon kişi öldüğü bunların 300.000’inin HIV pozitif hastalar olduğu ve ölümlerin %95’inin düşük ve orta gelirli ülkelerde olduğu bildirildi. Dünya nüfusunun %23’ünde latent enfeksiyon görüldüğü bildirilmiştir (3).

DSÖ 2018 raporunda; 2025 yılına kadar tüberküloza bağlı ölümlerin %6,5 oranında azalması, tüberküloz insidansın da %10 azalma hedeflendiği bildirilmiştir. Bu hedeflere ulaşmak için raporda tüberkülozun tanı, tedavisinin doğru planlaması gerektiğini vurgulanmıştır (3).

2.2.2. Türkiye’de Tüberküloz:

Türkiye Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü’nün Türkiye’de Verem Savaşı 2017 Raporu’na göre; toplam 12.772 yeni ve nüks tüberküloz olgusu 2015’de kayıtlara girmiştir. Toplam olgu hızı yüz binde 17,5’ten yüz binde 15,7’e düşüş göstermiştir. Hastaların 7.210’i (%56,5) erkek, 5.562’i (%43,5) kadındır. Cinsiyet açısından bakıldığında E/K oranı 1,4’tür. Yaş gruplarına göre olgu hızları incelendiğinde, 5-14 yaş grubunda düşüken 15-24 yaş grubunda aniden yükseldiği, 65 ve üzeri yaşlarda en yüksek düzeye (yüz binde 32,7) ulaştığı görülmektedir. 13.409 hastanın 11.803’i yeni olgu iken 747’si önceden tedavi almış olgulardır. Hastaların %59,5’i (7.598) AC-TB’u, %35,6’sı (4.548) AD-TB, %4,9’u (626) AC-TB’u ve AD-TB’dur. Toplam 12.772 tüberküloz olgusundan 61’inin HIV pozitif olduğu tespit edilmiştir. 2013’de yabancı uyruklu hastaların sayısı 872’dir. Bunların %83,6’sı (729) Asya, %9,4’ü (82) Avrupa, %6,7’si (58) Afrika, %0,3’ü (3) Amerika kıtası ülkelerindedir. Yabancı uyruklu hastaların 489 tanesi Suriye uyrukludur (15).

2.3. Mikobakterilerin Genel Özellikleri

2.3.1. Taksonomi:

Alem: Prokaryot

Şube: Firmicutes

Sınıf: Actinobacteria

Takım: Actinomycetales

Aile: Mycobacteriaceae

Cins: Mycobacterium

MTB, tüberküloz hastalığına neden olan önemli Mycobacterium türlerinden biridir (19). Bakteriyolojik ve DNA dizi homoloji benzerliği gösteren türler kompleks adı altında bir grupta toplanmaktadır. Tüberküloz etkeni olan ve MTBK adı altında toplanan türler, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. canetti* ve *M. pinnipedi*’dir. MTB insanlardaki tüberkülozun en sık

etkenidir (1,16). Diğer mikobakteriler, “Tüberküloz dışı mikobakteriler (TBDM)” grubunda bulunurlar. Bu grubun içinde saprofit ve fırsatçı olan mikobakteriler vardır. *Mycobacterium avium-intracellulare* kompleksi, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium goodii*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium haemophilum*, *Mycobacterium marinum* ve *Mycobacterium ulcerans* fırsatçı türlere örnek olarak verilebilir (17).

2.3.2. Mikobakterilerin Bakteriyolojik Özellikleri

Mikobakteriler; hareketsiz, aside dirençli boyanan, katalaz pozitif bakterilerdir. Uzunluğu 1-10 µm, genişliği 0,2-0,6 µm, hafif kıvrımlı ya da düz şekilli 12-18 saatte bölünüp, yavaş üreyen basillerdir (16,18). Bazı mikobakteriler toprak ve suda saprofit yaşayan bakterilerken, bazı mikobakterilerde omurgalılarda ölüme neden olan hücre içi patojenlerdir (19).

2.3.3. Hücre Duvarı

Mikobakterilerin hücre duvarının yapısı diğer bakterilerin hücre duvarından daha kompleks bir yapıdadır. Bu kompleksin iç tabakası diğer bakterilerde de olduğu gibi hücre zarıdır. Ortadaki tabakanın korunu ve duvarın iskeletini mikoarabinogalaktan peptidoglikan oluşturur. kor yapısına benzer bir yapı mikobakterilerin dışında korinebakteriler ile nokardiyalarda da görülür. Hücre duvarında mikolik asitin dışında çok sayıda lipit ve glikolipitler bulunur. Bu lipitler ile glikolipitlerin bolluğu ile birlikte simetrik olmayan dizilişleri hücre duvarını hidrofobik yapar. Kovalent olmayan bağla bağlanan lipitlerin içerisinde, α,α' trehaloz dimikolatlar, α,α' trehaloz monomikolatlar gibi trehalozlar, gliserol monomikolat ile birlikte fosfolipitler önemlidir. Glikozamin, korda yer alan arabinogalaktandaki arabinoza bağlı, alışılmadık N-asetil bileşeni şeklinde değil serbest amin şeklindedir. Mikobakteri hücresinin en dış kısmında ise kapsül yer almaktadır. Kapsül, en iyi enfekte makrofajlar ile hazırlanan preparatlarda görülür ve yoğunlukta polisakkarit ile proteinlerden daha az oranda da lipitten oluşur. Kapsülde bulunan polisakkaritlerin en önemlileri α -1,4 glukon, lipomannan ve lipoarabinomannandır. Ayrıca hücre duvarında diğer bakterilerde de olan porin proteinleri de vardır (19).

Plazma Zarı ve Orta Tabaka

Diğer bakteriler gibi çift sıra fosfolipit ve proteinden oluşur. Diğer bakterilerden çok farkı yoktur. Orta tabakada ise antijenik özelliğe sahip glikoproteinler bulunur (19).

Peptidoglikan Tabaka

Diğer bakterilerin peptidoglikanlarından farklı olarak mikobakteri peptidoglikanı kemotip-IV peptidoglikandır. Diğer bakterilerin peptidoglikanından iki önemli farklılık göstermektedir. İlk farklılık glikozillenmiş formda muramik asidin bulunması, ikinci farklılık ise tetrapeptit yan zincirlerde diaminopimelik asidin (DAP) bulunmasıdır. Peptidoglikan yapı bakteriye şeklini verirken, hücre duvarında bütünlük ve sağlamlık kazandırır. Mikobakteriler DAP sayesinde lizozime karşı direnç gösterir ve muramik asit içindeki N-glikozil grupları organizmayı hücre hasarından korur (19).

Arabinogalaktan:

Bu yapı D-galaktofuranoz ve D-arabinofuranoz'dan oluşur. Bu polisakkaritler doğada nadir görülür ve yapısal olarak da diğer bakterilerdeki polisakkaritlerden farklıdır (19).

Mikolik asit:

Mikolik asit, alfa dallanma gösteren beta hidroksillenmiş yağ asitleridir. Mikobakteriler dışında, *Corynebacterium*'lar, *Nocardia* ve *Rhodococcus* gibi başka türlerinde hücre duvar yapısında görülür. Mikolik asitler 1929'da R.J Anderson isimli bir bilim adamı tarafından MTB'de gösterilmiş ve iyi saflaştırılmadıkları için sabunlaştırılmayan mum tabiri kullanılmıştır. Mikolik asitler mikobakterilerin hücre duvarının kuru ağırlığının %50'sini ve lipitlerinin ise %60'ını oluştururlar. Hücre duvarına nonkovalent bağlar ile bağlanan ve simetrik olmayan dağılım gösteren lipit bölümleriyle beraber hücre duvarının hidrofobik bariyerini oluştururlar. Mikobakteriler iki çeşit mikolik asit içerirler. Biri alfa mikolik asit, diğeri ise meromikolik asittir (19).

2.4. Tüberküloz

Tüberküloz, MTBK ile enfekte kişilerden damlacık yoluyla bulaşan çoğunlukla akciğeri daha nadir olarak da diğer organları etkileyen sistemik bir hastalıktır. Tüberküloz hastalığı kuru öksürük ile başlar zamanla kanlı balgam ile devam eder. Hastada göğüs ağrısı, nefes darlığı, iştahsızlık ve halsizlik görülebilir

Primer enfeksiyon; birey enfekte olduktan sonra basil alt solunum yoluna inmeden üst lobda subplevral bölgede alveoller makrofajlar tarafından hücre içinde alınır ve makrofaj içinde canlı kalır. Zamanla makrofajların içinde çoğalarak makrofajları parçalar. Bu sırada bakteriler logaritmik üremeye devam ederek yeni makrofajları enfekte eder ve parçalanmasına sebep olur. Basiller lenf yoluyla bölgesel lenf nodlarına taşınır. Primer kompleks (Ghon kompleksi) oluşur. Enfeksiyondan hemen sonra oluşan primer enfeksiyon bazı bireylerde etkili bir bağışık yanıt sonucunda tamamen iyileşmeyle sonlanır. Sekonder enfeksiyonda enfekte bireylerin % 10'unda, primer tüberküloz sonrası ya hemen (%5) ya da yıllar sonra (%5) tüberküloz gelişir (20).

Akciğer tüberkülozu (AC-TB), akciğer parankimini tutan tüberküloz için kullanılır. Bu hastaların tanısı için balgam, derin trakeal aspirasyon (DTA), bronkoalveolar lavaj (BAL) gibi örnekleri incelenir. Parankimde tutulum yoksa, plevra efüzyonu ya da göğüs boşluğundaki lenf tüberkülozu akciğer dışı tüberküloz (AD-TB) kabul edilir. AC-TB ve AD-TB birlikte ise bu hastalarda her iki tutulumun olduğu belirtilir aynı zamanda akciğer dışı tutulan organlarında belirtilmesi gerekmektedir. Bu grup hastalar DSÖ'ne AC-TB olarak bildirilmektedir (20).

2.5. Tüberkülozun Tanısı:

Aktif tüberkülozun kesin teşhisi için, MTB'nin kültür yoluyla üretilmesi gerekmektedir. Bununla birlikte, bu yöntem bakterinin yavaş üremesi nedeniyle hızlı ve kolay değildir. Dolayısıyla balgam yayması sonra yapılan mikroskopik inceleme birincil yöntem olmuştur, ancak duyarlılığı düşüktür. Balgam yaymasıyla tüberküloz hastalığına, erişkinlerde sadece %44'üne çocuklarda ise sadece %15-20'sine tanı konulabilir. Bu nedenle hastanın tüberküloz bulguları varsa ve balgam yaymaları negatif ise, kültür, göğüs radyografisi veya moleküler metotlar gibi farklı yöntemler

kullanılabilir. Latent tüberküloz tanısı için tüberkülin deri testi (TDT), interferon- γ salınım testi (IGST) testleri kullanılır (21, 23, 24).

2.5.1. Örneklerin Toplanması:

Akciğer tüberkülozu düşünülen hastadan balgam, DTA, BAL, açlık mide suyu (AMS) gibi örnekler istenir. Balgam üç gün üst üste sabah çıkan ilk balgam olmalıdır. Balgam kabı steril, tek kullanımlık, sızdırmaz özellikte, burgu kapaklı, polipropilen yapıda olmalıdır. Örnek laboratuvara kabul edilmeden önce tükürük olmamasına dikkat edilmelidir. Balgam mümkün olduğunca çabuk incelenmelidir, ancak bekletilmesi gerekirse birkaç gün +4°C bekleyebilir. Akciğer, plevra, larinks ve miliyer tüberküloz olgularında üç balgam tetkiki (yayma ve kültür) yapılması önerilir. Gece boyunca bronşlarda biriken balgamda basil daha iyi gösterildiğinden, ideali, üç gün sabah kalkar kalkmaz çıkarılan ilk balgamın incelenmesidir. Bu mümkün değilse, hastanın ilk gün iki kez anlık balgamı alınır, üçüncü örnek olarak ertesi sabah ilk çıkan balgamı getirmesi istenir. Başka bir yöntemde ise ilk gün anlık, ikinci gün sabah balgamı ve yine ikinci gün sabah gelince de üçüncü balgamı anlık almaktır (21).

Hasta balgam çıkartamıyorsa indüklenabilir ya da çocuklardan AMS alınabilir. Bu yolla da örnek alınamazsa bronkoskopik lavaj sıvısı bu amaçla kullanılabilir. Akciğer dışı tüberkülozu düşünülen hastalarda ise plevral sıvı, lenf nodu biyopsisi gibi örnekler gelebilir. Bunlarda silikon içermeyen steril boş tüplerde gelmelidir. Diğer organları tutan tüberkülozlu vakalarda ise tuttuğu organa göre idrar, beyin omurilik sıvısı (BOS), perikart sıvısı, periton sıvısı, pü, biyopsi materyali gibi örnekler laboratuvara kabul edilir.

Kültür için gönderilecek kan örneğinin pıhtılaşması engellenmeli ve üç yöntemden biri uygulanmalıdır. Birincisi, ticari olarak bulunan lizis-santrifügasyon sisteminin kullanılması; ikincisi, kan için özel olarak tasarlanmış sıvı besiyerlerine hasta başı ekimi yapılması; üçüncü yöntem ise kanın santrifüj edilerek lökositleri içeren katmanın deoksikolat ile patlatılarak ya da patlatılmadan sıvı ve katı besiyerine ekilmesidir (22).

2.5.2. Mikroskopik İnceleme:

Yayma-pozitif tüberküloz olgularının saptanıp tedaviye erken başlanmasında mikroskopik incelemenin rolü büyüktür. Balgamın mikroskopik olarak incelenmesi, az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde pulmoner tüberkülozda en önemli tanı yöntemidir. Bu ülkelerde balgam örneği direkt olarak Ehrlich- Ziehl Neelsen (EZN) boyama yöntemi ile boyandıktan sonra mikroskopik inceleme yapılmaktadır. Mikroskopik inceleme basit, hızlı, ucuz ve özgül bir yöntem olması nedeniyle özellikle tüberkülozun endemik olduğu ülkelerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikroskopik incelemede aside dirençli basilin görülebilmesi için örneğin mililitresinde en az 5000 kadar bakteri bulunması gerekmektedir (25, 27, 71).

Yapılan farklı çalışmalar incelendiğinde, mikroskopik inceleme duyarlılığının %20-80 arasında değişebildiği gözlenmektedir (25, 28, 29). Duyarlılık oranlarındaki bu farklılıklar genel olarak, kullanılan boyama yöntemi ve kullanılan mikroskopun kalitesiyle değişmektedir. Aynı zamanda örneğin türü, yaymanın kalınlığı ve inceliği, boyama sırasında dekolorizasyon süresi ve incelemeyi yapan kişinin deneyimi de çok büyük önem taşımaktadır (25). Duyarlılığı arttırmak için testin daha da geliştirilmesi, ağartma, sodyum hidroksit veya NALC-NaOH gibi kimyasalların eklenmesiyle, MTB'nin kümelenip çökme süresini azaltmak için santrifüj edilerek balgamın sıvılaştırılmasıyla elde edilebilir (32). Ayrıca kültür sonuçlarının elde edilmesi birkaç haftayı bulabileceğinden, pozitif bir mikroskopik inceleme sonucu çok değerlidir (25).

BOS örneklerinin triton ile işlenmesiyle birlikte sitospin lamaları kullanılan modifiye ZN boyama yöntemi, tüberküloz menenjitinin teşhisi için daha etkilidir (30). Ayrıca, auramin Q boyası kullanarak floresan mikroskopisi (FM) EZN'den özgülüğü daha yüksek, daha hızlı ve yaklaşık % 10 daha fazla duyarlıdır (31,32).

DSÖ kılavuzunda, teknisyen, ardışık günlerde hastadan en az iki veya üç yayma incelemek zorundadır bilgisi yer almaktadır (34). Yeni tüberküloz vakalarında klinik materyalde basil sayısı az olduğu için mikroskopik inceleme sonucu "negatif" olarak bulunabilir.

Yayma hazırlanırken balgamın pürülan kısmından alınarak temiz bir lam üzerine boyu 1-2 ve eni ise 2-3 cm olacak şekilde dairesel hareketler ile yayılır. Kanlı

bölge tercih edilmemelidir. BOS, plevral sıvı, periton gibi örnekler santrifüj edildikten sonra dipten alınarak yayma yapılmalıdır.

Mikroskopik inceleme öncesinde uygulanan boyama yöntemleri içinde en sıklıkla kullanılanlar EZN boyama yöntemi, Kinyoun boyama yöntemi ve Auramin-rodamin floresan boyama yöntemidir. Ülkemizde büyük merkezler dışındaki laboratuvarlarda EZN ve Kinyoun aside dirençli boyama yönteminden biri kullanılmaktadır. Aside dirençli boyanan preparatlarda bakteriler mavi zemin üzerinde kırmızı basil olarak görünmektedir (25).

2.5.3. Kültür Temelli Yöntemler:

Kültür yöntemi aktif tüberkülozun klinik tanısı için altın standart bir yöntem olarak kabul edilmektedir (5,21).

Akciğer, plevra, larinks ve miliyer tüberküloz olgularında üç balgam tetkiki (yayma ve kültür) yapılması önerilir. En ideali üç gün sabah kalkar kalkmaz çıkarılan ilk balgamın işleme alınmasıdır. Bu mümkün değil ise örnek toplanması başlığı altındada anlatıldığı gibi farklı yollara başvurulmalıdır (21).

Laboratuvarda işlem sırasında kullanılacak kalite standartlarına uygun bir güvenlik kabini, aerosol korumalı santrifüj bulunmalı ve işlem sırasında kişisel koruma ekipmanları kullanılmalıdır. Biyogüvenlik kabini doğrudan veya “thimble” bağlantı ile dış ortama bağlanmalı negatif basınçlı oda oluşturulmalıdır. Tüberküloz kültürünün yapılacağı laboratuvar akridite olmuş bir laboratuvar olmalıdır (5).

Kültür işlemleri öncesinde özellikle balgam örneklerinin işlenmesiyle örneğin homojenizasyonu, yoğunlaştırılması ve dekontaminasyonu sağlanmaktadır. Bu işlem, steril olduğu düşünülen BOS gibi örnekler uygulanmamaktadır. İdrar gibi hacmi fazla olan klinik örneklerin homojenizasyon ve dekontaminasyon işleminde idrar önce 3000 “revolutions per minute” (rpm)’de 15 dk santrifüj edilir, idrarın üst kısmı atılır, geriye kalan çökeltiye homojenizasyon-dekontaminasyon işlemi uygulanır (5,21). Örneklerin işlenmesi aşaması, gerek mikroskopik inceleme, gerekse kültür yöntemleri için duyarlılık belirleyici bir aşamadır. Duyarlılığı ne kadar yüksek ve son teknoloji kültür veya boyama yöntemi kullanılırsa kullanılsın bunların öncesinde yapılan örnek işleme

aşamasını gereği gibi yapılmazsa, sonraki işlemlerden elde edilecek sonuçların kalitesi düşecektir. Bu nedenle bu basamakta kullanılacak farklı yöntemleri içeren birçok çalışma yapılmıştır (25, 36, 37). Örneklerin işlenmesinde üç temel amaç vardır. Bunlar; örneğin mikrobiyotadan arındırılarak dekontamine edilmesi, örnek içerisinde bulunan olası tüberküloz basillerinin yoğun bir hale getirilmesi ve balgam gibi yoğun kıvamdaki örneklerin homojen bir hale getirilmesidir. Ancak bu üç temel amaca ulaşılırken, bu işlemin örnek içindeki tüberküloz basillerine zarar vermeden gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu üç temel amaca ulaşma süreci, canlı tüberküloz basili sayısı çok azaltılmadan tamamlanmalıdır. Kullanılan örnek işleme yönteminde bu hassas dengenin çok başarılı bir şekilde kurulabilmesi, bunu takip edecek olan mikroskopik inceleme ve kültür yöntemlerinin duyarlılığının artmasına yardımcı olacaktır (25).

Örnek işleme yöntemleri içinde gerek ülkemizde gerekse dünya genelinde en sıklıkla kullanılan yöntem NALC-NaOH yöntemidir. Bu yöntem uygulanamıyorsa ya da bu yöntem ile kültür kontaminasyon oranı %5'ten fazla ise sodyum hidroksit modifiye Petroff yöntemi ya da santrifüj cihazının olmadığı durumlarda da sodyum hidroksit Ogawa yöntemi kullanılabilir. Bunun yanı sıra sodyum hipoklorür, oksalik asit, setil piridinyum-sodyum hidroksit yöntemi gibi yöntemler de örneklerin işlenmesi amacıyla kullanılabilir (25, 38, 39).

Başlıca Homojenizasyon-Dekontaminasyon Yöntemleri ve Decomics Homojenizasyon-Dekontaminasyon Kiti:

NALC-NaOH Yöntemi:

Bir hacim balgam örneğine bir hacim NALC-NaOH çözeltisinden eklenir. Tüpün kapağı sıkıca kapatılır. Oda sıcaklığında 15 dk bekletilir. Bu süre içinde balgam birkaç kez vortekslenir. Daha sonra üç katı kadar 0,067 M fosfat tamponu eklenir. Tüpün ağzı sıkıca kapatılır birkaç kez alt üst edilir. Onbeş dk 3000 rpm'de santrifüj edilir. Santrifüjden sonra üstte kalan sıvı, içinde dezenfektan bulunan atık kabına dökülür. Çökelti üstüne birkaç damla fosfat tamponu eklenir. Örnek, ekim ve diğer işlemler için hazırdır (5).

NaOH-Ogawa Yöntemi:

Bir hacim balgam örneğine bir hacim %4'lük NaOH çözeltisinden eklenir. Tüpün kapağı sıkıca kapatılır. Oda sıcaklığında 15 dk bekletilir. Bu süre içinde balgam birkaç kez vortekslenir. Onbeş dk sonunda her örnek modifiye Ogawa besiyerine 0,1 ml ekilir (5).

NaOH Modifiye Petroff Yöntemi:

Bir hacim balgam örneğine bir veya iki hacim %4'lük NaOH çözeltisinden eklenir. Tüpün kapağı sıkıca kapatılır. Oda sıcaklığında 15 dk bekletilir. Bu süre içinde balgam birkaç kez vortekslenir. Onbeş dk 3000 rpm'de santrifüj edilir. Santrifüj sonrası üstte kalan kısım içinde dezenfektan bulunan atık kabına dökülür. Onbeş ml steril distile su eklenerek çökelti tekrar süspansiyon haline getirilir. Tekrar 15 dk 3000 rpm'de santrifüj edilir ve santrifüj sonrası üstte kalan kısım içinde dezenfektan bulunan atık kabına dökülür. Daha sonra her örnek LJ besiyerine 0,1 ml ekilir (5).

Decomics Homojenizasyon-Dekontaminasyon Kiti:

Decomics kiti, dekontaminasyon çözeltisi içeren numune kabı, emici boncuklar, nötralizasyon yapan tampon çözeltisi olmak üzere üç malzemeden oluşur. Emici boncuklar homojenizasyon-dekontaminasyon kabındaki fazla sıvıyı emer böylece santrifüjleme işlemine gerek kalmaz (35).



Şekil 2.1. Decomics kitinin içinde bulunan malzemeler (35).

Klasik Kültür Yöntemleri:

Tüberküloz tanısında altın standart olan kültür yönteminde, yumurta bazlı veya agar içerikli katı besiyerleri ve sıvı besiyerleri kullanılmaktadır. Hızlı tanı sağlayabilmek amacıyla sıvı besiyerlerinin yarı otomatize cihazlarda kullanıldığı çeşitli sistemler mevcuttur. Kültür yöntemlerinin en önemli avantajları, mikobakteri canlılığını doğrudan gösterebilmeleri ve bakteri izolatu ile duyarlılık tespiti, tanımlama, genotiplendirme gibi ek testler yapılabilmesine imkan sağlamalarıdır (25).

Yumurta Bazlı Besiyerleri: LJ, Petraghani, American Trudeau Society ve Ogawa'dır (40). Tüberküloz kültürü yapmak için günümüzde en yaygın olarak kullanılan katı besiyeri LJ ve modifiye Ogawa besiyeridir (25, 41, 43). LJ besiyeri iyi üreme sağlar. Ancak ilaç duyarlılık testlerinde ilaç konsantrasyonlarının doğru ve tutarlı sağlanamaması, kullanılan yumurtanın kalitesinin basiyerinin bakteriyi üretme performansını etkilemesi gibi dezavantajları vardır. MTB'nin yumurtalı besiyerinde kolonileri 2-3 hafta sonra görülmeye başlar ve ilk görünümüleri küçük-kuru düzensiz şekillidir. Birkaç hafta sonra koloniler büyür. Ortası basık, düzensiz kenarlı, karnabahara benzeyen krem rengi, kuru tipik koloniler oluşur (42).

Agar Bazlı Besiyerleri: MB 7H10 ve 7H11 besiyerleri en çok tercih edilenlerdir. MB 7H9 ise agar bazlı sıvı besiyeridir. Sıvı besiyerleri bakteriyi daha hızlı üretir. Bu besiyerlerine, içerisinde oleik asit, albümin, dekstroz, katalaz olan OADC isimli bir solüsyon eklenmektedir. Besiyerleri şeffaf olduğundan ekim yapıldıktan 10-12 gün sonra mikrokoloniler görülebilir. Dezavantajları ise pahalı ve raf ömürlerinin nispeten kısa olmasıdır (18,44). CLSI - MTBK suşlarının duyarlılık çalışmalarında MB besiyeri kullanılmasını önermektedir (48).

Hızlı Kültür Sistemleri:

BACTEC 460 TB Sistemi, BACTEC MGIT (Mycobacterium Growth Indicator Tube) 960 Sistemi, MB/BacT ALERT sistemi, MYCOLOR TK Sistemi gibi hızlı kültür sistemleri vardır.

Kültür amacıyla günümüzde en yaygın olarak kullanılan katı besiyeri LJ besiyeridir. LJ besiyeri, laboratuvar şartlarında kolayca hazırlanabilmesi ve ucuz olması nedeniyle birçok merkez tarafından tercih edilmektedir.

BACTEC 460 TB radyometrik sistemi izolasyon, tanımlama ve duyarlılık deneylerinin uygulandığı bir sistem olarak uzun yıllar başarı ile kullanılmıştır. Bactec 12B (Middlebrook 7H12) ve Bactec 13A (Middlebrook 7H13) olmak üzere iki tip besiyeri içeren bu sistem; besiyerlerinde bulunan C14 işaretli palmitik asitin kullanılması ve metabolizma sonucu oluşan CO₂'nin sayısal değerlerinin üreme indeksi (GI) olarak ölçülmesi prensibi ile çalışmaktadır. Ekim işleminden önce besiyerlerine polimiksin B, azlosilin, nalidiksik asit, trimetoprim ve amfoterisin B (PANTA) içeren antibiyotik karışımı ilave edilmelidir(22,44). Bu sistemde besiyerlerinde karbon kaynağı olarak Palmitik asit kullanılmıştır. Bu palmitik asit bakteri tarafından kullanıldığında açığa çıkan CO₂ cihaz tarafından tespit edilir(44). Bu sistem uzun yıllar kullanılmıştır ancak; inokülasyon öncesi şişenin ön okutma işlemi ve haftada üç kez rutin okutma işlemleri nedeniyle iş yükünün fazla olması, kültür şişeleri arasında çapraz kontaminasyon riski, radyoaktif materyallerin kullanımına ve yok edilmesine ilişkin problemler, cihaz içinde okutmalar sırasında aerosol oluşma riski, koloni morfolojisinin belirlenememesi, karışık kültürlerin tanımlanmasında zorluk çekilmesi, enjektörlerin yoğun kullanımına bağlı olarak laboratuvar çalışanlarının iğne kazaları bakımından sürekli risk altında bulunmaları dezavantajlarına sahiptir (25, 45, 46).

Otomatize bir mikobakteri tanı sistemi olan MGIT 960 sistemi, BACTEC 460 TB sisteminin olumsuz yönlerini azaltabilmek amacıyla üretilmiştir. Bu sistem, floresan veren bir indikatörün bulunduğu tüplerde bakterilerin üretilmesi esasına dayanmaktadır (24, 45, 46). MB 7H9 sıvı besiyeri ve dip kısmında oksijene duyarlı rutenyum metal kompleksi içeren silikon bulunur. Ekim işleminden önce besiyeri içerisine PANTA eklenmelidir (22). Mikobakteriler üredikçe tüpteki oksijenin tüketilmesine bağlı olarak CO₂ serbest kalmakta ve floresan açığa çıkmaktadır. Açığa çıkan floresan cihaz tarafından ölçülmektedir. MGIT 960 sisteminin kısa sürede sonuç vermesinin yanında en önemli avantajları, iğne ve radyoaktif madde kullanılmaması, üremenin sürekli izlenmesine olanak sağlayan bir sistem olmasıdır (25, 45, 46).

Bactec MGIT 960 (BDDiagnostics, Franklin Lakes, NJ, ABD) ve BacT / Alert MB (bioMerieux, Craponne, Fransa) gibi otomatik sıvı kültür sistemleri ve diğerleri, katı besiyerlerine kıyasla daha yüksek bir hassasiyete sahiptir ve daha hızlı bir üreme sağlar. Bu nedenle pahalı, kontaminasyon olasılığı yüksek ve laboratuvar ortamları ve uzmanlık gerektiren katı kültürün yerini sıvı kültür almıştır (23,52).

Hızlı bir tüberküloz tanı sistemi olan TK kültür sistemi, yeni geliştirilmiş olan bir tanı yöntemidir. Bu sistemde izolasyon için kullanılan TK besiyeri, çoklu renk indikatörleri kimyasından yararlanılarak hazırlanmış, mikobakterilerin üremesini erken saptayan bir besiyeridir (53). Ekilen örnekte mikobakteri bulunması durumunda, inkübasyon süresince mikobakterilerin ürettiği metabolitlere ve enzimlere bağlı olarak TK besiyerinin orijinal kırmızı rengi sarıya, diğer bakteri veya fungal türlerin varlığında ise yeşile dönmektedir. Bu renk değişimi, kolonilerin görünür hale gelmesinden çok daha önce gerçekleşmektedir. Renk değişimi hem gözle hem de otomatik kültür sistemi MYCOLOR TK ile izlenebilmektedir. TK kültür sistemi tüberküloz tanısında rutin olarak kullanılacak pratik, hızlı ve güvenilir bir yöntemdir (25).

MB/BacT ALERT sistemi, besiyerindeki karbondioksit miktarının kolorimetrik olarak saptanması esasına dayanan bilgisayarlı bir sistemdir. Her şişenin tabanında bulunan silikona gömülü kolorimetrik algılayıcı, besiyerinde bulunan mikobakterilerin oluşturduğu çözünmüş karbondioksit değişimine ve bunun sonucunda değişen pH'ya duyarlıdır. Böylece üremenin gerçekleşmesi durumunda pH değişikliği sonucunda kolorimetrik algılayıcı renk değiştirir. Algılayıcının koyu yeşilden sarıya dönmesi, sonucun pozitif olduğunu gösterir ve bakteriler canlılığını yitirse bile bu renk değişimi geriye dönmez. Sistem kan dışındaki tüm örnekler için uygundur. Bu sistemde radyoaktif madde kullanılmaması bir avantaj olmakla birlikte, kontaminasyon riskinin biraz daha fazla olması ve bakteri varlığını saptama zamanının biraz daha uzun olması gibi dezavantajları vardır (24).

2.5.4. Moleküler Yöntemler:

Hastalığın yayılımının önlenmesi bakımından MTB'in tespitinin ve tanımlanmasının mümkün olan en kısa sürede yapılması bir zorunluluktur. Bu nedenle klinik mikobakteriyoloji laboratuvarları, hasta örneğinde MTB'in izolasyonu ve

tanımlaması ile anti-tüberküloz ilaç duyarlılığını test ederek tüberkülozun yayılımını önlemede ve kontrol altına alabilmede önemli bir role sahiptir. Etkin tüberküloz kontrol programının en önemli aşaması ise aktif olguların tespiti ve doğru tanının konabilmesidir (54,). Ayrıca geleneksel tanı yöntemlerinde mikroskopinin özgüllük ve duyarlılığının düşüktür, kültür yöntemi ise uzun zaman almaktadır (45). Bu gibi nedenlerle güvenilir ve hızlı tanı yöntemlerine duyulan ihtiyaç devam etmektedir. Özellikle dirençli olgu sayısındaki artış nedeniyle, tedaviye bir an önce başlayabilmek ve yeni bulaşları önleyebilmek amacıyla, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, hızlı sonuç veren, uygulaması kolay ve pahalı olmayan laboratuvar yöntemlerinin günlük kullanıma girmesi önemli bir gereksinim haline gelmiştir. Moleküler yöntemler bu ihtiyacı karşılayabilmek amacıyla geliştirilmişlerdir ve bu amaç doğrultusunda çalışmalar devam etmektedir (4). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC), 2009 yılında MTB tanımlanması için hasta başına en az bir moleküler teknik kullanılmasını önermiştir (55). Şimdiye kadar geliştirilmiş olan tüberküloz moleküler testleri içinde en ümit vadeden yöntem olarak göze çarpan bu test “Xpert MTB/RIF” testidir (25). Bu test DSÖ’nün desteğiyle bir üniversite ve özel bir şirket işbirliği ile geliştirilmiştir. Bu yöntem ile iki saat içerisinde örnekte MTB varlığı ve aynı zamanda rifampin direnci olup olmadığı saptanabilmektedir. Testte kullanılan teknoloji yeni bir teknoloji değildir. Bu test üç primer ve beş prob setinin kullanıldığı bir yarı-“nested real-time” PZR yöntemidir. Testin en belirgin özelliklerinden biri de, 2 ml üzerindeki yüksek örnek hacimleriyle çalışmaya başlanmasına uygun özel kartuşların kullanılmasıdır. Çocuklarda ve ayrıca AD-TB’nin tanısında da 2013 yılından önerilmektedir. Ülkelerin %69’u bu testin dirençli suşlarla enfekte olma riski taşıyan kişilerde, %60’ı ise HIV pozitif kişilerde öncelikli olarak tercih edilmesini önermektedirler (56, 57, 25, 58, 59)

Herhangi bir testin rutin uygulamada kullanılıp kullanılmayacağına en önemli göstergesi testin özgüllüğü, duyarlılığı ve pozitif prediktif değeridir. Tüberküloz tanısında kullanılan moleküler yöntemlerin özgüllükleri, yapılan birçok çalışmada yüksek bulunmuştur. Duyarlılık konusunda ise, uygulanan teste göre, oldukça değişik sonuçlar elde edilebilmektedir. Farklı duyarlılık sonuçları elde edilmesinde, kullanılan PZR yönteminin yanı sıra, örnek türü ve örnek içindeki basil miktarı da önemli rol oynamaktadır. Birçok çalışmada tüberküloz testin duyarlılığının bu kadar yüksek olmadığı gösterilmiştir. Bunun nedenleri arasında MTB DNA’sının iyi ekstrakte

edilememesi, örneğin işlenmesi sırasında basillerin kaybedilmesi veya örnek içinde inhibitör maddeler bulunması sayılabilir (25, 60).

Nükleik Asit Hibridizasyon Yöntemleri

Bu yöntem 1987 yılında kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntem, hedef nükleik asit dizisinin komplementer zinciri ile hibridizasyonuna dayanmaktadır. Özgüllüğü yüksek, ancak duyarlılığı düşüktür. İnhibitörlerden etkilenmez ve kontaminasyon riski çok düşüktür (61).

Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri:

PZR ilk kez 1985 yılında Kary Mullis tarafından geliştirilmiştir (54). Bu yöntem ile klinik örneklerdeki etken, kısa sürede gösterilip, tanımlanıp, moleküler olarak tiplendirilip, ilaç direnci saptanabilir (64).

RT-PZR (gerçek zamanlı PZR) yönteminde nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyali ölçülür. Bu sayede bu yöntemle kantitatif sonuç alınabilir. Bu sistemde elektroforeze gerek yoktur. Çalışma süresini kısaltır ve çok sayıda klinik örnek aynı zamanda çalışılabilir. Tek cihazda çoğaltma ve saptama işlemi yapılabilir. Amplifikasyon sonrasında elde edilen ürünler “Syber green” boyası, FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) problemleri, moleküler firkete (Molecular Beacon) gibi yöntemler kullanılarak saptanabilir (54).

Klinik örneklerden direkt MTBK’in tanımlanması geliştirilen sistemler, nükleik asit amplifikasyonu (NAA) esasına dayalı sistemleri içerir. Bu sistemler için primer amplifikasyon hedefleri IS 6110 insersiyon dizisi ve 16S rRNA geni ile 23S rRNA’dır. Hasta örneklerinde (tercihen yayma pozitif solunum yolu örneklerinde) basilin DNA’sını saptayarak kültür sonucu belli olmadan kısa sürede (3-8 saat içerisinde) tanı konmasına yardımcı olabilen yöntemlerdir. Kültürde üretilen mikobakterilerin tanımlanması ve tüberküloz ilaç direnci ile ilgili mutasyonların saptanması için mikobakterilerin rRNA’sı ile hibridize olan özgül DNA problemleri geliştirilmiştir. Mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanmasında genellikle 16S rRNA, *hsp65*, *rpoB* gen bölgeleri hedef olarak seçilir (54).

2.5.5. İmmünolojik Yöntemler:

TDT, enfeksiyonu saptamada kullanılan geleneksel bir yöntemdir. Mikobakterilerin proteini saflaştırılıp bireyin ön kolun deri altına enjekte edilir ve 2-3 gün sonra reaksiyon oluşan bölgenin çapı ölçülür. Bu reaksiyon hücresel gecikmiş tipte bir aşırı duyarlılık reaksiyonudur. Çapın 10-15 mm'den büyük olması bireyin tüberküloz basiline maruz kaldığını gösterir (63). Aşılınmış kişilerde bu test pozitif olarak saptanır bu nedenle Türkiye'de testin tanısal değeri düşüktür.

IGST, T hücre temelli yöntemlerdir. Bu yöntemler kullanılarak, önceden duyarlı hale gelmiş lenfositlerin MTB'ye özgü ESAT-6 (early secretory antigenic target protein-6) ve CFP-10 (culture filtrate protein-10) proteinleri ile karşılaştığında ürettiği IFN- γ kantitatif olarak ölçülebilmektedir. Bu iki protein MTB'nin RD1 bölgesi tarafından kodlanır ve *M. bovis* BCG suşu ile TDM'nin çoğunda (*M. marinum*, *M. szulgai*, *M. kansasii*, *M. flavescens* hariç) yoktur. Farklı IGST'lerinin duyarlılık ve özgüllüklerinin kıyaslandığı çeşitli meta-analiz çalışmalarında, bu testlerin duyarlılıklarının PPD'ye göre yüksek olduğu (%70-90) sonucuna varılmıştır (25, 64).

Günümüzde kültür ve moleküler yöntemlerin bir kısmı tanı amacıyla rutin ve araştırma laboratuvarlarında kullanılırken, bazıları hala geliştirilme aşamasındadır. Bunlar kromatografik ("High Performance Liquid Chromatography", HPLC) sistemler, nükleik aside dayalı moleküler yöntemler (PZR, DNA prob hibridizasyon, DNA microarray, PZR-RFLP, PZR-DNA dizi analizi), mikobakteriyofajlarla RIF direnç tayini (Faj amplifikasyonu) gibi yöntemlerdir. Rutin mikrobiyoloji laboratuvarında pek kullanılmamakla birlikte "radio immunoassay" (RIA), "enzyme linked immunosorbent assay" (ELISA) ve lateks aglütinasyonu gibi immünolojik ve serolojik yöntemler kullanılarak monoklonal antikorlarla tür tayini yapılabilmektedir. Ayrıca tüberküloz menenjitte mikobakteriyel antijenlere karşı gelişen özgül antikorları saptayabilen ELISA IgM ve IgG kitleri klinik tanıya yardımcı olarak kullanılabilir (54).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Bakterinin Canlandırılması

Bu çalışmada *M. tuberculosis* H37 Ra suşu kullanıldı. Canlandırmak için LJ besiyerine ekildi ve 4-6 hafta 37 °C %5 CO₂'li etüvde besiyerinde kontaminasyon olup olmadığı kontrol edilerek inkübe edildi.

3.2. Kullanılan Malzemeler

3.2.1. Besiyerleri

LJ besiyeri (Becton Dickinson(BD),Franklin Lakes, New Jersey, USA)

MB 7H10 katı besiyeri (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

3.2.2. Kimyasal Maddeler

Oleik asit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Albümin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Katalaz (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Dekstroz (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

NaCl (Merck, Darmstadt, Germany)

NaOH (Merck, Darmstadt, Germany)

Trisodyum Sitrata (Na₃C₆H₅O₇.2H₂O)

NALC (C₅H₉NO₃S)

Disodyum Hidrojen Fosfat (Na₂HPO₄)

Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH₂PO₄)

HCl

Bazik Fuksin

Metilen Mavisi

Etanol

Fenol

Decomics homojenizasyon-dekontaminasyon kiti (Salubris, Türkiye)

DNA ekstraksiyon kiti (GeneAll, Korea)

Anyplex MTB/NTM Real-Time Detection kiti (Seegene, Korea)

3.3. Besiyerinin Hazırlanması

LJ besiyeri BD (New Jersey, USA) firmasından hazır olarak temin edildi.

Tablo 3.1. LJ besiyerinin içeriği.

Besiyerinin içeriği	Miktar
Monopotasyum Fosfat	2,5 g
Patates Unu	30 g
Magnezyum Sülfat	0,24 g
Malaşit Yeşili	0,4 g
Sodyum Sitrata	0,6 g
Gliserol	12,0 mL
L-Asparajin	3,6 g
Tüm Yumurta	1000 mL
(600 mL Saf Su için Yaklaşık Formül)	

MB 7H10 katı besiyeri 19 g tartılarak 900 ml distile su içerisinde çözdürüldükten sonra 5 ml giserol eklendi ve otoklavlandı. Eş zamanlı olarak OADC katkı çözeltisini hazırlamak için; 50 mg oleik asit, 5 g albümin, 2 g dekstroz, 4 mg katalaz, 850 mg NaCl tartıldı ve bütün malzemeler 100 ml su içinde eritildi. Por çapı 0,22 µm filtreden geçirerek sterilize edildi. Bu OADC katkı çözeltisinden sıcaklığı sıcaklığı 50-55°C düşen MB 7H10 besiyerinin içine 100 ml (%10) oranında eklendi ve çapı 90 mm olan petri kaplarına döküldü.

3.4. Kinyoun Boyama için Boyaların Hazırlanması

3.4.1. Karbolfuksin'in Hazırlanması

Dört gram bazik fuksin, 20 ml % 90-95'lik etanolde çözüldü. Fenolün %9'luk çözeltisinden 100 ml eklendi ve ışık almayan koyu renkli cam şişeye süzüldü.

3.4.2. Asit Alkol Çözeltisinin Hazırlanması

İkibin ml'lik mezür içerisinde 1940 ml saf alkol ve 60 ml HCl karıştırıldı.

3.4.3. Metilen Mavisi'nin Hazırlanması

Dört gram metilen mavisi 200 ml %95'lik etil alkol içinde eritildi. Üzerine 800 ml distile su eklendi ve ışık almayan koyu renkli cam şişeye süzüldü.

3.5. NALC-NaOH ile Homojenizasyon-Dekontaminasyon için Solüsyonların Hazırlanması

3.5.1. %2'lik NALC-NaOH Solüsyonunun Hazırlanması

Yirmi gram NaOH ile 14,5 g trisodyum sitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) bir litre distile suda çözüldü. Bu stok solüsyon otoklovda steril edildi. Kullanmadan önce her 100 ml için 0,5 g NALC ($\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_3\text{S}$) eklendi.

3.5.2 Fosfat Tamponu Hazırlığı

Disodyum hidrojen fosfatın (Na_2HPO_4) 2,37 g'ı 500 ml distile su ile karıştırıldı. Potasyum dihidrojen fosfatın (KH_2PO_4) 2,27 g'ı 500 ml distile su ile karıştırıldı. Her iki solüsyon otoklavda steril edildi ve eşit oranda karıştırıldı. pH 6,8 olacak şekilde

ayarlandı. pH 6,8'den düşük çıktığında Na_2HPO_4 'tan daha fazla eklenerek pH'yı yükseltildi. Yüksek çıktığında ise KH_2PO_4 'tan daha fazla eklenerek pH düşürüldü.

3.6. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması

Sekiz tane steril tüpün içine 900'er ml steril serum fizyolojik konuldu. İlk tüpe (108/ml) bir McFarland bakteri süspansiyonundan 100 µl eklendi. İlk tüpten son tüpe kadar bir önceki seyreltme yapılmış tüpten 100 µl alınarak seri seyreltilmesi yapıldı. Her seyreltme öncesinde tüpler vortekslenerek bakterinin iyice karışması sağlandı.

3.7. Homojenizasyon ve Dekontaminasyonların Yapılması

Yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanmış seri seyreltmeler, 50 ml'lik steril tüplerde 3'er mL bulunan balgamlara 0,5 ml olacak şekilde eklendi. Bu şekilde iki set hazırlandı. Sekiz tüpten oluşan ilk setin biri NALC-NaOH yöntemi ile diğeri ise Decomics kiti ile muamele edilerek homojenizasyon-dekontaminasyon işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem 37 defa uygulandı.

3.7.1. NALC-NaOH ile Homojenizasyon-Dekontaminasyon

Homojenizasyon-dekontaminasyonda balgam miktarı kadar NALC-NaOH çözeltisinden eklenerek 15 dk vortekslendi. Tüpteki çözeltinin üzerine, miktarın üç katı kadar fosfat tamponu eklenerek alt üst edildi ve 15 dk 3600 rpm de soğutmalı santrüfjüde $+4^\circ\text{C}$ 'de santrüfjü edildi. Santrüfjü sonrasında uygulanan işlemler de biyogüvenlik kabiniinde yapıldı. Santrüfjü olan sıvıların üst kısmı (tüpün altında 5 ml sıvı kalacak şekilde) atık kabına tek hamlede boşaltıldı. Üstüne tekrar birkaç damla fosfat eklenerek kültür işlemine hazır hale getirildi.

3.7.2. Decomics Kiti ile Homojenizasyon-Dekontaminasyon

Decomics kiti ile homojenizasyon-dekontaminasyon kullanım kılavuzuna uyularak yapıldı. Kısaca; hazırlanan ikinci set balgamların içine kitte bulunan sıvıdan eklendi, vortekslendi ve 10 dk bekletildi. Daha sonra 50 ml tüpün içindeki çözelti, kitin içinden çıkan kaba aktarıldı, üzerine boncuklar eklenerek 5 dk bekletildi. Son olarak tampon çözelti kapların içine aktarılarak 5 dk daha bekletildi ve kültür için işleme alındı.

3.8. Ekim ve Yayma İşleminin Yapılması

Homojenizasyon-dekontaminasyon uygulanmış 16 tüpün her birinden 100 µl LJ besiyerine, 100 µl MB 7H10 katı besiyeri kantitatif ekimi yapıldı. Aside dirençli boyama yöntemi ile boyanması için yaymalar hazırlandı, PZR için mikrosantrifüj tüplerine 1000 µl ayırıldı.

3.9. Aside Dirençli Boyamaların ve Mikroskopik İncelemelerin Yapılması

Üç kere alevden geçirilerek tespit edilen yaymalar Kinyoun boyama ile aside dirençli boyandı. Yaymalar 5 dk karbol fuksin ile muamele edildi. Daha sonra distile su ile yıkandı. Bir dk asit-alkol karışımı ile muamele edilip distile su ile yıkandı. Son olarak 2 dk metilen mavisi ile muamele edildi ve yine distile su ile yıkanarak fazla boyadan arındırıldı. Boyanmış yaymalar havada kuruduktan sonra 100x'lük objektif ile immersiyon yağı kullanılarak 300 alan tarandı.

3.10. "Real-time" PZR İşleminin Yapılması

3.10.1. DNA İzolasyonu:

DNA, GeneAll DNA ekstraksiyon kiti ile izole edildi.

Homojenizasyon-dekontaminasyon sonrası kapaklı mikrosantrifüj tüplerine alınan sıvı 13000 rpm'de beş dk santrifüj edildi. Tüpün üst kısmındaki sıvı pipetle alınarak atıldı. Çökelti üzerine 100 µl ekstraksiyon sıvısı eklendi ve karıştırıldı. Tüpler 100°C'de 20 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan çıkan örnekler 13000 rpm'de beş dk santrifüj edildi ve DNA elde edildi.

İzole edilen bakteri DNA'sı hemen işleme alınmayacaksa -20°C'ye kaldırıldı.

3.10.2 "Real-time" PZR'ın Yapılması:

"Real-time" PZR; "Seegene Anyplex MTB/NTM Real-time" PZR kiti kullanılarak amplifiye edilen mikobakteri genomu BIO RAD CFX96 cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

“Real-time” PZR karışımı; 2 µL 10XMTB/NTM Oligo Mix solüsyonu, 3 µL su, 10 µL 2 Anyplex PZR Master miks solüsyonları eklenerek 15 µL hazırlandı. 15 µL PCR mikse ve 5 µL örnek DNA’sı ilave edilmiştir.

PZR döngüleri 95°C’de 15 dk (1 döngü) sonrasında; denatürasyon 95°C’de 30 sn, primer bağlanma ve sentez 60°C’de bir dk (44 döngü) olacak şekilde ayarlandı (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. PZR döngüleri:

Reaksiyon sıcaklığı	Süre
95°C	15 dk (1 döngü)
95°C	30 sn (44 döngü)
60°C	1 dk (44 döngü)

3.11. İstatistiksel Analiz

Veriler istatistiksel olarak ordinal yapıdaki değişkenler için Wilcoxon Signed Ranks Test ve dikotom yapıdaki değişkenler için ise McNemar Test kullanılarak değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık çıkarımı yapmak için $p < 0,05$ sınırı kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler yerine göre yüzde, ortanca ve çeyreklerarası aralık olarak verildi.

4. BULGULAR

4.1. Aside Dirençli Boyama Sonuçları:

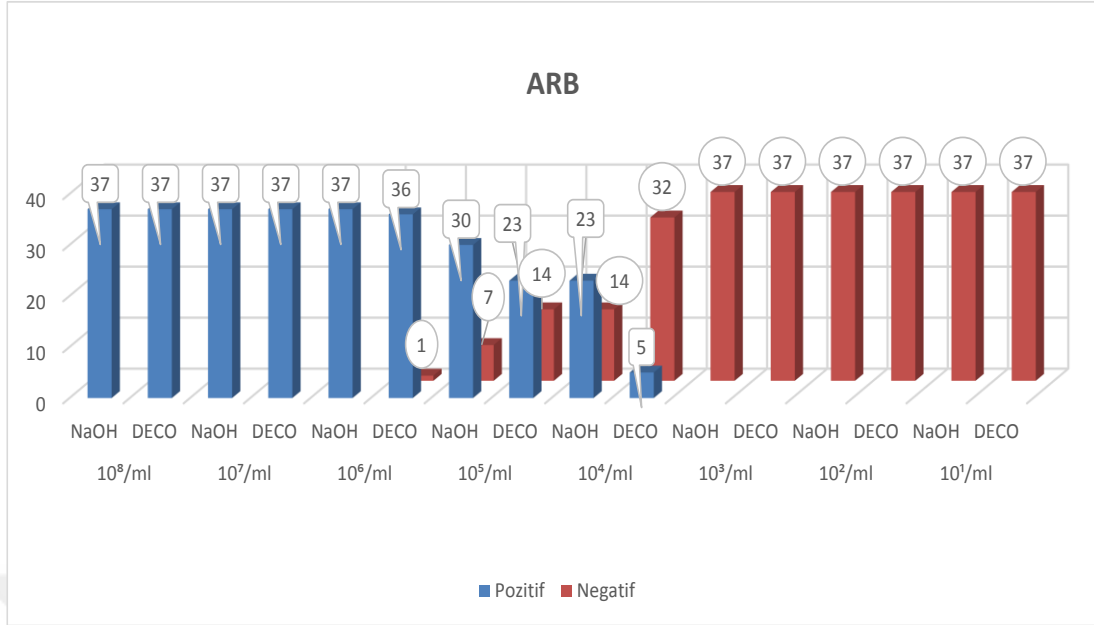
NALC-NaOH yöntemi ve Decomics kiti ile homojenizasyon-dekontaminasyonu yapılan ve içerisinde belirli oranda *M. tuberculosis* H37Ra suşu bulunan balgam örneklerinin ARB açısından incelenerek kıyaslanması yapıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.1'deki gibidir.

Tablo 4.1. ARB sonuçlarını sayısal ve yüzde olarak gösterimi.

ARB	n=37	10 ⁸ /ml		10 ⁷ /ml		10 ⁶ /ml		10 ⁵ /ml		10 ⁴ /ml									
		NaOH	DECO	NaOH	DECO	NaOH	DECO	NaOH	DECO	NaOH	DECO								
		Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif								
		37	100%	37	100%	37	100%	37	100%	36	97,30%	30	81,10%	23	62,20%	23	62,20%	5	13,50%
						1	2,70%	7	18,90%	14	37,80%	14	37,80%	32	86,50%				

ARB	n=37	10 ³ /ml		10 ² /ml		10 ¹ /ml		Toplam		
		NaOH	DECO	NaOH	DECO	NaOH	DECO	NaOH	DECO	
		Pozitif								155
Negatif	37	100%	37	100%	37	100%	37	100%	141	47,60%
									157	47%
									139	47%
									157	53%

Elde edilen sonuçlara göre; içerisinde 10⁸/ml-10¹/ml oranında bakteri bulunan balgamların NALC-NaOH ve Decomics kiti ile yapılan homojenizasyon-dekontaminasyon sonrasında hazırlanan yaymalardan Kinyoun boyama yöntemi ile aside dirençli boyama yapıldı. Üç yüz alan tarandı. 10⁸, 10⁷/ml oranında bakteri bulunduran balgamlar hem NALC-NaOH yöntemi ile hem de Decomics kitiyle yapılan homojenizasyon-dekontaminasyon sonrası alınan ARB'lerde 37 çalışmanın hepsinde ARB pozitif bulundu. Aynı işlemler 10⁶/ml oranında bakteri bulunan balgam örneklerine de uygulandı. Ancak NALC-NaOH yöntemi ile yapılan işlem sonrasında 37 örneğin tümü yayma pozitif saptanırken Decomics kiti ile yapılan homojenizasyon-dekontaminasyonda 36 örnek ARB pozitif olarak saptandı. Diğer tüberküloz basili katılmış örneklerdeki ARB sonuçları sırasıyla 10⁵/ml; NALC-NaOH yönteminde 37'de 30, Decomics'de 37'de 23; 10⁴/ml; NALC-NaOH yönteminde 37'de 23, Decomics'de 37'de 5 tanesi pozitif olarak saptandı. Hazırlanan diğer örneklerde, 10³/ml, 10²/ml, 10¹/ml oranında bakteri bulunan balgamlarda, ise her iki yöntemle yapılan homojenizasyon-dekontaminasyon sonrası hiç bir yaymada pozitiflik saptanmamıştır.



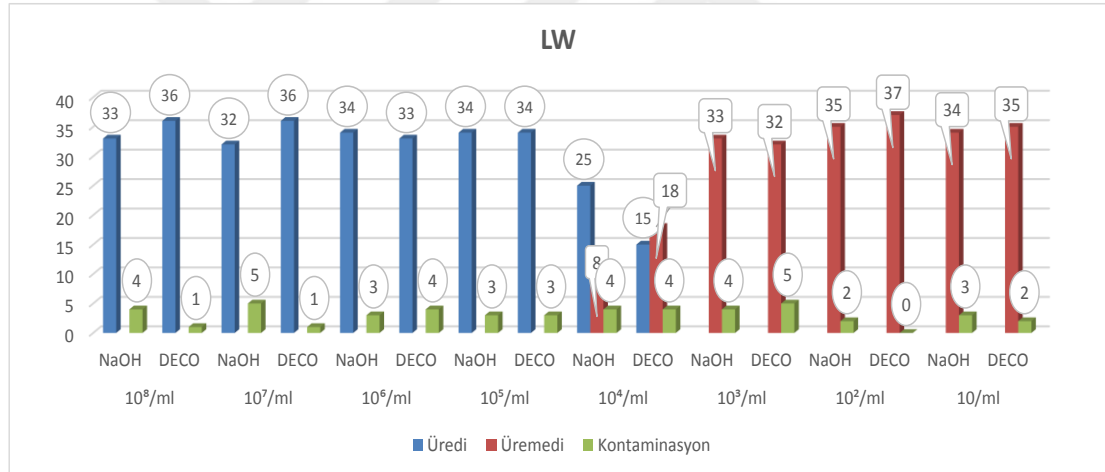
Şekil 4.1. NALC-NaOH yöntemiyle ve Decomics kiti ile homojenizasyon-dekontaminasyon sonrası yapılan yaymaların ARB verilerinin grafik ile gösterimi.

4.2. Kültür Sonuçları:

4.2.1. LJ Besiyerinde Üreme Sonuçları

İçinde 10⁸-10¹/ml oranında bakteri bulunan balgamlar NALC-NaOH yöntemi ve Decomics kiti ile homojenizasyon-dekontaminasyon uygulanması sonrasında LJ

kiti ile homojenizasyon-dekontaminasyonları yapılan ekimlerin 33 (%89,20)'ünde üreme tespit edilirken dört tanesinde kontaminasyon gözlemlendi. İçerisinde 10^5 /ml oranında bakteri bulunan balgamların her iki yöntemle yapılan homojenizasyon-dekontaminasyonları sonrası ekimlerin 34 (%91,90)'ünde üreme oldu, üçünde ise kontaminasyon gözlemlendi. İçerisinde 10^4 /ml oranında bakteri bulunan balgamların NALC-NaOH yöntemi ile homojenizasyon-dekontaminasyonu yapıp ekilenlerin 25 (%67,60)'ünde üreme tespit edilirken, sekizinde üreme gözlenmedi ve dört besiyerinde ise kontaminasyon gözlemlendi. Decomics kiti ile homojenizasyon-dekontaminasyonları yapıp ekilenlerin 15(%40,50)'ünde üreme gözlemlendi, 18'unda ise üreme gözlenmedi ve dördünde kontaminasyon tespit edildi. İçerisinde 10^3 - 10^2 - 10^1 /ml oranında bakteri bulunan balgamların her iki yöntemle de yapılan homojenizasyon-dekontaminasyon sonrası yapılan ekimlerinde üreme oranları yeterli olmadığı için değerlendirmeye alınmadı.



Şekil 4.2. NALC-NaOH yöntemiyle ve Decomics kiti ile homojenizasyon-dekontaminasyon sonrası LJ besiyerine ekilen balgamların üreyen, üremeyen ve kontamine olan kültür sayılarının grafik ile gösterimi.

4.2.2. MB Besiyerinde Üreme Sonuçları:

İçinde 10^8 - 10^1 /ml oranında bakteri bulunan balgamlar NALC-NaOH yöntemi ve Decomics kiti ile homojenizasyon-dekontaminasyon uygulanması sonrasında MB

besiyerine ekildi. Üremeler hergün kontrol edilerek 37°C'de 45 güne kadar inkübe edildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.3 , Tablo 4.4 ve Şekil 4.3'teki gibidir.

Tablo 4.3. MB 7H10 besiyerindeki kültür sonuçlarının sayısal ve yüzde değerleri.

MB		10 ⁸ /ml		10 ⁷ /ml		10 ⁶ /ml		10 ⁵ /ml		10 ⁴ /ml				
		NaOH	DECO	NaOH	DECO	NaOH	DECO	NaOH	DECO	NaOH	DECO			
Kontaminasyon	Üremedi	Üredi	4	33	2	35	4	33	3	34	4	28		
			10,80%	89,20%	5,40%	94,60%	10,80%	89,20%	8,1	91,90%	10,80%	75,70%		
			1	36		37	2	35	1	36	2	20		
			2,70%	97,30%		100,00%	5,40%	94,60%	2,70%	97,30%	5,40%	54,10%		

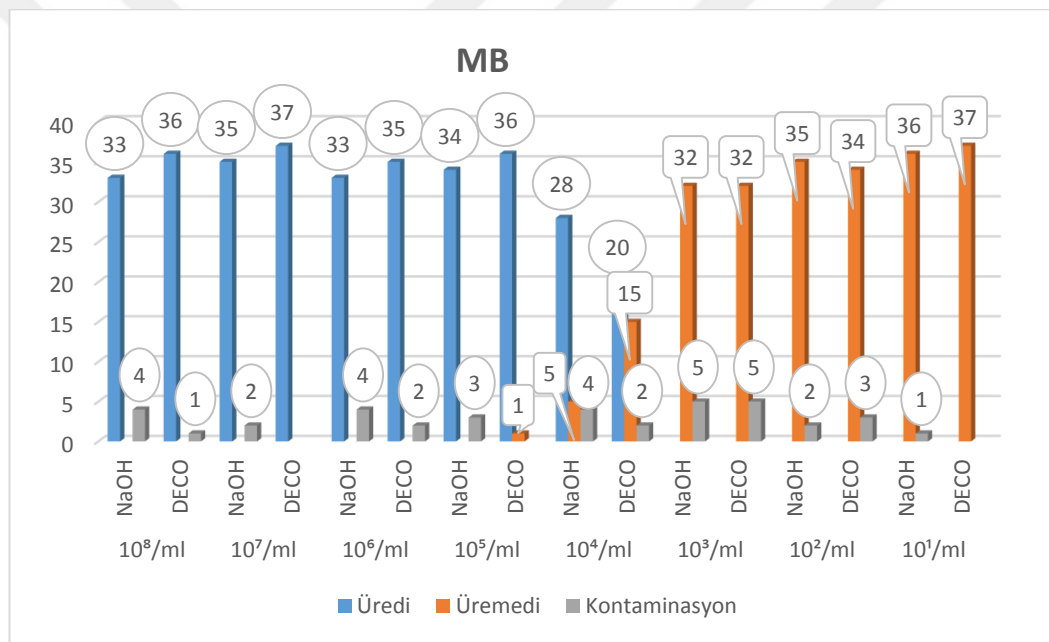
MB		10 ³ /ml		10 ² /ml		10 ¹ /ml		Toplam				
		NaOH	DECO	NaOH	DECO	NaOH	DECO	NaOH	DECO			
Kontaminasyon	Üremedi	Üredi	5	32	2	35	1	36	25	108	163	
			13,50%	86,50%	5,40%	94,60%	2,70%	99,30%	8,40%	36,50%	55,10%	
			5	32	3	34		37	13	119	164	
			13,50%	86,50%	8,10%	91,90%		100%	4,40%	40,60%	55%	

Tablo 4.4. MB 7H10 besiyerindeki koloni sayıları.

Koloni sayısı	n=37	10 ⁸ /ml		10 ⁷ /ml		10 ⁶ /ml		10 ⁵ /ml		10 ⁴ /ml		10 ³ /ml		10 ² /ml		10 ¹ /ml	
		NaOH	DECO	NaOH	DECO	NaOH	DECO	NaOH	DECO	NaOH	DECO	NaOH	DECO	NaOH	DECO	NaOH	DECO
		< 10000						3	8	27	35	29	20				
10000				4	8	19	7	1									
20000			4	7	16	6											
30000			5	4	4	2											
40000		1	3	13	2												
50000	4	11	15	7													
60000	2	3	7														
70000	4	7															
80000	13	8	1														
90000	3																
100000	7	7															

Elde edilen sonuçlara göre; içerisinde 10⁸/ml-10¹/ml oranında bakteri bulunan balgamların NALC-NaOH ve Decomics kitiyle yapılan homojenizasyon-dekontaminasyon sonrasında MB 7H10 besiyerine kantitatif ekim yapıldı. Üremeler hergün kontrol edilerek 37°C 45 gün inkübe edildi. 45 gün sonunda MB 7H10 besiyerinde üreme, ürememe, kontaminasyon ve koloni sayıları bakımından değerlendirildi. MB 7H10 besiyerinde; 10⁸/ml, 10⁷/ml, 10⁶/ml, 10⁵/ml, 10⁴/ml oranında bakteri bulunduran balgamların NALC-NaOH ve Decomics kiti ile homojenizasyon-dekontaminasyon sonrası üreme sayıları (yüzdeleri) sırasıyla; 33 (%89.20), 35(%94.60), 33 (%89.20), 34 (%91.90), 28 (%75.70); 36 (%97.30), 37 (%100), 35 (%94.60), 36 (%97.30), 20'dir (%54.10). 10³, 10², 10¹/ml'de ise iki yöntemde de üreme olmamıştır. Kontaminasyon sayılarına baktığımızda 10⁷, 10⁵/ml, 10¹/ml oranında bakteri olan balgamların Decomics ile homojenizasyon-dekontaminasyonu sonrası hiçbir MB 7H10 besiyerinde kontaminasyon gözlemlenmedi. Diğerlerinin hepsinde farklı oranlarda kontaminasyon gözlemlendi. Toplamda NALC-NaOH ve Decomics ile homojenizasyon-dekontaminasyon sonrası kontamine olan LJ besiyeri sayıları (yüzdeleri) 25 (%8.40) ve 13 (%4.40)'dir. 10⁸/ml, 10⁷/ml, 10⁶/ml 'da iki yöntemde de bakteri üremeyen besiyeri yokken 10⁵/ml, 10⁴/ml, 10³/ml, 10²/ml, 10¹/ml'de NALC-NaOH ve Decomics ile homojenizasyon-dekontaminasyon sonrası ürememe sayıları (yüzdeleri) sırasıyla; 3 (%13.50), 32 (%86.50), 35 (%94.60), 36 (%97.30); 1 (%2.70), 15 (%40.50), 32 (%86.50), 34 (%91.90), 37 (%100)'dir. Koloni sayısı bakımından incelendiğinde; 10⁸/ml oranında bakteri bulunan balgamların NALC-NaOH yöntemi ve Decomics kiti ile

homojenizasyon-dekontaminasyonları sonucu koloni sayıları (n) sırasıyla; 50.000 (4), 60.000 (2), 70.000 (4), 80.000 (13), 90.000 (3), 100.000 (7) cfu/mL üreme ve 40.000 (1), 50.000 (11), 60.000 (3), 70.000 (7), 80.000 (8), 100000 (7) cfu/mL üreme gözlemlendi. 10^7 /ml'de sırasıyla; 20.000 (4), 30.000 (5), 40.000 (3), 50.000 (15), 60.000 (7), 80.000 (1) cfu/mL üreme ve 10000 (4), 20.000 (7), 30.000 (4), 40.000 (13), 50.000 (7) cfu/mL üreme gözlemlendi. 10^6 /ml'de sırasıyla <10.000 (3), 10.000 (8), 20.000 (16), 30.000 (4), 40.000 (2) cfu/mL üreme ve <10.000 (8), 10.000 (19), 20.000 (6), 30.000 (2) cfu/mL üreme gözlemlendi. 10^5 /ml'de sırasıyla; <10.000 (27), 10.000 (7) cfu/mL üreme ve <10.000 (35), 10.000 (1) cfu/mL üreme gözlemlendi. 10^4 /ml'de ise sırasıyla; <10.000 (29) ve <10.000 (20) cfu/mL üreme gözlemlendi.



Şekil 4.3. NALC-NaOH yöntemiyle ve Decomics kiti ile homojenizasyon-dekontaminasyon sonrası MB 7H10 besiyerine ekilen balgamların üreyen, üremeyen ve kontamine olan kültür sayılarının grafik ile gösterimi.

4.3. RT-PCR Sonuçları:

Moleküler çalışma için ayrılan örneklerden 80 tanesine ve 10 pozitif örnekten ayrılan 20 örneğin 17 tanesine RT-PCR analizi yapıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.5 ve Şekil 5.4'deki gibidir.

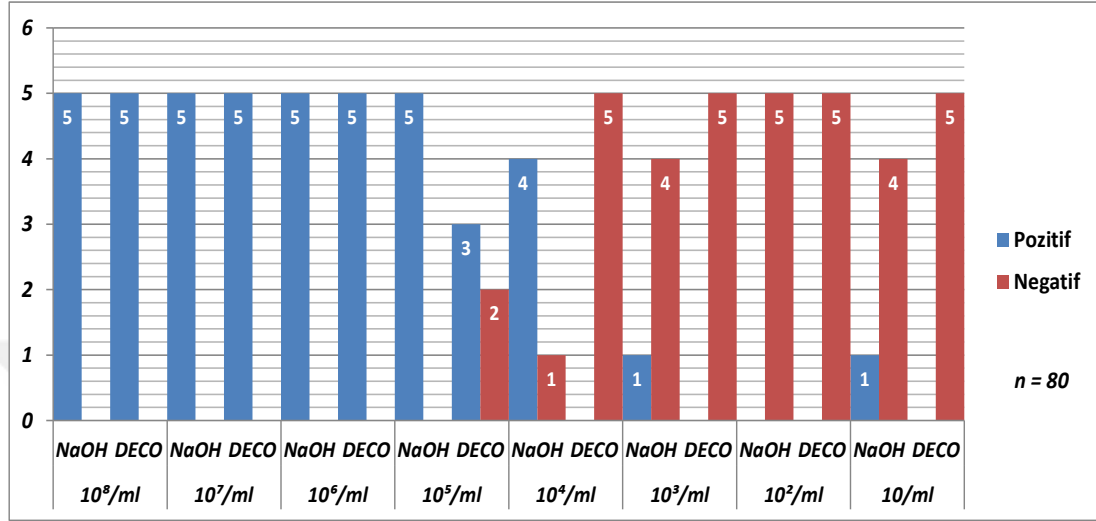
Tablo 4.5. RT-PCR sonuçlarının sayısal ve yüzde olarak gösterimi.

PCR	n=80	10 ⁸ /ml		10 ⁷ /ml		10 ⁶ /ml		10 ⁵ /ml		10 ⁴ /ml	
		NaOH	DECO	NaOH	DECO	NaOH	DECO	NaOH	DECO	NaOH	DECO
		Pozitif		Pozitif		Pozitif		Pozitif		Pozitif	
		5	100%	5	100%	5	100%	5	100%	3	60%
										2	40%
										1	20%
										5	100%

PCR	n=80	10 ³ /ml		10 ² /ml		10 ¹ /ml		Toplam	
		NaOH	DECO	NaOH	DECO	NaOH	DECO	NaOH	DECO
		Pozitif		Pozitif		Pozitif		Pozitif	
		1	20%			1	20%	26	65%
		4	80%	5	100%	4	80%	14	35%
		5	100%	5	100%	5	100%	22	55%
								18	45%

Elde edilen sonuçlara göre; içerisinde 10⁸-10⁷-10⁶/ml oranında bakteri bulunan balgamlarda hem NALC-NaOH yöntemi hem de Decomics kiti ile homojenizasyon-dekontaminasyon uygulandıktan sonra kalan sıvılardan rastgele seçilen beşinden yapılan RT-PZR'ların hepsi pozitif bulundu. İçlerinde 10⁵/ml oranında bakteri bulunan balgamların NALC-NaOH yöntemi ile yapılan homojenizasyon-dekontaminasyonu sonrası, sıvıdan yapılan PZR'ların hepsi pozitif iken, Decomics kiti ile homojenizasyon-dekontaminasyon yapılan örneklerin üç tanesi pozitif bulunurken ikisi negatif bulundu. İçlerinde 10⁴/ml oranında bakteri bulunan balgamların NALC-NaOH yöntemi ile yapılan homojenizasyon-dekontaminasyonu sonrası sıvıdan yapılan PZR'ların dördü pozitif biri ise negatif saptandı. Decomics kiti ile homojenizasyon-dekontaminasyon yapılan örneklerin beşi de negatif bulundu. İçlerinde 10³/ml ve 10¹/ml oranında bakteri bulunan balgamların NALC-NaOH yöntemi ile yapılan homojenizasyon-dekontaminasyonu sonrası alınan sıvıdan yapılan PZR'ların biri pozitif dördü negatif iken, Decomics kitiyle homojenizasyon-

dekontaminasyon yapılan örneklerin beşi de negatifti. İçlerinde $10^2/\text{ml}$ oranında bakteri bulunan balgamların homojenizasyon-dekontaminasyon sıvılarından yapılan PZR'ların beşi de negatif bulundu.



Şekil 4.4. NALC-NaOH yöntemiyle ve Decomics kiti ile homojenizasyon-dekontaminasyon sonrası RT-PZR sonuçlarının grafik ile gösterimi.

4.4. İstatistiksel Değerlendirme:

Verilerde; ordinal yapıdaki değişkenler için Wilcoxon Signed Ranks Test ve dikotom yapıdaki değişkenler için ise McNemar Test sonuçları aşağıda verildi.

MB ve LJ besiyerlerine ekimlerde 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^3 , 10^2 ve 10^1 /ml'de NALC-NaOH yöntemi ve Decomics kitinin sonuçları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. 10^4 /ml oranında bakteri bulunan örneğin ekimlerinde ise NALC-NaOH yöntemi Decomics kitine göre daha iyi bulunmuştur [MB(10^4 /ml) p= 0,039 ve LJ (10^4 /ml) p= 0,006)].

ARB ve PCR incelemelerinde 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^3 , 10^2 ve 10^1 /ml 'de NALC-NaOH yöntemi ve Decomics kitinin sonuçları arasında anlamlı bir fark yokken 10^5 /ml ve 10^4 /ml oranında bakteri bulunan örneğin ARB ve PCR'larında NALC-NaOH yöntemi Decomics kitine göre daha iyi bulunmuştur [ARB(10^5 /ml) p= 0,016 ve PCR(10^5 /ml) p= 0,5, ARB(10^4 /ml) p= 0,012 ve PCR(10^4 /ml) p=0,016)].

MB besiyerinde koloni sayısı bakımından incelendiğinde 10^4 , 10^3 , 10^2 ve 10^1 /ml'de NALC-NaOH yöntemi ve Decomics kiti arasında koloni sayıları bakımından anlamlı bir fark yokken 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 /ml' de NALC-NaOH yöntemi ile Decomics kiti arasında anlamlı bir fark vardır. Bu fark NALC-NaOH yöntemi lehinedir (10^5 /ml p= 0,004 ve 10^6 /ml p <0,001, 10^7 /ml p <0,001 ve 10^8 /ml p <0.001)

5. TARTIŞMA

Tüberküloz tedavi edilebilir bir hastalık olmasına rağmen yüksek mortalite ve morbidite oranlarından dolayı toplum sağlığını tehdit etmeye devam eden önemli bir hastalıktır. DSÖ'nün 2018 yılında yayınladığı raporda bunu destekler niteliktedir. Bu rapora göre, 2017 yılında 10 milyon yeni tüberküloz vakası bildirilmiştir. Bundan dolayı DSÖ bu raporda, 2025 yılına kadar tüberküloza bağlı ölümlerde %6,5 oranında azalma, tüberküloz insidansında da %10 oranında azalma hedeflendiği bildirilmiştir (3). Bu hedeflere ulaşmak için tüberküloz hastaları hızlı ve güvenilir bir şekilde teşhis ve tedavi edilmelidir. Tüberküloz tanısında kültür halen en güvenilir ve altın standart olan yöntemdir (66). Diğer klinik örneklerle karşılaştırıldığında balgam gibi mikrobiyota içeren örneklerde kontaminasyondan dolayı kültür verimi düşmektedir. Bu nedenle balgam gibi örneklerin homojenizasyon-dekontaminasyon işlemine tabi tutulduktan sonra ekimi yapılmaktadır. Rutin laboratuvar uygulamasında bu homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemlerinin bazı dezavantajları vardır. Homojenizasyon-dekontaminasyon işlemi zahmetli ve zaman alıcıdır. Ayrıca balgam örneğinin homojenizasyon-dekontaminasyonu sırasında mikrobiyota bakterilerinin yanı sıra mikobakteri basilleri de ölebilmektedir. Bu da içerisinde az basil bulunan örneklerin kültürünün negatif çıkmasına sebep olmaktadır. Homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemlerinin mikobakterinin sağkalım yüzdesi kullanılan yöntemle ve örnekte bulunan mikobakteriyel türlere göre değiştiği de gösterilmiştir (68, 69, 70). Homojenizasyon-dekontaminasyon sonrası yapılan kültürlerde kontaminasyon oranı ise %5-9 arasındadır (81).

Çalışmamızda, CLSI tarafından altın standart olarak gösterilen NALC-NaOH homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemi ile daha hızlı bir yöntem olduğu iddia edilen ve laboratuvar ekipmanlarına fazla gereksinimi olmayan Decomics homojenizasyon-dekontaminasyon kitinin etkinlikleri aside dirençli boyama (ARB), kültür ve PZR yöntemleri ile test edildi.

Klinik örneklerde homojenizasyon-dekontaminasyon sonrası yapılan yaymalardan aside dirençli boyama ile bakterilerin incelenmesi uygulama kolaylığı, ucuzluğu ve hızlı olması gibi nedenlerle yaygın olarak kullanılmaktadır. Preparatta basilin görülebilmesi için örneğin mililitresinde en az 5000 bakteri bulunmalıdır.

Örnekte 5000'den daha az bakteri varlığında yanlış negatif sonuçlar alınabilmektedir (71).

Çalışmamızda; NALC-NaOH yöntemi ve Decomics kiti ile homojenizasyon-dekontaminasyon sonrası yapılan yaymalar, tespit edildikten sonra, Kinyoun boyama yöntemi ile aside dirençli boyanmıştır. Işık mikroskopunda 100x'lük objektifte 300 alan taranmıştır. Yüksek (10^8 , 10^7 /ml) ve düşük (10^3 , 10^2 , 10^1 /ml) oranda bakteri bulunan balgamların mikroskopik inceleme sonuçları aynı bulunmuştur. Ancak 10^6 , 10^5 , 10^4 /ml oranında bakteri bulunan balgamların NALC-NaOH yöntemi ve Decomics kiti ile homojenizasyon-dekontaminasyon sonrası pozitiflik yüzdeleri sırasıyla %100, %97,30; %81,10, %62,20; %62,20, %13,50 olarak bulunmuştur. İçerisinde 10^5 , 10^4 /ml bakteri bulunan balgamların mikroskopik incelemesinde NALC-NaOH homojenizasyon-dekontaminasyon yönteminin Decomics kiti ile yapılan homojenizasyon-dekontaminasyon yönteminden daha üstün olduğu gösterilmiştir ($p=0,016$, $p=0,012$). Çalışmamızda; 10^5 /ml ve 10^4 /ml oranında bakteri eklenen balgamların ARB'sinin duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %76,7, %100 ve %28,6, %95,7 olarak bulunmuştur.

Türkiye'de 2014 yılında yapılan ve NALC-NaOH homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemi temel alınarak geliştirilen Mycoprosafe (Salubris Inc. İstanbul, Türkiye) kiti ve Decomics (Salubris Inc. İstanbul, Türkiye) homojenizasyon-dekontaminasyon kitini karşılaştıran bir çalışmada; 146 balgam örneği incelenmiştir. İki yöntemle de örneklerin %7,5 (11)'inin EZN boyama sonrası mikroskopik incelemesi negatif bulunmuştur. Örneklerin içerisinde çok düşük sayıda ($<1+ = 1-9$ aside dirençli bakteri) aside dirençli bakteri olmasının bir sonucu olabileceği vurgulanmıştır. Bu çalışma; mikroskopik inceleme açısından iki kitin sonuçlarının aynı olduğu göstermiştir (65).

Yaman ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; 572 örnek ile çalışılmış, 32 örneğin kültürü pozitif bulunmuş bunun da 15'inin EZN boyama sonrası mikroskopik incelemesi pozitif bulunmuştur. Bu çalışmada EZN boyama yönteminin duyarlılığı %47, özgüllüğü %98 bulunmuştur. ARB yönteminin düşük duyarlılığa sahip olması nedeniyle tek başına tanı için yetersiz olduğu ve hatalı sonuçlara neden olabileceği bildirilmiştir (71).

Çalışmamız, Karakeçe ve arkadaşlarının (65) çalışmalarında olduğu gibi Decomics kiti ile homojenizasyon-dekontaminasyonundan sonrası ARB kıyaslanmıştır. Onlar çalışmalarında Mycoprosafe (Salubris Inc. İstanbul, Türkiye) kiti ve Decomics (Salubris Inc. İstanbul, Türkiye) homojenizasyon-dekontaminasyon kiti arasında fark olmadığını belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise $10^5, 10^4$ /ml bakteri bulunan balgamların mikroskopik incelemesinde fark bulunmuştur (sırasıyla duyarlılık ve özgüllükleri %76,7, %100 ve %28,6, %95,7). Buda gösteriyor ki; balgamın içindeki bakteri sayısı azaldıkça ARB'nin duyarlılığı azalmaktadır. Bu çalışmada elde edilen düşük duyarlılık sonuçları bizim çalışmamızın doğruluğunu desteklemektedir.

Tüberkülozun kesin tanısı etkenin izolasyonu ve tanımlanması ile konulmaktadır. Moleküler teknikler gibi birçok teknik geliştirilmesine rağmen kültür hala önemini korumaktadır. Ayrıca ilaç duyarlılık gibi laboratuvar işlemlerinin yapılması için de besiyerinde üretmek şarttır. Örneğin mililitresinde 10-100 arasında bakteri bulunması kültür pozitifliği için yeterlidir (71). Kültürün kontaminasyonun önlemek için örneğin homojenizasyon-dekontaminasyonu çok önemlidir. Dünya çapında homojenizasyon-dekontaminasyon için farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden birçoğu basit, etkili ve düşük maliyetli bir teknik yaratmak amacıyla geliştirilmiştir. Kullanılan yöntemler arasında standart olan ve CLSI tarafından önerilen yöntem NALC-NaOH homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemidir (66, 81).

Bizim çalışmada; içerisinde 10^4 /ml oranında bakteri içeren balgamın LJ ve MB 7H10 besiyerinde de üreme oranına bakılınca NALC-NaOH ile yapılan homojenizasyon-dekontaminasyonunun Decomics kiti ile yapılan homojenizasyon-dekontaminasyondan daha iyi olduğu ($p= 0,006$, $p= 0,039$) diğer bütün balgamların üreme oranları arasında belirgin bir fark olmadığı gösterildi. Karakeçe ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; akciğer tüberkülozundan şüphelenilen hastalardan 146 balgam alınmıştır. Bu örnekler Mycoprosafe kiti ve Decomics kiti ile dekontamine edilmiştir. TCK-SLC-L (Salubris Inc. İstanbul, Türkiye) ve MGIT (Becton Dickinson) sıvı besiyerlerine inoküle edilmiştir. Mycoprosafe ve Decomics kitlerine göre üreme oranları sırasıyla %31,5 (46), %26,7 (39) olarak saptanmıştır. İki yöntem arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (65).

CLSI tarafından önerilen NALC-NaOH homojenizasyon-dekontaminasyon yönteminin çalışma süresinin uzun olması ve laboratuvar ekipmanları gerektirmesi en önemli dezavantajıdır. Bunun gibi dezavantajlardan dolayı yeni yöntem arayışlarına girilmiştir. Geliştirilen yeni yöntemlerin örneklerin içindeki mikrobiyota elamanlarını öldürürken MTB'yi en az oranda öldürmesi gerekmektedir. NALC-NaOH homojenizasyon-dekontaminasyon yönteminde %2-5 oranında kontaminasyon normal olduğu bildirilmiştir (75). Bazı çalışmalarda LJ'de daha yüksek kontaminasyon oranı bildirilmiştir (76).

Çalışmamızda; LJ ve MB 7H10 besiyerlerinde 10^8 - 10^1 /ml oranında bakteri bulduran balgamların NALC-NaOH ve Decomics kiti ile homojenizasyon-dekontaminasyonu sonrası kontaminasyon oranlarına baktığımızda Decomics kitinin daha iyi dekontamine ettiğini söyleyebiliriz. Gitteh ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; 68 balgam ile çalışılmış. Tüm örnekler NALC-NaOH homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemi ve %0,7 klorheksidin yöntemi ile dekontamine edilmiş. Homojenizasyon-dekontaminasyon sonrası sıvıdan LJ besiyerine ekilmiş. LJ besiyerinde NALC-NaOH ve %0,7 klorheksidin ile dekontamine edilen balgamlarda üreme oranları ve kontaminasyon oranları sırasıyla % 54,4 (37/68), % 61,8 (42/68) ve %4,4 (3/68), %1,5 (1/68)'dir. %0.7 klorheksidin ile homojenizasyon-dekontaminasyonun daha hızlı ve kontaminasyon oranının daha az olduğu vurgulanmıştır (73).

Brezilya'da 2017 yılında yapılan ve NaOH temelli iki yöntem olan Ogawa-Kudoh yöntemini Modifiye Petrof yöntemi ile karşılaştıran başka bir çalışmada; 166 akciğer tüberkülozu şüpheli hastadan 205 balgam örneği alınmıştır. Bu örneklerin homojenizasyon-dekontaminasyonları aynı anda Ogawa-Kudoh yöntemi ve Modifiye Petrof yöntemi ile yapılmıştır. Homojenizasyon-dekontaminasyon sonrası sıvı LJ besiyerine ekilmiş ve üremeleri gözlemlenmiştir. Çalışma sonrasında Ogawa-Kudoh yöntemi ve Modifiye Petrof yöntemi üreme yüzdeleri ve kontaminasyon oranları sırasıyla % 34,6 (71/205), % 37,1 (76/205); %6,4 (13/205), %2,9 (6/250) bulunmuştur. Bulgulara göre iki yöntem mikobakteri tespiti için etkin olup istatistiksel olarak üreme yüzdeleri ve kontaminasyon oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,54$, $p=0,065$) (77).

Çalışmamızda; MB 7H10 besiyerinde koloni sayılarına baktığımızda 10^8 /ml'de NALC-NaOH yönteminde koloni sayısı 50.000-100.000 kob/mL arasında iken Decomics kiti ile 40.000-100.000 kob/mL arasındadır. 10^7 /ml'de NALC-NaOH yönteminde 20.000-80.000 cfu/mL, Decomics kitinde ise <10.000-20.000 cfu/mL arasındadır. 10^6 /ml'de NALC-NaOH yönteminde <10.000-30.000 cfu/mL, Decomics kitinde ise <10.000-30.000 cfu/mL arasında, 10^5 /ml ve 10^4 /ml'de ise NALC-NaOH yönteminde <10.000 cfu/mL, Decomics kitinde ise <10.000 cfu/mL'dır. Bizim çalışmamızda NALC-NaOH homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemi ile bakteri kaybı Decomics kitine göre daha az olmuştur. Koloni sayıları özellikle NALC-NaOH homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemi ile dekontaminasyon sonrası daha yüksek bulunmuştur. Asmar ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 8 örnekten %0,7 klorheksidin homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemi kullanılarak üretilen MTB kolonilerinin sayısı (8, 47, 52, 83, >100, >100, >100, >100) NALC-NaOH homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemi ile üretilen koloni sayısından (12, 7, 8, 31, 13, 17, 66, >100) daha yüksek bulunmuştur (78). Bizim çalışmamızın aksine karşılaştırılan diğer yöntem, NALC-NaOH homojenizasyon-dekontaminasyon yönteminden daha yüksek koloni sayısı sahip olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda; içerisinde 10^4 /ml oranında bakteri içeren balgamın LJ ve MB 7H10 besiyerlerinde de üreme oranına bakılınca NALC-NaOH homojenizasyon-dekontaminasyonunun Decomics kiti ile yapılan homojenizasyon-dekontaminasyondan daha iyi olduğu ($p=0,006$, $p=0,039$) diğer bütün balgamların üreme oranları arasında belirgin bir fark olmadığı gösterildi. Karakeçe ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise (65) iki yöntem arasında kültürde üretme bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bunun sebebi içerisinde yoğun olarak tüberküloz basili içeren örnekler ile çalışılmasından kaynaklanabilir. Koloni sayılarına bakıldığında Decomics kiti ile dekontamine edilen balgamların MB 7H10 besiyerindeki koloni sayıları NALC-NaOH ile dekontamine edilenlerden daha düşük bulunmuştur. Bizim çalışmamızda özellikle NALC-NaOH homojenizasyon-dekontaminasyon yönteminin kontaminasyon oranı yüksek çıkmıştır. Bunun sebebi balgamın toplanarak çalışılması olabilir. Decomics kitinin kontaminasyon oranı ise NALC-NaOH'a göre daha düşük çıkmıştır.

NALC-NaOH homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemi ile başka homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemlerini karşılaştıran yayınlar da vardır. %0,7 klorheksidin ile kıyaslayan Gitteh ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, %0,7 klorheksidin yönteminin daha hızlı olduğu ve laboratuvar ekipmanı az olan laboratuvarlar ve sosyo-ekonomik açıdan az gelişmiş ülkeler için daha iyi olduğu vurgulanmıştır (73). Asmar ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada %0,7 klorheksidin yöntemini NALC-NaOH homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemi ile kıyaslamış koloni sayıları bakımından da %0,7 klorheksidin yönteminin daha iyi olduğunu göstermişlerdir (78).

Gambia'da 2016 yılında yapılan bir çalışmada; 75 balgam NALC-NaOH homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemi ve santüfuj gerektirmeyen ve örnek başına beş dakikada dekontaminasyon sağlayan Kudoh swab yöntemi ile dekontamine edilmiştir. İki yöntem arasında anlamlı bir fark olmadığı ancak Kudoh swab yönteminin daha basit ve ucuz bir yöntem olduğu vurgulanmıştır (74).

MTB'nin hızlı tespiti hasta tedavisi ve enfeksiyon kontrolü için çok önemlidir. Bazı tanısal yöntemlerin duyarlılığı düşükken bazı yöntemlerin ise sonuç verme süresi uzundur. MTB'nin yavaş üremesi göz önüne alındığında, nükleik asit amplifikasyon analizleri klinik örneklerde MTB'nin doğrudan tanımlanması için mükemmel araçlardır (79).

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre; 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 /ml bakteri içeren balgamların NALC-NaOH yöntemi ile homojenizasyon-dekontaminasyonu sonrası RT-PZR da pozitiflik yüzdesi % 100 iken Decomics kiti ile dekontaminasyonu sonrası RT-PZR da yüzdelerinde ise 10^8 , 10^7 , 10^6 /ml'de % 100 bulunmuştur. NALC-NaOH yöntemi ile homojenizasyon-dekontaminasyonu sonrası RT-PZR da pozitiflik yüzdesi % 0 olan sadece içerisinde 10^2 /ml bakteri bulunan balgamlarken Decomics kiti ile homojenizasyon-dekontaminasyonu sonrası RT-PZR da yüzdelerinde ise 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 /ml'de %0 bulunmuştur.

Vinuesa ve arkadaşlarının 2018 yılında yayınlanan çalışmalarında; 1020 hastadan solunum yolu örneği alınmış homojenizasyon-dekontaminasyon sonrası kültür ve RT-PZR (Abbott RT-MTB PCR) yapılmıştır. Onyediyen hastanın PZR'ı pozitif çıkmıştır. Bu 17 hastanın 12'sinin kültürü de pozitif bulunmuştur. Kültürü negatif,

PZR pozitif olan beş hastanın, tüberküloz tedavisi aldığı için kültür sonucunun negatif olduğu bildirilmiştir. PZR negatif, kültür pozitif olgular bildirilmemiştir. Ayrıca NTM olan hastaların hiçbirinin PZR'ı pozitif saptanmamıştır (80). Bizim ve Vinuesa ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın verilerine göre RT-PZR testi ile olası tüberkülozlu hastalardan alınan solunum örneklerinin kültür ile uyumlu olduğunu gösterilmiştir. Bu şekilde tanı ve antitüberküloz tedavisine başlama süresini PZR'ın azaltabileceği söylenebilir.

Bizim çalışmamız farklı bakteri yoğunluğu kullanılarak yapıldığı için özgün bir çalışmadır. Nitekim düşük veya yüksek yoğunlukta bakteri içeren örneklerde karşılaştırılan NALC-NaOH yöntemi ve Decomics kiti arasında fark olmadığı gösterilmiştir. Ancak orta yoğunlukta balgamlarda sonuçlarda farklılık gözlenmektedir. CLSI tarafından önerilen NALC-NaOH homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemi ile Dekomics kitini kıyaslamak için litaretürde tek çalışma bulunmaktadır. Karakeçe ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada için de ARB pozitifliği olan hasta örnekleri seçilmiştir. Bizim çalışmamızda yaptığımız gibi farklı yoğunlukta bakteriler ile çalışılmamıştır (65). NALC-NaOH homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemi ile farklı homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemleri de kıyaslanmış özellikle %0,7 klorheksidin ile yapılan homojenizasyon-dekontaminasyon yönteminin daha iyi olduğunu vurgulayan yayınlar vardır. Decomics kiti ile %0,7 klorheksidin ile yapılan dekontaminasyon yöntemini farklı konsantrasyonlarda bakteri kullanılarak kıyaslamamızın yararlı olacağı görüşündeyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

İki farklı homojenizasyon-dekontaminasyon yönteminin *M. tuberculosis* H37 Ra suşu katılarak hazırlanan balgam örneklerinde homojenizasyon-dekontaminasyonun etkinliği ARB, LJ ve MB 7H10 besiyerlerine ekilerek kültür ve RT-PZR yöntemleri ile ölçülmüştür.

Homojenizasyon-dekontaminasyon sonrası sıvıdan yapılan preparatlar tespit edildikten sonra ARB ile boyanmış ve mikroskopta incelenmiştir. Çalışma sonrası toplam verilere baktığımızda preparat NALC-NaOH homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemiyle 155 (%52,40) preparat, Decomics homojenizasyon-dekontaminasyon kiti ile 137 (%49) preparat pozitif olarak bulunmuştur. Yüksek ve çok düşük bakteri konsantrasyonları içeren balgamların ARB pozitiflik oranları iki homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemi ile de aynı bulunurken 10^5 , 10^4 /ml gibi orta düzeyde bakteri yoğunluğunun olduğu balgamların NALC-NaOH homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemi ile ARB pozitiflik oranları daha yüksek saptanmıştır.

Homojenizasyon-dekontaminasyon sonrası sıvıdan LJ besiyerine ve MB 7H10 besiyerine kantitatif ekim yapılmıştır. Çalışma sonrası toplam üreme ve kontaminasyon oranlarına baktığımızda LJ besiyerinde sırasıyla 158 (%53,40), 28 (%9,50)'dir. MB 7H10 besiyerinde ise sırasıyla 154 (%52), 20 (%6,80) bulunmuştur. Çalışmamızda iki homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemi arasındaki fark orta düzeyde 10^4 - 10^5 /ml bakteri yoğunluğu içeren tüplerde saptanmıştır.

Homojenizasyon-dekontaminasyon sonrası sıvıdan RT-PZR çalışılmıştır. Çalışma sonrası toplam verilere baktığımızda NALC-NaOH yönteminde 26 (%65), Decomics kitinde ise 18 (%45) pozitif saptanmıştır. Çalışma sayısı az olduğu için istatistiksel olarak anlamlı bir karşılaştırma yapılamamıştır. Daha fazla örnek ile çalışılarak moleküler açıdan kıyaslanması ile anlamlı sonuçlara ulaşılabileceği düşünülmektedir.

Decomics kiti ile homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemi daha hızlı olduğu, kontaminasyon oranı daha düşük olduğu, daha az ekipman gerektirdiği, içerisinde yoğun oranda bakteri bulunan örneklerde NALC-NaOH yöntemiyle

arasında istatistiksel olarak fark olmadığı için tüberkülozun yoğun olarak görüldüğü az gelişmiş ülkelerde kullanılabilir.



KAYNAKLAR

1. Brosch, R., Gordon, S.V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K. ve diğ erleri. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2002; 99 (6): 3684-3689.
2. Tünger A. Çavuşoğlu C. Korkmaz M. Asya Mikrobiyoloji kitabı. Meta Basım. İzmir.2005.
3. World Health Organisation (2018) Global Tuberculosis Report, (WHO/HTM/TB/2016.6.).
4. Dye, C., Watt, C.J., Bleed, D.M., Hosseini, S.M., Raviglione, M.C. (2005) Evolution of tuberculosis control and prpspects for reducing tuberculosis incidence, prevelance and deaths globally. JAMA, 293 (22), 2767-2775.
5. İsmail C, Mehmet B.S, Ahmet Saniç, Gülnur T. Tüberkülozda Bakteriyolojik Tanı. Ankara:2007: s:57
6. Davies PDO., Evans CC. Historicalbackground. In Clinical Tuberculosis. London:Chapman Hall ;1994.
7. Daniel, T.M. (1997) Captain of Death: The story of tuberculosis. Rochester, N.Y.: University of Rochester Press.
8. Grange JM. Mycobacterial disease in the world: Yesterday, today and tomorrow. The biology of Mycobacteria. Vol:3, London: Academic Press:1989;3,
9. Stead WW, Dutt AK. Epidemiyoloji ve konak faktörleri.(Tetik Kurt C., çeviri editörü.) Tüberküloz. İstanbul: Bilimsel ve Teknik Yayın Çeviri Vakfı; 1995;1-11.
10. René Jules Dubos, J.D. The White Plague: Tuberculosis, Man, and Society: Rutgers University Press. (1952)
11. Bloom BR, Murray CJL. Tuberculosis: Commentary on a reemergent killer. Science. 1992;257:1055-64.
12. Seber E. Tüberkülozun dünü. ANKEM Derg.2010;24(Ek 2):52-60
13. Thomas M. Daniel. The history of tuberculosis, Center for Global Health and Diseases, Case Western Reserve University School of Medicine, 2006.
14. Kochi A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. Tubercule 1991;72:1-6.
15. Türkiye Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. 2017 Türkiye’de Verem Savaşı Raporu. (THSGM/2018)
16. Tünger A. Çavuşoğlu C. Korkmaz M. Asya Mikrobiyoloji kitabı. Meta Basım. İzmir.2005
17. Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J., Zinkernagel, R. M. (2002) Tıbbi Mikrobiyoloji. 9. Basım. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002, s. 256-263
18. da Silva, P.A.,Aínsa, J.A. Drugs and drug interactions. *Tuberculosis*.2007: 593-633.
19. Köksal F. Yaman A. Farklı Bir Bakteri Topluluđu: Tüberküloz Basilleri Topluluđu[Bildirisi]. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu; 11 - 12 Haziran 2003;Samsun
20. Jose A, Luna A.C. Tuberculosis Guide for Specialist Physicians. 68 boulevard Saint Michel, 2003;75006 France
21. Tüberküloz Tanı ve Tedavi Rehberi. Sağlık Bakanlığı. Ankara: Başak Matbaacılık;2011.(SOR)
22. Geo.F.B.Mikobakteriler.Osman Ş.Y.. Jawetz, Melnick ve Adelberg Tıbbi Mikrobiyoloji, İstanbul:Nobel Tıp Kitabevi;2010

23. Cheon SA¹, Cho HH¹, Kim J², Lee J², Kim HJ³, Park TJ⁴. Recent tuberculosis diagnosis toward the end TB strategy. *J Microbiol Methods*. 2016;123:51-61.
24. Sester, M., Sotgiu, G., Lange, C., Giehl, C., Girardi, E., Migliori, G.B. ve ark. Interferon- γ release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur. Respir. J.* 2011; 37, 100–111.
25. Alp, A. Tüberkülozun laboratuvar tanısında güncel durum. *Hacet Tıp Derg.* 2011; (42), 28-33.
26. Steingart KR, Ng V, Henry M, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, et al. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2006; 6:664-74.
27. Perkins MD. New diagnostic tools for tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2000; 4(Suppl 2):S182-8.
28. Van Deun A, Maug AK, Cooreman E, Hossain MA, Chambuganj N, Rema V, et al. Bleach sedimentation method for increased sensitivity of sputum smear microscopy: does it work?. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2000; 4:371-6.
29. Trebucq A. Revisiting sputum smear microscopy. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2004; 8:805.
30. Chen, P., Shi, M., Feng, G.D., Liu, J.Y., Wang, B.J., Shi, X.D. et al. A highly efficient Ziehl–Neelsen stain: identifying de novo intracellular *Mycobacterium tuberculosis* and improving detection of extracellular *M. tuberculosis* in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* 2012;50, 1166–1170.
31. Peter, J.G., van Zyl-Smit, R.N., Denkinger, C.M., Pai, M. Diagnosis of TB: state of the art. *Eur. Respir. Mon.* 2012; 58, 124–143.
32. Marais, B.J., Brittle, W., Painczyk, K., Hesselning, A.C., Beyers, N., Wasserman, E. et al. Use of light-emitting diode fluorescence microscopy to detect acid-fast bacilli in sputum. *Clin. Infect. Dis.* 2008; 47, 203–207.
33. Matu, S.W., Juma, E., Improved Ziehl–Neelsen microscopy: bleach sputum smear-negative specimens after centrifugation. *J. Life Sci.* 2013; 7, 607–621.)
34. World Health Organisation (2013) Global Tuberculosis Report, (WHO/HTM/TB).
35. Kocagöz T, Akyar I, Revolutionizing Decontamination and Concentration Method for the Diagnosis of Tuberculosis. American Society for Microbiology Meeting; 2012; San Francisco
36. Chakravorty S, Dudeja M, Hanif M, Tyagi JS. Utility of universal sample processing methodology, combining smear microscopy, culture, and PCR, for diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:2703-8.
37. Padilla E, Manterola JM, Gonzalez V, Thornton CG, Quesada MD, Sanchez MD, et al. Comparison of the sodium hydroxide specimen processing method with the C18-carboxypropylbetaine specimen processing method using independent specimens with auramine smear, the MB/BacT liquid culture system, and the Cobas Amplicor MTB Test. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:6091-7.
38. Saxena S, Mathur M, Talwar VK. Detection of tubercle bacilli in sputum: application of sodium hypochlorite concentration method. *J Commun Dis.* 2001; 33:241-4.
39. Lawson L, Yassin MA, Ramsay A, Olajide I, Thacher TD, Davies PD, et al. Microbiological validation of smear microscopy after sputum digestion with bleach; a step closer to a one-stop diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis.* 2006; 86:34-40.
40. Nolte, F.S., Metchock, B. *Mycobacterium*. R. R. Murray (Ed.). *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: American Society for Microbiology Press; 1995.

41. Siddiqi, S. Procedure for primary isolation of mycobacteria from clinical specimens. BACTEC TB system product and procedure manual Becton Dickinson, Maryland, Revision E. pp II;1996
42. Ertuğran, S. Erişkin Tüberkülozunda Mikrobiyolojik Tanı. İ.Ü Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Erişkin Ve Çocukta Tüberküloz Sempozyumu. İstanbul;1999. S.49-52
43. Uzun M. Mycobacterium tuberculosis Kompleksi. Emel Bozkaya. Tıbbi Mikrobiyoloji-2-. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi;2012
44. Koneman, E.W., Winn, W., Allen, S., Janda, W., al., e. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Philadelphia Lippincott Williams Wilkins;2005
45. CLSI. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes approved standard CLSI document M24-A2 (2 bs.). Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute;2011
46. Otlu B. Mikobakterilerde Laboratuvar. Mustafa Altındış. Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar Kitabı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi;2013
47. Uzun M. Örneklerin İşlenmesi ve Kültür Yöntemleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu; 11 - 12 Haziran 2003; Samsun
48. Türk Thoraks Derneği. 2010. Tüberküloz, İstanbul: Aves Yayıncılık;2010, s.93
49. Siddiqi SH. Procedure for primary isolation of mycobacteria from clinical specimens. p. II.1-II.13. In BACTEC TB System Product and Procedure Manual 1989, Becton Dickinson, Maryland.
50. Rishi S, Sinha P, Malhotra B, Pal N. A comparative study for the detection of Mycobacteria by BACTEC MGIT 960, Lowenstein Jensen media and direct AFB smear examination. Indian J Med Microbiol. 2007; 25:383-6.
51. Chan DS, Choy MY, Wang S, Sng LH. An evaluation of the recovery of mycobacteria from urine specimens using the automated Mycobacteria Growth Indicator Tube system (BACTEC MGIT 960). J Med Microbiol. 2008; 57:1220-2.
52. Tortoli E, Cichero P, Piersimoni C, Simonetti MT, Gesu G, Nista D. Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: multicenter study. J Clin Microbiol. 1999 ;37(11):3578-82.
53. Baylan O, Kisa O, Albay A, Doganci L. Evaluation of a new automated, rapid, colorimetric culture system using solid medium for laboratory diagnosis of tuberculosis and determination of anti-tuberculosis drug susceptibility. Int J Tuberc Lung Dis. 2004; 8:772-7.
54. Özyurt M. Tüberkülozun Laboratuvar Tanısında Kullanılan Moleküler Ticari Tanı Sistemleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve 2. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun.
55. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2009;58:7-10
56. Crump JA, Tanner DC, Mirrett S, McKnight CM, Reller RB. Controlled comparison of BACTEC 13A, MYCO/F LYTIC, BacT/ALERT MB, and ISOLATOR 10 systems for detection of mycobacteremia. J Clin Microbiol 2003; 41:1987-90.
57. Van Rie A, Page-Shipp L, Scott L, Sanne I, Stevens W. Xpert MTB/RIF for point-of-care diagnosis of TB in high-HIV burden, resource-limited countries: hype or hope? Expert Rev Mol Diagn 2010; 10:937-46.

58. World Health Organization. Global tuberculosis report 2016:WHO report 2016. Geneva, Switzerland
59. World Health Organization. Xpert MTB/RIF implementation manual 2014. WHO, Geneva, Switzerland.
60. Greco S, Girardi E, Navarra A, Saltini C. Current evidence on diagnostic accuracy of commercially based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Thorax* 2006; 61:783-90.
61. Alp, A. Tüberküloz Tanısı. *Katkı*.2006; 28, 436-448.
62. Durmaz, R. *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji: Nobel Tıp Kitapevleri*. Ankara;2001
63. Wang, L., Turner, M., Elwood, R., Schulzer, M.,FitzGerald, J. A meta-analysis of the effect of Bacille Calmette Guerin vaccination on tuberculin skin test measurements. *Thorax*. 2002;57 (9), 804-809.
64. Erturan Z. Tüberkülozda diğer hızlı tanı testleri. Özkara Ş, Kılıçaslan Z (editörler). *Tüberküloz*. 1. Baskı. İstanbul: Türk Toraks Derneği, AVES Yayıncılık. 2010; 134-48.
65. Karakeçe E, Terzi H.A, Çiftçi İ.H. Could a Step in the Isolation of Mycobacteria from Sputum Samples be Eliminated by New Decontamination Kits?. *Pol J Microbiol*. 2014;63(3):369-71
66. Kurtoğlu M.G., M. Ozdemir, R. Keşli, B. Ozkalp and B. Baysal. Tüberküloz Şüpheli Hastalardan Mycobacterium tuberculosis Kompleks İzolasyon Oranı ve Suşların BACTECTM NAP ve İmmünokromatografik TB Ag MPT64
67. Peres R.L., E.L. Maciel, C.G. Morais, F.C.K. Ribeiro, S.A. Vinhas, C. Pinheiro et al. Comparison of two concentrations of NALC-NaOH for decontamination of sputum for mycobacterial culture. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis*. 2009;13(12): 1572–1575.
68. P.C. Buijtsels, P.L. Petit, Comparison of NaOH-N-acetyl cysteine and sulfuric acid decontamination methods for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *J.Microbiol. Methods*. 2005; 62: 83–88.
69. L. Grandjean, L. Martin, R.H. Gilman, T. Valencia, B. Herrera,W. Quino, et al, Tuberculosis diagnosis and multidrug resistancetesting by direct sputum culture in selective broth without decontamination or centrifugation, *J. Clin. Microbiol*. 2008;46:2339–2344.
70. Satapathy P, Das D, Murmu BN, Kar SK. Decontamination of sputum for longer time in sodium hydroxide for isolation of Mycobacterium tuberculosis. *Int J Mycobacteriol*. 2014;3(4):290-2
71. Yaman G, Parlak M, Demirkol M, Güdücüoğlu H, Berktaş M. Çeşitli Klinik Örneklerin EZN Boyama ve Tüberküloz Kültür Sonuçlarının Değerlendirilmesi. *Ortadoğu Medical Journal*. 2012; 4 (1): 19-22.
72. Karadağ A, Egemen U, Kemal B, Akif K.G, Cafer E, Murat G. Comparison of Culture, Real-Time DNA Amplification Assay and Ehrlich-Ziehl-Neelsen for Detection of Mycobacterium tuberculosis. *Balkan Med J*. 2013; 30(1): 13-5.
73. Gitteh E, Jacob O, Tijan J, Francis M, Isatou T, Nana B. et al. Evaluation of sodium hydroxide–N-acetyl-L-cysteine and 0.7% chlorhexidine decontamination methods for recovering Mycobacterium tuberculosis from sputum samples: A comparative analysis (The Gambia Experience). *Int J Mycobacteriol*. 2016;1: 167-168.
74. Jobarteh T, Jacob O, Ensa G, et al. Evaluation of the Kudoh method for mycobacterial culture: Gambia experience. *Int J Mycobacteriol*. 2016; 1: 166.

75. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults children, 2000. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:1376–95.
76. Mukesh S, Rabindra NM, Nageswari RG, Savita VJ, Kalpana A, Vivian W. Comparison of modified Petroff's and N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide methods for sputum decontamination in tertiary care hospital in India. *Tuberculosis (Edinb).* 2012;93:565–6.
77. Rodrigues da Costa R, Suzane F, Romário C, Raquel L, Thamisir V, Marcio R. Comparison between Ogawa-Kudoh and modified Petroff techniques for mycobacteria cultivation in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Einstein.* 2018;16(2):1-5.
78. Asmar S, Michel D. Chlorhexidine decontamination of sputum for culturing *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Microbiol.* 2015; 5(15):155.
79. Kim JU, Ryu DS, Cha CH, Park SH. Paradigm for diagnosing mycobacterial disease: direct detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex and non-tuberculous mycobacteria in clinical specimens using multiplex real-time PCR. *Jclinpath.* 2017;204945.
80. Vinuesa V, Borrás R, Briones ML, Clari MÁ, Cresencio V, Giménez E. May. Performance of a Highly Sensitive *Mycobacterium tuberculosis* Complex Real-Time PCR Assay for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in a Low-Prevalence Setting: a Prospective Intervention Study. *J Clin Microbiol.* 2018;56(5):00116-18.
81. Maciel E.L., T.N. Prada, R.L. Peres, M. Palaci, J.L. Jahnsen, R. Dietze. Guided sputum sample collection and culture contamination rates in the diagnosis of pulmonary. *TB. J. Bras. Pneumol.* 2009;35(5):460-463.

EKLER

EK.1. Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler ve Yayınlar

39th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology; July 01–04.2018 Dresden, Germany; Comparison of Decomics Decontamination Kit with Kubica Method for Recovery of *Mycobacterium tuberculosis* from Sputum.

COMPARISON OF DECOMICS DECONTAMINATION KIT WITH KUBICA METHOD FOR RECOVERY OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* FROM SPUTUM

Meltem OZDEN¹, Zeynep SARIBAS¹, Alpaslan ALP¹, Mutlu HAYRAN², Yakut AKYON¹
¹Hacettepe University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.
²Hacettepe University, Cancer Institute, Ankara, Turkey.

Introduction:
The aim of this study, was to compare Decomics decontamination and concentration kit with the Kubica (NaOH and N-acetyl-L-cysteine (NALC)) method in sputum samples that had been spiked with *Mycobacterium tuberculosis*.
Decomics is a decontamination and concentration kit that contains decontamination solution, absorbent beads and neutralization solution. Absorbent beads have smaller pores than bacteria and absorb the decontamination and neutralization solutions. Decomics kit does not require centrifugation and sample processing is completed in about 25 minutes.

Results:
In the acid-fast bacillus (AFB) staining of the samples, both methods detected AFB in concentrations between 10^8 - 10^4 /ml. In cultures, isolation rates in either LJ or MB7H10 agar were between 91-100%, in samples processed with Decomics in mycobacterial concentrations of 10^3 to 10^8 /ml. Isolation rates of cultures, in either LJ or MB7H10, decontaminated with Kubica method were between 91-94% in concentrations of 10^3 to 10^8 /ml. A decrease of 21 to 27% in isolation rates was observed in the concentration of 10^4 /ml. Kubica method detected 67% (LJ) and 75% (MB7H10) of the cultures while Decomics detected 40% (LJ) and 54% (MB7H10) of them. No colonies were seen in concentrations lower than 10^4 /ml in samples decontaminated with either of the methods. Of the 37 repeats five of them were tested with real-time PCR. Both methods detected bacilli in concentrations of 10^5 - 10^6 /ml. Kubica method detected bacilli in 5, 4, 1 of the sputum repeats in concentrations of 10^5 , 10^4 and 10^3 /ml respectively. Decomics detected 3 repeats in the concentration of 10^5 and none in concentrations of 10^4 or 10^3 /ml (Table 1).

Decomics Kit (Salubris)

Materials and Methods:
Serial dilutions of *M. tuberculosis* H37Ra strain (10^8 - 10^1 /ml) were prepared in three ml of sputum. Two series of spiked bacterial suspensions were prepared. One of the series was used for decontamination with Decomics decontamination kit and the other for Kubica method. Each group was repeated for 37 times.
Spiked sputum samples (3ml) were put into the decontamination solution, mixed by vortexing and was kept for 10 minutes at room temperature. Then absorbent beads were added and mixed by vortexing. After incubation for 5 minutes at room temperature, 100 µl of the decontaminated and concentrated sample was inoculated into both Löwenstein – Jensen (LJ) slants and Middlebrook (MB) 7H10 agar plates. Kinyoun acid-fast staining method was applied to the processed sample. Real-time PCR was done for five repeats for each sample.
Processed samples were directly used for real-time PCR. DNA extraction was done by GeneAII DNA extraction kit. The real-time PCR was performed using the Seegene Anyplex MTB / NTM real-time PCR Kit and BIO RAD CFX96 instrument. Briefly, 15 µL PCR mix and 5 µL sample DNA were used. The cycles were carried out at 95°C for 15 minutes for initial denaturation followed by 44 cycles of 95°C for 30 seconds, 60°C for 1 minute.

Conclusions:

- In high mycobacterial concentrations Decomics yielded high isolation rates. Kubica method, in general, yielded slightly lower isolation rates in high concentrations of bacteria. It may be due to the centrifugation process in Kubica method and hydrophobicity of mycobacteria. Probably, in this study, hydrophobic molecules attached to each other and centrifugation made the solution concentrated but a proper homogenization was not obtained. The part of the solution that did not contain *M. tuberculosis* bacilli were inoculated into the culture media. Since Decomics kit does not require centrifugation, it detected higher isolation rates in high concentrations of *M. tuberculosis*. As a result, it can be said that, Decomics efficiently decontaminates sputum and bacilli can be detected in the concentrations of approximately 10^5 - 10^8 /ml.
- Inability to detect mycobacteria by culture by both methods in samples at a concentration lower than 10^3 /ml may be due to inability of perfectly homogenizing mycobacteria to stand as a single bacterial cell due to their high hydrophobic nature, while preparing the simulated samples. The detection limit may be different by both methods in real sputum samples.
- Usage of Decomics decontamination kit can be helpful where tuberculosis is endemic and in areas where the laboratory facilities are inadequate since Decomics kit does not require centrifugation.
- Another advantage of Decomics kit is that decontamination and homogenization process is completed in 25 minutes instead of 45 minutes by Kubica method. It is a fast and easy way decontamination homogenization process.

Table 1: Number of positive results among 37 repeats of decontamination and homogenization processes.

	10 ⁸ /ml		10 ⁷ /ml		10 ⁶ /ml		10 ⁵ /ml		10 ⁴ /ml		10 ³ /ml		10 ² /ml		10 ¹ /ml	
	KUBICA	DECOMICS	KUBICA	DECOMICS	KUBICA	DECOMICS	KUBICA	DECOMICS	KUBICA	DECOMICS	KUBICA	DECOMICS	KUBICA	DECOMICS	KUBICA	DECOMICS
AFB n=37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0
LJ n=37 (%)	33 (89)	36 (97)	32 (86)	36 (97)	34 (91)	33 (89)	34 (91)	34 (91)	25 (67)	15 (40)	0	0	0	0	0	0
MB7H10 n=37 (%)	33 (89)	36 (97)	35 (94)	37 (100)	33 (89)	35 (94)	34 (91)	36 (97)	28 (75)	20 (54)	0	0	0	0	0	0
RT-PCR n=5	5	5	5	5	5	5	5	3	4	0	1	0	0	0	1	0

EK.2. Orjinallik Raporu ve Dijital Makbuz

Mycobacterium tuberculosis İzolasyonu Öncesinde Uygulanan İki Farklı Dekontaminasyon İşleminin Karşılaştırılması

ORJİNALLİK RAPORU

% 17	% 16	% 4	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.tip.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	% 6
2	www.klimik.org.tr İnternet Kaynağı	% 2
3	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	% 1
4	basm.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	xtremenutrients.com İnternet Kaynağı	% 1
6	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	% 1
7	biyologlar.com İnternet Kaynağı	% 1
8	library.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Meltem Özden
Ödev başlığı: Mycobacterium tuberculosis izolas...
Gönderi Başlığı: Mycobacterium tuberculosis İzolas...
Dosya adı: Meltem_o_zden_-tez_turnitin_i_in...
Dosya boyutu: 399.75K
Sayfa sayısı: 61
Kelime sayısı: 10,818
Karakter sayısı: 85,563
Gönderim Tarihi: 17-Ara-2018 11:59AM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1058160361



ÖZGEÇMİŞ**Kişisel Bilgiler**

Soyadı, Adı : ÖZDEN, Meltem
Uyruđu : T.C
Doğum Tarihi ve Yeri : 18.02.1981, Kaman
Medeni Hali : Evli
Telefon : 505 527 3478
e-mail : ozden.meltem00@gmail.com.

Eğitim**Tarih**

Yüksek Lisans	Hacettepe Üniversitesi	2014-2019
İngilizce Hazırlık	Hacettepe Üniversitesi	2013-2014
Pedagojik Formasyon	Gazi Üniversitesi	2012-2013
Lisans	Gazi Üniversitesi/Biyoloji	2002-2005