



T. C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* KOMPLEKS  
İZOLATLARINDA ÇEŞİTLİ DUYARLILIK  
YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Yasemin AY ALTINTOP

KAYSERİ – 2008



T. C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* KOMPLEKS  
İZOLATLARINDA ÇEŞİTLİ DUYARLILIK  
YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Yasemin AY ALTINTOP

Danışman  
Doç. Dr. Duygu EŞEL

KAYSERİ – 2008

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iv
KISALTMALAR.....	v
TABLO ve ŞEKİL LİSTESİ .....	viii
ÖZET .....	x
ABSTRACT .....	xii
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>4</b>
2.1. TARİHÇE.....	4
2.2. GENEL MİKROBİYOLOJİK ÖZELLİKLER .....	6
2.3. SINIFLANDIRMA .....	9
2.4. <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> KOMPLEKSİN MİKROBİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ .....	10
2.4.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	10
2.4.2. <i>Mycobacterium bovis</i> .....	11
2.4.3. <i>Mycobacterium africanum</i> .....	11
2.4.4. <i>Mycobacterium microti</i> .....	11
2.4.5. <i>Mycobacterium canettii</i> .....	11
2.5. ANTİJENİK YAPI .....	12
2.5.1. Mikobakteriyel proteinler.....	12
2.5.2. Mikobakteriyel lipidler .....	13
2.5.3. Mikobakteriyel polisakkaridler .....	15
2.6. PATOGENEZ VE VİRÜLANS .....	15

2.6.1. <i>M. tuberculosis</i> 'in savunma ve virulans faktörleri (Perzistans faktörleri) .....	16
2.6.2. Fagositozdan kaçış mekanizmaları .....	17
2.7. EPİDEMİYOLOJİ.....	17
2.7.1. Dünyada Tüberküloz .....	19
2.7.2. Ülkemizde Tüberküloz.....	20
2.8. KLİNİK TABLOLAR.....	20
2.8.1. Primer tüberküloz .....	20
2.8.1.1. Miliyer tüberküloz.....	21
2.8.2. Sekonder Tüberküloz.....	21
2.8.2.1. Endojen reaktivasyon .....	21
2.8.2.2. Ekzojen reinfeksiyon.....	21
2.8.3. Ekstrapulmoner tüberküloz .....	22
2.9. LABORATUVAR TANI .....	22
2.9.1. Aside dirençli boyama.....	22
2.9.2. Örnek alınması ve işlenmesi.....	23
2.9.3. Kültür.....	24
2.9.4. Tanımlama .....	28
2.9.4.1. NAP Testi (p-nitro- $\alpha$ -acetylamino- $\beta$ -hydroxypropiofenone) .....	28
2.9.4.2. Moleküler Yöntemler .....	29
2.9.5. Antibiyotik duyarlılık testleri .....	29
2.9.5.1. Agar orantılama yöntemi.....	31
2.9.5.2. BACTEC 460 TB (Radyometrik) Antibiyotik duyarlılık testi .....	31
2.9.5.3. MGIT 960 ( Florometrik ) Antibiyotik duyarlılık testi .....	32
2.9.5.4. Etest duyarlılık yöntemi .....	32
2.10. KORUNMA VE KONTROL .....	32
2.10.1. Birincil Koruma.....	32

2.10.2. İkincil koruma .....	33
2.11. TEDAVİ .....	33
2.11.1. Birinci seçenek antitüberküloz ilaçlar .....	33
2.11.2. İkinci seçenek ilaçlar .....	35
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>36</b>
3.1. BAKTERİLERİN TANIMLANMASI.....	36
3.1.1. NAP Testi (p-nitro- $\alpha$ -acetylamino- $\beta$ -hydroxypropioiophenone) (MGIT) .....	36
3.2. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ .....	37
3.2.1. Agar orantılama yöntemi .....	37
3.2.2. BACTEC 460 TB (Radyometrik) Antibiyotik duyarlılık testi .....	40
3.2.3. MGIT 960 ( Florometrik ) Antibiyotik duyarlılık testi .....	42
3.2.4. Etest duyarlılık yöntemi .....	44
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>46</b>
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>50</b>
<b>6. SONUÇLAR.....</b>	<b>61</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>63</b>
<b>Kabul Onay Sayfası.....</b>	<b>73</b>

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince bilgi ve birikimiyle yardımlarını esirgemeyen, sabırla destekleyen değerli hocam, tez danışmanım Doç. Dr. Duygu EŞEL'e; asistanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini tevazuyla paylaşan değerli hocalarım Prof. Dr.Yusuf ÖZBAL'a, Prof. Dr. Hüseyin KILIÇ'a, Prof. Dr. A. Bülent SÜMERKAN'a, Prof. Dr. A. Nedret KOÇ'a, Doç. Dr. Selma GÖKAHMETOĞLU'na, Uzm. Dr. Mustafa ÖZCAN'a teşekkür ederim.

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Merkez Laboratuvarı çalışanlarına da asistanlık eğitimim boyunca yardımlarını esirgemedikleri için teşekkür ederim.

Hayatım boyunca ve özellikle tez dönemimde sabırla destekledikleri için annem, babam ve kardeşlerime; yanımda olan eşime ve beni bu dönemde anlayışla bekleyen oğullarıma teşekkür ederim.

## KISALTMALAR

AO	: Agar Orantılama
Acr	: Alfa kristalin proteini
AIDS	: Acquired Immun Deficiency Syndrome
AraLAM	: Arabinan terminaline mannoz bağlı olmayan lipoarabinomannan
ARB	: Aside dirençli basil
ATCC	: American Type Culture Collection
BAL	: Bronko alveolar lavaj sıvısı
BCG	: Bacille Calmette Guerin
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
CDC	: Centers for disease Control and Prevention
CFP	: Culture Filtrate Protein
CFU	: Colony Forming Unit
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
ÇİD	: Çok İlaç Dirençli Tüberküloz
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ELISA	: Enzyme Linked Immune Sorbent Assay
ESAT	: Early Secretory Antigenic Target
ETM	: Etambütol
HIV	: Human Immune Deficiency Virus
INF	: İnterferon
İNH	: İsoniazid
g	: Gravite

GI	: Growth Index
LAM	: Liporabinomannan
LZR	: Ligaz Zincir Reaksiyonu
ManLAM	: Arabinan terminaline mannoz bağlı Lipoarabinomannan
MDP	: Müramil dipeptit
MGIT	: Mycobacteria Growth Indicator Tube
MHC	: Major Histocompatibility Complex
MİK	: Minimal İnhibitor Konsantrasyon
MOTT	: <i>M. tuberculosis</i> kompleks dışı mikobakteriler (Mycobacteria Other Than Tuberculosis Complex)
M.Ö.	: Milattan Önce
NaCl	: Sodyum Klorür
NALC	: N-asetil L-sistein
NaOH	: Sodyum hidroksit
NAP	: N-asetil beta hidroksi propiyofenon
OADC	: Oleik asit, Albumin, Dekstroz, Katalaz
OT	: Old Tüberkülin
PANTA	: Polimiksin B, Amfoterisin B, Nalidiksik asit, Trimetoprim, Azlosilin
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
kDa	: Kilo Dalton
PPD	: Purified protein derivative
PAS	: Para Amino Salisilik asit
PZD	: Pirazinamid
PIM	: Fosfatidil inozitol mannozit
PNB	: Para nitro benzoik asit



PNL	: Polimorf nüveli lökosit
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RCF	: Relative Centrifugal Force
RD	: Region of Difference
RİF	: Rifampisin
RNA	: Ribonükleik asit
SDA	: Strand Displacement Amplification
STR	: Streptomisin
T2H	: Tiyofen – 2 – karboksilik asit hidrazid
TMA	: Transcription mediated amplification
TNF	: Tümör Nekrozis Faktör
TU	: Todd ünitesi
UV	: Ultraviyole
YİD	: Yaygın ilaç dirençli tüberküloz

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> Woods ve Washington sınıflandırması.....	10
<b>Tablo 2.</b> Bazı <i>M. tuberculosis</i> kompleks üyelerinin identifikasyon özellikleri .....	12
<b>Tablo 3.</b> Mikobakterilerin genel üretim besiyerleri .....	24
<b>Tablo 4.</b> Mikobakterilerin seçici besiyerleri .....	25
<b>Tablo 5.</b> Tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlar .....	35
<b>Tablo 6.</b> Middlebrook 7H10 besiyerine eklenen ilaçların stok ve çalışma konsantrasyonları .....	38
<b>Tablo 7.</b> Agar plaklarındaki mikobakteri kolonilerinin üreme yönünde kantitasyonu .....	40
<b>Tablo 8.</b> BACTEC 460TB duyarlılık testinde liyofilize antibiyotiklerden stok solüsyon hazırlama ve 12B besiyerindeki son antibiyotik konsantrasyonları .....	42
<b>Tablo 9.</b> MGIT liyofilize antibiyotiklerinin dilüsyon şeması ve MGIT tüpündeki son konsantrasyonları .....	44
<b>Tablo 10.</b> <i>M. tuberculosis</i> kompleks suşlarının izole edildiği klinik örnekler .....	46
<b>Tablo 11.</b> Altın standart yöntemine göre suşların duyarlılık ve direnç durumu .....	47
<b>Tablo 12.</b> Agar orantılama ve BACTEC yöntemleriyle antitüberküloz ilaç duyarlılığı, testin duyarlılığı ve özgüllüğü .....	47
<b>Tablo 13.</b> Agar orantılama ve MGIT yöntemleriyle antitüberküloz ilaç duyarlılığı, testin duyarlılığı ve özgüllüğü .....	48
<b>Tablo 14.</b> Agar orantılama ve Etest yöntemleriyle antitüberküloz ilaç duyarlılığı, testin duyarlılığı ve özgüllüğü .....	48
<b>Tablo 15.</b> Agar orantılama yöntemi altın standart olarak alındığında diğer duyarlılık yöntemleriyle test edilen antitüberküloz ilaçlar için hata oranları .....	49
<b>Tablo 16.</b> Dirençli izolatların özellikleri .....	49
<b>Tablo 17.</b> Testlerin ortalama süreleri .....	49
<b>Tablo 18.</b> Ülkemizde çeşitli bölgelerden elde edilen direnç oranları .....	53

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Mikobakteri hücre duvarı yapısı .....	8
--	---

**MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS KOMPLEKS  
İZOLATLARINDA ÇEŞİTLİ DUYARLILIK YÖNTEMLERİNİN  
KARŞILAŞTIRILMASI**

**ÖZET**

*Mycobacterium tuberculosis* güncel tanı ve tedavisine rağmen hala önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir. Hastaların tedaviye uyumsuzluğu ve etkili olmayan ilaç kombinasyonları giderek artan ilaç direncine yol açmaktadır. Bu çalışmada bölgemizdeki *Mycobacterium tuberculosis* kompleks izolatlarının çeşitli yöntemlerle duyarlılığı çalışılarak hem izolatların duyarlılık paterninin ortaya konması hem de yöntemlerin karşılaştırılması amaçlandı.

Çalışmaya alınan 33 pulmoner ve ekstra pulmoner klinik örnekten izole edilen mikobakteriler, konvansiyonel yöntemler, NAP testine ek olarak kimyasal yöntemlerle *M. tuberculosis* kompleks olarak tanımlandı. Bu izolatların streptomisin (STR), izoniazid (İNH), rifampisin (RİF), etambutole (ETM) duyarlılıkları Middlebrook 7H10 besiyeri ile agar orantılama (AO); BACTEC 460TB ve MGIT 960 ve Etest yöntemleri ile çalışıldı. Standart yöntemler için CLSI'ın önerdiği kritik ilaç konsantrasyonları kullanıldı. MGIT için üretici firmanın önerdiği miktarlar kullanıldı. Standart testlerin kritik ilaç konsantrasyonları Etest sınır değerleri olarak kabul edildi.

Standart yöntemle iki izolat İNH ve RİF'e dirençli bulunurken diğer izolatlar tüm ilaçlara duyarlıydı. Tüm antibiyotikler için AO ve BACTEC arasında % 100 uyum bulundu. MGIT yöntemi ile STR için bir suş AO yöntemine göre yanlış dirençli bulundu. Etest yöntemiyle küfle kontaminasyon nedeniyle ancak 15 izolattan sonuç alındı. İNH ve RİF için Etestin AO ile uyumu % 98 iken STR ve ETM için % 100 uyum bulundu.

Agar orantılama yöntemi uzun zaman alması ve uğraştırıcı olmasına rağmen arada kalan test sonuçlarını çözmekte kullanılmalıdır. BACTEC 460TB standart sonuç verdiği için referans laboratuvara doğrulama için suş gönderemeyen laboratuvarlarda tercih edilebilir. MGIT 960 sistemi çok örnek çalışan, standart suşlarla uyumsuz

sonuçları kontrol edebilen laboratuvarlara uyabilecek bir sistem olarak görünmektedir. Ancak kontaminasyon riski fazladır. Etest ise az örnek çalışan laboratuvarların ilk tercihi olmamalı. Maliyeti de düşünen merkezler için pahalı gibi görünen ancak tek seferde sonuç verecek sistemlerin kullanılması gerekmektedir.

**COMPARING SUSCEPTIBILITIES OF THE ISOLATES OF  
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX BY DIFFERENT  
SUSCEPTIBILITY METHODS**

**ABSTRACT**

In spite of current diagnosis and treatment, *Mycobacterium tuberculosis* is still an important cause of mortality and morbidity. Uneffective drug combinations and patient in compliance lead to increasing drug resistance. This study by managing different susceptibility methods was carried out to determine the susceptibility patterns of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in our region and to compare the methods.

A total of 33 isolates from pulmonary and extrapulmonary sites were identified as *M. tuberculosis complex* by chemical methods if needed as addition of conventional methods and NAP testing. Antimicrobial susceptibility testing was performed by agar proportion (AP) on Middlebrook 7H10 medium, BACTEC 460TB, MGIT 960 and Etest for streptomycin (STR), isoniazide (INH), rifampicin (RIF) and ethambutol (ETM) using recommended critical drug concentrations by CLSI. These critical concentrations were also accepted as breakpoints in Etest method.

Only two isolates were together resistant to INH and RIF by agar proportion and the rest of the isolates were all susceptible. The agreement between AP and BACTEC 460 TB was 100 %. By MGIT one isolate was false resistant to STR. Only the MIC's of 15 of 33 isolates were determined by Etest due to contamination by mould. The agreement with AP were 100 % for STR and ETM, and 98% for INH and RIF.

Although the proportion method is difficult and cumbersome, it could be used to evaluate discordant results. BACTEC 460TB can be preferred in laboratories which cannot send discordant isolates to the reference laboratories, as it gives reliable results. MGIT system is suitable for laboratories having much more contamination risk. Etest should not be the first choice of laboratories managing few tests. For

centers taking into the financial problem account, the systems which are able to give accurate results are needed even if they are expensive.

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Tüberküloz başta akciğer olmak üzere tüm organ ve sistemleri tutabilen, tanımlanmış tedavisi olmasına rağmen uygun tedavi edilmediğinde hayatı tehdit eden sekellerle sonuçlanabilen bir hastalıktır.

Günümüzde dünya nüfusunun 1/3'ünün tüberküloz basili ile infekte olduğu tahmin edilmektedir. Basili taşıyan kişilerin 30 milyonu aktif tüberküloz hastası olup, hastalık her yıl yaklaşık 3 milyon kişinin ölümüne neden olmaktadır. Ölüm ve hastalığın görülme oranının artışı tanı koymada gecikme, etkili tedavinin planlanması ve uygulanmasında başarısızlıktan kaynaklanmaktadır (1).

Tüberküloz hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerin önemli halk sağlığı sorunlarından (2). Dünya sağlık örgütünün (DSÖ) tüberküloz için önerdiği standart tedavi rifampisin (RIF), izoniazid (INH), pirazinamid (PZD), streptomisin (STR) ya da etambutolden (ETM) oluşan çoğul ilaçla tedavidir. Bu yöntem sıklıkla *Mycobacterium tuberculosis* komplekse etkilidir. Ancak yüksek oranda ilaç direncinin bulunduğu durumlarda tedavi etkisiz olmakta ve başarı oranı düşmektedir. Bu durumda standart tedavi devam ettirilirse sağaltım oranı düşük bulunmakta ve direnç oranı artmaktadır (3).

CDC (Centers for Diseases Control and Prevention),

- i- Kültüründe *M. tuberculosis* kompleks izole edilen her hastaya,
- ii- Üç aylık tedaviden sonra yayma ve kültür pozitifliği devam eden ve
- iii- Tedaviye klinik yanıtı olmayan bütün hastalara duyarlılık testi yapılmasını



önermektedir (4).

Ayrıca dirençli tüberküloza sahip bir hastayla temas öyküsü bulunanlar, Human immune deficiency virus (HIV) ile infekte olup kaviter lezyonu bulunanlar, sosyoekonomik düzeyi düşük insanlar, yüksek ilaç direnci bulunan (primer izoniazid direnci % 4'den fazla) bölgelerde yaşayanlar tedaviye başlamadan önce mutlaka direnç varlığı yönünden incelenmelidir (5).

En az izoniazid ve rifampisine birlikte olmak üzere daha fazla antitüberküloz ilaca dirençli suş çok ilaca dirençli (ÇİD) *M. tuberculosis* suşu olarak tanımlanmıştır. Bu durumda standart tedavinin etkinliği % 15-77 ye düşmektedir (3).

Duyarlılığın zamanında ve sistematik ortaya konması;

i-İlaç dirençli suşların hızlı yakalanması

ii-Hastaların etkin tedavisi ve

iii-Çok ilaca dirençli tüberkülozun yayılımının azaltılması, uygun halk sağlığı ölçülerini belirlemesi için şarttır.

CDC, klinik örnek laboratuvara kabul edildikten sonra ortalama 28 günde *M. tuberculosis* kompleks için duyarlılık testlerinin sonuçlanmasını önermektedir (4). Bu amaçla bütün dünyada yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri agar orantılama yöntemi olup, CLSI (Clinical Laboratory Standards of Institute) M24-A standardında altın standart olarak kabul edilmektedir (6). Bu yöntem zaman alan, zahmetli, değerlendirmesi uzmanlık gerektiren bir yöntemdir. Agar orantılama yöntemi referans yöntem olma özelliğini devam ettirmektedir ancak sadece ilk sıra antitüberküloz ajanlar için standardize edilmiştir. Sonuç almak için de 3 hafta kadar zaman gerekmektedir. BACTEC 460TB (Becton Dickinson Diagnostic Instruments, Sparks, MD) radyometrik yönteminde ise daha hızlı sonuç alınır ancak radyoizotop kullanılır. Etest (AB BIODISK, Solna, Sweden) hızlı üreyen mikobakteriler için hızlı başka bir duyarlılık yöntemi seçeneğidir (7). MGIT 960 (Becton Dickinson Diagnostic Instruments, Sparks, MD) floresan kullanan oksijene duyarlı bir kültür sistemidir, radyoizotop kullanılmaması avantajdır.

Bu çalışmada; *M. tuberculosis* kompleks suşlarının tüberküloz tedavisinin dört temel ilacı olan STR, ETM, İNH ve RİF'e karşı duyarlılığın belirlenmesinde agar

orantılama, BACTEC 460 TB, MGIT 960 ve Etest yöntemlerinin karşılaştırılması ve bölgemizdeki *M. tuberculosis* kompleks suşlarının duyarlılık paterninin araştırılması amaçlandı.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. TARİHÇE

Tüberküloz yüzyıllardır bilinen bir hastalıktır. Almanya'da bulunan ve M.Ö. 8000 yılına dek uzanan tarih öncesi insana ait iskelet kalıntılarının hastalık izi taşıdığı bulunmuştur. Milattan önce (M. Ö.) 4000- 2400'lü yıllarda Mısır'da firavunlar döneminden kalma Thebus bölgesindeki 85 mumyadan alınan organik materyalde bulunduğu ispatlanmış ve spoligotipleme ile suş tayini yapılmıştır (8).

Hipokrat M. Ö. 460'lı yıllarda erime, tükenme anlamına gelen 'fitizis' terimini kullanmıştır. İlk olarak Aristo (M.Ö. 354–322) bu hastalığın bulaşıcı olduğunu düşündüren bir özelliğinin farkına varmıştır. Romalı Celsus M. Ö. 30-50 yıllarında tüberkül tanımını literatüre geçirmiştir. İstirahat, öksürüğün kesilmesi, göğüs yakıları gibi ilk tedavi önerilerini ise M.S. II. yüzyılda yaşayan Galen ortaya koymuştur. Vesalius (M.S. 1478) fitizisli hastaların otopsislerinde kaviter lezyonları bildirmiştir. F. Sylvius ise tüberkülozdan ölen hastaların akciğerlerinde tüberkül olarak adlandırdığı küçük sert nodüllerin bulunduğunu göstermiştir (9). Pierre Desault (1675–1737) ise hastalığın bulaşıcı olduğunu, temel bulaştırıcı unsurun ise balgam olduğunu belirtmiştir. Robert Koch tüberkülozdan ölen bir hastanın akciğerindeki lezyonlarda basili göstermiş, bunu kültürde üretmiş ve üretilen basil ile deney hayvanlarında hastalık oluşturmuştur. Böylece Koch 1882 yılında Berlin Fizyoloji Derneğinde tüberkülozun *M. tuberculosis* tarafından oluşturulduğunu kanıtlamıştır. 1910 yılında Calmette-Guerin *M. bovis*'i 13 yıl süreyle 233 kez pasajlayarak Bacille Calmette-Guerin (BCG) denen aşı kökenini elde etmiştir (8). Seibert ve Glenn (1939)

ise PPD'yi (Protein Purified Derivative) bulmuşlardır. *M. tuberculosis*'in aslında *Mycobacterium bovis*'ten türediği ve *M. bovis*'in insanlığın hayvanları evcilleştirip süt içmeye başladığı dönemde hastalığa yol açtığı ve yerleşik yaşama geçişle birlikte hastalığın yaygınlaştığı düşünülmektedir (9).

Onyedinci ve onsekizinci yüzyıllarda sanayi devrimi, yoksul, yetersiz beslenen ve kalabalık barınma koşullarında yaşayan insan sayısının artırarak tüberküloz salgınının genişlemesine neden olmuştur. Hastalık onsekizinci yüzyılda Avrupa'yı tamamen etkisi altına almıştır. Avrupalılar tüm dünyaya yayıldıkça tüberküloz da yaygınlık kazanmıştır. Bu dönem dünyada tüberkülozdan ölümlerin en yüksek düzeyde yaşandığı dönemdir (9).

Ondokuzuncu yüzyılın sonlarına doğru tüberküloz salgını, Osmanlı İmparatorluğu'nda büyük bir halk sağlığı sorunu olmuş, Balkan Savaşları ve 1.Dünya Savaşı'ndaki yoğun yoksulluk koşullarında Anadolu'ya yayılmaya başlayan hastalık, 1940' ların sonunda en yüksek düzeyine ulaşmış ve bu dönemde en sık görülen ölüm nedeni olmuştur. Ülkemizde tüberküloz ile etkin mücadele 1950' li yıllarda başlatılmıştır. Çıkartılan bir yasa ile 1960 yılında Verem Savaş Dispanserleri kurulmuştur. Doksanlı yıllarla birlikte 'Göğüs Hastalıkları ve Tüberküloz alanında bilimsel dernek örgütlenmeleri gerçekleşmiş ve düzenli, disiplinli bir şekilde bilimsel çalışmalar, mezuniyet sonrası mesleki eğitimler yapılmaya başlanmıştır (10).

Tüberküloz tedavisinde klinik etki sağlayan ilk antibiyotik olan STR, 1946'da New Jersey 'de bir toprak mikrobiyoloğu olan Selman Waksman tarafından keşfedilmiştir. STR'nin keşfi ile tüberküloz tedavisinde kemoterapi dönemi başlamıştır. Aynı yıl İsveçli bilim adamı Jorgen Lehman salisilik asidin para-amino tuzunu sentezleyerek para-amino salisilik asit (PAS)' in tüberküloz tedavisinde kullanımını sağlamış ve bu iki ilacın kullanıma girmesiyle tüberküloz tedavisinde iyi sonuçlar alınmaya başlanmıştır (11). İNH' in antitüberküloz aktivitesinin 1952 yılında bulunmasıyla İNH, PAS ve STR' den oluşan üçlü tedavi dönemi başlamış ve hastaların % 90-95'i bu üç ilacın 24 ay süreyle devamlı olarak kullanılması ile tedavi edilebilir hale gelmiştir (12). Daha sonra 1954 yılında PZD, 1962 yılında ETM ve 1966 yılında RİF bulunmuştur. Ancak her keşfedilen ilaçtan 10 ila 20 yıl sonra direnç sorunu ortaya

çıkılmaktadır (9). İngiliz Tıbbi Araştırma Konseyi (British Medikal Research Council) 1950 yılında PAS ve STR'yi tek tek ve kombine kullanarak ilk karşılaştırmalı, randomize klinik çalışmayı yapmışlar ve kombine tedavinin daha etkili olduğunu ve bu şekilde ilaç direnci gelişiminin engellendiğini açıklamışlardır (13). 1960'lı yıllarda PAS'ın yerini etambutolün almasıyla iki önemli yarar elde edilmiştir; ETM hem hastalar tarafından PAS'tan daha iyi tolere edilebilmiş hem de tedavi süresini 18 aya indirebilmiştir (14). Rifampisin'in 1970'lerde tedaviye eklenmesi ve bu ilacın kazeöz odaklarda bulunan yarı dormant basillere etkili olduğunun bulunmasıyla tedavi süresi daha da kısalmıştır (15). Pirazinamid'in tedaviye eklenmesiyle kültür negatifliğine ulaşma süresi daha da kısalmış ve 6 ayda % 95'in üzerinde kür oranları elde edilmiştir (16).

Günümüze kadar gelen direnç paterninde 3 evre ayırılır. İlk evre STR direnci dönemidir. PAS ve İNH'nin tedaviye girmesiyle bunun üstesinden gelinilebilmiş ancak bu kez "İNH ve STR" direnç dönemi gözlenmiştir. Bugün kötü tüberküloz programları özellikle RİF'in denetimsiz kullanımı sonucu sorun çözümü çok zor bir noktaya taşınmıştır. Son dönemde en az İNH ve RİF'e direnç olarak tanımlanan ÇİD tüberküloz sorunu ortaya çıkmıştır (17).

## 2.2. GENEL MİKROBİYOLOJİK ÖZELLİKLER

*Mycobacterium* cinsi *Mycobacteriaceae* ailesi içindeki tek cinstir (18). Mikobakteriler aerob, sporsuz, katalaz üreten, hafif kıvrık ya da düzgün çomak şeklinde, dallanabilen, 0.2 ila 0.6 µm eninde, 1.0 ila 10 µm boyunda mikroorganizmalardır. Koloni morfolojisi türler arasında değişmekle birlikte S (smooth) ya da R (rough) pigmentli ya da pigmentless olabilir. Eski kültürler karotenoid pigmentlere bağlı olarak sarı, turuncu nadiren pembe de olabilir. Bazı türler pigment oluşturmak için ışığa gereksinim gösterirken (fotokromojen) diğerleri ışıkta da karanlıkta da pigment oluşturabilir (skotokromojen). Bazen filamentöz ya da miçelyuma benzer üreyebilir ancak hafif bastırınca kokoid ve basil parçalarına ayrılır. H37RV suşunun genomu 4 milyon baz çifti büyüklüğündedir ve 3959 genden oluşmaktadır (19,20).

Mikobakterilerin hücre duvarı yapısı alışılmadık bakteri hücre duvarlarından oldukça farklı, kompleks bir yapıdır (Şekil 1). Bu komplekste en iç tabaka, diğer

bakterilerde de görülen plazma membranıdır. Orta tabaka ve duvarın iskeletini peptidoglikan arabinogalaktanın mikolik asit esterinden oluşan mikolilarabinogalaktan peptidoglikan oluşturur. Benzer kor yapısı mikobakteriler dışında korinobakteriler ve nokardiyalarda da görülür. Mikolik asitlerin dışında çok sayıda farklı polar veya apolar yapıda nonkovalent bağlı lipid ve glikolipidler hücre duvarında yer alır. Biyolojik aktif olan bu lipidler ve glikolipidlerin bolluğu ve asimetric dizilişleri hücre duvarına aşırı derecede hidrofobisite kazandırır. Bu yapılar içerisinde alfa-1,4 glukozamin, bir arabinomannan ve mannan içeren lipomannan ve lipoarabinomannan gibi polisakkaritler, son derece önem arz eder. Mikobakterilerin hücre duvarında gram negatif bakterilerde görülen porin proteinleri de bulunur (21).

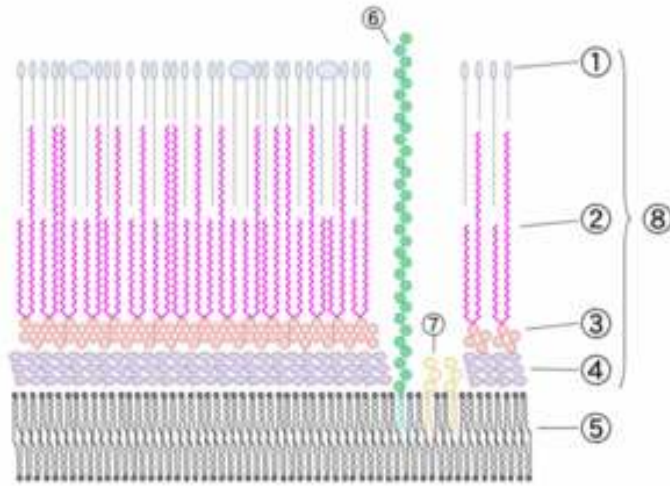
**Plazma membranı:** Membran tipik olarak protein ve fosfolipidlerden oluşan çift katmanlı bir yapıdadır. Kuramsal olarak bir periplazmik boşluk sayesinde peptidoglikandan ayrılır.

**Orta tabaka:** Hücre duvarının orta tabakası peptidoglikan, arabinogalaktan, mikolik asitler, açıl trehalozlar, oligosakkarid içeren lipidler ve fosfatidilinozitolün glikozil derivatları yer almaktadır. Bu yapılara antijenik özelliğe sahip glikoproteinler ile porin yapılar da katılmaktadır.

**Peptidoglikan yapı:** Mikobakterilerde hücre duvarının en önemli karakteristiği kemotip-IV peptidoglikan yapısıdır. Klasik bakteriyel peptidoglikandan farklı olan bu yapı N-asetil-glukozamin ve N-glikozilmuramik asidin, betaglikozid ve fosfodiester bağlarla bağlanmasından oluşan bir heteropolimerdir. Diğer bakterilerin peptidoglikanlarından farklı olarak mikobakteri peptidoglikanında, bir başka ifade ile kemotip-IV peptidoglikanda iki önemli farklılık görülmektedir. Bunların ilki muramik asidin asetillenmiş yapısı yerine glikolik asitle glikozillenmiş formunun yapıda yer alması, diğeri de tetrapeptid yan zincirler diaminopimelik asidin yer almasıdır (21).

Mikolik asitler mikobakterilerde tüm hücre duvarı kuru ağırlığının % 50'si ile hücre lipidlerinin % 60'ını oluştururlar. Mikobakterilerde mikolilarabinogalaktan peptidoglikan kompleksinde en fazla bulunan mikolik asit türü oksitlenmiş grupları içermeyen 60 karbon büyüklüğündeki  $\alpha$  mikolik asitlerdir. Bu yapıda bir çift bağ veya siklopropan halka yer alır. *M. tuberculosis* de dahil olmak üzere bir çok

mikobakteri türünde görülen major mikolik asitler olup tüm mikolik asitlerin % 25'den fazlasını oluştururlar. Mikobakterilerdeki peptidoglikan tabaka kor bölgesinin iskeletini oluşturmak üzere gram pozitif bakterilerdeki teikoik asidin bağlanmasına benzer bir disakkarit fosforil köprü ile bir heteropolisakkarit olan arabinogalaktanı kovalent olarak bağlar. Peptidoglikan yapı bakteriye şeklini verir, hücre duvarına bütünlük ve sertlik kazandırır. Tetrapeptit yapıda yer alan diaminopimelik asit nedeni ile lizozimlere karşı dirençlidir (20, 21).



**Şekil 1.** Mikobakteriyel hücre duvarı yapısı (22)

1-yüzeyel lipidler, 2-mikolik asit, 3-polisakkaritler (arabinogalaktan), 4-peptidoglikan, 5-plazma membranı, 6-lipoarabinomannan (LAM), 7-fosfatidilinozitol mannozid (PIM), 8-hücre duvarı iskeleti

Yüksek lipid içerikli bariyerden dolayı mikobakteriler gram pozitif kabul edilmelerine rağmen gram boyama ile boyanmazlar. Bakterilerin karbol fuksinle boyandığında asit alkol dekolorizasyonuna gösterdiği dirençten dolayı aside dirençli basil (ARB) olarak tanımlanmaları işte bu zengin lipid içeriği dolayısıyladır (23). Mikobakteriler, yavaş üreyen mikroorganizmalar olup bölünme süreleri türden türe 2 ile 20 saat arasında değişir. Katı besiyerinde kolonilerin gözle görülmesi subkültürleri yapıldığında hızlı üreyenlerde 7 günden az, yavaş üreyenlerde 7 günden fazla sürerken; klinik örneklerden primer kültürde üreme süresi 8 hafta kadar sürebilir. pH 6.5- 6.8'de ve %5-10 CO<sub>2</sub>'li ortamda iyi ürerler. Üreme için uygun ısı yine türden türe 30°C- 45°C arasında değişmektedir. p-nitro- $\alpha$ -asetilamino- $\beta$ -

hidroksipropiyofenon (NAP) *M. tuberculosis* kompleksin üremesini inhibe eder. Mikobakteriler canlılığını +4°C’de haftalarca, -70°C’de aylarca koruyabilir (23, 24).

### 2.3. SINIFLANDIRMA

*Mycobacterium* cinsi yüksek G (guanin) + C (sitozin) : (% 61-71 mol) içeren DNA’sından dolayı diğer mikolik asit içeren *Gordonia*, *Tsukamurella*, *Nocardia*, *Rhodococcus* ile birlikte *Actinomycetales* takımında sınıflandırılmış olup *Mycobacteriaceae* ailesinde yer alan tek cinstir (18,20). *Mycobacterium* cinsi içinde bugün 80’den fazla tür tanımlanmıştır. İnsan ve diğer sıcakkanlı hayvanlarda hastalık oluşturan *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* ve *M. canetti* ’nin birbirleriyle gösterdikleri genetik yakınlık temel alınarak bu türler “*M.tuberculosis complex*” adı altında toplanmışlardır. Son yıllarda özellikle Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS)’un ortaya çıkışıyla birlikte, diğer bazı mikobakteri türlerinin, *M. tuberculosis* kompleks dışı mikobakterilerin (MOTT) (*M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. smegmatis* ve *M. avium complex*) klinik öneminin anlaşılması, ilginin bu türler üzerinde yoğunlaşmasına neden olmuştur.

Bin dokuz yüz ellilerin sonuna doğru Ernest Runyon MOTT’ları üreme hızları, pigment üretimleri ve koloni morfolojilerini temel alarak fotokromojen, skotokromojen, non-fotokromojen ve hızlı üreyenler olarak dört grupta inceledi (25). Bu sınıflama halen MOTT’ların ilk aşama identifikasyonunda kullanılsa da tüm mikobakterilerin gruplandırılmasında yetkili değildir. 1987’de Woods ve Washington (Tablo 1), 1979’da Wolinski’nin ilk bahsettiği klinikle uyumlu sınıflamayı önermişlerdir (26).



**Tablo 1.** Woods ve Washington sınıflandırması

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

## 2.4. *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* KOMPLEKSİN MİKROBİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ

*M. tuberculosis* kompleks *M. tuberculosis*, *M. bovis* (*M. bovis* BCG dahil), *M. africanum*, *M. microti* ve *M. canettii* türlerinden oluşur.

### 2.4.1. *Mycobacterium tuberculosis*

Tüm dünyada insanda hastalık etkeni olarak en sık izole edilen mikobakteridir. Diğer kompleks üyelerinden fenotipik olarak ayırt edilebilir. Pigmentsiz, aerop ortamda, 37°C’de 2-4 haftada, R koloni yaparak ürer. Niasin biriktirir, nitratları nitrite indirger. Tiyoferen-2-karboksilik asit hidrazid (T2H) varlığında ürer. Pirazinamidaz aktivitesi pozitifdir. Katalaz aktivitesi yoktur. Esas konağı insandır.

Mikrokolonilerinin gözlendiği kültürleri boyanınca kord faktörünü oluşturduğu görülür (26).

#### **2.4.2. *Mycobacterium bovis***

Esas olarak sığırlarda infeksiyon yapmasına rağmen keçi, kedi, köpek, geyik, porsuk ve keseli sıçan gibi geniş konak çeşitliliği gösterir. İnsan az da olsa konak olabileceği için epidemiyolojik açıdan *M. tuberculosis* ile tür düzeyinde ayırt edilmelidir. Aerobik, 6-8 haftada R yada S koloni yaparak ürer. Çoğunlukla niasin reaksiyonu vermez. Nitratları nitrite indirgemez. T2H'ya duyarlıdır, varlığında üreyemez. Pirazinamidaz aktivitesi yoktur. Katalaz aktivitesi vardır. Besiyerine piruvat eklenmesi üremesini artırır. *M. bovis* BCG 1924 yılında Calmette ve Guerin tarafından *M. bovis* in 10 yıl boyunca 233 kez pasaj edilmesiyle elde edilmiş virulan olmayan aşı kökenidir. Mesane kanserinin tedavisinde immünsitümulan olarak kullanılırken nadiren yayılabilir (26, 27).

#### **2.4.3. *Mycobacterium africanum***

Genel olarak Afrika'da insan tüberkülozuna yol açan bir tür mikobakteridir. 1968 yılında Senegalli bir hastadan soyutlanmıştır. Mikroaerofilik ortamda iyi ürer. Nitratı indirgeyemez. T2H varlığında üreyemez. Pirazinamidaz aktivitesi pozitifdir (26, 27).

#### **2.4.4 *Mycobacterium microti***

Tarla faresi gibi kemiricilerden izole edilmiştir. Hem immunkompetan hem de immunsupresif hastalarda infeksiyon oluşturabilir. Ehrlich Ziehl Nielsen boyamasında ay çöreği görüntüsü tipiktir. Kültürde üretilmesi zordur (20).

#### **2.4.5. *Mycobacterium canettii***

*M. tuberculosis* kompleksinin en son üyesi olan *M. canettii* 1969'da Canetti tarafından, 1990'ların sonuna doğru Soolingen ve Pfyffer tarafından tanımlanmıştır. Doğal konağı bilinmemektedir ancak bildirilen vakalar insan infeksiyonlarıdır. Düz, yuvarlak kolonileriyle kompleks üyelerinden ayrılır (20).

*M. tuberculosis* kompleksi üyelerinin özellikleri Tablo 2'de gösterilmiştir:

**Tablo 2.** Bazı *M. tuberculosis* kompleks üyelerinin identifikasyon özellikleri (20)

	<i>M. tuberculosis</i> (%)	<i>M. africanum</i> (%)	<i>M. bovis</i> (%)	<i>M. canettii</i> (%)
Üreme sıcaklığı	37 <sup>0</sup> C	37 <sup>0</sup> C	37 <sup>0</sup> C	37 <sup>0</sup> C
Pigmentasyon	Nonkromojen(100)	N	N(100)	N
Niasin	+ (95)	V	- (4)	+
T2H varlığında üreme	+	V	-	+
Nitrat indirgenmesi	+	V	- (9)	+
Semikantitatif katalaz	< 45mm (89)	< 45mm	< 45mm (69)	*
68 <sup>0</sup> C katalaz	-	-	-	-
Tween 80 hidrolizi	± (68)	-	- (21)	-
Tellürit indirgenmesi	± (36)	-	*	*
%5 NaCl'e tolerans	-	-	- (0)	*
Arilsülfataz (3 gün)	-	-	- (0)	-
Üreaz	± (64)	+	± (50)	*
Pirazinamidaz (4 gün)	+	-	-	+

\* Değerlendirilemedi.

## 2.5. ANTİJENİK YAPI

*M. tuberculosis*'in antijenik yapısı karmaşık olması nedeniyle birçok araştırmacının ilgisini çekmiş ve üzerinde çok çeşitli çalışmalar yapılmış olmasına rağmen antijenik yapının tamamı ve immünitedeki rolü kesin olarak aydınlatılamamıştır. Mikroorganizmanın yapısında yer alan protein, lipid ve polisakaridlerin tümü immünojeniktir. Bu birimlerin, immünsupresyon, makrofaj aktivasyonu, granülom oluşturma, toksisite, alternatif yoldan kompleman aktivasyonu gibi çok çeşitli etkileri vardır. Proteinler anahtar immunojen olarak kabul edilirler (18).

### 2.5.1. Mikobakteriyel proteinler

**Old tüberkülin (OT):** Tüberküloz basilinin kaynatılmış kültür ekstraktıdır. Önceleri intradermal cilt testinde kullanılmış ancak sadece mikobakteriyel proteinler içermemesi nedeniyle saflaştırılmasına gerek duyulmuştur (28).

**Saflaştırılmış Protein Türevi (PPD):** İlk kez Seibert ve Glenn tarafından 1941'de tanımlanmıştır. Sentetik besiyerlerinde hazırlanmış old tüberkülinin kollodyen membranlardan süzülmesi ve amonyum sülfatla çöktürülmesi sonucu elde edilmiştir. İçerdiği proteinler daha küçük ve karbonhidratı az olduğundan OT'ye göre daha az özgül olmayan reaksiyona neden olur. Tam saflaştırılamamıştır ve diğer mikobakterilerle infeksiyonda çapraz reaksiyon verebilir. DSÖ 0.1 ml solüsyonda 5 TU (0.0001 mg PPD-S proteini) dozunda PPD bulunmasını önermektedir (24).

**65 kDa protein:** Konak hücre içinde çoğalan basillerden salgılandığı ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu sonucu lezyonda kazeifikasyon ve likefaksiyon oluşturduğu bulunmuştur. İmmünojenitesi yüksek olan bir ısı şok proteinidir (23, 24).

**Antijen 85 kompleks (Alfa antijen 30/32- kDa antijen):** Mikobakteri hücre duvarının karakteristik yapısı trehaloz dimikolatın (Kord faktör) sentezi için gerekli olan *M. tuberculosis* salgıladığı major antijendir. Potansiyel koruyucu bir antijen olduğu düşünülmektedir. Mikolik asit sentezini inhibe eden izoniazidin in vitro Ag 85'in sentezini indüklediği ve tedaviye cevap vermeyen olgularda bu antijenin balgamda tespit edildiği gösterilmiştir. Son çalışmalar, tüberkülozlu hastalarda bronkoalveolar hücrelerin Ag 85'e sağlıklı insanlardan daha fazla yanıt verdiğini ancak bu yanıtın PPD'ye olan yanıtın daha az olduğunu ortaya koymaktadır (28).

**Antijen 5, antijen 6, antijen 60:** Saflaştırılmış sitoplazmik proteinlerdir. Bakteriye karşı oluşan humoral yanıtı göstermek amacıyla kullanılmaktadır. Ancak özellikle antijen 60'a dayalı ELISA (Enzim ile işaretli antikor testi) deneyi bu antijenin tüm mikobakterilerde olması ve *Nocardia* türleri ile çapraz reaksiyon vermesi nedeniyle tanıda çok yer edinmemiştir (29).

**19 kDa lipoprotein:** *M.tuberculosis* hücre duvarında bulunur. Özellikle immüniteyle ilgili çok önemli rolleri vardır. İnterferon gama (INF G) sentezini kodlayan genleri ve makrofajların INF G reseptörünü inhibe eder. Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) ve IL-12 sentezini azaltarak T lenfosit aktivasyonunu inhibe eder. Nitrojen ara ürünlerinin üretimini, MHC-I'in antijen bağlamasını inhibe eder. Monosit ve makrofajların apoptozunda görevlidir (30).

**ESAT-6 (Early secretory antigenic target) ve CFP-10 (Culture filtrat protein):** *M.tuberculosis* RD1( Region of difference) gen lokusundan kodlanmaktadır ve bu proteinlere karşı oluşan interferon yanıtını T hücre sayısını göstererek in vitro ölçen kitler geliştirilmiştir. Bu yöntem yardımıyla aktif ve latent tüberküloz tanısı konabilmekte, tedaviye yanıt takip edilebilmekte ve *M. tuberculosis* infeksiyonunun BCG aşılmasıyla ayrımı yapılabilmektedir (31).

### 2.5.2. Mikobakteriyel lipidler

**Trehaloz-6,6, dimikolat (Kord faktör):** Tüberküloz basilinin küme oluşturmaya neden olur. Adjuvan etkiye sahiptir ve alternatif kompleman yolunu aktive eder.

Önemli bir virulans faktörüdür. Granülom oluşumunda rol oynar ve tümör geriletici etkiye sahiptir. PNL göçünü inhibe eder. Konak hücre mitokondri membranına tutunarak solunum ve oksidatif fosforilasyonda hasar yapar (24, 28).

**Muramildipeptit (MDP):** İmmün sistemi uyarır ve tümör geriletici etkisi vardır (24).

**Sülfolipidler (Sülfatidler):** Sülfür içeren glikolipidlerdir. Kord faktöre sinerjik etki yapar ve makrofaj içinde fagozom-lizozom füzyonunu engelleyerek, basili lizozomalenzimlerin etkisinden koruduğu dolayısıyla makrofajlara karşı direnci artırdığı gösterilmiştir (24).

**Wax D:** Peptidoglikolipid yapısındadır. Freud adjuvanının etkisini arttırıcı özelliğe sahiptir. Tümör geriletici özelliğe sahip olup, BCG aşısının bazı tümörlerde gerilemeye neden olan immünoterapötik etkisinde rolü vardır (24).

**Lipoarabinomannan:** *M. tuberculosis*in major hücre duvarı lipoglikanı olup üç tipi vardır: ManLAM (arabinan terminaline mannoz bağlı), fosfo-myo-inozitol bağlı LAM ve AraLAM (arabinan terminaline mannoz bağlı olmayan). ManLAM virulan mikobakterilerde diğerleri hızlı üreyen avirulan mikobakterilerde bulunur (32). ManLAM, monositleri inaktive edici ve lenfositleri süprese edici bir sitokin olan TGF-beta'nın ekspresyonunu indükler ve monositleri inaktive edici TNF- $\alpha$ 'nın daha az üretilmesine neden olur (28). Ayrıca manLAM'ın insan periferik kan T hücre kemotaksisini indüklediğine dair çalışmalar, granülamatöz yanıtın başlamasında manLAM'ın rolü olabileceğini düşündürmektedir (33).

**Mikotiyol:** Yüksek antioksidan kapasiteli, düşük molekül ağırlıklı bir tiyol olup, sadece mikobakteriler ve aktinomiçetler tarafından üretilmektedir. Mikotiyol, çoğu ökaryot ve bazı prokaryot hücrelerdeki antioksidan kapasiteli glutatyon analogudur. Basilin oksidatif strese verdiği yanıt ve detoksifikasyon enzimlerinin sentezi için gerekli bir kofaktördür. Mikotiyol biyosentezinde rol alan enzimler tüberküloza karşı geliştirilecek yeni ilaçların hedefi olmaya aday görünmektedir (33).

**Fosfatidil inozitol mannozid (PIM):** Lipid yapısındadır. Hapten özelliği gösterir. Çapraz koruyucu immünitede rolünün olabileceği düşünülmektedir (24).

### 2.5.3. Mikobakteriyel polisakkaridler

Arabinoz, galaktoz, mannoz içeren polisakkarid I molekülleri geç tip aşırı duyarlılık oluşturabilir. Polisakkarid II molekülleri ise serolojik aktivite gösterir (34).

## 2.6. PATOGENEZ VE VİRÜLANS

Tüberküloz hastalığına karşı son kırk yılda birincil seçenek yeni bir ilaç ortaya konamamış, etkili ve güvenli bir aşı hala bulunamamıştır. Bu nedenle tüberküloz basilinin konakla etkileşimini açıklamaya yönelik kapsamlı çalışmalar gerekmektedir (35).

Basil solunum, sindirim, deri, genitoüriner sistem ya da konjunktivadan girebilir. Sıklıkla inhalasyonla alınan basil alveolar makrofajlarca fagosite edilir, sindirilir yada zayıf alveolar makrofajlarda basiller sindirilemez ve çoğalarak makrofajları parçalar. Alveolar boşluğa geçer. Parçalanan makrofajlardan salınan kemotaktik faktörler, monositlerin ve diğer inflamatuvar hücrelerin infeksiyon bölgesine gelmesini sağlar ve granülom oluşumunu başlatır. Alveolar boşluğa geçen basiller, yeni makrofajlarca fagosite edilseler bile makrofajlar henüz aktive edilmedikleri için çoğalmaya devam ederler. Lenfohematojen yolla tüm vücuda yayılır ve yeni granülomlar oluşturur (32).

*M. tuberculosis* inhalasyonundan 2-6 hafta sonra etkene özgül hücrel immün yanıt gelişir. Lezyon bölgesinde çoğalan basillerin tüberkülin benzeri proteinleri, doku hasarı yapan gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonuna yol açar. Gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu tüberkülin testi pozitifliğine ve kazeifikasyon, likeifikasyon, kavitasyona neden olur. Böylece inaktif makrofajlar içindeki basillerin çoğalması durdurulur ve granülom merkezinde kazeöz nekroz alanları oluşturulur. Kazeöz nekroz alanları içinde basiller daha fazla çoğalamaz ve yaşam boyu dormant kalır. Primer infeksiyon ve primer odakların (Ghon odağı) olduğu bu evrede tüberkülin testi pozitifdir (32). Bu dönemin nasıl ilerleyeceği, bakterinin virulansı ve konağın immün durumu arasındaki dengeye bağlıdır (35).

Granülomlarda kazeöz odağın etrafında toplanan aktif makrofajlar, kazeöz odaklardan kaçan basilleri fagosite ederek hızla sindirirler. Aktif makrofajların yakaladığı basiller çoğalmayı sürdürürse gecikmiş tip aşırı duyarlılık yanıtı tekrarlanarak doku hasarlanması artar. İmmün yanıtı baskılanmış kişilerde kazeöz

odaklardan kaçan basiller, inaktif ya da düşük aktivitedeki makrofajlar tarafından fagosite edilir, fakat sindirilemezler. Bu makrofajların basil çoğalmasının durdurabilmesi için gecikmiş tip aşırı duyarlılık yanıtının tekrarlanması gerekir. Bu yanıt tekrarlandıkça kazeöz nekrozlar genişler ve primer tüberküloz oluşur. Lenfo-hematojen yolla basiller akciğerden vücudun diğer bölümlerine yayılır ve pulmoner ven duvarında oluşan kazeöz odağın açılması ile miliyer ve dissemine tüberküloz gelişir (33).

Hücrel immün yanıtı primer tüberkülozu kontrol edemeyen kişilerde primer tüberküloz endojen reaktivasyon veya ekzojen reinfeksiyonla ilerleyerek yıllar sonra gelişen kaviter lezyonlar oluşur (sekonder tüberküloz). Buna göre *M.tuberculosis* ile infeksiyonun ilerleme süreci doku nekrozu, fibrozis ve rejenerasyon arasındaki dengeye bağlanabilir.

#### **2.6.1. *M. tuberculosis*'in savunma ve virulans faktörleri (Perzistans faktörleri)**

Virülans rol oynayan kesin bir faktör bilinmemekte ancak birçok faktör suçlanmaktadır. Virulans mekanizmaları esas olarak hücre yüzey lipid moleküllerine odaklanmıştır. Ayrıca latent infeksiyon oluşturma potansiyeli fazla olan mikroorganizmanın yıllar süren perzistansını açıklamak da virulans konusunda yardımcı olabilir. Perzistans faktörlerinin en önemlileri şunlardır:

**Mikolik asit:** Birçok kemoterapotik için direnç sağlar, mikroorganizmayı çevresel strese korur ve infeksiyonun perzistansını sağlar.

**16 kDa alfa- kristalin proteini (acr):** Mikroaerofilik veya anaerobik ortamda ve üremenin durgun fazında yüksek oranda ifade edildiği, *Acr* geninin delesyonunun makrofaj içindeki mikobakteri üremesinde baskılanmaya neden olduğu gösterilmiştir (33).

**RD1 gen lokusu:** Virulansı artıran özelleşmiş sekresyon sistemlerini kodlar (35).

**Sigma faktörleri (rpoV, Sig F):** Latent fazda salınır, basilin değişik çevre koşullarına yanıtında gen ekspresyonunun regülasyonunda, özellikle Sig F'in muhtemel spor oluşumuyla ilgisi olduğu konusunda çalışmalar yapılmaktadır (35).

**Dimikoserozat ester poliketid:** Dış membran lipidleri arasında major virulans faktörleridir (36).

**İzositrat liyaz:** Glioksilat döngüsünde yer alır. Fagositozdan sonra kimyasal yapısını değiştiren alveolar makrofaj içindeki basiller izositrat liyazın yardımıyla alternatif besin kaynağı olarak yağ asitlerini kullanmaya başlar böylece makrofaj içinde yıllarca kalabilir (37).

**Fenolik glikolipidler:** Yakın zamanda yapılan çalışmalarda yeni antitüberküloz ilaç geliştirilmesinde hedef molekül seçilmesi önerilmektedir. Küçük moleküllü virulans faktörü olarak tanımlanmıştır (38).

Lipoarabinomannan, muramidilpeptit, mikotiyol , trehaloz-6,6, dimikolat (Kord faktör), sülfalipid , PIM, wax D diğer virulans faktörleridir.

### **2.6.2. Fagositozdan kaçış mekanizmaları**

- 1- Fagozom-lizozom birleşmesinin önlenmesi
- 2- Fagolizozomdan stoplazmaya kaçış
- 3- Lizozom içeriğinin alkalizasyonu
- 4- Reaktif oksijen ara ürünlerinin inhibisyonu
- 5- Lizozomal enzimlere direnç
- 6- Makrofaj aktive edici moleküllerin yapımının önlenmesi
- 7- Metabolizma ve hücre döngüsünün durdurulması tüberküloz basillerinin fagositozdan kaçış mekanizmalarıdır (39).

### **2.7. EPİDEMİYOLOJİ**

Tüberküloz 1882’de Robert Koch tarafından bilim dünyasına tanıtıldığından beri gelişmiş ülkelerde görülme oranı azalmış gibi görünse de, DSÖ tarafından aktarılan bilgi aslında Koch zamanından beri bu dünya çapındaki halk sağlığı problemine çok da etkili çözümler getirilmemiş olduğudur (40). Günümüzde tüm ölümlerin % 7’si, önlenebilir ölümlerin % 26’sı tüberküloz nedeniyle olmaktadır (41). Tüberküloz görülme sıklığının artması birçok nedene bağlanabilir:

- i- Artan ilaç direnci
- ii-1980’lerde başlayan HIV/AIDS pandemisi
- iii-Damar içi ilaç kullanımının artması



iv-Sosyal yapının değişmesi

v-Yüksek insidansın olduğu bölgelerden göç

vi-Toplu yaşam alanlarından aktif bulaş ( örn. Hastane, hapishane vb.)

vii-Hasta bakım hizmetlerindeki yetersizlik (42).

Etkileşime giren bu farklı bileşenlerin etkilerini risk ve savunma faktörlerini anlamayı kolaylaştırmak için Ruffino-Netto tüberküloz yüküyle ilgili bir formül geliştirmiş (41):

$$Tb \text{ yükü} = \frac{(SA).(HIV+).(UTA).(PD).(G).(Y)}{(YSH).(DGT).(ED).(BD).(P).(PK)}$$

SA: Sosyal Adaletsizlik

YHS: Yeterli sağlık hizmeti

HIV +: HIV pozitif olanlar

DGT: Direkt gözetimli tedavi

UTA: Uygun tedavi alamayanlar

ED: Eğitim düzeyi

PD: Primer direnç+kazanılmış direnç

BD: Beslenme düzeyi

G: Göç

P: Personel

Y: Topluluğun yaşı

PK: Politikaya katılan halkın miktarı

Gerçekten de yukarıdaki formülü destekleyecek şekilde 1994-1997 arasında beş kıtadan otuz beş ülkenin katılımıyla standart yöntemler kullanılarak yapılan duyarlılık çalışmalarında tüm bölgelerde en az bir ilaca direnç bulunmuş bu da infeksiyonun dünya çapında bir sorun olduğuna işaret etmektedir (43).

Günümüzde tüberkülozun bir toplumdaki durumu ve seyrini değerlendirmede en güvenilir epidemiyolojik ölçütler:

-Direkt mikroskopik incelemede basil pozitif bulunan hasta insidansı

-Yıllık infeksiyon riski

-İnfeksiyon hızındaki yıllık değişim hızıdır (41).

*M. tuberculosis* kompleks için bulaş kaynağı infeksiyonlu insanlar yada inek vb bazı memeli hayvanlardır. Bulaşta özellikle tedavi almayıp fazlaca basil çıkararak insanlar önemlidir. Toplu yaşam alanlarında (okul, çocuk yuvası, hastane) böyle hastalar

büyük tehlike unsurudur. Tedavi verildiğinde bulaştırıcılık 2-3 haftada sona erer. En sık bulaş solunum yoluyla olur. Açık tüberkülozlu kişilerin öksürük ve aksırıklarıyla etrafa saçılan damlacıkların içerdikleri basiller kolayca infeksiyonu bulaştırabilir. Besinlerle ve özellikle çiğ içilen inek sütüyle sindirim yoluyla da bulaş olabilir. Çok yaygın olmasa da daha çok laboratuvar çalışanlarında basil içeren infekte materyalle temas sonrası deri yoluyla da bulaş görülebilir.

Primer infeksiyondan hastalığa geçiş için en riskli dönem primer infeksiyondan sonraki ilk 1-2 yıldır. Süt çocuğu ve adölesanda bu eğilim daha fazladır. Erkek cinstе, genellikle yaş arttıkça görülme sıklığı artar. Sistemik hastalığı olanlar, immüniteyi baskılayıcı tedavi alanlar ve bazı genetik faktörlere sahip olanlarda hastalığın gelişme riskini artmıştır (39).

### **2.7.1. Dünyada Tüberküloz**

Tüberkülin testi pozitifliği esas alınarak yapılan değerlendirmede dünya nüfusunun 1/3'ünü oluşturan yaklaşık 1.7 milyar kişinin tüberküloz basili ile infekte olduğu ve bunların büyük çoğunluğunun gelişmekte olan ülkelerde bulunduğu tahmin edilmektedir. Günümüzde her yıl 10-12 milyon yeni tüberküloz vakası ortaya çıkmaktadır ve yaklaşık olarak 100.000'i çocuk olmak üzere toplam 2 milyon insan bu hastalıktan ölmektedir. Önümüzdeki on yılda 90 milyon insanda tüberküloz hastalığı gelişmesi ve 30 milyon insanın da bu nedenle ölmesi beklenmektedir (44). Dünya nüfusunun % 25'inin yaşadığı gelişmiş ülkelerde (Avrupa, Kuzey Amerika, Japonya, Avustralya) yıllık infeksiyon riski % 0.1-% 0.01 düzeyindedir ve bu oran her yıl % 10'dan fazla düşmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde ise yıllık infeksiyon riski % 0.5-2.5 arasında değişmekte ve infeksiyonun hızı daha yavaş azalmaktadır. Tüm dünyada 16 milyondan fazla tüberkülozlu hasta bulunmaktadır ve bunların % 80'i 22 ülkede yaşamaktadır. Prevalansın 16,2 milyon/yıl olduğu tüberkülozda, ölümcül vaka oranı % 23'tür ve bu oran HIV prevalansının yüksek olduğu bölgelerde % 50'yi aşabilmektedir. Tüm dünyadaki mevcut hastaların % 95'i gelişmekte olan ülkelerde yaşarken, tüberkülozdan ölümlerin % 98'i yine bu ülkelerde gerçekleşmektedir. Bu ülkelerdeki hastaların yarısından azına (% 46) tanı konabilmekte, tanı konanların da ancak yarısından azı tedavi edilebilmektedir. Günümüzde küresel tüberküloz sorunu büyük oranda, yetersiz kontrol programlarının

uygulandığı Güneydoğu Asya, Sahra Altı Afrika ve Doğu Avrupa ülkeleri ile yüksek tüberküloz / HIV birlikteliğinin bulunduğu Afrika ülkelerinden kaynaklanmaktadır. 1980'den sonra giderek artan HIV enfeksiyonu insidansı bugün birçok ülkede tüberkülozlu hasta sayısının belirgin şekilde artışından sorumlu görünmektedir (44).

### **2.7.2. Ülkemizde Tüberküloz**

İlk Veremle Savaş Cemiyeti' nin 1918 yılında kurulduğu Türkiye'de, Cumhuriyet' in ilk yıllarından beri tüberkülozla ilgili mücadele kampanyaları sürdürülmüştür. 1950'lerde 1000'de 25 olan hastalık prevalansı 1975'te 1000'de 1'e düşmüş, bu yıllar arasında en az % 10'luk yıllık enfeksiyon risk oranında azalma sağlanmıştır. Fakat 1970'li yılların başında 'tüberkülozun artık kontrol altına alındığı' şeklindeki resmi açıklamalar, bu yıllardan sonra kamuoyunun ve devletin konuya ilgisinin giderek azalmasına neden olmuş ve 1977'den sonra yapılan çalışmalarda enfeksiyon riskinin artmaya başladığı görülmüştür (5). DSÖ'nün 2007'de yayınladığı son raporda, Türkiye'de tanı konulan toplam olgu sayısı 100 binde 25-49 olarak bildirilmektedir. Bu sayı diğer ülkeler ile karşılaştırıldığında azımsanmayacak bir değerdir ancak ülkemizde hasta bildirimleri ve kayıtlama sistemlerinde önemli sorunlar olması nedeniyle gerçek tüberküloz görülme sıklığının daha fazla olması gerektiği de göz ardı edilmemelidir. Ülkemizde enfeksiyon havuzunun pek değişmediği ve bu infekte kişilerden yılda binde 2-3 kişi hastalanacağı için, 20-30 yıl süreyle her yıl 30-40 bin yeni hastanın ortaya çıkacağı öne sürülmektedir (44).

## **2.8. KLİNİK TABLOLAR**

### **2.8.1. Primer tüberküloz**

Daha önce *M.tuberculosis* ile karşılaşmamış veya BCG ile aşılanmamış PPDsi negatif birey inhalasyonla basille ilk karşılaştığında 2-3 hafta içinde enfeksiyon odağında ve uzak organlarda granülomlar oluşur. İmmün yanıtla bu bölgelerde kazeifikasyon nekrozu oluşturularak enfeksiyon sınırlandırılır. Klinik bulgu olmayan yalnızca PPD pozitifliği olan sürece primer enfeksiyon denir (5).

Eğer konakçının immün yanıtı yeterli değilse kazeifikasyon nekrozu genişleyip klinik olarak belirginleşen primer tüberküloz (hastalık) dönemi başlar (33).

### **2.8.1.1. Miliyer tüberküloz**

Kazeöz bir odağın komşu kan damarlarına açılması veya damar duvarındaki tüberkülün kazeifiye olarak dolaşıma bol miktarda basil vermesi, özellikle 0-4 yaş arası immün sistemi zayıf çocuklarda miliyer tüberküloz gelişimine yol açar. Yetişkinlerde ise eski bir tüberküloz lezyonunun yeniden alevlenmesi ve kan damarlarında erozyon yapmasıyla veya tüberküloz lezyonu içeren bir organda yapılan cerrahi işlemle basiller kana karışabilir ve böylece miliyer tüberküloz gelişebilir. Miliyer tüberkülozlu hastaların % 30'unda PPD negatiftir (5).

### **2.8.2. Sekonder Tüberküloz**

Primer infeksiyon geçiren ve tüberkülün deri testi pozitifleşen kişilerde, infeksiyondan en az beş yıl sonra yaşamlarının herhangi bir döneminde gelişen tüberkülozdur. İki şekilde gelişebilir:

#### **2.8.2.1. Endojen reaktivasyon**

Primer infeksiyondan sonra aylar veya yıllar boyu dokularda dormant kalan basillerin, stres, steroid tedavisi, kanser kemoterapisi veya HIV infeksiyonu gibi hücrel immün yanıtın baskılandığı herhangi bir zamanda aktif hale geçmesiyle oluşur (27).

#### **2.8.2.2. Ekzojen reinfeksiyon**

Daha önce primer infeksiyon geçirmiş, PPDsi pozitif bireyler, eğer tüberküloz basiliyle yeniden karşılaşılırsa, mevcut hücrel immünite bu basillerin alvollere yerleşmesini, çoğalmasını önler fakat bu koruma tam değildir. Hücrel immünite zayıfladığında basiller yeniden çoğalmaya başlar (5).

Sekonder tüberküloz gelişiminde bu mekanizmalardan hangisinin belirleyici olduğu bilinmemektedir. Fakat infeksiyon riskinin düşük olduğu gelişmiş ülkelerde endojen reaktivasyon, infeksiyon riskinin yüksek olduğu gelişmekte olan ülkelere ise ekzojen reinfeksiyonun varlığı gösterilmiştir (5).

### **2.8.3. Ekstrapulmoner tüberküloz**

Tüberküloz akciğer dışında plevra, perikard, periton gibi vücut zarlarını genellikle komşuluk yoluyla; kemik ve eklemleri, böbrek, genital, gastrointestinal, merkezi

sinir sistemini ise hematojen yolla infekte edebilir. Deri tüberkülozu direkt temasta oluşabilir.

## **2.9. LABORATUVAR TANI**

*M. tuberculosis* kompleksin klinik örneklerde gösterilmesi ile kesin tanı konur. Günümüzde yaygın olarak kullanılan klasik yöntemlerle yapılan laboratuvar tanı mikobakterilerin doğası gereği 6-8 hafta gibi uzun zaman almaktadır. Özellikle ilaca dirençli olguların ciddi bir halk sağlığı sorunu olmasından dolayı hem etkili tedaviye hemen başlamak hem de aktif tüberkülozun çevreye bulaşımı engellemek için kısa sürede sonuç veren yöntemlere ihtiyaç vardır.

### **2.9.1. Aside dirençli boyama**

Tanıda öncelik laboratuvara gelen klinik materyalin uygun şekil ve miktarda olmasıdır. Sonrasında aside dirençli boyama yöntemiyle preparat hazırlanıp incelenir. Duyarlılığı ve özgüllüğü düşük olmasına rağmen klinik örnekte aside dirençli basil gösterilmesi çoğu zaman tedaviye başlanması için yeterlidir. Boyama için iki tip boya tercih edilir:

1. Karbolfuksin boyaları
  - a. Ehrlich Ziehl-Neelsen (sıcak boya)
  - b. Kinyoun (soğuk boya)
2. Florokrom boya: Auramin - rodaminle hazırlanır.

Karbolfuksin boyalarla boyandığında basiller ilk aldığı boyayı asit-alkol dekolorizasyonuna rağmen bırakmazlar. Zıt boya metilen mavisi ile boyanmayıp ışık mikroskopunda mavi zeminde pembe-kırmızı basiller şeklinde görünürler. Uygun şekilde hazırlanıp boyanmış bir preparatın en az 100-300 alan taranması gerekir (20). Florokrom boyamada da boyalı preparatlar floresan izotiyosiyanat filtreli mavi ışıkta, koyu zemin üzerinde parlak sarı veya turuncu-kırmızı basiller şeklinde görülür. Karbolfuksinle boyanmış preparatlara göre daha hızlı tarama imkanı verir.

### **2.9.2. Örnek alınması ve işlenmesi**

Akciğer tüberkülozunda inceleme için en uygun örnek balgamdır ve 3 gün arka arkaya alınan ekspektore balgam örneklerinde basil aranır. Hastanın balgam

çıkaramadığı durumlarda endotrakeal aspirasyon, bronkoalveolar lavaj, özellikle çocuklarda gastrik aspirasyon sıvıları gibi örnekler de kullanılabilir.

Böbrek tüberkülozunda sabah ilk idrarı olmak koşuluyla 3 gün arka arkaya alınan orta akım idrarları kullanılır. Bunların dışında infeksiyon odağına yönelik beyin omurilik sıvısı, periton, plevra, dışkı, eklem ve kemik iliği aspirasyonları ve kan gibi steril veya steril olmayan klinik örnekler işlenmek için alınır.

Normal vücut flora üyelerinin bulunabileceği klinik örneklerle, alınırken ve laboratuvara taşınırken sterilizasyon kurallarına uyulmadığı düşünülen örneklerle, besiyerlerine kültür için ekilmeden önce organik kalıntıları sindirmek için homojenizasyon, kontaminasyona yol açan mikroorganizmaları ortadan kaldırmak için de dekontaminasyon işlemleri yapılır (45). Bu amaçla kullanılan yöntemler:

-N-asetil L-sistein (NALC) -NaOH yöntemi

-NaOH yöntemi

-Zefiran-trisodyum fosfat yöntemi

-Okzalik asit yöntemi

-Cetilpiridinyum klorid-sodyum klorid yöntemi

-Sülfirik asit yöntemidir.

Ancak bu işlemlerin mikobakterilere zarar vermemesi için bu süre 15 dakikayı geçmemelidir. Süre tamamlandığında fosfat tamponu (PH 6.8) ilave edilerek nötralizasyon sağlanır ve dekontaminasyon işlemi durdurulur. Kullanılan fosfat tamponunun sterilitesinin korunması önemlidir.

Steril örneklerin dekontaminasyona ihtiyacı olmayabilir. Ayrıca mikobakterilerin üreme şansını artırmak için santrifüjle konsantre edilmesi de gerekir. En uygun santrifüj işlemi 3000 g (RCF)'de 15 dakika süreyle yapmaktır.

### **2.9.3. Kültür**

Mikobakterilerin izole edilmeleri ve çeşitli özelliklerinin incelenmesi amacıyla kullanılan konvansiyonel besiyerleri katı ve sıvı olmak üzere iki tiptir. Katı özellikteki besiyerlerini ise yumurta bazlı ve agar bazlı olmak üzere iki bölümde incelemek mümkündür. Tam yumurta ya da yumurta sarısı içeren yumurta bazlı

besiyerleri arasında bugün en yaygın kullanılanı Löwenstein-Jensen (LJ) besiyeridir (Tablo 3). Ancak Petragnani ve American Trudeau Society Medium gibi besiyerleri de tercih edilmektedir. Tipik koloni morfolojisi oluşturmaları ve daha bol üremeleri nedeniyle özellikle primer izolasyonda LJ besiyerinin kullanılması önerilmektedir. Yumurta bazlı besiyerlerinin opak görünümlü olmasına karşın, agar bazlı besiyerleri şeffaftır. Bu nedenle, ekim yapılan besiyerleri 10-12 gün sonra mikroskop altında incelenirse, oluşan kolonileri görmek mümkün olmaktadır. M 7H10 ve M 7H11 en çok tercih edilen agar bazlı besiyerleridir (45).

**Tablo 3.** Mikobakterilerin genel üretim besiyerleri (26)

Besiyeri	İçerik	İnhibitör Ajan
Löwenstein Jensen	Koagüle tam yumurta, bazı tuzlar, gliserol, patetes unu	Malaşit yeşili, 0.025 g / 100 ml
Petragnani	Koagüle tam yumurta, yumurta sarısı, süt, gliserol, patetes, patetes unu	Malaşit yeşili, 0.052 g / 100 ml
Middlebrook 7H10	Bazı tuzlar, vitaminler, kofaktörler, oleik asit, albümin, katalaz, gliserol, dextroz	Malaşit yeşili, 0.0025 g / 100 ml
Middlebrook 7H11	Bazı tuzlar, vitaminler, kofaktörler, oleik asit, albümin, katalaz, gliserol, dextroz, %0.1 kazein hidrolizat	Malaşit yeşili, 0.0025 g / 100 ml
American Thoracic Society Medium (ATSM)	Koagüle taze yumurta sarısı, gliserol, patetes unu	Malaşit yeşili, 0.02 g / 100 ml

Bunun yanı sıra kontaminasyona neden olan mikroorganizmaların üremesini etkin bir şekilde engellemek amacıyla selektif besiyerleri olan, LJ Gruft, Mycobactosel LJ, Mitchison selektif 7H11 de kullanılabilir. Primer izolasyonda besiyerlerinden en az birinin selektif olması önerilir (Tablo 4).

**Tablo 4.** Mikobakterilerin seçici besiyerleri (26)

Besiyeri	İçerik	İnhibitör ajan
Löwenstein Jensen (Gruft modifikasyonu)	Koagüle tam yumurta, bazı tuzlar, gliserol, patetes unu, RNA-5 mg / 100 ml	Malaşit yeşili, 0.025 g / 100 ml Penisilin, 50 U /ml Nalidiksik asit, 35 mg / ml
Löwenstein Jensen	Koagüle tam yumurta, bazı tuzlar, gliserol, patetes unu,	Malaşit yeşili, 0.025 g / 100 ml Sikloheksimid, 400 mg / ml Linkomisin, 2 mg / ml Nalidiksik asit, 35 mg / ml
Middlebrook 7H10	Bazı tuzlar, vitaminler, kofaktörler, oleik asit, albümin, katalaz, gliserol, glukoz	Malaşit yeşili, 0.0025 g / 100 ml Sikloheksimid 360 mg / ml Linkomisin, 2 mg / ml Nalidiksik asit 20 mg / ml
Middlebrook 7H11 (Mitchison besiyeri)	Bazı tuzlar, vitaminler, kofaktörler, oleik asit, albümin, katalaz, gliserol, dextroz, kazein hidrolizat	Karbenisilin 50 mg / ml Amfoterisin B 10 mg / ml Polimiksin B 200 / ml Trimetoprim laktat 20 mg / ml

Sıvı besiyerleri içinde yer alan M 7H9 ve Dubos tween albumin, mikobakterilerin stok suşlarının subkültürlerinin yapılması, duyarlılık deneyleri ve diğer in vitro deneylerde inokulum hazırlanması amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca bakteri sayısının az olduğu steril bölgelerden alınan klinik örneklerde, bakteriyi çoğaltmak ve dolayısıyla izolasyon şansını artırmak amacıyla da kullanılabilir. M 7H9 sıvı besiyeri, çoğu hızlı kültür sisteminde temel besiyeri olarak kullanılmaktadır (26).

Günümüzde birçok laboratuvarında, konvansiyonel besiyerlerinin yanısıra tüberküloz etkeni bakterilerin izolasyon süresinin çok daha kısa ve izolasyon oranının çok daha yüksek olduğu hızlı kültür sistemleri rutin inceleme amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Bu sistemlerde gaz basıncındaki değişiklikler, CO<sub>2</sub> oluşumu ve oksijen kullanımı florometrik veya kolorimetrik olarak ölçülür. Primer izolasyonda sıvı besiyerlerine ilave olarak bir de katı besiyeri kullanılması CDC tarafından önerilmiştir ve bu kombinasyonla mikobakterilerin izolasyon şansının arttığı bilinmektedir. Hızlı kültür sistemleri içinde yer alan yarı otomatize BACTEC 460 TB (Becton Dickinson Diagnostic Instruments, Sparks, MD) sistemi, izolasyon, identifikasyon ve duyarlılık deneylerinin uygulandığı bir sistem olarak uzun yıllardır



kullanılmaktadır (19, 20, 24). Sistemde izolasyonun yanısıra, *M. tuberculosis* kompleksi ile tüberküloz dışı mikobakterilerin (MOTT) ayrımı yapılabilmekte ve *M. tuberculosis* kompleksi suşlarının primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılığı çalışılmaktadır. BACTEC 12B (M 7H12) ve BACTEC 13A (M 7H13) olmak üzere iki tip besiyeri içeren bu sistem, besiyerlerinde bulunan 14C işaretli palmitik asitin kullanılması ve metabolizma sonucu oluşan  $^{14}\text{CO}_2$  in 0-999 sayısal değerleri arasında 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. Başarı ile kullanılmakla beraber, sistemde yer alan besiyerlerinin radyoaktif madde içermesi ve cihazda yapılan rutin kontroller sırasında meydana gelen çapraz kontaminasyon sorun oluşturmaktadır. Günümüzde alternatif izolasyon sistemlerinin geliştirilmesi için çalışmalar devam etmektedir.

Tam otomatize sistemler:

- ESP II (Extra Sensing Power) (Trek Diagnostics, Inc. , Westlake, Ohio)
- MB/Bact T (Organon Teknika, Durham, NC)
- BACTEC 9000 MB (BD Biosciences, Sparks, MD)
- BACTEC MGIT 960 (Mycobacterium Growth Indicator Tube) (BD Biosciences, Sparks, MD) (20, 24, 26).

Sistemler arasında izolasyon oranı açısından önemli bir fark olmamakla birlikte, konvansiyonel katı besiyerlerine göre daha yüksek; BACTEC (B) 460 TB sistemine göre daha düşük oranda izolasyon sağladıkları bildirilmektedir (20, 45, 46). Mikobakterileri üretme süreleri açısından sistemler karşılaştırıldığında, B460 TB sisteminin, ESP II ve MB/BacT sistemlerine oranla daha avantajlı olduğu belirlenmiştir. Birçok çalışmada tam otomatize sistemlerde üretme süresi ortalama  $\leq 14$  gün olarak saptanmış ve en yüksek izolasyon oranının B460 TB ve katı besiyeri kombinasyonu ile sağlandığı bildirilmiştir. Kontaminasyon oranları açısından tam otomatize sistemler birbiri ile karşılaştırıldığında önemli bir fark bulunamamıştır ancak bu sistemlerde oran, B460 TB ve katı besiyerlerine göre daha yüksektir (20, 26).

**ESP II**, selüloz sünger ve M 7H9 sıvı besiyeri içeren bir sistemdir. Sistemde mikroorganizmaların üremesi sonucu oluşan gaz basıncındaki değişiklikler ölçülerek değerlendirme yapılır. Bilgisayar destekli bir sistemdir ve besiyerinde oluşan gaz basıncındaki değişiklik grafiksel olarak bilgisayarda görüntülenir. Besiyerlerine ekim yapılmadan önce, mikobakterilerin üremesini destekleyen oleik asit-albumin-dekstroz katalaz (OADC) ve kontaminasyonu engellemek amacıyla antibiyotik karışımı ilave edilir. Sistem tüm klinik örnekler için uygundur (20,26)

**MB/Bac T**, besiyerinin dip kısmında kolorimetrik bir sensor içeren ve oluşan CO<sub>2</sub> düzeyini ölçerek üremeyi değerlendiren bir sistemdir. Bilgisayar desteği bulunan sistemde besiyerleri sürekli kontrol altındadır. Steril örnekler ekilmeden önce besiyerlerine "reconstitution" sıvısı ilave edilirken; steril olmayan örneklerin ekiminden önce antibiyotik karışımı eklemek gereklidir. Sistem kan dışındaki tüm örnekler için uygundur (20).

**BACTEC 9000 MB**, besiyerlerindeki oksijen kullanımının floresans ile belirlendiği bir sistemdir. Modifiye M 7H9 sıvı besiyerlerine ekimden önce PANTA ilave edilir. Sistemde balgam ve diğer solunum yolu örnekleri için "Myco/F sputa" , kan ve diğer steril vücut bölgelerinden alınan örnekler için "MycoF/lytic" besiyeri kullanılır (20).

**BACTEC MGIT 960** sisteminde kullanılan tüplerde, M 7H9 sıvı besiyeri ve dip kısımlarında oksijene duyarlı rutenyum metal kompleksi içeren silikon bulunur. Klinik örnekler ekilmeden önce besiyerlerine OADC ve PANTA ilave edilir. Kullanılan besiyerlerinde herhangi bir üreme olmadığında oksijen varlığına bağlı olarak silikon tabakaya gönderilen UV ışınına karşı floresan oluşmazken; mikobakteri veya diğer mikroorganizmalar ürettiğinde oksijenin kullanılması sonucunda UV ışınına karşı floresan oluşmakta ve oluşan floresan miktarı üreme indeksi olarak değerlendirilmektedir. Tam otomatize bir sistem olmakla birlikte, UV ışığı altında makroskobik olarak da değerlendirme yapılabildiğinden manuel olarak kullanılmaya da uygundur. Kan dışındaki diğer tüm klinik örnekler için kullanılabilir (20,26)

Fazla sayıda örneği aynı anda kontrol edebilen BACTEC MGIT 960 ( 960 örnek),

BACTEC 9000 MB (240 örnek) , MB/BacT (240 örnek) ve ESP. II (128/256/384 örnek inceleyen üç farklı cihaz) genellikle yüksek kapasite ile çalışan laboratuvarlarda tercih edilmekle birlikte; daha düşük kapasite ile çalışan laboratuvarlar için Septi-Check AFB (BD Biosciences, Sparks, MD), MGIT (BD Biosciences, Sparks, MD) ve MB Redox (Biotest Diagnostics Corp., Danville, NJ) gibi manuel sistemler önerilmektedir (26).

**Septi-Check AFB**, sıvı (M 7H9) ve üç tip katı (LJ, M 7H11, çukulatamsı agar) besiyerinin kullanıldığı bifazik bir kültür sistemidir. Çukulatamsı agar kontaminasyonu belirlemek amacıyla kullanılır. Kültür işleminden önce besiyerine glukoz, gliserin, oleik asit, pridoksal HCl, katalaz, albumin, azlosilin, nalidiksik asit, trimetoprim, polimiksin B ve amfoterisin B içeren zenginleştirici ilave edilir. Klinik örneklerin ekiminden sonra besiyerleri ilk 24 saat ters olarak bekletilir ve süre sonunda dik konuma getirilir. Kültür süresince besiyerleri ara sıra hafifçe çalkalanarak sıvı besiyerinin katı besiyerlerine teması sağlanmalıdır. Sistem kan dışındaki tüm klinik örnekler için uygundur (20). Cihaz gerektirmeyen MB Redox sisteminde mikobakterilerin izolasyonu amacıyla antibiyotik karışımı ve renksiz tetrazolium tuzu içeren modifiye Kirchner besiyeri kullanılır. Tetrazolium tuzu mikobakterilerin redoks sistemi sayesinde, hücre yüzeyinde granüler formda biriken pembe, kırmızı ve menekşe renginde formazona indirgenir ve üreme sonucu oluşan mikrokoloniler renkli partiküller şeklinde makroskobik olarak görülebilir (20). Drancourt ve arkadaşları (47) tarafından yapılan bir çalışmada, *M. tuberculosis*'in primer izolasyonunda % 5 koyun kanlı agarın kullanılabileceği de bildirilmiştir

#### **2.9.4. Tanımlama**

Klasik ve türe özgü geliştirilmiş problemlerle moleküler olarak tanımlama yapılabilir. Klasik yöntemlerle tanımlamada koloni morfolojisi, üreme zamanı, üreme ısısı, kord faktör oluşumu, karanlıkta yada ışıkta pigment oluşumunun gözlenmesi; aril sülfataz, katalaz tayini, nitrat redüksiyonu, niasin birikimi testi, pirazinamidaz, tellürit redüksiyonu, PNB (para-nitro benzoik asit) içeren besiyerinde üreme, tiyofen-2 karboksilik asit hidrazid (T2H) ile üremenin inhibe edilmesi ve tween 80 hidrolizi gibi biyokimyasal yöntemler kullanılır. Çok büyük emek harcanmakla beraber tüm türlerin tanımlanması mümkün olmamaktadır (48).

#### **2.9.4.1. NAP Testi (p-nitro- $\alpha$ -acetylamino- $\beta$ -hydroxypropiofenone)**

NAP kloramfenikol sentezinde ara bileşik olan bir antimikobakteriyel ajandır. *M. tuberculosis* kompleksin üremesini selektif olarak inhibe eder. Diğer mikobakteri türleri NAP ile inhibe olmaz veya kısmen inhibe olabilir. NAP içeren tüpe şüpheli koloniler inoküle edilir. Üreme yoksa bakterinin *M. tuberculosis* komplekse ait olduğu düşünülür (48).

#### **2.9.4.2. Moleküler Yöntemler**

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

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

Moleküler yöntemler şunlardır:

- Amplicor MTB test (Roche Diagnostics)
- AMTD (Gen-Probe) testi
- SDA (BD ProbeTec ET)
- LCx MTB (Abbott)
- Real-time PCR
- Inno-LiPA Rif TB (Innogenetics)

Serolojik testler de uygulanması kolay, ucuz, antijenik yapının saptanması esasına dayanır; ancak duyarlılıklarının düşük olması, *M. tuberculosis* kompleksin diğer mikobakterilerle ayrımını yapamadıkları için rutin tanı laboratuvarlarında yaygın kullanıma girememiştir.

### 2.9.5. Antibiyotik duyarlılık testleri

*M. tuberculosis* kompleksin antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılığını belirlemede en güvenilir ve en hızlı yöntemi bulmak amacıyla çok sayıda duyarlılık yöntemi geliştirilmiştir.

Direkt yöntem: Çalışılacak örnek, gelen klinik materyal ise preparatında görülen aside dirençli bakteri oranına göre mililitresindeki ortalama bakteri sayısı hesaplanarak, homojenizasyon-dekontaminasyon işlemleri sonrasında ilaçlı ve ilaçsız besiyerlerine ekimi yapılır.

İndirekt yöntem: Klinik örneklerden saf kültür halinde aside dirençli bakteri izole edilir, uygun inokulum hazırlanarak ilaçlı ve ilaçsız besiyerlerine ekim yapılır.

Duyarlılık yöntemleri arasında orantılama yöntemini temel alan, kültüre dayalı klasik testler en yaygın kullanılanlarıdır. Katı besiyeri olarak LJ, agar bazlı besiyeri olarak da M 7H10, 7H11 kullanılmaktadır. Modifiye M7H9 sıvı besiyerinin kullanıldığı B 460 TB ve MGIT 960 gibi hızlı ticari sistemler de yaygın olarak kullanılmaktadır. Etest yöntemi de kullanılabilir alternatif bir yöntemdir. Ancak duyarlılık testlerini yapmak ve yorumlamak için bazı tanımları bilmek gerekir:

İlacın kritik konsantrasyonu: Daha önce ilaçla karşılaşmamış *M. tuberculosis*'in mutasyon içermeyen klinik izolatlarının (sokak suşu) % 95'ini inhibe eden, ancak aynı zamanda ilaca cevap vermemiş hastalardan alınan türleri inhibe etmeyen en düşük konsantrasyondur (6). Farklı besiyerinde ilacın kritik konsantrasyonlarının farklı olmasının nedenleri; besiyeri içindeki ilacın farklı şekilde absorpsiyonu, ilacın bazı besiyeri komponentlerine bağlanması, besiyerinin hazırlanması sırasında ilacın inaktivasyonu ve ilaçsız besiyerinde yeterli üreme için gerekli inkübasyon süresinde ilaçlı besiyerinde ilacın bozulması şeklinde sıralanabilir (7).

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

**a) Orantı (proporsiyon) yöntemi (direkt – indirekt):** Canetti, Rist ve Grosset tarafından 1963 yılında tanımlanmıştır. Bu yöntemde basiller ilaç içeren ve ilaç içermeyen agar temelli besiyerlerine ekilip 3 hafta inkübasyona bırakılmaktadır. İnkübasyon sonunda ilaç içeren besiyerindeki koloni sayısının, ilaç içermeyen

besiyerindeki koloni sayısına oranı dirençli basillerin oranını gösterir. Test edilen suşlarda hesaplanan direnç yüzdesi 1 veya daha fazla ise o suşun test edilen antibiyotiğe dirençli olduğu kabul edilir (51). Uygulama koşullarından en az etkilenen sonuçları en kabul gören yöntemdir.

**b) Mutlak konsantrasyon yöntemi:** Meissner tarafından 1961’de tanımlanmıştır. Test edilen organizmaya karşı her bir ilacın Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerini tespit etme temeline dayanan bu yöntemde,  $2 \times 10^3$  veya  $2 \times 10^4$  koloni oluşturan birim/mililitre (CFU/mL) bakteri içeren mikobakteri solüsyonu, hem belirli konsantrasyonlarda ilaç içeren hem de ilaçsız kontrol besiyerlerine ekilir. Üreme olmayan besiyerindeki ilaç konsantrasyonu o suşun MİK değeri olarak kabul edilir.

**c) Nisbi direnç yöntemi:** Mitchisson tarafından 1957’de tanımlanmıştır. Mutlak konsantrasyon yöntemi ile aynı temel prensibe dayanır. Farkı bu yöntemde standart H37Rv *M. tuberculosis* suşu ile denenen suşa paralel bir seri hazırlanmasıdır. Denenen mikobakteri suşunun MİK değeri, standart suşun MİK değerine bölünerek direnç belirlenir. Bu oran  $\geq 8$  ise suş denenen ilaca dirençli,  $\leq 2$  ise duyarlıdır. Oranın 4 olması suşun dirençli olabileceği hakkında fikir vermektedir (51).

#### **2.9.5.1. Agar orantılama yöntemi**

Middlebrook 7H10 besiyeri ile standart olarak önerilen modifiye orantılama yönteminde, test edilecek tüberküloz basilinin standardize edilmiş süspansiyonu antibiyotik içeren ve içermeyen agar plaklarına paralel olarak inokule edilir. CO<sub>2</sub>’li ortamda 37°C’de 3 haftalık inkübasyonu takiben, antibiyotik içeren besiyerindeki üreme miktarı antibiyotiksiz kontrol besiyerindeki üreme miktarı ile karşılaştırılarak, mikroorganizma dirençli veya duyarlı olarak sınıflandırılır.

#### **2.9.5.2. BACTEC 460 TB (Radyometrik) Antibiyotik duyarlılık testi**

Mikobakteriler antibiyotik içeren ve içermeyen BACTEC 12B (M 7H12) şişelerine ekilir ve 37°C’de inkübe edilir. Kontrol şişesine ekilen mikroorganizma konsantrasyonu ilaç içeren şişeye göre 100 kat azdır. Şişeler günlük olarak B 460 cihazında okunur. Antimikobakteriyel inhibisyon olmadığında, mikobakteriler ürer ve besiyerindeki <sup>14</sup>C işaretli substratı kullanır. Böylelikle substrat dekarboksile olarak, <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> oluşur ve B 460 cihazında kantitatif olarak ölçülür. Üretilen <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>’nin kantite edilmesi Growth Index (GI) terimiyle sayısal olarak yapılmaktadır. GI değeri

besiyerindeki mikobakterilerin üreme miktarıyla direkt olarak orantılıdır. Duyarlılık sonuçları, kontrol ve ilaç içeren şişelerin günlük GI değeri artışlarının karşılaştırılmasıyla yorumlanır. Antitüberküloz ilaç içeren besiyerinde, duyarlı mikobakterilerin üremesi inhibe olur ve bu GI okumalarıyla kaydedilen günlük  $^{14}\text{CO}_2$  üretiminde artmama veya azalmayla sonuçlanır. Mikobakteriler test edilen ilaca dirençliyse, üremenin inhibisyonu sözkonusu olmayacak ve GI günlük olarak artacaktır. Günlük GI değerindeki artış, test kültürünün dirençlilik derecesiyle orantılıdır.

#### **2.9.5.3. MGIT 960 ( Florometrik ) Antibiyotik duyarlılık testi**

Modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içerir. MGIT tüpünün dibindeki silikon içine floresan madde gömülüdür. Floresan madde sıvı besiyerinde çözülmüş oksijen varlığına duyarlıdır. Çözülmüş oksijenin başlangıçtaki konsantrasyonu floresan maddeden floresans yayılımını baskılar. Üreyen mikroorganizmalar oksijeni tüketir ve floresan maddenin floresans yaymasına neden olur. MGIT 960 SIRE kiti 4-13 günde sonlanan kalitatif bir testtir. Test *M. tuberculosis* izolatlarının ilaçlı ve ilaçsız tüplerdeki üremelerinin karşılaştırılması esasına dayanır. MGIT 960 cihazı tüplerdeki floresans artışını sürekli izler. Cihaz yardımıyla ilaçlı ve ilaçsız tüplerdeki floresans analizleri karşılaştırılarak duyarlılık sonuçları belirlenir. MGIT 960 cihazı otomatik olarak bu sonuçları yorumlar ve duyarlı ya da dirençli olarak bildirir.

#### **2.9.5.4. Etest duyarlılık yöntemi**

Löwenstein-Jensen besiyerinde üremiş ortalama 2 haftalık taze kültürden sıvı besiyeri içine alınıp emülsifiye edilir. Bulanıklığı Mac Farland no 3'e ayarlanır. Eküvyonlu çubuk yardımıyla M 7H10 besiyerine üç yönlü sürülüp % 5-10  $\text{CO}_2$ li ortamda inkübe edilir. 24 saat sonra Etest (AB BIODISK, Solna, Sweden) şeritleri yerleştirilir. Yine aynı ortamda inkübasyona bırakılır. Ortalama 5-7 gün sonra yeterli üreme varsa okunur. Üremenin kuvvetle inhibe olduğu çizginin Etest şeridini kestiği nokta MİK değeri olarak saptanır (7).

## **2.10. KORUNMA VE KONTROL**

Gelişmiş ülkelerde 1980'lere kadar aktif tüberküloz kontrol programlarının uygulanmasıyla tüberküloz insidansında belirgin azalma kaydedilmekle birlikte HIV

epidemisi, antitüberküloz ilaçlara direnç, seyahatlerin yaygınlaşması gibi nedenlerle hastalık yeniden tırmanışa geçmiştir (5).

### **2.10.1. Birincil Koruma**

Henüz tüberküloz basili ile karşılaşmamış bireylerde tüberküloz gelişimini önlemek amacıyla uygulanır. Bunun için iki yöntem uygulanmaktadır:

**a-** Tüberkülozlu hastaların erken dönemde belirlenip etkili tedavi edilmesi. Böylece kaynak azaltılarak infekte olmamış kişilerin tüberküloz basilleri ile karşılaşma riskini azaltmak,

**b-** Aşılama: Tam hücre aşıları (canlı, ölü)... BCG aşısı

Subünit aşıları

Çıplak DNA aşıları

### **2.10.2. İkincil koruma**

İnfekte bireylerde hastalık gelişiminin önlenmesi amacıyla genellikle izoniasid verilerek uygulanır (24).

## **2.11. TEDAVİ**

Etkili tüberküloz tedavisi hızlı üreyen basillere karşı erken bakterisidal etkili ve dormant basilleri de ortadan kaldırmaya yönelik olmalıdır (41).

İlaça dirençli tüberküloz, dünyanın ve ülkemizin son yıllarda üzerinde ciddi olarak durduğu bir konudur. Yeni olguların başarı ile tedavi edilmesi yeni ilaç direnci olan olguların ortaya çıkmasına engel olmaktadır fakat varolan ilaca dirençli olgular tedavi edilmezse, bulaştırma, yeni infeksiyon ve yeni hastalık ile ilaç direncinin sürmesi söz konusudur (52). Bu nedenle tedavide bazı tanımları bilmek yararlı olacaktır:

Çok ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD): En az izoniazid ve rifampisine birlikte olmak üzere daha fazla antitüberküloz ilaca dirençli suş olarak tanımlanır.

Yaygın ilaç dirençli tüberküloz (YİD): ÇİD ve ikinci seçenek ilaçlardan en az üçüne dirençli suş olarak tanımlanır (52).

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



### 2.11.1. Birinci seçenek antitüberküloz ilaçlar

**İzoniazid:** İzonikotirik asidin hidrazididir. İzoniazid halen mevcut olan antitüberküloz ilaçların en güçlüsüdür. Klinik dozlarla oluşan konsantrasyonlarda dormant basiller üzerinde bakteriyostatik, hızlı çoğalanlar üzerinde bakterisit etki yapar. Ayrıca makrofajlar ve kazeöz lezyonlar içine girebilmesi, iyi absorbe edilmesi, kolay alınması ve ucuz olması bu ilacı en önemli antitüberküloz ilaç yapar. Etki mekanizması kesin olarak bilinmemektedir. Bir görüşe göre bakteri içine

giren izoniazid orada bir peroksidazın etkisi altında hidrazin ve izonikotirik aside dönüşür. Sonucu madde bakteride nikotirik asidin antimetaboliti olarak etki yapar ve bir koenzim A türünün sentezini bozar. Sonuçta hücrede hidrojen peroksid yıkımı yapılamaz ve fazla miktarda biriken bu madde letal etki yapar (53, 54).

**Rifampisin :** Bir rifampisin türüdür. Tüberküloz tedavisinde izoniazidden sonra ikinci önemli ilaçtır. Hem hızlı çoğalan, hem de dormant duruma geçmiş mikobakterilere etkilidir. Gerek hücre dışındaki ve gerekse hücre içindeki mikobakterilere bakterisit etki yapar. Mikobakterilerin RNA polimeraz enzimini inhibe eder. Tek doz halinde alınabilmesi, bütün tüberküloz ilaçları içinde etki gücü bakımından izoniazide en yakın ilaç olması, yan etkilerinin ondan daha az olması ve diğer ilaçlara dirençli suşlara karşı etkili bulunması bu ilacın değerini artırır (53, 55).

**Pirazinamid :** Nikotinamidin sentetik pirazin analogudur. İzoniazid derecesinde olmasa bile oldukça güçlü bakterisit etkisi vardır. Bu etkisini hem çoğalma halindeki, hem de dormant duruma geçmiş mikobakteriler üzerinde gösterir. Monositler ve makrofajlar içindeki yavaş çoğalan mikobakteriler üzerinde en etkili bakterisittir (53, 54).

**Streptomisin :** *M. tuberculosis*'e karşı etkin olduğu gösterilen ilk ilaçtır. Streptomisin parenteral olarak kullanılan bir ilaçtır. 1940'larda keşfinden bugüne sürekli olarak tüberküloz kemoterapisinde majör bir rol oynamıştır. Streptomisin bakterinin 30S ribozomuna irreversibl olarak bağlanır, böylece protein sentezini inhibe eder. Streptomisinin bakteri ve makrofajlar içine girme yeteneği düşüktür. Klinikte kullanılan dozlarda, streptomisinin etkisi esas itibariyle bakteriyostatiktir. Böylece streptomisinle tedavi süpresif bir tedavidir, yani vücuttaki odaklarda

yerleşmiş bakteri ilaç ortamda bulunduğu sürece baskı altında kalır, çoğalamaz; fakat bakterilerin tamamıyla yok edilmesi mümkün olmaz (53, 54).

**Etambutol** : Başka hiçbir antimikrobiyal ilaç ailesi ile ilişkisi olmayan ayrı bir bileşiktir. Di- (1-butanol)-etilendiimin dihidroklorür'ün dekstro şeklidir. Birinci sıra ilaçlara artan bakteriyel direnç nedeniyle geliştirilmiştir. Tüberkülostatik bir ilaçtır ve etkinliği izoniazid ve rifampisine göre düşüktür, ancak kendisine karşı yavaş direnç gelişmesi teröpatik değerini artırır (53).

Bu ilaçların ETM dışında bakterisidal etki gösterdikleri kabul edilmektedir. Ancak diğer antimikrobiyal ajanlarda olduğu gibi bu ilaçları bakteriyostatik ve bakterisidal olarak sınıflamak pek uygun görülmemektedir. Çünkü alınan dozlara, birlikte kullanılan diğer ajanlara ve in vivo etkinliğe bağlı olarak bakteriyostatik ve bakterisidal etkinliklerin değişikliğe uğrayabildiği farklı klinik çalışmalarla gösterilmiştir (54). Sözü edilen bu ilaçların toksisiteleri çok azdır ve kombine şekilde kullanıldıklarında oldukça etkililerdir. Basiller duyarlı olduğu sürece tüberküloz tedavisi bu ilaçlardan oluşan tedavi rejimleri ile yapılmalıdır (Tablo 5).

### **2.11.2. İkinci seçenek ilaçlar**

Kapreomisin, kanamisin, etionamid, para-aminosalisilik asit, ofloksasin, siprofloksasin ve sikloserinden oluşmaktadır. Bu grup ilaçlar, birinci seçeneklere göre daha az etkili, daha çok toksik ve daha az tolere edilebilen ilaçlardır. Genellikle birinci seçenek ilaçlara karşı direnç geliştiği yada toksik etki meydana geldiği durumlarda kullanılırlar. Yeni geliştirilen ve etkinlikleri henüz geniş klinik çalışmalarda incelenmemiş olan deneme aşamasındaki ilaçlar (kinolonlar, amikasin, rifabutin, klofazimin ve beta laktam-beta laktamaz inhibitör kombinasyonları) da bu grup içinde değerlendirilebilir (53, 55).

**Tablo 5.**Tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlar (55)

<b>Birinci Seçenek ilaçlar</b>		<b>İkinci Seçenek ilaçlar</b>		
<b>Temel</b>	<b>Diğerleri</b>	<b>Eski</b>	<b>Yeni</b>	
İzoniazid Rifampisin	Pirazinamid Etambutol Streptomisin	Etionamid Sikloserin Kaproemisin Amikasin Kanamisin PAS Tiosetazon	Kinolonlar	
			Ofloksasin Siprofloksasin Sparfloksasin	
			Makrolidler	
			Klaritromisin	
			Klofamizin Amoksasilin- Klavulanik asid	
			Yeni rifamisinler	
			Rifabutin	
			Rifapentin	

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

20 Mayıs 2005 ile 21 Temmuz 2006 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri'ne başvuran tüberküloz ön tanılı hastalara ait klinik örneklerden izole edilen 33 *M. tuberculosis* kompleks suşu çalışmaya alındı.

Suşlar çalışma tarihine kadar süt kaymağı (Oxoid,UK) içinde -70°C'de ve M 7H9 besiyerinde +4°C'de 6'şar aylık pasajlar yapılarak saklandı. Çalışma sırasında Löwenstein-Jensen katı ve Middlebrook (M) 7H9 sıvı besiyerlerine subkültürleri yapılarak canlandırıldı. Agar orantılama yöntemi, BACTEC 460 TB, MGIT 960 ve Etest yöntemleriyle duyarlılıkları çalışıldı.

#### 3.1. BAKTERİLERİN TANIMLANMASI

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri'nden Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden izole edilen mikobakteriler klasik yöntemlere ek olarak NAP testi yapılarak *M. tuberculosis* kompleks olarak tanımlandı.

##### 3.1.1. NAP Testi (p-nitro- $\alpha$ -acetylamino- $\beta$ -hydroxypropiophenone) (MGIT)

Üreme saptandıktan sonraki 1-2. Gün: Steril tüp içerisinde 1 mL pozitif MGIT Tüpü, 4 mL steril distile su ile sulandırıldı. GC (üreme kontrolü) ve NAP testi için 2 yeni MGIT 7 mL tüpüne suş kaydı yapıldı. GC ve NAP kontrolü için tüpler işaretlendi GC ve NAP tüpü içerisine "Growth Suplemanı" ve MGIT PANTA karışımından 0,8'er mL eklendi. NAP işaretlenmiş şişe içerisine 0,1 mL p-NAP reaktifi eklendi.

1 /4 sulandırılmış süspansiyondan her iki tüpe 0,5 mL süspansiyondan ekildi. İkili barkod taşıyıcılarına GC tüpü sola, NAP şişesi sağa yerleştirildi. Barkod okutularak cihaza yerleştirildi.

Üreme saptandıktan sonraki 3-5. gün: Pozitif MGIT tüpündeki bulanıklığın 0.5 MacFarland'ı geçip geçmediği kontrol edildi. 0.5 MacFarland'dan daha bulanık olduğu durumlarda, yeni bir steril tüp içerisinde, distile su ile dilüe ederek en fazla 0.5 MacFarland bulanıklığına ayarlandı. Pozitif MGIT tüpündeki bulanıklığı 0,5 Mac Farland'ı geçmeyen ve daha yoğun olup da 0,5 Mac Farland bulanıklığına ayarlanmış tüplerle 1 ve 2. gündeki işlem basamağına devam edildi.

Değerlendirme: Cihaz günlük okuma yaparak ortalama 4 günde kontrol şişesinde üreme olup NAP şişesinde üreme olmayan şişeyi gösterip testi sonuçlandırdığında suşlar *M. tuberculosis* kompleks olarak tanımlandı. Ayrıca kord faktör, koloni morfolojisi, üreme ısısı ve süresi gibi konvansiyonel yöntemler, gerektiğinde de kimyasal yöntemler tanımlamada kullanıldı.

### **3.2. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ**

Çalışmada *M. tuberculosis* kompleks antibiyotik duyarlılığı için agar orantılama yöntemi, BACTEC 460TB duyarlılık yöntemi, MGIT 960 duyarlılık yöntemi ve Etest yöntemi kullanıldı.

#### **3.2.1. Agar orantılama yöntemi**

M 7H10 besiyeri kullanılarak çalışıldı.

i)Antibiyotik solüsyonlarının hazırlanması:

Toz şeklindeki antibiyotikler Ankara Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı'ndan elde edildi. ETM, STR, İNH için steril distile su ile, RİF için dimetil sulfoksit veya metanolla çözerek en az 1.000 µg/mL'lik stok solüsyon hazırlandı. Stok solüsyon hazırlarken; gereken miktarın biraz fazlası toz antibiyotik tartıp, istenen stok antibiyotik konsantrasyonunu elde etmek için, gereken hacim şu formülle hesaplandı:

$$Hacim(ml) = \frac{Ağırlık (mg) \times Potens (\mu g / mg)}{İstenilen konsantrasyon (\mu g / mL)}$$

Stok solüsyonu 0.22 µm por çaplı membran filtreden süzüp steril ettikten sonra, polipropilen tüplerde parçalara bölerek -70°C’de saklandı.

Besiyeri hazırlanırken antibiyotikler besiyerlerine eklenmeden önce stok konsantrasyonlardan çalışma konsantrasyonları hazırlandı ve besiyerlerine uygun miktarlarda eklendi (Tablo 6).

**Tablo 6.** Middlebrook 7H10 besiyerine eklenen ilaçların stok ve çalışma konsantrasyonları (56)

İlaç	Çözücü	Stok konsantrasyon (µg/mL)	7H10 agar için çalışma konsantrasyonu (µg/mL)	200 mL 7H10 agara çalışma konsantrasyonundan eklenen miktar (mL)	7H10 agarda ilacın Son konsantrasyonu (µg/mL)
İNH	SDS	10.000	200	0.2	0.2 (KK)
				1.0	1.0
ETM	SDS	10.000	1.000	1.0	5.0 (KK)
RİF	MET	10.000	1.000	0.2	1.0 (KK)
STR	SDS	10.000	1.000	0.4	2.0 (KK)
				2.0	10.0

SDS: Steril distile su, MET: Metanol, KK: Kritik konsantrasyon

ii) Agar besiyerinin hazırlanması;

Her birine 1'er mL gliserol, üreticilerin tavsiyelerine uygun miktarda M 7H10 (GBL Rosmedia) besiyeri ve distile su konmuş halde otoklavlanan 200 mL'lik altı balon agar besiyerine su banyosunda 50-56°C'ye geldiğinde 20 mL zenginleştirici OADC (oleik asit, albumin, dekstroz, katalaz ) (Becton Dickinson Diagnostic Instruments, Sparks, MD) eklendi. Devamında bir balon ayrılarak geride kalan beş balona İNH için iki ayrı konsantrasyonda olmak üzere uygun miktarlarda STR, ETM, RİF eklendi. Ayrılan balondaki besiyeri üreme ve kontaminasyon kontrolü için kullanıldı.

iii) İnokulum hazırlanması;

Katı besiyerinde üremiş ortalama 2 haftalık koloniler kazınarak alındı ve içinde 6-8

adet cam boncuk bulunan M 7H9 sıvı besiyerinde emulsifiye edildi. 1-2 dakika süreyle vortekslendi. Büyük partiküllerin çökmesi için 30 dakika süreyle tüp bekletildi. Süpernatant steril pastör pipeti yardımıyla boş bir steril cam tüpe alındı. Sıvı besiyeri eklenerek süspansiyonun bulanıklığı MacFarland no 1'e ayarlanıp (yaklaşık  $10^7$  CFU/mL) steril distile suyla bu süspansiyonun  $10^{-2}$  (1/100) ve  $10^{-4}$  (1/10.000) dilüsyonları hazırlandı.

iv) İnokulasyon ve inkübasyon:

Antibiyotik duyarlılığı test edilecek her bir mikroorganizma için; iki set test

besiyeri (I ve II nolu plakların her birinden 2'şer) oda ısısına getirildi. Petri plakları hasta kültür numarası ve dilüsyon oranlarını gösterecek şekilde (setlerden birini  $10^{-2}$  diğerini  $10^{-4}$ ) işaretlendi. Önce I nolu setin her bir bölümüne önceden hazırlanmış olan  $10^{-2}$  basil dilüsyonundan steril bir pipet kullanarak 0.1'er mL inokule edildi. Sonra II nolu set için aynı işlem  $10^{-4}$  dilüsyon ile tekrarlandı. İnokulumun saf olup olmadığını kontrol etmek amacıyla dilue edilmemiş süspansiyondan 1-2 damla bir adet kanlı agar besiyerine de ekim yapıldı. İnokulumun besiyerlerine absorbe olması için inokule edilen plaklar agarlı tarafı aşağıda olmak üzere oda ısısında yaklaşık 1 saat süreyle bekletildi.

Bu işlem esnasında, formaldehit oluşumunu önlemek için, plaklar ışıktan korundu. Her bir petri plağı ayrı bir CO<sub>2</sub> geçirgen polietilen torbaya sarılıp % 5-10 CO<sub>2</sub>li ortamda 3 hafta süreyle inkübe edildi.

v) Plakların okunması ve yorumlama:

İnkübasyonun ilk 7 günü kontaminant bakteri varlığı yönünden kanlı agar incelendi. Kontaminasyon saptandığında test tekrar edildi. Test besiyerlerinde ise antibiyotiksiz kontrol bölmeleri üç hafta boyunca her hafta incelendi. Üçüncü hafta sonunda üreme yetersizse, test tekrar edildi. Üç haftadan önce kontrol bölümünde 50 koloni üzerinde üreme (+1 veya daha fazla) görülünce test değerlendirildi ve dirençli sonuçlar kaydedildi. Fakat duyarlı sonuçları kaydetmek için üç hafta beklendi. Üçüncü haftadan sonra plaklar değerlendirilmedi. İnkübasyon sonunda tüm kadrantlardaki koloniler sayıldı ve tablo 7'ye göre yorumlandı. İlaç içeren besiyerindeki üreme oranı kontrol besiyerindeki üremenin % 1'ine eşit veya daha büyük ise sonucu dirençli; % 1'inden az ise duyarlı olarak yorumlandı.

$$\text{Direnç oranı (\%)} = \frac{\text{İlaçlı bölmedeki koloni sayısı} \times 100}{\text{kontrol bölme sin deki koloni sayısı}}$$

**Tablo 7.** Agar plaklarındaki mikobakteri kolonilerinin üreme yönünde kantitasyonu (56)

<b>Koloni sayısı</b>	<b>Kantitasyon</b>
0-50	Gerçek koloni sayısı
50-100	1+
100-200	2+
200-500	3+
>500 (aşırı üreme)	4+

### **3.2.2. BACTEC 460 TB (Radyometrik) Antibiyotik duyarlılık testi**

i) Antibiyotik solüsyonlarının hazırlanması:

BACTEC SIRE kitinden STR, INH, RİF ve ETM'nin stok solüsyonlarını hazırlandı. Her liyofilize antibiyotik şişesinin kapağı alkollü pamukla silindi. Her liyofilize antibiyotik şişesine 5 mL steril deiyonize su eklenip tamamen çözünene kadar karıştırıldı. Her antimikrobiyal ajan için tek bir konsantrasyon kullanıldı. Antimikrobiyal ajanların dilüsyon şeması ve BACTEC 12B besiyerindeki son konsantrasyonları tablo 8'de görülmektedir. Stok solüsyonu parçalara bölünüp; 2-8°C'de 3 gün, -70°C'de altı aya kadar saklandı.

ii) BACTEC 12B şişelerinin etiketlenmesi;

Her bir antibiyotik duyarlılık testi için beş adet 12B şişesi ve bir adet dilüsyon sıvısı (DF) şişesi hazırlanıp tüm şişelerin üzerine hasta kültür numarası, beş adet 12B şişesinin birine kontrol, dördüne ise çalışılacak dört antibiyotiğin ismini yazıldı.

iii) Antibiyotik içeren 12B besiyerlerinin hazırlanması;

Dört antibiyotiğin her birinden 0.1 mL, tek kullanımlık tüberkülin enjektörüyle, her



birinin üzerinde antibiyotiğin ismi yazan dört ayrı BACTEC 12B şişesine eklendi

iv) İnokulum hazırlanması;

Primer izolasyon şişesi kullanıldığında, GI değeri 10'un üzerine çıktığında şişeleri günlük olarak test ederek, GI değerinin >500 olmasını beklenip bu şişe inokulum olarak kullanıldı. Eğer 12B şişesine subkültür yapıldıysa, GI değeri >500 olana kadar şişeleri günlük olarak okutup GI değeri >800 ise, süspansiyon DF ile 1/1 dilue edildi ve bu süspansiyon inokulum olarak kullanıldı.

v) İnokulasyon ve inkübasyon;

Antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılacak tüm 12B şişelerini BACTEC 460 cihazında test ederek şişelerin içinde % 5'lik CO<sub>2</sub> ortamı sağlandı. Dört adet antibiyotikli ve bir adet antibiyotiksiz kontrol besiyerini sıralandı. Şişelerin lastik kapaklarını alkollü pamukla dezenfekte edilip inokulum süspansiyonu iyice karıştırılıp bir tüberkülin enjektörü yardımıyla 0.1 mL dilue edilmemiş süspansiyon ilaç içeren dört adet 12B şişesine inokule edildi. Birkaç damla inokulum süspansiyonu, bir adet kanlı agar ve bir adet M 7H10 agar plağına inokule edildi. DF ile 1/100 oranında dilüe edilmiş süspansiyondan 0.1 mL kontrol şişesine inokule edildi. Her şişenin lastik kapağı dezenfektan emdirilmiş pamukla ve peşinden alkollü pamukla silinip şişeler 37 ±1 °C'de karanlıkta inkübe edildi.

vi) Sonuçların değerlendirilmesi

Kontaminasyon kontrolü yapıldı. Günlük programda; şişeler hafta sonu ve tatiller dahil olmak üzere yaklaşık aynı saatte günlük olarak okutuldu. Okutmaya en az 4 gün devam edildi. Kontrol şişesinin GI değeri >30 olduğunda sonuçlar yorumlandı. Kontrol şişesinin GI değeri bir iki gün içinde >30 olduğunda inokulumun yoğun olduğu kabul edilip test tekrar edildi. Kontrol şişesinin GI değeri 14 günlük inkübasyondan sonra 30'a ulaşmazsa, test yine tekrar edildi.

Hafta sonu dahil olmayan programda; test Cuma günü yapıldı. Pazartesiinden itibaren okumaya başlandı. Her gün aynı saatte olmak üzere en az 3 gün okutuldu (5 gün inkübasyon). Kontrol şişesinin GI değeri Pazartesi günü >30 olursa, inokulumun çok yoğun olduğu düşünülüp test tekrar edildi. Kontrol şişesinin GI değeri 14 günlük inkübasyondan sonra 30'a ulaşmazsa, test tekrar edildi.

vii) Yorumlama;

Kontrol ve ilaç içeren şişelerin, bir gün önceyle karşılaştırarak, GI farklılıkları ( $\Delta GI$ ) hesaplandı. Sonuçları aşağıdaki gibi yorumlandı.

kontrol şişesinin  $\Delta GI >$  ilaçlı şişenin  $\Delta GI =$  duyarlı

kontrol şişesinin  $\Delta GI <$  ilaçlı şişenin  $\Delta GI =$  dirençli

kontrol şişesinin  $\Delta GI \cong$  ilaçlı şişenin  $\Delta GI =$  sınırdaki veya kısmi dirençli

İlaç içeren şişenin GI değeri 500'ü geçer ve bir sonraki gün de 500'ün üzerinde kalırsa, kontrol şişesinde inokulumun yoğun olmadığı ispatlanmak koşulu ile  $\Delta GI$ 'e bakmaksızın, sonuç dirençli olarak yorumlandı. Sınırdaki sonuçlar söz konusuysa, şişeler ek olarak 2-3 gün daha okutuldu.

**Tablo 8.** BACTEC 460TB duyarlılık testinde liyofilize antibiyotiklerden stok solüsyon hazırlama ve 12B besiyerindeki final antibiyotik konsantrasyonları (56)

Antibiyotik	Şişedeki liyofilize miktar	Sulandırım için steril distile su	Sulandırım sonrası konsantrasyon	12B'ye aktarılan miktar	12B'deki final konsantrasyon
Streptomisin	1.2 mg	5 mL, sonra 1/3 dilüsyon	80 µg/mL	0.1 mL	2.0 µg/mL
İzoniiazid	0.02 mg	5 mL	4 µg/mL	0.1 mL	0.1 µg/mL
Rifampisin	0.4 mg	5 mL	80 µg/mL	0.1 mL	2.0 µg/mL
Etambutol	1.5 mg	5 mL, sonra 1/3 dilüsyon	100 µg/mL	0.1 mL	2.5 µg/mL

### 3.2.3. MGIT 960 ( Florometrik ) Antibiyotik duyarlılık testi

i) Antibiyotik solüsyonlarının hazırlanması:

Antibiyotikler MGIT SIRE kiti içinde liyofilize halde üretici firma tarafından sağlandı. Liyofilize halde bulunan bu ilaç şişeleri sulandırılarak stok solüsyonlar hazırlandı. Her liyofilize antibiyotik şişesine 4 mL steril distile su ekleyip tamamen çözünene kadar karıştırıldı. Liyofilize antibiyotiklerin dilüsyon şeması ve MGIT 7 mL besiyerindeki final konsantrasyonları tablo 9'de görülmektedir. Özellikle INH için olmak üzere, eğer bir ilacın kritik konsantrasyonunda direnç görülürse, ilacın

daha yüksek bir konsantrasyonu için duyarlılık testi yapılması önerilmektedir. Bu amaçla MGIT SM 4.0 ve INH 0.4 kitleri mevcuttur. Bu çalışmada da dirençli görülen İNH ve STR için gerektiğinde bu konsantrasyonlar test edildi.

ii) Antibiyotikli ve antibiyotiksiz MGIT tüplerinin hazırlanması :

Her test izolatu için 5 tane MGIT tüpünü alınıp ve üzerleri yazıldı. (Kontrol-K, diğerlerine S, I, R ve E olarak). Her tüpe aseptik şartlarda 0.8 mL MGIT SIRE zenginleştiricisi eklendi. Dört SIRE tüpünün her birine, daha önce hazırlanan antibiyotik solüsyonlarından bir mikropipet yardımı 100 µL pipetlendi (tablo 9). Kontrol tüpüne antimikrobiyal ajan eklenmedi.

iii) İnokulum hazırlanması:

Katı ve sıvı besiyerinden inokulum hazırlanabilir. Çalışmamızda pozitif MGIT tüpünden inokulum hazırlandı.

Pozitif bir MGIT tüpü, MGIT 960 cihazında pozitif olduktan sonraki gün (1.gün) dahil 5. güne kadar kullanılabilir. Tüpün 5 günden daha fazla bir pozitifliği varsa, 'Growth' zenginleştiricisi eklenmiş yeni bir MGIT tüpüne subkültürü yapıldı ve pozitif oluncaya kadar cihazda test edilip, pozitifliği takip eden 1-5. günlerde kullanıldı. Tüpler 1-2 gündür pozitifse iyice karıştırılıp, inokulum olarak kullanıldı. Tüpler 3-5 gündür pozitifse serum fizyolojikle 1/5 dilüe edildi ve bu süspansiyon inokulum olarak kullanıldı.

iv) İnokülasyon:

Dört adet ilaçlı MGIT tüpünün her birine (S, I, R, E) inokulum süspansiyonundan 0.5 mL pipetlendi. 1/100'lük kontrol süspansiyonu hazırlamak için 9.9 mL steril SF içine 0.1 mL mikroorganizma süspansiyonu pipetlenip iyice karıştırıldı. 1/100'lük kontrol süspansiyonundan kontrol olarak etiketlenmiş MGIT tüpüne 0.5 mL pipetlendi. MGIT 960 cihazına giriş kaydı yapıldı. İnokulum süspansiyonundan % 5 koyun kanlı agara 0.1 mL ekilip, 35-37°C'de inkübe edildi. Bakteriyel kontaminasyon açısından kanlı agar plağı 48. saatte kontrol edildi. Kanlı agar plağında üreme yoksa teste devam edildi, üreme varsa test tekrar edildi.

v) Sonuçların yorumlanması ve rapor edilmesi:

MGIT 960 cihazı sonucu dirençli ya da duyarlı olarak yorumlayıp verdi. Sonucu hatalı verdiğinde test tekrar edildi.

**Tablo.9.** MGIT liyofilize antibiyotiklerinin dilüsyon şeması ve MGIT tüpündeki son konsantrasyonları (56)

Liyofilize antibiyotik	Sulandırım (steril distile su)	Sulandırıldıktan sonraki ilaç konsantrasyonu (µg/mL)	MGIT tüpüne eklenen miktar (µg)	MGIT tüpündeki son konsantrasyon (µg/mL)
MGIT STR	4 mL	83	100	1.0
MGIT İNH	4 mL	8.3	100	0.1
MGIT RİF	4 mL	83	100	1.0
MGIT EMB	4 mL	415	100	5.0
MGIT SM 4.0	2 mL	332	100	4.0
MGIT İNH 0.4	2 mL	33.2	100	0.4

### 3.2.4. Etest duyarlılık yöntemi

Löwenstein-Jensen besiyerinde üremiş ortalama 2 haftalık koloniler kazınarak alındı ve içinde 6-8 adet cam boncuk bulunan M 7H9 buyyonunda emulsifiye edildi. 1-2 dakika süreyle vortekslendi. Büyük partiküllerin çökmesi için 30 dakika süreyle tüp bekletildi. Süpernatant steril pastör pipeti yardımıyla boş bir steril cam tüpe alındı. Sıvı besiyeri eklenerek süspansiyonun bulanıklığı MacFarland no 3'e (yaklaşık  $9 \times 10^8$  CFU/mL) ayarlanıp M 7H10 katı besiyeri yüzeyine ışınal tarzda yayıldı ve petrilere 37°C'lik etüvde % 5-10 CO<sub>2</sub>'li ortamda 24 saat inkübe edildi. Ertesi gün aynı saatlerde petrilere STR, INH, RİF, ETM Etest şeritleri (AB BIODİSK, Solna, Sweden) yerleştirildikten sonra, petrilere kenarları kurumaması için parafilmle kaplanarak yine 37°C'lik etüvde % 5-10 CO<sub>2</sub>'li ortamda 5-10 gün inkübe edildi. Üremenin kuvvetle inhibe olduğu çizginin Etest şeridini kestiği nokta MİK değeri olarak saptandı. MİK sınır değerleri hesaplanırken daha önceki çalışmalarda önerilen şekilde agar orantılamada esas alınan kritik konsantrasyonlar dikkate alınarak duyarlı ya da dirençli sonuç olarak yorumlandı. Buna göre STR için 2µg/mL, INH için 0.2µg/mL, RİF için 1.0 µg/mL ve ETM için 5µg/mL'in üzeri MİK değerleri dirençli olarak kabul edildi.

Çalışmaların tamamı Sınıf II biyogüvenlik kabini içinde yapıldı. Tüm yöntemler uygulanırken *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) kalite kontrol suşu kullanıldı.

Duyarlılık yöntemleri karşılaştırılırken Bayes' teoremi kullanıldı (57). Test süreleri arasındaki fark ise Tukey analizine göre araştırıldı (58).

## 4. BULGULAR

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanelerine başvuran tüberküloz ön tanı hastaların klinik örneklerinden izole edilen *M. tuberculosis* kompleks suşlarının izole edildiği klinik örneklere göre dağılımı Tablo 10'da gösterilmiştir.

**Tablo 10.** *M. tuberculosis* kompleks suşlarının izole edildiği klinik örnekler (n:33)

Örnek	Sayı	%
Balgam	8	24,3
BAL	5	15,1
Plevral mayi	4	12,1
BOS	6	18,1
Apse	3	9,1
Doku	3	9,1
İdrar	2	6,1
Periton mayi	1	3,05
Batın içi mayi	1	3,05
<b>Toplam</b>	<b>33</b>	<b>100</b>

Klinik örneklerin ancak 5'inde ( 3 balgam , 1 apse ve 1 BAL örneğinde) Ehrlich Ziehl Neelsen boyama yöntemiyle aside dirençli basil görülmüştür. Kültürlerin tamamının boyalı preparatlarında kord faktörü bulunmuştur.

Altın standart agar orantılama yöntemine göre suşların duyarlılık ve direnç durumu Tablo 11’de gösterilmiştir. Buna göre suşlar arasında streptomisine ve etambütöle direnç bulunmazken izoniazid ve rifampisine birlikte dirençli iki suş bulunmuştur.

**Tablo 11.** Altın standart yöntem (AO) göre suşların duyarlılık ve direnç durumu

AGAR ORANTILAMA(AO)	Duyarlı (S)	Dirençli ( R)	Direnç %
Streptomisin	33	0	0
İzoniiazid	31	2	6
Rifampisin	31	2	6
Etambütöl	33	0	0

*M. tuberculosis* kompleks suşlarının agar orantılama yöntemiyle karşılaştırmalı olarak diğer üç yöntemle uygulanan duyarlılık testlerinin sonuçları Tablo 12, 13, 14’de gösterilmiştir. Buna göre BACTEC 460TB yöntemi ile, agar orantılama yöntemiyle tüm antibiyotiklerle edinilen aynı bulgular elde edilmiştir. MGIT 960 sistemiyle ek olarak bir suşta streptomisine direnç gözlenmiştir. Etest yönteminde ise tüm suşlar en az iki kez çalışılmasına rağmen küfle kontaminasyon nedeniyle ancak 15 suşun minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri elde edilmiş ve standart yöntemle dirençli bulunan bir suş izoniazid ve rifampisine duyarlı bulunurken bir suş bu iki ilaca dirençli bulunmuştur. Duyarlılık testlerinin sonuçları Bayes’ teoremine göre değerlendirilmiştir.

**Tablo 12.** Agar orantılama ve BACTEC yöntemleriyle antitüberküloz ilaç duyarlılığı, testin duyarlılığı ve özgüllüğü

İlaçlar	AO		BACTEC		BACTEC (%)	
	Duyarlı (%)	Dirençli(%)	Duyarlı (%)	Dirençli(%)	Duyarlılık	Özgüllük
STR	33 (100)	0	33 (100)	0	*	100
İNH	31 (93.9)	2 (6.1)	31 (93.9)	2 (6.1)	100	100
RİF	31(93.9)	2 (6.1)	31(93.9)	2 (6.1)	100	100
ETM	33 (100)	0	33 (100)	0	*	100

\*İzolalar arasında dirençli suş bulunmadığı için hesaplanamadı.

**Tablo 13.** Agar orantılama ve MGIT yöntemleriyle antitüberküloz ilaç duyarlılığı, testin duyarlılığı ve özgüllüğü

İlaçlar	AO		MGIT		MGIT (%)	
	Duyarlı (%)	Dirençli(%)	Duyarlı (%)	Dirençli(%)	Duyarlılık	Özgüllük
STR	33 (100)	0	32 (96.9)	1 (3.1)	*	96.8
İNH	31 (93.9)	2 (6.1)	31 (93.9)	2 (6.1)	100	100
RİF	31(93.9)	2 (6.1)	31(93.9)	2 (6.1)	100	100
ETM	33 (100)	0	33 (100)	0	*	100

\*İzolatlar arasında dirençli suş bulunmadığı için hesaplanamadı.

**Tablo 14.** Agar orantılama ve Etest yöntemleriyle antitüberküloz ilaç duyarlılığı, testin duyarlılığı ve özgüllüğü

İlaçlar	AO		Etest		Etest (%)	
	Duyarlı (%)	Dirençli(%)	Duyarlı (%)	Dirençli(%)	Duyarlılık	Özgüllük
STR	33 (100)	0	15 (100)	0	*	100
İNH	31 (93.9)	2 (6.1)	14 (93.3)	1 (6.7)	50.0	92.8
RİF	31 (93.9)	2 (6.1)	14 (93.3)	1 (6.7)	50.0	92.8
ETM	33 (100)	0	15 (100)	0	*	100

\*İzolatlar arasında dirençli suş bulunmadığı için hesaplanamadı.

Antitüberküloz ilaçlar dikkate alındığında testlerin agar orantılama yöntemine göre yorumlana hata sınıflaması tablo 15 'de gösterilmiştir.



**Tablo 15.** Agar orantılama yöntemi altın standart olarak alındığında diğer duyarlılık yöntemleriyle test edilen antitüberküloz ilaçlar için hata oranları

	STR (n/%)			İNH (n/%)			RİF (n/%)			ETM (n/%)		
	ÇBH	BH	UYUM	ÇBH	BH	UYUM	ÇBH	BH	UYUM	ÇBH	BH	UYUM
BACTEC (n=132)	0	0	132/100	0	0	132/100	0	0	132/100	0	0	132/100
MGIT (n=132)	0	1(0.8)	131/92	0	0	132/100	0	0	132/100	0	0	132/100
ETEST (n=60)	0	0	60/100	1 (2)	0	59/98	1(2)	0	59/98	0	0	60/100

ÇBH: Çok Büyük Hata, BH: Büyük Hata

Standart yöntemle dirençli bulunan izolatların özellikleri Tablo 16’da gösterilmiştir. Suşların retrospektif irdelenmesinde hastaların ilk kez tanı aldığı ve örnek alındığı sırada antitüberküloz tedavi almadığı bilgisine ulaşılmıştır.

**Tablo 16.** Dirençli izolatların özellikleri

Suş no	Örnek	İlaç	AO	BACTEC	MGIT	ETEST (µg/ml)
30	Balgam	STR	S	S	R	0.064 S
32	Doku	İNH RİF	R R	R R	R R	0.016 S 0.016 S
33	Batın içi mayi	İNH RİF	R R	R R	R R	32.0 R 2.0 R

Duyarlılık testleri çalışılırken testlerin toplam süreleri kaydedilmiş ve ortalama test süreleri Tablo 17’de gösterilmiştir.

**Tablo 17.** Testlerin ortalama süreleri

Testin ortalama süresi	AO	BACTEC	MGIT	ETEST
Gün	21	6.39	6.93	7.06

$p < 0,05$

Buna göre testler süreleri açısından karşılaştırıldığında, Tukey testi kullanılarak yapılan analizde Etest ve BACTEC arasında BACTEC lehine anlamlı fark bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).

## 5. TARTIŞMA

Tüberküloz, tanı ve tedavi yöntemlerindeki ilerlemelere rağmen sadece gelişmekte olan değil gelişmiş ülkelerde de çözülmesi gereken bir halk sağlığı sorunudur. Çözümün ilk aşaması tanının hızlı ve doğru konmasıyla tedavinin ivedilikle başlanmasına kadar sürer. Böylece en büyük bulaş kaynağı olan tanı almamış, çevreye basil saçan infekte bireyler daha çabuk kontrol altına alınmış olur. Çözümün ikinci aşaması ise verilen tedavinin uygunluğuna karar verilmesi ve direnç gelişimine neden olunmaması için hasta ve kültür odaklı duyarlılık çalışmaları yaparak infeksiyonu sınırlandırmak ve sonrasında yok etmeyi amaçlamalıdır.

Tedavi seçenekleri ne bakterinin geçmişi kadar eski ne de moleküler yapısı ve geliştirdiği direnç mekanizmaları kadar çok çeşitlidir. Bu nedenle halihazırda kullanımda olan, tedaviyi kolaylaştıracak, tanıyı ve bakterinin duyarlılık paternini ortaya koyacak her türlü yöntem en verimli şekilde uygulanmalıdır. Çok ilaca dirençli tüberküloz sorunu, hala tam olarak çözülememiş; kültürün uygun koşullarda yapılmaması, standardize olmamış yöntemler, kalite kontrol ölçülerinin olmaması, güncel gelişmeleri yakalayacak uzun vadeli çalışmaların yapılmaması, primer ve kazanılmış direncin farkını ortaya koyan bazı çalışmaların başarısızlığı gibi metodolojik problemler dikkat çekmektedir (59).

DSÖ ve Uluslararası Akciğer Hastalıkları ve Tüberküloz Birliği 1994'de antitüberküloz ilaç direnci surveyansı için dünya çapında bir proje başlatmıştır. Bu proje, standart yöntemlerle direnç sıklığını ölçmek için:

- i) Tüberküloz hastasının örneğinin toplumun çoğunu temsil etmesi
- ii) Laboratuvarın validasyonu
- iii) Primer (yeni olgularda) ve kazanılmış (tedavi almış olgularda) ilaç direncinin ayırt edilmesi gibi prensipler edinmiştir.

Bu projenin üçüncü raporunda ortalama direnç oranları streptomisin için % 6.3, izoniyazid için % 5.9, rifampisin için % 1.4 ve etambutol için % 0.8 bulunmuştur (59).

Mikobakteriyoloji laboratuvarına gelen örneğin sayısından çok niteliği, istek kağıdında beraberinde ilaç kullanılıp kullanılmadığı bilgisini içermesi önemlidir. Gülhane Askeri Tıp Akademisi'nden Baylan ve arkadaşları (60) laboratuvarlarına beş yıl içinde gelen örnekleri irdelediklerinde, gönderilen örnek sayısında her yıl artış olmasına rağmen üreme oranlarında artış olmadığını bulmuşlardır. Klinik örneğin akciğer ya da akciğer dışı vücut bölgelerinden alınmış olması üreyecek etken ve direnci öngörmek açısından faydalı olabilir. Bu çalışmada klinik örneklerin yaklaşık % 60'ı akciğer (balgam, BAL, plevral mayi, doku) kaynaklıdır. Çalışmaya alınan suşlar *M. tuberculosis* kompleks olarak tanımlananlar olduğu için örneklerin çoğunun akciğer kaynaklı olması aslında klinik olarak da daha çok akciğer tüberkülozu ile karşılaştığımız gerçeğini doğrulamaktadır. Daha çok *M. tuberculosis* kompleks dışı mikobakterilerin etken olduğu genitoüriner sistem tüberkülozunun göstergesi olan idrar örneğinin oranı ise % 6'dır.

Ülkemizin tamamını temsil eden, ilaç direnç paternini gösteren fazlaca çok merkezli çalışma bulunmamaktadır. Yapılan bölgesel çalışmalarda da farklı antitüberküloz duyarlılık yöntemleri ve bu yöntemlerde de farklı antitüberküloz ilaç konsantrasyonları kullanılmıştır. Böylece standart miktarda ilaç konsantrasyonu kullanılmayan çalışmalarda direnç oranlarının karşılaştırmalı olarak yorumlanması mümkün olmamaktadır (60). Bu çalışmada CLSI'in onaylanmış standardında agar orantılama için STR, İNH, RİF ve ETM için sırasıyla 2.0, 0.2-1.0, 1.0 ve 5.0 µg/ml ve BACTEC için STR, İNH, RİF ve ETM için sırasıyla 2.0, 0.1-0.4, 2.0, 2.5 µg/ml önerilen ilaç konsantrasyonları kullanıldı (6). Çalışma retrospektif yapıldığı için hastaların tedavi ya da önceden tüberküloz tanısı alıp almadığı bilgisi de sonradan dosyalarına ulaşılarak elde edilmeye çalışıldı. Özellikle antitüberküloz ilaç direnci

bulunan klinik örneklerin hastalarının, önceden tüberküloz tanısı almamış yeni hastalar olduğu öğrenildi. Böylece İNH ve RİF için çalışmamızda bulunan % 6'lık direnç 'primer direnç' olarak yorumlandı. Bölgemizde önceki yıllarda yapılan duyarlılık çalışmalarında STR, İNH, RİF ve ETM direnç oranları sırasıyla % 6.5-9.4, % 19.8-25.4, % 21.3-22.1, % 4.2-5.3 arasında bulunmuştur. Bu çalışmalarda direncin çalışmamızdakinden fazla olması örneklere göğüs hastalıkları hastanesi ve verem savaş dispanserinden gelen, önceden tanı almış ve tedavide sorunu olan dirençli suşların da katılması sonucudur.

Ülkemizde direnç durumunu yansıtan en kapsamlı bildiri 1984-1989 ve 1990-1995 yılları arasında yapılmış 21 çalışma ve 21.959 suşun sonuçlarını kapsayan bir meta analiz çalışmasının verilerini içermektedir. Bu çalışmanın ilk ayağında primer ilaç direnci STR, İNH, RİF ve ETM için sırasıyla % 8.8, % 14.4, % 5.7 ve % 2.2 bulunmuş, ikinci ayağında sırasıyla STR, İNH, RİF ve ETM için %10.1, % 8.8, % 8.9 ve % 3.0 bulunmuştur. Toplam direnç ise STR için % 22.5, İNH için % 27.8, RİF için %22.3, ETM için % 7.8 olarak bildirilmiştir (61). Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarına 1999-2002 yılları arasında yedi bölge tüberküloz laboratuvarlarından gönderilen toplam 505 *M. tuberculosis* kompleks suşunun duyarlılıkları LJ orantılama yöntemiyle çalışılmıştır. İlk sıra antitüberküloz ilaçlara sırasıyla STR, İNH, RİF, ETM için % 9.1, % 13.2, % 13.2 ve % 3.3 direnç oranlarını bulmuşlardır (62). Ülkemizde yapılan diğer bölgesel çalışmalardan elde edilen antitüberküloz direnç oranları tablo 18'de verilmiştir.

**Tablo 18.** Ülkemizde çeşitli bölgelerden elde edilen direnç oranları

Kaynak	Yıl	Merkez	Besiyeri	INH	RİF	STR	ETM
Yüce ve ark.(63)	1997	İzmir	LJ	6,0	10,3	10,3	5,2
Otkun ve ark.(64)	1997	Edirne	7H10	30,0	11,0	39,0	13,0
Aydın ve ark.(65)	1998	Bursa	12B	22,2	7,4	4,5	4,0
Balcı ve ark.(66)	1999	Gaziantep	12B	10,6	0,5	2,0	4,5
Öztürkeri ve ark.(67)	1999	İstanbul	12B	35,3	21,0	6,8	30,5
Saniç ve ark.(68)	2000	Samsun	LJ	7,3	22,1	10,1	16,0
Sürücüoğlu ve ark.(69)	2002	Manisa	12B	17,1	12,4	20,2	7,0
Kısa ve ark.(70)	2002	Ankara	12B	8,7	2,1	4,1	5,1
Gani ve ark.(71)	2002	Gaziantep	12B	13,9	2,9	1,9	3,4
Kocazeybek.(72)	2002	İstanbul	MGIT	19,6	14,7	6,5	3,2
Tansel ve ark.(73)	2002	Edirne	12B	9,0	4,5	2,2	1,5
Karadağ ve ark.(74)	2004	Samsun	12B	8,0	4,0	4,0	2,0
Yanık ve ark. (75)	2005	Samsun	12B	18,8	3,1	3,1	12,5
Abaslı ve ark.(76)	2006	Ankara	12B	17,0	3,6	3,7	4,3
Alp ve ark.(77)	2006	Ankara	12B	18,7	9,3	12,5	4,6
Tanıdır ve ark. (78)	2006	İstanbul	MGIT	20,6	2,9	4,4	11,8
Öksün ve ark.(79)	2006	Adana	MGIT	13,4	8,9	7,4	2,9

Bu sonuçlara göre izolat sayımız az olsa da İNH ve RİF için standart yöntemi kullanarak bulduğumuz oran ülke genelinde bulunan dirençle uyumludur. STR ve ETM’de ise direnç bulamamamız, kısıtlı popülasyonda çalışmamız ve özellikle ETM için görülen direncin zaten az olmasından kaynaklanabilir.

Dünyada görülen direnç oranları tüberkülozun endemik olarak görüldüğü bölgelerle az görüldüğü ülkeler arasında belirgin farklılık göstermektedir. Hastalığın sıklığı ise uygun tedavi rejimlerinin verilmemesi, tüberküloz kontrol önlemlerinin yeterince uygulanmaması, HIV epidemisi ve ülkenin göç alıp almaması gibi nedenlerle

bağlantılı olarak dalgalanmalar göstermektedir. Tüberküloz vakalarının % 95'inden fazlası gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir (44). DSÖ ve Uluslararası Akciğer Hastalıkları ve Tüberküloz Birliğinin 1999-2002 yılları arasında, çeşitli ülkelerden 75 merkezden tedavi görmemiş 55,779 hasta üzerinde yapılan çalışmalarının analizine göre bir veya daha fazla ilaca direnç oranı % 10.2 olup en yüksek direnç oranı % 57.1 ile Kazakistan'da saptanmıştır. Ortalama direnç oranları STR için % 6.3, İNH için % 5.9, RİF için % 1.4 ve ETM için % 0.8 olarak bulunmuştur. Ortalama çok ilaca direnç oranı ise % 1.1 olarak hesaplanmıştır (78). Bu oranların tedavi almış eski vakalarda STR için % 11.4, İNH için % 14.4, RİF için % 8.7 ve ETM için % 3.5; ortalama çok ilaca direncin ise % 7.0 olduğunu görmek şaşırtıcı olmasa gerektir. Bazı ülkelerde uygulanan tüberküloz kontrol politikaları sayesinde hem infeksiyonun görülme sıklığı hem de ÇİD'li suş oranı azalmıştır. Örneğin İzlanda, İtalya, Kanada gibi ülkelerde tüberküloz görülme sıklığı yaklaşık 1-4/100 bin iken bu ülkelerdeki ÇİD oranı % 0-1'in altındadır. Doğu Avrupa, güneydoğu Asya, batı Pasifik bölgeleri tüberküloz görülme sıklığının yaklaşık 200/ 100 bin, ÇİD'in % 6.5'in üzerinde görüldüğü 'sıcak nokta' ülkelerinin yer aldığı bölgelerdir. DSÖ verilerine göre ülkemizin tahmin edilen tüberküloz görülme sıklığı 12/ 100 bin iken tedavi edilmemiş izolatlarda ÇİD oranı % 1-5 arasındadır (44).

Tüberkülozda ilaç direnci, doğal direnç genlerinin varlığına ve randomize spontan mutasyonlarla mutant kökenlerin seçilmesine bağlı ortaya çıkar. RİF için doğal direnç olasılığı  $10^{-8}$ , İNH ve ETM için  $10^{-6}$ , STR için ise  $10^{-5}$  tir. İNH+RİF için sıklık  $10^{-14}$ , İNH+RİF+ETM için ise  $10^{-20}$  kadardır, dolayısıyla doğru tedavi edilmiş bir tüberküloz basilinin iki ilaca birden spontan direnç geliştirme olasılığı neredeyse imkansızdır (80). Çalışmamızda yeralan dirençli suşların ikisi de İNH ve RİF'e birlikte primer olarak dirençli bulunmuştur. Freixo ve arkadaşları (81) çok ilaca direncin iki aşamada kazanıldığını bildirmektedir. İlk aşamada genellikle RİF'den önce İNH'a direnç gelişir. Bu çalışmada da İNH'a dirençli suşlar % 100 RİF'e de dirençli bulunmuştur. Bu bulgu Hazbon ve arkadaşlarının (3) ÇİD araştırırken sadece RİF direncine bakmanın iyi bir gösterge olduğu iddiasını desteklemektedir. Streptomisin direncinden *rpsL* veya *rrs* genlerinin mutasyonu, rifampisin direncinden *rpoB*, izoniyazid direncinden *katG* ve *inhA* genlerinin mutasyonu, etambutol direncinden ise *embB* geni mutasyonunun sorumlu mekanizmalardan olduğu rapor

edilmektedir (80, 82, 83). Moleküler yöntemler çalışmamızda kullanılmadığından olası direnç genleri tespit edilememiştir.

Duyarlılık yöntemleri arasında agar orantılama yöntemi CLSI tarafından referans yöntem olarak kabul edilip uygulanması tavsiye edilmiştir (6). Bu yöntemi uygularken LJ, M 7H10 yada 7H11 besiyerleri kullanılabilir. LJ besiyeri katılaştırılması sırasında uygulanan yüksek ısı ve besiyerinin bol protein içeriği nedeniyle antitüberküloz ilaçların inaktive olmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle ilaç konsantrasyonu ve etkinliği açısından agar orantılama yönteminde LJ besiyerinin kullanılması önerilmemektedir (84). Middlebrook besiyeri ilaç konsantrasyonunun standardizasyonu açısından daha kolay kullanılabilir. Değerlendirme yaparken de şeffaf olduğu için mikrokoloniler daha çabuk görünür hale gelir. Çoban ve arkadaşlarının (85) yaptığı çalışmada duyarlılık testi her iki besiyerinde karşılaştırmalı olarak yapılmış ve LJ besiyerinde çalışılan duyarlılık testlerindeki direnç oranları M 7H10'dan fazla bulunmuştur. M 7H11'de ek olarak bulunan kazeinin üremeyi hızlandırdığı, özellikle Etest çalışırken kullanılmasının ek fayda getireceği bildirilmektedir. Ancak M 7H10 ve 7H11'in bu farkını ortaya koyan çalışma bulunmamaktadır. Öztürkeri (86) LJ ve Middlebrook besiyerlerinin etkinliğini araştırırken RİF, İNH ve ETM'nin yüksek konsantrasyonunda LJ ile M 7H10 arasında % 100 uyum bulmuş, STR testinde iki ve ETM'nin düşük konsantrasyonunda M H710 ile duyarlı, LJ ile dirençli bir suş bulmuştur. Her iki besiyeri arasındaki uyumu % 98.9 olarak saptamıştır. Bu çalışmada da agar orantılamada daha standart uygulanan ve güvenilir sonuç veren M 7H10 besiyerini kullanıldı. Orantılama yöntemi referans yöntem olmasına karşın zahmetli, yorumlanması uzmanlık gerektiren ve 21 gün gibi uzun zaman alan bir yöntemdir. Süreyi azaltmak, iş yükünü hafifletmek için geliştirilen yarı otomatik sistem radyometrik BACTEC 460TB sistemidir. Middlebrook 7H12 sıvı besiyeri kullanılarak, orantılama yöntemi esas alınarak duyarlılık çalışılır. Orantılama yöntemiyle karşılaştırmalı yapılan çalışmalarda BACTEC 460TB'nin klasik yöntemle uyumu tüm ilk sıra ilaçlar için % 95'in üzerinde bulunmuştur (2, 19, 60). Çalışmamızda da BACTEC radyometrik yöntemini agar orantılama yöntemiyle, İNH ve RİF için % 100 duyarlı ve özgül; STR ve ETM için dirençli suş olmadığından duyarlılığı hesaplanmasa da % 100 özgül bulunmuştur. BACTEC 460TB sistemi de

çalışma prensibi gereği orantılama yöntemine benzemesi, duyarlılık sonuçlarının orantılama yöntemiyle % 100'e yakın uyumlu olması gibi nedenlerle altın standart test olarak kabul edilmektedir. Dolayısıyla yeni geliştirilecek her sistemin BACTEC ile karşılaştırılıp uyumuna bakılması gerekmektedir (87).

Mersin'de yapılan bir çalışmada BACTEC 460 ile agar orantılama karşılaştırılmış; iki yöntem arasındaki genel uyum % 97.3, en az İNH için % 96.5'lik uyum, en fazla RİF için % 98.8'lik uyum bulunmuştur (88). Alp ve ark. (89) BACTEC 460 ile agar orantılama yöntemlerini karşılaştırdıkları çalışmalarında iki yöntemin uyumunu İNH için % 100, RİF için % 96, ETM için % 94, STR için % 100 bulmuşlardır. Gaziantep'ten bildirilen çalışmada ise bu iki yöntem arasındaki uyum İNH için % 99, RİF için % 100, ETM için % 92.3, STR için % 100 bulunmuştur (90).

DSÖ'nün 1994'de dünya çapında başlattığı eksternal kalite kontrol çalışmasında en fazla güvenilir ve uyumlu sonuçlar çok ilaca direnci gösteren İNH ve RİF için bulunmuştur. ETM içinse duyarlılık daha düşük bulunmuştur (91). Bunun nedeni ETM direncindeki heterojenite olabilir. Düşük dozda test edildiğinde dirençliyen, yüksek dozda yanlış duyarlı bulunabilir. O halde özellikle test sonucu dirençli çıktığında mümkünse üst konsantrasyonla test tekrarlanmalıdır. Bu çalışmada da İNH'a dirençli çıkan izolatlar yüksek konsantrasyonda ilaçla yeniden test edildi ve dirençli bulundu. Duyarlı bulunsaydı sonuca düşük düzeyde dirençli, tedavide yüksek doz ilaçtan yarar görebilir yorumu eklenecekti. Çalışmamızda da kalite kontrol çalışmasını doğrular şekilde Etest dışında diğer yöntemlerle İNH ve RİF için sonuçlar % 100 uyumlu bulunmuştur. Buna göre her iki sıvı besiyerli sistem de ÇİD *M. tuberculosis* kompleks suşlarını yakalamak için gönül rahatlığıyla kullanılabilir.

Laboratuvar kalite kontrol programının amacı test yöntemlerinin doğruluğu ve güvenilirliğini değerlendirmek, kullanılan malzemenin gücünü ve testi yapan personelin performansını ortaya koymaktır (6, 59). BACTEC 460TB sistemi artık ülkemizde de birçok merkezde kullanılan, güvenilir, hızlı sonuç veren standart bir yöntem haline gelmiştir. Ancak maliyetinin fazla, radyoaktif madde içeren şişelerinin imhasının zor olması kullanılmasında sorun oluşturabilecek noktalardır. MGIT 960 sistemi maliyete olmasa da, radyoaktif atıklara çözüm getiren alternatif bir sistem olarak ortaya çıkmıştır. Çalışma esası orantılamaya dayanan, otomatize ve atık



sorunu olmayan sistemde bilgisayar program ağıyla çalışan ve iş yükünü azaltan bir sistem vardır. Süre olarak birbirine avantajı olmasa da laboratuvarında personele bağlı hatayı azaltabilir. Çünkü testin sonlandırılması ve yorumu bilgisayar programı tarafından yapılmaktadır. Sürekli monitörizasyon yapması ve şişelerinin plastik olması başka avantajlarıdır. Ancak BACTEC 460TB ile karşılaştırıldığında kontaminasyon oranı dolayısıyla hata oranı fazladır. Sıvı kültür sistemlerinin zenginleştirilmiş ortamı, bölünme süresi *M. tuberculosis* kompleksten kısa olan mikroorganizmaların üremeleri için uygun besiyeri oluşturur. MGIT sisteminde ek olarak tüplerin kapaklı olması ve pipet kullanılması kontaminasyon riskini artırmaktadır. BACTEC sisteminde, lastik tüp başlığı ve kullanılan küçük enjektörler BACTEC şişesinin kontaminasyon riskini en aza indirecek şekilde tasarlanmıştır. Bu çalışmada STR için MGIT'la bir suşta büyük hata bulunmuştur. Johansen ve ark. (92) STR'yi almadıkları çalışmalarında, 7 uyumsuz sonucu standart yöntemle tekrar değerlendirmiş; 1 suşu MGIT lehine 6 suşu BACTEC lehine sonuçlandırmıştır. Genel kontaminasyonu % 2.3 buldukları çalışmalarında MGIT sistemiyle dirençli bulunan her suşun mutlaka saf kültür olduğunun gösterilmesi ve kontaminasyon kontrolünün yapılması gerektiğini bildirmişlerdir.

Diğer çalışmalarda da MGIT'la büyük hata oranı BACTEC 460TB'den fazla bildirilmiştir (2, 87). Tortoli ve ark. (87) iki sistemi karşılaştırdıkları çalışmalarında, 18 uyumsuz sonucu agar orantılama yöntemi ile değerlendirmiş; 11'i BACTEC lehine, 7'si MGIT lehine sonuçlandırmıştır. Tüm ilaçlara bakıldığında toplam uyum % 96.7 bulunmuş ve BACTEC lehine sonuçlanan duyarlılıklar da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Uyumsuzluklarda MGIT sonuçları dirençli, BACTEC sonuçları duyarlı olma eğilimindedir. BACTEC için duyarlılık oranını, MGIT için de özgüllük oranını yüksek bulmuşlardır. Kontaminasyon oranı MGIT tüplerinde fazla olduğu için yanlış dirençli çıkan sonuçlar testin tekrarını gerektirmiş ve sonuç verme süresini uzatmıştır ama büyük hata çok büyük hata kadar ciddi olmayabilir sonucuna varmışlardır.

Karşılaştırma çalışmalarında toplam hata oranı BACTEC 460TB sisteminde MGIT 960'a göre az olmasına rağmen BACTEC'teki çok büyük hata ve büyük hata oranı daha fazla gibi görünmektedir. Bu durum yani BACTEC için yalancı duyarlı olma durumu Johansen ve ark. (92) tarafından testlerin eş zamanlı çalışılmamasından

dolayı tekrar edilen subkültürlerde duyarlı bakterilerin seçilmesi şeklinde açıklanmıştır. Bu açıklamayı destekler şekilde çalışmamızda da malzemeleri geç elde ettiğimiz için önce MGIT yöntemi sonra dondurulup çözülüp subkültürler yapılarak BACTEC yöntemi çalışılmıştır. Rüsç-Gerdes ve ark. (91). MGIT ve BACTEC duyarlılık testlerinden tüm antitüberküloz ilaçlar için elde ettikleri uyumsuz sonuçları agar orantılama yöntemiyle çözmeye çalışmış ve uyumsuz sonuçların yarısı BACTEC lehine diğer yarısı MGIT lehine sonuçlanmıştır. Palicova ve ark. (93) ise İNH, RİF ve ETM için sonuçları % 100 uyumlu buldukları halde STR için uyumu % 86.8 gibi düşük bir oranda bulmuşlardır. Uyumsuz izolatlar bizim çalışmamızdaki gibi MGIT sisteminde dirençli iken BACTEC sisteminde duyarlı bulunmuştur. Toplam yedi suş agar orantılama yöntemiyle tekrar çalışıldığında iki suş dirençli beş suş duyarlı bulunmuştur. Scarparo ve ark. (2) MGIT 960 ve BACTEC 460 arasında % 96.3 uyum bulmuş, standart yöntemle 26 uyumsuz sonucun 8'i MGIT lehine, 18'i BACTEC 460 lehine sonuçlanmıştır. MGIT için 8 çok büyük hata, BACTEC 460 için 4 çok büyük hata bulmalarına rağmen ilaç bazında iki yöntemin istatistiksel farkını bulamamışlardır. Her iki yöntemle de ETM'ye dirençli buldukları izolatları mutlaka İNH'a da dirençli bulmuşlar. Bu çalışmada da ETM direnci bulunamadı ama sonucu CLSI'nın tek başına ETM direncinin pek mümkün olmadığı, rastlandığında testin tekrarlanması önerisini desteklemektedir.

Adjers ve ark. da (94) MGIT ve BACTEC 460 sistemlerinin İNH ve RİF'a direnç sözkonusu olduğunda güvenilir ve hızlı sonuç verdiğini ancak ETM ve STR için hala daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu bildirmişlerdir.

Agar orantılama, BACTEC 460 ve MGIT 960 gibi sistemlerin primer antitüberküloz ilaçlara karşı kabul görmüş, standardize olmuş ve karşılaştırılabilir sonuçları vardır. Ancak artan tüberküloz insidansı ve ona paralel artan primer ilaç direnci araştırmacıları yeni antitüberküloz ilaçlar geliştirmeye yönlendirmektedir. Yeni ilaçların klinik izolatlarda duyarlılığının belirlenmesi, klasik yöntemlerle ve cihaza bağlı otomatik yöntemlerle güvenilir şekilde yapılamamaktadır. Doksanlı yılların başından itibaren araştırmacılar MİK değeri veren, uygulanması kolay, özellikle de hızlı üreyen mikobakteriler için kullanılacak Etest yöntemiyle duyarlılık çalışmaları yapmaya başlamışlardır. Kantitatif sonuç verdiği için duyarlılık

yorumunu araştırmacıya bırakan yeni antitüberküloz ilaçlar için de kullanılabilir bir yöntemdir. Wanger ve Mills (95) Etestin yavaş üreyen mikobakteriler için de kullanılabilirliğini çalışmalarında gösterince bu konuyla ilgili karşılaştırmalı birçok çalışma yapılmıştır. Etestin; hızlı sonuç vermesi, farklı dilüsyonlarda ilaç konsantrasyonlarını göstermesi nedeniyle ÇİD *M. tuberculosis* suşlarının yaygın olarak görüldüğü gelişmekte olan ülkelerde tarama testi olarak kullanılması önerilmektedir (3). Diğer yöntemlerle de vurgu yapılan RİF duyarlılığının ÇİD’i temsil edebileceği düşüncesinden hareketle direncin fazla görüldüğü bölgelerde sadece RİF Etesti çalışılarak genel direnç ve tedavi konusunda az maliyetle fikir sahibi olunacağı savunulmaktadır (3). Etest çalışırken ve değerlendirirken standardizasyonu ile ilgili sorunlar bulunmaktadır. *M. tuberculosis* kompleks gibi yavaş üreyen bakteriler için kısa sürede üreme olup üremenin Etest şeridini kestiği noktanın belirlenmesi, yoğun inokulum kullanılmasını gerektirir. Kimi yayınlarda Mac Farland no 4, kimi yayınlarda ise Mac Farland no 3 kullanılmıştır. Önerilen Mac Farland no 1-3 arasındadır çünkü inokulum yoğunluğu arttıkça üremenin şeridi kestiği bölge daha çabuk görülmektedir (7). Değerlendirme yapılırken MİK sınır değerleri agar orantılama için kritik konsantrasyon olarak kabul edilen STR için 5.0µg/ ml, İNH için 0.2 µg/ ml, RİF için 1.0 µg/ ml ve ETM için 2.0 µg/ ml olarak alındığında bazı duyarlı suşlar dirençli gibi değerlendirilebilir (81).

Altın standart yöntemin esası % 1’lik dirence dayandığı için aslında Etestin MİK değerleriyle çok farklı yöntemler olmasına rağmen yapılan çalışmalar iki yöntemin uyumunun iyi olduğunu göstermektedir (7, 81, 95). Wanger ve ark. (7) agar orantılama ile Etest arasında STR, İNH, RİF ve ETM için sırasıyla % 94, % 93, % 100, % 90 uyum bulmuşlardır. Hazbon ve ark. (3) benzer şekilde STR, İNH, RİF ve ETM için sırasıyla % 94.7, % 97.9, % 100, % 100 agar orantılama için uyum bulmuşlardır. Joloba ve ark. (96) Etest sonuçlarını BACTEC sonuçlarıyla karşılaştırmış ve İNH, RİF için % 100, STR için % 94 ve ETM için % 97 uyumlu bulmuşlardır.

Freixo ve ark. (81) ETM dışındaki ilaçlara dirençli suşlarda Etest ve agar orantılamayı karşılaştırmışlar; uyumsuz sonuçları, sıklıkla dirençle bağlantılı genlerdeki mutasyonları gösteren DNA sekans analizi ve BACTEC ile değerlendirmişlerdir. Etest ve orantılamayla, İNH ve RİF için diğer çalışmalara

benzer şekilde uyumlu sonuçlar elde edilmişken; STR için uyumsuz sonuçlar almışlardır. Uyumsuz sonuç veren suşun genetik analizinde direnç genine de rastlanmamış, ancak bazı suşlarda Etest yeniden çalışıldığında uyumlu sonuç bulunmuştur. Araştırmacı subkültürde dirençli mutantların seçilerek ürediği yorumunu yapmıştır. Genetik analiz destekli bu çalışmadan çıkarılan bir diğer sonuç da dirençli sokak suşlarının ortalama MİK değerlerinin tedavi almış mutant dirençli suşların ortalama MİK değerlerinden çok daha düşük olduğudur. Bu çalışmada 33 izolatın tamamına ikişer kez Mac Farland no 3'le duyarlılık çalışıldığı halde ancak 15 tanesinden MİK değeri elde edilebilmiştir. Petrilerin küfle kontaminasyonu önemli bir sorun olmuştur. Kültürün saflığını kontrol edip defalarca subkültür yapılmasına rağmen bazı suşlar kurtarılamamıştır. Yapılan çalışmalara bakıldığında kontaminasyon oranları bu kadar yüksek görülmemektedir. Sonuç almak için çok tekrar edilmesi gereken bir çalışmadır. Bazı duyarlı ya da dirençli kökenlerin seçilmesini sağlayacağı için en azından bu çalışma için çok da uygulanabilir bulunmamıştır. Bazı yazarların belirttiği gibi tek Etest şeridiyle ÇİD konusunda yorum yapmak bizim sonuçlarımıza göre pek mümkün görünmemektedir. Kaldı ki bir izolat için çok sayıda Etest kullanmak ve doğrulama için de standart agar yada sıvı sistemleri kullanmak ekonomik ve işlevsel görünmemektedir. Brezilya'dan bildirilen başka bir Etest çalışmasının verileri de yorumumuzu destekler şekilde inokulum oranının bir dereceye kadar MİK değerini etkilediği, özellikle STR için yalancı duyarlı ve yalancı dirençli sonuçların fazla olduğu, dolayısıyla yanlış sonuçları çözmek için fazladan kullanılan Etest şeridinin, besiyerinin, CO<sub>2</sub> poşetinin geliştirmekte olan ülkelerde maliyeti ve uygulanabilirliği azalttığını bildirmişlerdir (97).

Testlerin sonuçlanma süreleri dikkate alındığında Tukey analizine göre yalnızca BACTEC ve Etest süreleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Görüldüğü gibi diğer çalışmalarla benzer şekilde standart yöntem dışında diğer testlerin sadece süreleri açısından birbirine belirgin üstünlüğü yoktur.

## 6. SONUÇLAR

Bu çalışmada dirençli izolat oranı az bulunsa da çok ilaca dirençli izolat oranı fazladır. Bu izolatların primer dirençli olduğu düşünüldüğünde oranın yüksek olması tüberküloz kontrol önlemlerinin ivedilikle gözden geçirilmesini gerektirmektedir. Bu nedenle toplumun genel direnç profilini yansıtan daha fazla sayıda izolata dahil edildiği çok merkezli çalışmalara ihtiyaç vardır.

“Duyarlılık testlerinin güvenilir olması hızlı olmasından iyidir” anlayışını benimsemek gerekir. Hızlı sonuç vermek pahasına yeterince standardize edilmemiş, yinelenebilirliği olmayan, yorumlanması güç yöntemler özellikle rutin laboratuvar koşullarında uygulanmamalıdır. Agar orantılama yöntemi duyarlılık çalışılan her mikobakteriyoloji laboratuvarı personelinin bilmesi gereken bir yöntemdir. BACTEC standart sonuç verdiği için referans laboratuvara doğrulama için suş gönderemeyen laboratuvarların tercih sebebi olabilir. MGIT 960 sisteminde sonucun cihaz tarafından ve hızlı verilmesi avantajlı olsa da kontaminasyon riski fazladır. Etest ise özellikle mevcut çalışmadan anlaşıldığı kadarıyla az örnek çalışan, hızlı ama güvenilir sonuç vermeye çalışan laboratuvarların ilk tercihi olmamalıdır.

## 7. KAYNAKLAR

- 1- Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2005. Geneva . World Health Organization (WHO / HTM / TB /2005. 349).
- 2- Scarparo C, Ricardi P, Piccoli P. Evaluation of the fully automated BACTEC MGIT 960 System for testing *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamid, streptomycin, izoniasid, rifampin, etambutol and comparison the radiometric BACTEC 460 TB method. J Clin Microbiol 2004; 42: 1109-1114.
- 3- Hazbon HM, Labreda LA. Evaluation of Etest for susceptibility testing of multidrug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2000; 38: 4599- 4603.
- 4- MMWR: Initial therapy for tuberculosis in the era of multidrug resistance. Recommendations of the advisory council for the elimination of tuberculosis of the Centers for Diseases Control and Prevention. MMWR 1993; 42: 1-8.
- 5- Kocabaş A. Akciğer tüberkülozu In: Topçu Wilke A, Söyletir G, Doğanay M, (ed). İnfeksiyon Hastalıkları 1. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 1996; 396-443.
- 6- CLSI. *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia and Other Aerobic Actinomycetes: Approved Standard*. CLSI document M24-A [ISBN 1-56238-500-3]. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- 7- Wanger A, Mills K. Testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibility to ethambutol, isoniazid, rifampin, streptomycin by using Etest. J Clin Microbiol 1996; 34: 1672-1676.
- 8- Kayalı R, Çöplü N, Ceyhan İ, ve ark. Çok İlaça Dirençli (ÇİD) *Mycobacterium tuberculosis* Suşlarının Minör İlaçlara Direncinin Saptanması. 5. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu. İzmir. 2004: 226.
- 9- Karlıkaya C. Tüberküloz Ders Notları. Trakya Üniversitesi Yayınları 1998: 12-21. <http://www.trakya.edu.tr/ckarlikaya/TBdernot.htm>

- 10- Barış Y.İ. Çağlar boyu tüberküloz. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu, Samsun. 2003: 1-7.
- 11- Iseman MD. Tuberculosis therapy: past, present and future. Eur Respir J 2002; 20 (36): 87-94.
- 12- 18. Medical Research Council. Various combinations of isoniazid with streptomycin or with PAS in the treatment of pulmonary tuberculosis. BMJ 1955; 1: 435-445.
- 13- Medical Research Council. Treatment of pulmonary tuberculosis with streptomycin and paramino salicylic acid. BMJ 1950; 2: 1073-1085.
- 14- Doster B, Murray FJ, Newman R, et al. Ethambutol in the initial treatment of pulmonary tuberculosis. U.S. Public Health Service, Tuberculosis Therapy Trials. Am Rev Respir Dis 1973; 107: 177-190.
- 15- Davidson PT, LE HQ: Drug treatment of tuberculosis. 1992; 43(5): 651-673.
- 16- Hong Kong Chest Service, BMR Council. Controlled trial of 6-months and 8-months regimens in the treatment of pulmonary tuberculosis: The results up to 24 months. Tubercle 1979; 60: 201-210.
- 17- Aslan G, Delioğlu N, Emekdaş G, ve ark. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının izoniazid, rifampin, streptomisin ve etambutol duyarlılıklarının BACTEC yöntemi ile belirlenmesi. Ankem dergisi. 2005; 19 (1): 43-47.
- 18- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC. Mycobacteria. In Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Philadelphia, Lippincott; 1997: 893-946.
- 19- Glickman J. Microbial Pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: Dawn of a Discipline. *Cell* 1999; 104 (4): 477 – 485.
- 20- Pfyffer GE, Brown-Elliot BA, Wallace RJ. Mycobacterium In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington DC: 2003; 532-559, 1156-1164.
- 21- Köksal F, Yaman A. Farklı bir bakteri topluluğu mikobakterilerde hücre duvarı yapısı. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu, Samsun. 2003: 34-47.
- 22- www. answers.com/ main/ Record2/ Q=NR&url, [http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Mycobacterial\\_cell\\_wall\\_diagram.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Mycobacterial_cell_wall_diagram.png).

- 23- Inderlied CB. Mycobacteria In: Armstrong D, Cohen J (eds). Infectious Diseases, Mosby Company, London. 1999; 1 (8): 1-22.
- 24- Kıryan M. *Mycobacteriaceae*. Ustaçelebi Ş, Cengiz AT (Ed). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara: Güneş Kitabevi; 1999: 419-455.
- 25- Runyon, E.H. *Mycobacterium intracellulare*, relationship of ‘atypical’ acid-fast bacilli to human disease . American Review of Respiratory Disease 1967; 95: 861- 867.
- 26- Wayne LG, Kubica GP. Mycobacteria In: P.H.A.Sneath, (ed), Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. 1986; 1435-1457.
- 27- Haas DW. Mycobacterial Diseases In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (ed). Principles and Practice of Infectious Diseases, 5th ed, Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000; 2596-2608.
- 28- Schwander SK, Torres M, Seda E, et al. Enhanced responses to *M. tuberculosis* antigens by human alveolar lymphocytes during active pulmonary tuberculosis. J Infect Dis 1998; 178: 1434-45.
- 29- Maes R. Clinical usefulness of serological measurements obtained by antigen 60 in mycobacterial infections: Development of a new concept. Klin Wochenschr 1991; 69: 696-709.
- 30- Noss EH, Pai RK, Sellati TJ, et al. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19 kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol, 2001; 167: 910-918.
- 31- Andersen P, Munk ME, Pollock JM, et al. Specific immunebased diagnosis of tuberculosis. Lancet 2000; 356: 1099-104.
- 32- Özbal Y. Tüberküloz immünolojisi. Erciyes Tıp Dergisi, 2006; 28 (1): 25-34.
- 33- Babacan F, Över U. Mikobakterilerin Genel Özellikleri ve *Mycobacterium tuberculosis* complex, In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (ed), İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2002; 538-591.



- 34- Freedman AG, Martin JM, Riska PF, et al. Monoclonal antibodies to surface antigens of *Mycobacterium tuberculosis* and their use in a modified enzyme-linked immune sorbent spot assay for detection of Mycobacteria. J Clin Microbiol 1996; 34 (11): 2795- 2802.
- 35- Esen N. Tüberkülozda Mikobakteriyel Persistans Mekanizmaları. 4. Tüberküloz Sempozyumu Kitabı, Malatya, 2005; 58-64.
- 36- Nigou J, Gilleron M, Puzo Germain. Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis. Biochimie 2003; 85 (1,2): 153-166.
- 37- Smith CV, Huang CC, Miczak A, et al. Biochemical and structural studies of malate synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem 2003; 278: 1735-1743.
- 38- Ferreras JA, Stirret KA, Lu X, et al. Mycobacterial phenolic glycolipid virulence factor biosynthesis: mechanism and small-molecule inhibition of polyketide chain initiation. J Chembiol 2007; 11: 10.
- 39- Öztürk R. Tüberkülozda doğal direnç ve risk faktörleri. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu Kitabı, Samsun, 2003, 58-73.
- 40- Bloom BR, Murray CJL. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. Science 1992; 257: 1055-1064.
- 41- Ducati RG, Ruffino-Netto A, Basso LA, et al. The resumption of consumption- a review on tuberculosis. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101 (7): 1-9.
- 42- Fatkenheuer G, Taelman H, Lepage P, et al. The return of tuberculosis. Diagn Microbiol Infect Dis 1999; 34: 139-146.
- 43- Pablos-Mendez A, Raviglione MC, Laszlo A, et al. Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997. N Eng J Med 1998; 338: 1641-1649.
- 44- Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2007. Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2007.376).
- 45- Della-Latta P, Weitzman I. Mycobacteriology. In: Isenberg HD (ed). Essential Procedures for Clinical Microbiology. Washington DC: ASM Press.1998: 169-75,175-83.
- 46- Alp A. Non-moleküler tekniklerin tanı amaçlı kullanımları. IV. Tüberküloz sempozyumu kitabı, Malatya, 2005: 98-103.

- 47- Drancourt M, Carrieri P, Gevaudan MJ, et al. Blood agar and *Mycobacterium tuberculosis*: the end of a dogma. J Clin Microbiol 2003; 41: 1710-11.
- 48- Sürücüoğlu S. Tüberküloz basilinin klasik yöntemlerle identifikasyonu. 4. Tüberküloz sempozyumu kitabı, Malatya, 2005: 173-185.
- 49- Piersimoni C, Scarparo C, Piccol P, et al. Performance assessment of two commercial amplification assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples. J Clin Microbiol 2003; 41: 5355-5365.
- 50- Alp A. Moleküler tanı yöntemlerinde yenilikler. 6. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu kitabı, Kızılcahamam, 2006; 165-169.
- 51- Kocagöz T. *M. tuberculosis* için uygulanan fenotipik ve genotipik direnç testleri. 4. Ulusal mikobakteri sempozyumu kitabı, Abant, 2002; 115-117.
- 52- Özkara Ş. Dünyada ve Türkiye’de çok ilaca dirençli tüberküloz. 6. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu kitabı, Kızılcahamam, 2006; 197-204.
- 53- Oğuz Kayaalp. Tüberküloz ve diğer mikobakteri infeksiyonlarında kullanılan ilaçlar In: Tıbbi Farmakoloji. 2002: 306-312.
- 54- Douglas JG, McLeod MJ. Pharmacokinetic factors in the modern drug treatment of tuberculosis. Clin Pharmacokinet 1999; 37(2): 127-146.
- 55- Artvinli M. Tüberküloz ilaçları ve yan etkileri. In: Kocabaş A (ed). Tüberküloz kliniği ve kontrolü. 1. Basım 1991; 265-271.
- 56- Özkütük N. Antibiyotik duyarlılık test yöntemleri. IV. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kurs Kitabı, Malatya, 2005; 186-211.
- 57- Sox H.C. Probability Theory in the Use of Diagnostic Tests. Annals of Internal Medicine. 1986; 104: 60-66.
- 58- Özdamar K. Paket programlar ile istatistiksel olarak veri analizi-1, 5.baskı, Ankara: Kaan kitabevi, 2004; 213.
- 59- Kim SJ. Drug susceptibility testing in tuberculosis: methods and reliability of results. Eur Respir J 2005; 25: 564-569.

- 60- Baylan O, Kısa Ö, Albay A, ve ark. Mikobakteriyoloji laboratuvarımızda 2002 yılında tüberküloz olgularından izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTC) suşları ve antitüberküloz ilaç duyarlılık sonuçları. *Gülhane Tıp Dergisi*, 2003; 45 (3): 256-262.
- 61- Yolsal N, Malat G, Dişçi R, ve ark. Türkiye’de tüberküloz ilaçlarına direnç sorununun 1984-1989 ve 1990-1995 yılları için karşılaştırılması: Meta-analiz, *Klimik Dergisi* 1998; 11(1): 6-9.
- 62- Saygan MB, Ocak F, Ceyhan İ, ve ark. Bölge tüberküloz laboratuvarlarından gönderilen *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının major antitüberküloz ilaçlara duyarlılıkları, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı, Sıhhiye, Ankara Mikrobiyoloji Bülteni 2007; 41(3): 403-9.
- 63- Yüce A, Yücesoy M, Ercan H, ve ark. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının antitüberküloz ilaçlara direnç paternleri ve izoniazid direnci ile katalaz aktivitesi arasındaki ilişki, *Klimik Derg* 1997; 10(1): 33-5.
- 64- Otkun M, Akata F, Karabay O, ve ark. Trakya Üniversitesi Hastanesine 1996 yılı içinde başvuran tüberkülozlu olgularda antitüberküloz ilaçlara direnç sorunu, *İnfeksiyon Derg* 1997; 11(3): 191-6.
- 65- Aydın Ö, Özakin C, Gedikoğlu. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks suşunun Bactec ile saptanan antitüberküloz ilaç duyarlılıkları, II. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu, Ankara (1998).
- 66- Balcı İ, Bayram A, Filiz A. *Mycobacterium tuberculosis*’te birinci seçenek ilaçlara direnç, *İnfeksiyon Derg* 1999; 13(4): 521-5.
- 67- Öztürkeri H, Emektaş G, Kocabey Ö, ve ark. İzoniazid, rifampin, streptomisin ve etambutolün tüberküloz basillerine in-vitro etkinlikleri. BACTEC test yöntemi ile alınan sonuçlar, *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 1999; 29 (1-2): 58-60.
- 68- Saniç A, Günaydın M, Çoban AY, ve ark. A comparison of the E-test and proportion methods for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*, *J Chemother* 2000; 12(6): 491-4.
- 69- Sürücüoğlu S, Özkütük N, Kurutepe S, ve ark. Manisa bölgesinde izole edilen tüberküloz basillerinin primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılıklarının incelenmesi, 4. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu, Abant (2002).

- 70- Kısa Ö, Albay A, Baylan O, ve ark. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarında antitüberküloz ilaç direnç oranlarının BACTEC 460 TB kültür sistemi ile değerlendirilmesi, Flora 2002; 7(3): 171-6.
- 71- Gani O, Zer Y, Balcı İ, ve ark. Mikobakteriyoloji laboratuvarında incelenen örneklerin retrospektif olarak değerlendirilmesi, Türk Mikrobiyol Cem Derg 2002; 32 (34): 225-9.
- 72- Kocazeybek B. Tüberküloz tanısında BBL-“Mycobacteria-Growth Indicator Tube (MGIT)” Yönteminin “Löwenstein-Jensen” besiyeri ile karşılaştırılması ve izole edilen suşların dört majör ilaca karşı dirençlerinin değerlendirilmesi, Flora 2002; 7 (2): 112-9.
- 73- Tansel Ö, Yüksel P, Kuloğlu F, ve ark. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının antitüberküloz ilaçlara direnci: Trakya Üniversitesi Hastanesi'nin iki yıllık sonuçları, İnfeksiyon Derg 2003; 17 (1): 23-6.
- 74- Karadağ A, Tokaç M, Güvenli A, ve ark. Klinik örneklerden izole edilen tüberküloz basili kompleksinin majör antitüberküloz ilaçlara direnç oranları, ANKEM Derg 2004; 18 (4): 189-192.
- 75- Yanık K, Cirit OS, Çoban AY, ve ark. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının majör ilaçlara duyarlılığının araştırılması, 6. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu kitabı, Kızılcahamam, 2006; 246.
- 76- Abaslı HE, Kısa Ö, Şenses Z, ve ark. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks izolatlarının antitüberküloz ilaçlara duyarlılık oranları, 6. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu kitabı, Kızılcahamam, 2006; 250.
- 77- Alp A, Ercis S, Haşçelik G. Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında son iki yılda izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarında saptanan direnç oranlarının değerlendirilmesi, 6. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu kitabı, Kızılcahamam, 2006, 248.
- 78- Tamdır B, Arabacı Ç, Aksu B, ve ark. M.Ü. Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı Mikobakteriyoloji biriminin iki yıllık performansının değerlendirilmesi, 6. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu kitabı, Kızılcahamam, 2006, 247.

- 79- Öksün E, Biçer AT, Kibar F, ve ark. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının antibiyotik direnç oranları, 6. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu kitabı, Kızılcasamam, 2006, 244.
- 80- World Health Organization: Anti-tuberculosis drug resistance in the world, Third Global Report. The WHO/IUATLD Global Project on anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance 1999-2002, WHO (2005).
- 81- Freixo MIM, Caldas PCS, Said A, et al. Antimicrobial susceptibility determined by the Etest, Löwenstein-Jensen Proportion, and DNA sequencing methods among *M. tuberculosis* isolates- discrepancies, preliminary results. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2004; 99 (1): 107-110.
- 82- Viedma DG. Rapid detection of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review discussing molecular approaches. Clin Microbiol Infect 2003; 9: 349-59.
- 83- Musser JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights . Clinical Microbiology Reviews, 1995; 8: 496.
- 84- Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. CDC, Atlanta, 1985; 71-120.
- 85- Çoban AY. *Mycobacterium tuberculosis* ilaç duyarlılığının Löwenstein-Jensen ve Middlebrook 7H10 besiyerinde proporsiyon metod ile karşılaştırmalı olarak araştırılması. Yüksek lisans tezi, Samsun, 1997.
- 86- Öztürkeri H. *Mycobacterium tuberculosis*'in antitüberküloz ilaçlara duyarlılığını saptamada Löwenstein- Jensen besiyerinin etkinliğinin, Middlebrook 7H10 besiyeri ile karşılaştırmalı olarak modifiye proporsiyon yöntemiyle araştırılması. Mikrobiyoloji Bülteni, 1988; 32: 177-184.
- 87- Tortoli E, Benedetti M, Fontanelli A, et al. Evaluation of automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to four major antituberculous drugs: Comparison with the radiometric BACTEC 460TB method and the agar plate method of proportion. J Clin Microbiol, 2002; 40 (2): 607-610.

- 88- Aslan G, Yıldız Ç, Direkel Ş, ve ark. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılığının belirlenmesinde BACTEC 460TB ve agar proporsiyon yöntemlerinin karşılaştırılması. *İnfeksiyon dergisi*, 2007; 21(2): 75-80.
- 89- Alp A, Günalp A. *Mycobacterium tuberculosis* antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılığının saptanmasında kullanılan üç yöntemin karşılaştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 2000; 34: 267-277
- 90- Korkmaz G, Balcı İ, Bayram A, ve ark. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks kökenlerinin birinci seçenek antitüberküloz ilaçlara duyarlılığının saptanmasında BACTEC ve agar proporsiyon yöntemlerinin karşılaştırılması. *İnfeksiyon Dergisi*, 2006; 20 (1) :7-14.
- 91- Rüsç-Gerdes S, Domehl C, et al. Multicenter evaluation of the Mycobacteria Growth Indicator Tube for testing susceptibility *Mycobacterium tuberculosis* to first line drugs. *J Clin Microbiol*, 1999; 37(1) : 45-48.
- 92- Johansen IS, Thomsen VO, Marjamaki M, et al. Rapid, automated, nonradiometric susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex to four first-line antituberculous drugs used in standard short-course therapy. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2004; 50: 103-107.
- 93- Palicova F, Jahn EIM, Pfyffer GE. Susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to anti-tuberculosis drugs: BACTEC MGIT vs BACTEC 460TB System. 100th General Meeting Los Angeles, California, May 21-25, 2000.
- 94- Adjers Koskela K, Katila ML. Susceptibility testing with the manual MGIT and the MGIT 960 system provides rapid and reliable verification of multidrug resistant tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 2003; 41(3): 135-1239.
- 95- Wanger A, Mills K. Etest for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-intracellulare*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1994; 19: 179-181.
- 96- Joloba LM, Bajaksouzian S, Jacobs M. Evaluation of Etest for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 2000; 38 (10) : 3834-3836.

- 97- Freixo MIM, Caldas PCS, Martins F, et al. Evaluation of Etest strips for rapid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol, 2002; 40 (6): 2282-2284.

**T.C.**  
**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA**

Dr. Yasemin AY ALTINTOP'a ait "*Mycobacterium Tuberculosis Kompleksi İzolatlarında Çeşitli Duyarlılık Yöntemlerinin Karşılaştırılması*" adlı çalışma, jürimiz tarafından Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih:

İmza

Başkan .....İmza

Üye.....İmza

Üye.....İmza

Üye.....İmza

Üye.....İmza