

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

99224

**TÜBERKÜLOZUN MİKROBİYOLOJİK TANISINDA
AMPLIFIED MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
DIRECT TEST'İN UYGULANMASI VE KONVANSİYONEL
YÖNTEMLERLE KARŞILAŞTIRILMASI**

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Müge OĞUZKAYA ARTAN

Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
DOKTORA TEZİ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Hüseyin KILIÇ

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 98-12-1 nolu proje ile desteklenmiştir.

Kayseri
2000

Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

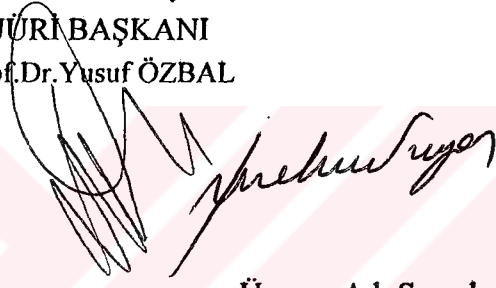
Doktora Programı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki
jüri tarafından

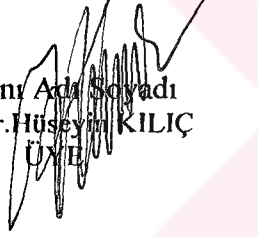
DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınav Tarihi : **24.11.2000**

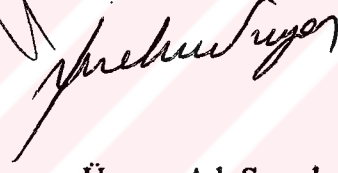
Ünvanı Adı Soyadı
JÜRİ BAŞKANI
Prof.Dr.Yusuf ÖZBAL



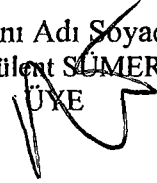
Ünvanı Adı Soyadı
Prof.Dr.Hüseyin KILIÇ
ÜYE



Ünvanı Adı Soyadı
Doç.Dr.Mehmet KIYAN
ÜYE



Ünvanı Adı Soyadı
Doç.Dr.Bülent SUMERKAN
ÜYE



Ünvanı Adı Soyadı
Yrd.Doç.Dr.Selma GÖKAHMETOĞLU
ÜYE



Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

ÖZET

**Tüberkülozun Mikrobiyolojik Tanısında Amplified Mycobacterium
Tuberculosis Direct Test'in Uygulanması ve Konvansiyonel Yöntemlerle
Karşılaştırılması**

Tüberkülozun laboratuvar tanısında uygulanan konvansiyonel yöntemler (aside dirençli boyama, kültür yöntemleri: Löwenstein- Jensen besiyeri ve Bactec TB sistem) ve yeni moleküler yöntemlerden biri olan "Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test" (AMTDT) ile 87 klinik örnek incelendi. Bunlardan 56 klinik örnek pulmoner, 31'i ekstrapulmonerdi. Toplamda 27 (% 31.1) örnek Ziehl-Neelsen boyama yöntemi ile, 36 (% 41.3) örnek kültür yöntemleri ile ve 50 (% 57.4) örnek ise AMTDT ile pozitif bulundu. İlgili klinisyenlerce tüberküloz tanısı alınması gold standart olarak alındı. Pulmoner örneklerde Ziehl-Neelsen yöntemi duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla: % 62.8, % 90.4, % 91,6 ve % 59.3; kültür yöntemleri için ise sırasıyla: % 82.8, % 100, % 100 ve % 77.7 ve AMTDT için sırasıyla: % 97.1, % 90.4, % 94.4 ve % 95.0 olarak belirlendi. Ekstrapulmoner örneklerde ise Ziehl-Neelsen yöntemi için; duyarlılık özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerler sırasıyla; % 14.2, % 94.1, % 66.6 ve % 57.1; kültür yöntemleri için sırasıyla: % 50, % 100, % 100 ve % 70.8 ve AMTDT için ise sırasıyla: % 92.8, % 94.1, % 92.8 ve % 94.1 olarak belirlendi.

İstatistiksel olarak yöntemler arasında fark bulundu (Cochran Q= 24, $p < 0.05$). Kültür yöntemleri ile AMTDT ve AMTDT ile Ziehl-Neelsen boyama yöntemi sonuçları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). Kültür yöntemleri ile Ziehl-Neelsen boyama yöntemi sonuçları arasındaki fark ise istatistiksel olarak anlamsızdı ($p = 0.267$).

Bulgular pulmoner ve ekstrapulmoner örneklerde *M.tuberculosis* kompleksin hızlı tanısında AMTDT'nin duyarlı ve özgül bir test olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: AMTDT, *M. tuberculosis*, kültür.

SUMMARY

Evaluation of Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test in Microbiological Diagnosis of Tuberculosis and Comparison with Conventional Methods

A total of 87 clinical specimens examined with conventional methods (acid-fast staining with Ziehl-Neelsen and culture systems with radiometric Bactec TB system and traditional culture method Löwenstein-Jensen) and a new molecular technique called Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct test (AMTDT). Among all, 56 were pulmonary and 31 were extrapulmonary clinical specimens. A total of 27 (31.1 %), specimens from 87 patients were positive by acid-fast staining, 36 (41.3 %) specimens were positive by culture and 50 (57.4 %) specimens were positive by AMTDT. Clinical diagnosis was considered to be "gold standard". Over all sensitivities, specificities and positive and negative predictive values for pulmonary specimens 62.8, 90.4, 91.6 and 59.3 % for Ziehl-Neelsen stain, respectively; 82.8, 100, 100, 77.7 % for culture, respectively and 97.1, 90.4, 94.4, 95.0 % for AMTDT, respectively. With extrapulmonary specimens, sensitivities, specificities and positive and negative predictive values were 14.2, 94.1, 66.6 and 57.1 % for Ziehl-Neelsen stain respectively; 50, 100, 100 and 70.8 % for culture respectively and 92.8, 94.1, 92.8 and 94.1 % for AMTDT respectively.

Statistically, there were significant difference among methods (Cochran Q= 24, $p < 0.05$). There were significant difference between culture with AMTDT and AMTDT with Ziehl-Neelsen staining method ($p < 0.05$). But there was no significant difference between culture and Ziehl-Neelsen staining method ($p = 0.267$).

The results indicate that AMTDT is an effective, highly sensitive and specific technique for the rapid detection of *M. tuberculosis* complex in all types of clinical specimens.

Key Words: AMTDT, *M. tuberculosis*, culture.

İÇİNDEKİLER**SAYFA**

İÇ KAPAK	I
KABUL ONAY SAYFASI	II
ÖZET	III
SUMMARY	IV
İÇİNDEKİLER	V
KISALTMALAR	VI
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	VII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. TARİHÇE	4
2.2. MİKROBakterilerin Genel Özellikleri	5
2.3. Patogenez ve İmmünite	8
2.3.1. Mikobakteriyel Antijenler	11
2.4. İNFEKSİYONLARI	14
2.4.1. Primer İnfeksiyon.....	14
2.4.2. Sekonder Tüberküloz	15
2.5. TANI YÖNTEMLERİ.....	19
2.5.1. Aside Dirençli Boyama Yöntemleri.....	22
2.5.2. İzolasyon ve İdentifikasyon Yöntemleri.....	23
2.5.2.1. Homojenizasyon ve Dekontaminasyon Yöntemleri	24
2.5.2.2. Konvansiyonel Kültür Yöntemleri.....	25
2.5.2.3. Radyometrik Kültür Yöntemleri	26
2.5.2.4. Radyometrik Olmayan Kültür Yöntemleri.....	27
2.5.2.5. Biyokimyasal İdentifikasyon.....	29
2.5.3. Nükleik Asit Çoğaltma Ve Hibridizasyon ile Direkt Tanı Yöntemleri	32
2.5.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	33
2.5.3.2. Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test.....	34
2.6. EPİDEMİYOLOJİ VE KORUNMA.....	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM	38
3.1. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI.....	38
3.2. ZIEHL-NEELSEN BOYAMA YÖNTEMİ.....	39
3.3. KÜLTÜR YÖNTEMLERİ	40
3.3.1. Löwenstein-Jensen Besiyerine Ekim.....	40
3.3.2. Bactec 12B Şişelerine Ekim	41
3.4. AMPLIFIED MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DIRECT TEST	41
3.5. İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER.....	43
4. BULGULAR	45
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	52
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	69

KISALTMALAR

M. tuberculosis	: Mycobacterium tuberculosis
OT	: Old Tuberkulin
PPD	: Prufied Protein Derivative
BCG	: Bacillus Calmette-Guerin
LJ	: Löwenstein Jensen
PAS	: Para Amino Salisilik Asit
INH	: Isoniazid
µm	: Mikrometre
nm	: Nanometre
ARB	: Aside Dirençli Basil
MHC	: Major Histocompatibility complex
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
IFN	: Interferon
Gth	: Gecikmiş Tipte Hipersensitivite
AIDS	: Acquired Immun Deficiency Sendrom
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
MAC	: Mycobacterium avium complex
AMS	: Açlık Mide Suyu
NAP	: P-nitro α Asetilamino β Hidroksi Propiofenon
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
AMTDT	: Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test
LCR	: Ligaz Zincir Reaksiyonu
SDA	: Zincir Ayırma Çoğaltma Reaksiyonu
NCCLS	: National Comitee for Clinical Laboratory Standarts
RFLP	: Restriction Fragment Leght Polymorphism
PCR	: Polymerase Chain Reaction
HIV	: Human Immun Deficiency Virus
GI	: Growth Index
RLU	: Relatif Light Unit

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ**Sayfa****Tablo Listesi**

Tablo 1	: Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin Sınıflandırılması ve En Sık Neden Oldukları Hastalıklar.....	9
Tablo 2	: Direkt Boyalı Preparatların Değerlendirilmesi ve Rapor Edilmesi.....	23
Tablo 3	: EZN Boyama Yöntemi Bulguları	46
Tablo 4	: Kültür Yöntemleri Bulguları	46
Tablo 5	: AMTDT Yöntemi Bulguları.....	47
Tablo 6	: Mikroskopi ve Kültür Bulgularının Karşılaştırılması	48
Tablo 7	: Kültür ve AMTDT Bulgularının Karşılaştırılması	48
Tablo 8	: Mikroskopi ve AMTDT Bulgularının Karşılaştırılması	48
Tablo 9	: Pulmoner Örneklerde Mikroskopi, Kültür ve AMTDT'nin Tüberküloz Klinik Tanısı İle Korelasyonu.....	49
Tablo 10	: Ekstrapulmoner Örneklerin Mikroskopi, Kültür ve AMTDT Sonuçlarının Tüberküloz Klinik Tanısı İle Korelasyonu.....	50
Tablo 11	: Klinik Örneklerde Mikroskopi, Kültür ve AMTDT'nin, Tüberküloz Klinik Tanısı ile Korelasyonu.....	51

Şekil Listesi

Şekil 1	: Mikobakterilerin Hücre Duvar Yapısı.....	7
Şekil 2	: Primer İnfeksiyonun Sonuçları	15

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Binlerce yıldır bir halk sağlığı sorunu olma özelliği taşıyan tüberküloz; sağlık alanında olan dev gelişmelere rağmen günümüzde de önemini korumaya devam etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre; dünyada 1.7 milyar insan *Mycobacterium tuberculosis* ile infektidir. Basili taşıyan insanların 20 milyonu aktif tüberkülozlidir, bunlardan yılda üç milyondan fazlası ölmektedir. Her yıl 8 milyon yeni tüberküloz olgusu ortaya çıkmaktadır ve bunların üç milyonu bulaştırıcıdır (1, 2, 3, 4, 5) .

Uluslararası standartlara göre mikobakteriler ile çalışmak için ayrı bir mikobakteri laboratuvarının olması ve mümkün ise yapılan işlemlere ait farklı ortamların oluşturulması önerilmektedir. Konvansiyonel yöntemler gözden geçirilerek; bakterinin, gerek bakteriyolojik gerekse moleküler yöntemlerle tanımına yönelik çeşitli standartlar geliştirme çabaları tüm dünyada devam etmektedir (6, 7, 8, 9).

Bu alışmada, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı bünyesinde bulunan Mikobakteriyoloji Laboratuvarına gönderilen pulmoner ve ekstrapulmoner tüberküloz şüpheli hasta örneklerinde konvansiyonel yöntemler (aside dirençli boyama ile Löwenstein Jensen ve BACTEC 12B şişelerine ekim) ve hızlı sonuç veren moleküler yöntemlerden biri olan özellikle ekstrapulmoner tüberküloz uygulamalarında standardizasyon çalışmaları devam eden "Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test" (AMTDT)'in tanı değerinin karşılaştırılması amaçlandı.



2. GENEL BİLGİLER

Mycobacteriaceae ailesinin tek cinsi olan *Mycobacterium*'ların temel özelliği, yavaş üremeleri, aside dirençli olmaları ve hücre duvarlarında bol miktarda lipid içermeleridir. *Mycobacterium* cinsi zorunlu parazit, saprofit ve ara formlardaki değişik türleri içerir (10, 11). Cinsin *Mycobacterium tuberculosis* dışında 80'den fazla türü bulunmaktadır (2). Klinik açıdan bakıldığında hastalık yapma potansiyeli ve halk sağlığı ile yakın ilişkisi nedeniyle *M. tuberculosis* *Mycobacterium* cinsinin en önemli üyesidir (12).

Tüberküloz, "*Mycobacterium tuberculosis* kompleks" diye tanımlanan bir grup mikobakteri (*M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.africanum*) tarafından oluşturulan, en sık yerleştiği organ akciğer (% 85) olan, tüm organları tutabilen kronik nekrotizan bir bakteriyel enfeksiyondur. Hastalığın oluşumundan % 97-99 oranında *M. tuberculosis* sorumludur (5, 12).

2.1. TARİHÇE

Tüberküloz insanlık tarihinin en eski hastalıklarından biridir. Bakterinin paleolitik çağda, insanları infekte etmeden önce, hayvanlar arasında yaygın olarak bulunduğu tahmin edilmektedir. İnsanoğlunun M.Ö. 8000 yıllarında ilk yerleşik topluluklar oluşturması ve sığırları evcilleştirmesiyle birlikte mikobakterilerle tanıştıkları düşünülmektedir. Etkenin infekte hayvan etlerinin yenmesi veya kontamine sütlerin içilmesiyle insanlara geçtiği, toplu yaşamaya geçişle birlikte önce kabile içi daha sonra kabileler arası yayılım gösterdiği sanılmaktadır. Taş devrinden kalma iskeletler ve Mısır mumyaları üzerinde yapılan incelemelerde tüberkülozu düşündüren kemik lezyonlarına (Pott hastalığı) ve aside dirençli basillere rastlanmıştır (1, 13). Hipokrat (M.Ö. 460-377) hastalık için erime, tükenme anlamına gelen "Phtisis" deyimini kullanırken, M.S. 2. yüzyılda yaşayan Galen, kendisinden sonra 1000 yıl değişmeyen tedavi önerileri ortaya koymuştur. Bu öneriler: istirahat, öksürüğün kesilmesi, göğüs yakıları, venden kan alımı, sülük uygulaması, kusturucular, müshiller ve kabartıcı maddelerle ciltte yaralar oluşturmak şeklinde özetlenebilir (12).

Tüberküloz ile ilgili ilk klinik ve patolojik gözlemler; hastalıktan ölen kişilerin akciğerlerinde kaviter lezyonlar olduğunu bildiren Salius (1478) ile başlamaktadır. Sonraki yıllarda Sylvius (1614-1672) tarafından tüberküller tanımlanmış, Marton (1689) hastalık için bitme, tükenme anlamına gelen "verem" tabirini kullanmıştır (12, 13).

Hastalığın bulaşıcı karakterde olduğu hakkındaki kuşkular ilk defa 16. yüzyıl başlarında Fracastorius tarafından ileri sürülmüş, 1865'te Fransız hekimi Villemin tüberkülozlu hastaların kavitelerinden alınan materyali inoküle ettiği tavşanlarda tüberküloz geliştiğini göstermiştir. Fakat tüberküloz tarihinin en önemli dönüm noktası, Robert Koch'un 24 Mart 1882'de Berlin Fizyoloji Derneği'nde, tüberkülozun *M. tuberculosis* tarafından oluşturulan bir infeksiyon hastalığı olduğunu kanıtlamasıyla gerçekleşmiştir (14, 15). Daha sonraki çalışmalar, tanı için basilin kültür ve izolasyonu, etkili tedavi ve aşı hazırlanması yönünde ilerlemiştir. Paul Ehrlich kısa süre içinde tüberküloz basilinin aside

dirençli olduğunu keşfetmiş, Ziehl ve Neelsen isimleriyle anılan metotta küçük değişiklikler yaparak, günümüzde de önemini koruyan Erhlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyama tekniğini bulmuştur. Dorset 1902 yılında ilk defa yumurta-bazlı besiyerini basilin kültüründe kullanırken, 1930'lu yıllarda Löwenstein bu besiyerinde bazı geliştirmeler yapmıştır. Löwenstein-Jensen (LJ) adıyla anılan besiyeri önemini günümüzde de korumaktadır (15).

Koch 1890 yılında "old tüberkulin" ile hastalığın özel immünite ve alerjisini ortaya koymuştur. F. Seibert 1930'lu yıllardan sonra OT'nin saflaştırılmasıyla elde edilen tüberkülinin saflaştırılmış protein türevi (PPD, purified protein derivative) kullanılarak tüberküloz enfeksiyonunun varlığı belirlenmeye başlanmıştır. Fransa da 1921 yılında Calmette ve Guerin ilk tüberküloz aşısını 13 yıllık bir periyotta sığır tüberküloz basilini 230 kez pasaj ederek Bacillus Calmette-Guerin (BCG)'i geliştirmişlerdir. Bu aşı 2. Dünya Savaşından sonra tüm dünyada yaygın bir şekilde kullanıma girmiştir (12, 15). Tüberküloz tarihinin önemli dönüm noktalarından biri de 1940'ların ortasında *M. tuberculosis*'e karşı etkili ilk iki ilacın bulunmasıdır. Wahsman'ın (ABD) 1944'te streptomisini buluşu, 1944 yılının tıp tarihine "mucize yılı" (annus mirabilis) olarak geçmesine neden olmuştur (14). Lehmann'ın (İsveç) 1946 yılında paraamino salisilik asiti (PAS) buluşu tüberküloz tedavisinde yeni bir dönemi başlatmıştır. Tek başlarına kullanılan tüberküloz ilaçlarının bir ay gibi kısa bir sürede direnç gelişimine yol açtıklarının anlaşılması, başlangıçta hayal kırıklığına yol açmış ve bu durum yeni ilaç bulma çalışmalarına ivme kazandırmıştır. Robitzek ve Selikof (ABD) tarafından 1952'de izoniazitin (INH) bulunması ile 1950'li yılların ortalarından itibaren kombine tedavi ile tüberküloz, 18-24 ayda tam olarak tedavi edilebilir bir hastalık haline gelmiştir (15).

2.2. MİKOBAKTERİLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ

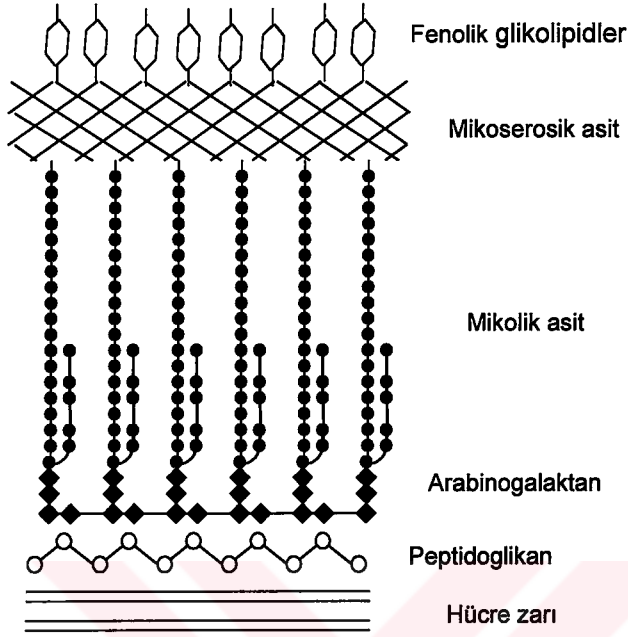
Mikobakteriler ; aerop, sporsuz, hareketsiz 0.2-0.4 µm en ve 2-10 µm boyunda, düz veya hafif kıvrık basillerdir. Bazen filamentöz, misel benzeri yapılarda görülmekle birlikte genelde basil yada kokoid formda görülürler (2, 15, 16).

Mycobacteriaceae familyasının en önemli özelliği, zor boyanan, boyaların uzun süre tutulması veya ısı ile uygulanması halinde bir defa boyandıktan sonra boyalarını asit ve alkol karşısında kolay bırakmayan aside dirençli basiller (ARB) olmalarıdır (2, 15, 17). Aside dirençliliğin mikobakterilere özgü kalın hücre duvarında bulunan lipidlerin oluşturduğu ağ tabakası ile ilintili olduğu düşünölmektedir (12).

Bazı araştırmacılar, *M. tuberculosis*' in sitoplazmik zar ve hücre duvarını birlikte hücre zarfı olarak adlandırmakta ve fonksiyonlarını ortak olarak değerlendirmektedir. Doğal olarak bu yapı, hücre içi basınca karşı bakteriyi korumak ve mekanik destek sağlamak, hücre içine madde giriş çıkışını ayarlamak gibi temel işlemlere sahiptir. Ancak yapısal olarak önemli farklılıklarının olması mikobakterileri diğer bakterilerden ayrıcalıklı kılmaktadır (7).

Mikobakterilerin sitoplazmik zarının dışında Gram olumlu bakterilerdeki gibi bir peptidoglikan katmanı bulunmaktadır. Mikobakterilerde peptidoglikan tabakada N-asetil müramik asit yerine N-glikolil mikolik asit yer almaktadır (Şekil.1). Bunun dışında ise üst üste üç katman gibi görünen ayrı bir yapı görölmektedir. Glikolil yapısı nedeniyle bakteri lizozime dirençlidir. Bu yapının temelinde mikolik asit ile çevrili arabinogalaktan polisakkarit yapısı bulunur. Bakterinin boyanma özellikleri ile ilgili maddelerden birisi **kord faktör** olup bir trehaloz dimikolattır. Hücre duvarında ayrıca polianyonik glikolipitler, fosfolipidler, sülfolipidler ve peptidoglikolipidler bulunur (7, 13).

Şekil 1. Mikobakterilerin hücre duvar yapısı.



Basil zorunlu aeroptur, bununla beraber çok sınırlı oksijen desteği altında çoğalmadan canlılığını sürdürebilir. Hareketsizdir, spor oluşturmaz. Üremesi yavaştır, 15-20 saatte kendini eşler ve standart kültür ortamında üremesi en az 3 haftada gerçekleşir. Olumsuz koşullara oldukça dayanıklıdır ve uzun süre canlı kalabilir. Optimum üreme sıcaklığı 37 °C' dir, bazı suşlar 30-35 °C'da ürerler. Optimum pH 6.4-7.0'dir. Ortama % 5-10 CO₂ eklenmesi ve besiyerine % 0.5 gliserol eklemesiyle üreme desteklenebilir (11). Besin gereksinimi çok azdır. Nitrojen kaynağı olarak amonyağı, karbon kaynağı olarak glikozu içeren basit bir besiyerinde üreyebilir (12). *M. tuberculosis* pigment oluşturmaz ve düzensiz, R tipi (Rough) koloni yapar (13).

Mycobacterium, *Mycobacteriaceae* ailesinin tek cinsidir. *Mycobacterium* türleri % 62-70 mol G+C oranı ile diğer mikolik asit üreten bakterilerle, *Nocardia* (G+C: % 60-69), *Rhodococcus* (G+C: % 59-69), *Corynebacterium* (G+C: % 51-59) ile benzerlik gösterir. Bu ortak özellikleri dolayısıyla *Mycobacterium*, *Nocardia* ve *Corynebacterium*; CNM grubu olarak anılsalarda, mikobakteriler, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* kitabının 1986 baskısında ayrı bir bölüm içinde ele alınmıştır (11, 13).

Tüberküloz dışı mikobakteri türleri yavaş ve hızlı üreyenler olarak ikiye ayrılmıştır. Yavaş üreyenler uygun kültür ortamında, ideal şartlar altında katı besiyerinde görülebilir koloni oluşturmak için en az 7güne ihtiyaç duyarlar. Hızlı üreyenler ise 7 günden az zamanda görülebilir koloniler oluştururlar (2). Yavaş üreyen grup pigmentasyon özelliklerine göre; fotokromojenler (Runyon grup I), skotokromojenler (Runyon grup II), fotokromojen olmayanlar (Runyon grup III) olarak üçe ayrılmaktadır (Tablo1). Fotokromojen mikobakterilerin kolonileri ışık karşısında sarı yada portakal sarısı renginde pigment oluştururlar. Skotokromojenler karanlıkta pigment yaparlar. Fotokromojen olmayanlar ise pigment yapmazlar. Bu sınıflama iyi bir taksonomik standardizasyon için olmasa da klinik yaklaşım ve identifikasyon kolaylığı nedeniyle yaygın kullanım alanı bulmuştur (18).

2. 3. PATOGENEZ VE İMMÜNİTE

Tüberküloz hava yolu ile geçen infeksiyonların klasik bir örneğidir. *M. tuberculosis*'in kişiden kişiye geçişi solunum yoluyla olur. Tüberküloz infeksiyonu hemen hemen tüm olgularda, içinde canlı tüberküloz basili içeren ve havada asılı halde bulunan yeterince küçük damlacıkların (1-5 nm) solunum yoluyla alınması ile gerçekleşir. Diğer geçiş yolları (gastrointestinal sistem, deri, konjenital ve benzeri) da bildirilmesine rağmen nadirdir (5, 19, 20). Kaynak; genellikle balgam yaymaları pozitif öksüren, hapşıran, konuşan akciğer tüberkülozlu insanlardır. Bir öksürük yaklaşık 3000 infeksiyöz damlacık içerir. Bulaş infeksiyöz damlacığın havada asılı kalabileceği kapalı mekanlarda olur (1, 5). Yetişkinler için, havadaki infeksiyöz damlacığın konsantrasyonu ve bu havayı soluduğu sürenin uzunluğu iki önemli risk faktörüdür (5).

Tablo 1. Tüberküloz dışı mikobakterilerin sınıflandırılması ve en sık neden oldukları hastalıklar (18).

Tür	Yaptıkları Hastalık
Grup I Fotokromojenler	
<i>M.kansasii</i>	Akciğer infeksiyonu, lenfadenit
<i>M.asiaticum</i>	Akciğer infeksiyonu
<i>M.marinum</i>	Deri ve yumuşak doku infeksiyonu
<i>M.intermedium</i>	Akciğer infeksiyonu
Grup II Skotokromojenler	
<i>M.szulgai</i>	Akciğer infeksiyonu, lenfadenit
<i>M.scrofulaceum</i>	Lenfadenit, akciğer infeksiyonu
<i>M.interjectum</i>	Lenfadenit
<i>M.gordonae</i> , <i>M.cookii</i> , <i>M.hiberniae</i>	Patojen değil
Grup III Fotokromojen olmayanlar	
<i>M.avium</i> complex (<i>M.avium</i> ve <i>M.intracellulare</i>).....	Akciğer infeksiyonu, dissemine infeksiyon, Lenfadenit
<i>M.celatum</i>	Akciğer infeksiyonu, dissemine infeksiyon
<i>M.genavense</i>	İmmüno kompromize hastalarda deri infeksiyonu, septik artrit
<i>M.haemophilum</i>	İmmüno kompromize hastalarda dissemine infeksiyon
<i>M.malmoense</i>	Akciğer infeksiyonu
<i>M.shimoidei</i>	Akciğer infeksiyonu
<i>M.simiae</i>	Akciğer infeksiyonu
<i>M.ulcerans</i>	Kronik deri ülserleri
<i>M.xenopi</i>	Akciğer infeksiyonu
<i>M. gastrii</i> , <i>M. terrae</i> complex (<i>M.nonchromogenicum</i> , <i>M.terrae</i> , <i>M.triviale</i>)	Patojen değil.
Grup IV Hızlı Üreyenler	
<i>M.fortuitum</i> complex (<i>M.fortuitum</i> subsp <i>fortuitum</i> , <i>M.fortuitum</i> subs <i>acctamidolyticum</i> , <i>M.fortuitum</i> biovar 3, <i>M.peregrinum</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M.chelonae</i>).....	Patojen değil
<i>M.flavescens</i> , <i>M.neonarum</i> , <i>M.smegmatis</i> , <i>M.thermoresistibile</i> ..	Patojen değil.

Tüberküloz, hücrel immün yanıtla (T lenfositler, makrofajlar ve bunlardan salınan sitokinler) kontrol edilebilen hücre içi infeksiyonların tipik bir örneğidir. Etken toplumsal bir öfkeyi de yansıttığı açık olan “en aşağılık intrasellüler patojen” olarak tanımlanmıştır. Solunum yoluyla alınan ve alveole yerleşen tüberküloz basili, adhezinler ile fagositler tarafından yakalanmayı sağlar (21).

Mikobakterilerin patojenitedeki en önemli özellikleri fagositler, monosit ve makrofajlar içinde çoğalabilmeleridir. Konakta basillerin belli bir sayıya ulaşması

ve hücrel immün cevabın ortaya çıkmasına kadar 3-8 haftalık bir süre geçer. Basilli alanların % 5-10'un da ya infeksiyonu takip eden iki yıl içinde primer hastalık gelişir ya da latent bir dönemin ardından reaktivasyon tüberkülozu görülür (22).

Hücrel immün cevapla birlikte aktive olan T lenfositler ve makrofajlar basilleri çevreleyerek nonspesifik konak cevabının bir göstergesi olan granümatöz inflamasyon gelişimine yol açar. Granülom çevresindeki kan damarlarından dokuya, T lenfositler ve monositler geçer. CD_4^+ T hücrelerinden salınan interferon gamma (IFN γ) ile lenfokinler, makrofaj ve monositleri aktive eder. Monositlerden köken alan doku makrofajları epiteloid hücrelere, bunlarda birleşerek çok nükleuslu dev hücrelere dönüşür. Etkili hücrel immünitede makrofajların en önemli fonksiyonlardan biri, T hücrelerine sunulmak üzere antijeni işlemektir. Aktive makrofajlar fagozom içerisindeki basilleri serbest radikallerle öldürür, lizozim ve asit fosfatazların etkisiyle bakterinin duvarı parçalanır. Bakteri endozomal alanda işlenerek "major histocompatibility complex" (MHC) II molekülleriyle birleşerek, makrofajın yüzeyine eksprese edilir. Mikobakteriyel hücrel cevapta dominant olan T lenfositlerinin % 90'ı α ve β zincirlerinden oluşan reseptörleriyle antijeni tanıyarak aktif hale geçer. γ - δ lenfositleri ise basilli bir bütün olarak tanıyabilmekte, tanıma işlemini MHC I ve II ile sınırlanmaktadır (12). Makrofajlar tarafından fagosite edilen ancak öldürülemeyen bakteriler MHC I molekülleri ile birleşip CD_8^+ T lenfositlere sunulurlar. Ancak CD_8^+ T lenfositleri tüberkülozlu hastalardan seyrek olarak izole edilirler ve bu hücrelerin insanda mikobakteriye karşı savunmadaki rolleri de aydınlatılamamıştır (13, 22, 23). Yeterli hücrel immün cevap basille ilk infeksiyonu sınırlar ve durdurur. Bu durumda primer infeksiyonun tek belirtisi PPD'nin pozitifleşmesidir. Eğer hücrel immünite yetersiz kalırsa primer infeksiyon, aktif hastalığa ilerler (13).

Hücrel immünite ve gecikmiş tip aşırıduyarlılık (Gth) tarafından oluşturulan T hücreleriyle meydana gelen hastalık belirtileri ile yakından ilişkili olaylardır. Hücrel immünite infeksiyon ajanını öldürmeyle ilgilidir. Gth ise konak organizmanın infeksiyona verdiği immünolojik bir reaksiyondur. Gth,

tüberkülin deri testi pozitifliğinden, tüberkülozda görülen kazeifikasyondan, likefaksiyon ve kavitasyon gibi zararlı etkilerden sorumludur. Gth tarafından yaratılan yerel nekroz, hücrel immünite tarafından yerel makrofaj aktivasyonu sağlaması için konakçıya zaman kazandırır. Gth tarafından oluşturulan nekrotik bölgenin kenarından kaçan basiller buradaki yerel makrofajlarca tutulur. Eğer bu makrofajlar hücrel immünite tarafından aktive edilmiş iseler fagosite ettikleri basilleri öldürecek ve hastalığı durduracaklardır. Fakat aktive edilmemiş iseler basiller bu makrofajlar içinde tekrar çoğalmaya başlayacak, çoğalmayı önlemek için Gth yanıtı tekrarlanacak, böylece kazeöz nekroz alanları genişleyecektir (12).

2. 3. 1. Mikobakteriyel antijenler

Mikobakterilerin fiziksel, kimyasal ve fonksiyonel özelliklerinde farklılık gösteren çok sayıda antijenik yapısı vardır. Mikobakteriyel antijenler, pek çok lipid, protein ve polisakkaritten oluşur. Bu komponentlerin immünsüpresyon, makrofaj aktivasyonu, granülom oluşturma, toksisite, alternatif yoldan kompleman aktivasyonu gibi çok değişik etkileri vardır. Mikobakterinin neden olduğu infeksiyonlarda esas olarak hücrel immün sistem rol oynadığından proteinler, anahtar immünojenler olarak kabul edilir (13).

Mikobakteriyel Proteinler

Old tuberkulin (OT): İlk kez Koch tarafından hazırlanan OT; *M. tuberculosis* ve *M. bovis*'in sıvı besiyerinde 37°C' de 3-8 hafta üretilmesini takiben akım halindeki buharla öldürülmesi, ilk hacminin $1/10$ 'u kalıncaya kadar ısıyla yoğunlaştırılması ve filtrasyonla sterilize edilmesi sonucu elde edilen saf olmayan bir üründür. OT' nin infekte bireylerde, basille karşılaşmamış olanlara nazaran daha çabuk ve daha belirgin reaksiyon oluşturduğu görülmüş ve tüberküloz infeksiyonun tanısında, intradermal cilt testi olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ancak OT' nin besiyerinden kaynaklanan başka komponentler de içermesi, bu aktif tüberküloproteinin saflaştırılması ihtiyacını doğurmuştur (15).

Safılaştırılmış Protein Türevi (Purified Protein Derivative: PPD)

İlk kez Seibert tarafından tanımlanan PPD, yapay besiyerinde hazırlanmış OT' in kollodyen membranlardan süzölüp amonyum sülfat ve aseton ile çöktürölmesi sonucu elde edilmiş bir üründür. Safılaştırılmış protein türevi (PPD) ismine karşın saf protein değildir, bazı avantajsız durumları söz konusudur. Hazırlanmasında son derece uzun bir inkübasyon dönemi, basili 100 °C'ye kadar ısıtarak öldürme ve proteinlerin çöktürölmesi basamakları vardır. Tüm bu basamaklar proteinin denatürasyonuna neden olur. Stanford ve arkadaşları "yeni tüberkölünler" adı altında deri testi için daha uygun protein deriveleri hazırlamışlardır. Bunlar PPD' den türe özgül antijenler bakımından çok daha zengindirler (15).

Dünya Sağlık Örgütü 0.1ml solüsyonda 5 tüberkölün ünitesi (TÜ) dozunda PPD veya 0.0001 mgr PPD-S proteini bulunmasını önermektedir. Deri testi sonuçları 48-72 saat sonunda oluşan endürasyon bölgesinin ölçölmesi ile değerlendirilir (4, 15). Oluşan bu immünolojik fenomen: Tip IV veya gecikmiş tipte aşırı duyarlılık reaksiyonu olarak isimlendirilir (15).

Antijen 5, Antijen 6, Antijen 60: Safılaştırılmış sitoplazmik proteinlerdir. Bakteriye karşı oluşan hüморal immün cevabı göstermek amacıyla kullanılmaktadır. Mikobakteriyel infeksiyonlarda oluşan hüморal immün cevap antijen 60'a dayalı Enzim İle İşaretli Antikor Deneyi (ELISA) ile gösterilebilir, ancak bu antijen bütün mikobakterilerde vardır ve *M. leprae* gibi diğer mikobakteri türleri ve *Nocardia* ve *Corynebacteria* ile çapraz reaksiyon vermektedir (24).

65k Da Protein: Safılaştırılmış mikobakteriyel antijenler içinde en ilgi çekici olanıdır. Özellikleri bakımından ısı çok proteinlerine çok benzerler. Etkili antitüberkölöz aşı geliştirme çalışmalarında, insanda Th₁ hücre cevabını uyaran mikobakteriyel antijenlerin tanımlanması kritik bir öneme sahiptir. Rekombinant tekniklerle elde edilen protein antijenleri (10, 30, 38 ve 65k Da) verimli T hücre cevabını sağlamışlardır (22, 25).

Antijen 85 Kompleksi: *M. tuberculosis'* in fibronektine bağlanan bir proteindir. Salgısal tiptedir. Fibronektin T hücre reseptörleri ile bağlanarak T lenfositlerini aktivite edebilmektedir. 85A T hücre aktivasyonunu ve buna bağlı olarak makrofaj aktivasyonunu bozar, deri testi cevabını engeller ve infeksiyon bölgesinde makrofajların savunma yapmalarını önler (14, 21).

Mikobakteriyel Polisakkaritler

Arabinoz, galaktoz ve mannoz içeren polisakkarit I molekülleri geç tip aşırıduyarlılık oluşturabilirler, polisakkarit II molekülleri ise geç tip aşırı duyarlılık oluşturmaz, fakat serolojik aktivite gösterirler (26, 27). Polisakkaritlerin temel kaynağı hücre duvarıdır, arabinogalaktanlar, arabinomannanlar ve glukanlar hücre duvarında bulunur (2, 12, 14, 15, 21).

Mikobakteriyel Lipidler

Mikobakteriyel lipitler, esas olarak hücre duvarında yer almakla birlikte, sitoplazmada da bulunurlar (15, 21, 28).

Trehaloz glikolipidler (Kord faktör): Trehaloz dimikolat yapısındadır. Tüberküloz basillerine küme oluşturma kabiliyeti kazandırdığı için kord faktör olarak bilinir. Çoğu sitokin salınımına bağlı pek çok özelliği tanımlanmıştır. Başlıcaları; sistemik toksisite, antitümör aktivite, granülom oluşumu, makrofaj kemotaktik faktörlerinin salınımı, lökosit migrasyon inhibisyonu olarak özetlenebilir. Kord faktör komplemanı alternatif yoldan aktivite ederek akut inflamasyona da yol açar. Farelerde karakteristik bir toksisiteye sahiptir (13, 15, 28) .

Sülfolipidler: Sülfür içeren glikolipidlerdir. Bakterinin patojenitesi ile ilgilidir. Kord faktöre sinerjik etki yapar. Makrofajda fagozom-lizozom füzyonunu engeller ve bakterinin intrasellüler yaşamını sürdürmesinde rol oynar (13, 28).

Fosfolipidler: Epitel hücrelerinin dev hücrelere dönüşmesine neden olur. Tüberküloz oluşumunda rol oynar (13).

Wax D: Peptidoglikolipid yapıdadır. Freund's adjuvanının etkisini artırıcı özelliğe sahiptir. Basile ait bazı proteinlerle beraber tüberküline karşı geç tipte hipersensitivite oluşturur (13).

Fosfotidil inositol mannosid: Hücre duvar iskeleti için bir çimento görevi görür. Sitoplazmik membrana bağlıdır. Peptidoglikan ve hücre duvar polisakkaritlerinin sentezinde rol oynarlar. Safılaştırılmış fosfotidil inozitol mannozidler hapten ve antikor yanıtı oluştururlar (12, 14, 28).

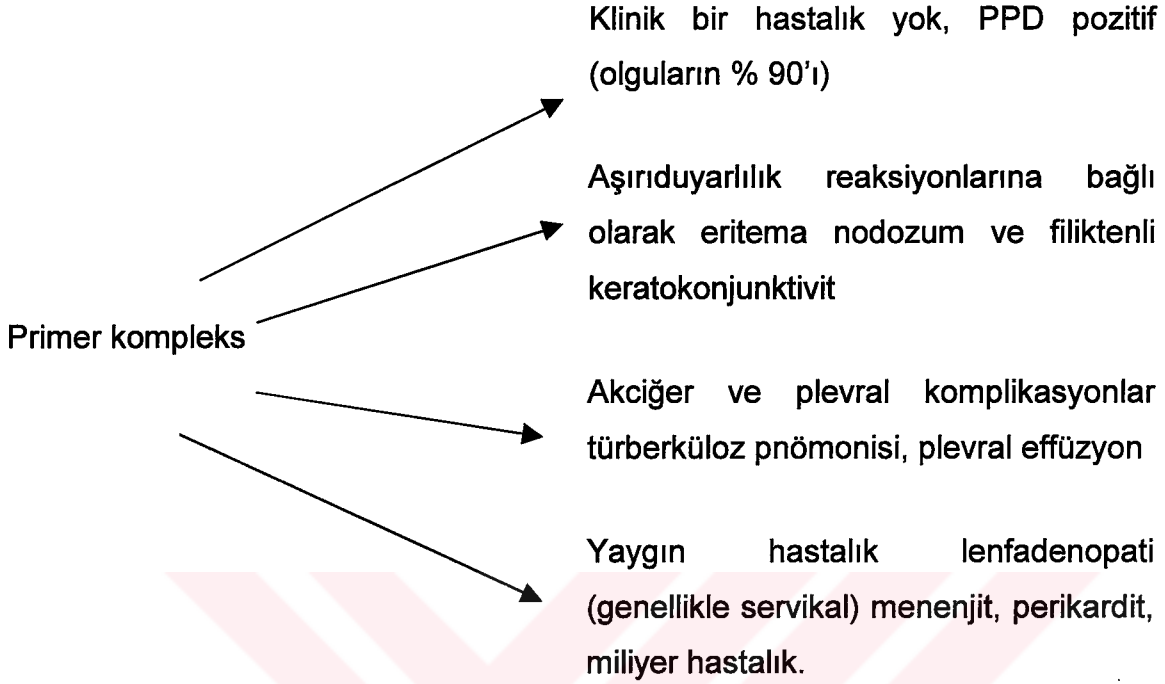
2.4. İNFEKSİYONLARI

2.4.1. Primer infeksiyon

Primer tüberküloz, bireyin tüberküloz bakterisi ile ilk defa enfekte olmasıdır. Enfeksiyon, basillerin konağın ilk savunma mekanizmasını yenip hayatta kalmayı başarmasının ardından akciğer parankiminde çoğalması ile başlar (Ghon odağı). Komşu lenfatikler basili hiler lenf nodlarına götürür. Ghon odağı ve ilişkili hiler lenfadenopati primer kompleksi (Ranke kompleksi) oluşturulur (5, 13). Primer infeksiyonda denilen süreç hücresel immün yanıt gelişimi ile durdurulur ise, hastalık gelişmeden olay sonlanır. Basilin infektif dozu ve immün cevabın gücü daha sonra ne olacağını belirler. Pek çok olguda immün cevap basilin çoğalmasını durdurur birkaç basil gizli (dorman basil) kalabilir. Enfeksiyonun tek göstergesi pozitif tüberkülin deri testidir. Bazı olgularda immün cevap basilin çoğalmasını dururacak kadar güçlü değildir. Bu durumda birkaç ay içinde hastalık oluşacaktır (5).

Primer tüberküloz genellikle asemptomatiktir (Şekil 2). Bir yaş altındaki çocukların % 45-50'sinde, bir yaş üstündekilerin ise %85-95'inde tesadüfen çekilen grafiler ile tanı konur. Bir çocukta; balgam pozitif aktif tüberkülozlu bir hasta ile temas hikayesi, PPD pozitifliği ve akciğer grafisinde hiler/paratrekeal lenfadenopati ve/veya Ghon odağının varlığı primer tüberkülozu düşündürmelidir (13).

Şekil 2. Primer infeksiyonun sonuçları (5).



Miliyer Tüberküloz

Basil kanla primer kompleksten tüm vücuda yayılabilir. Daha çok 0-4 yaş arası çocuklarda primer infeksiyonun erken komplikasyonu olarak ortaya çıkar. Çeşitli organlarda sayısız küçük lezyonlar vardır. Miliyer tüberküloz olarak adlandırılan tabloyu birkaç hafta içinde gelişen, tüberküloz menenjit izleyebilir. Miliyer tüberkülozlu hastaların % 30'unda PPD negatiftir (13). Çeşitli vücut sıvılarından ve sekresyonlarından *M. tuberculosis* izole edilebilir. Lenf bezi, kemik iliği, karaciğer, akciğer gibi doku biyopsi örneklerinde basilin gösterilmesi üretilmesi ve tipik granülatöz histopatolojik bulguların saptanması tanıda son derece önemlidir (29).

2.4.2. Sekonder Tüberküloz

Sekonder tüberküloz; primer infeksiyonu izleyen aylar veya yıllarca süren latent bir sürecin ardından gelişir. Reaktivasyon ya da reinfeksiyon şeklinde oluşur.

Endojen reaktivasyon; primer infeksiyondan sonra aylar veya yıllarca dokularda canlılığını sürdüren basillerin (dorman basil) hayatın herhangi bir döneminde hücrel immün yanıtta meydana gelen baskı nedeniyle (stres, beslenme yetersizliği, kemoterapi, AIDS vb) aktif hale geçmesiyle meydana gelir. Endojen reaktivasyon primer komplekste (orta-alt akciğer zonlarındaki ilk akciğer odağında ve komşu lenf bezinde) değil, akciğer apekslerindeki hematojen yayılım odaklarında gelişmektedir (12,13).

Eksojen reinfeksiyon: Daha önce primer infeksiyon geçirmiş, PPD pozitif olan kişiler, eğer tüberküloz basili ile yeniden karşılaşılırsa, mevcut hücrel immünite bu basillerin alveollere yerleşmesini, çoğalmasını önler fakat bu koruma tam değildir. Karşılaşma yoğun ve sık tekrarlanıyor ise basiller hava yolu ile geldikleri akciğer apekslerine yerleşebilirler, buradaki basiller çoğalarak belirli bir sayıya ulaştınca immün T lenfositler lezyon bölgesine gelerek kazeifikasyon nekrozu oluştururlar. Böylece basillerin büyük çoğunluğu yok edilirken az sayıda basil dorman hale geçer ve bu halde canlılıklarını sürdürürler. Basiller hücrel immünite zayıfladığında tekrar çoğalmaya başlar (12).

Ekstrapulmoner Tüberküloz

Plevra Tüberkülozu: Erişkin veya yaşlılarda eksudatif plörezinin en önemli nedenidir. Adölesan çağda ve genç erişkinlerde geçirilmiş tüberküloz infeksiyonunun şekli olarak ortaya çıkar. Plevral tüberkülozu subplevral yerleşimli tüberküloz odaklarının plevral aralığa açılması ile olur. Olguların yarısından çoğunda kültür pozitifliği vardır, biyopsi örneğinde direkt basil gösterme oranı da yüksektir (29).

Perikard tüberkülozu: *M. tuberculosis* ile mediastinal veya hiler lenf bezinin perikard aralığa rüptürü sonucu tüberküloz perikardit gelişir. Miliyer tüberküloz sırasında basillerin hematojen yayılımla perikarda ulaşması nadirdir. Perikardiosentez ile alınan perikard sıvısı eksuda karakterindedir. Direkt mikroskopide basil pozitifliği düşük orandadır, kültür izolasyon oranı ise % 50'dir.

Kemik ve eklem tüberkülozu: Hematojen veya daha nadiren yakın bir odaktan lenfatik yolla yayılım sonrası ortaya çıkar. Omurga tüberkülozuna tüberküloz spondilit veya Pott hastalığı adı verilir. Tüberkülozun endemik olduğu bölgelerde adölesan çağda ve genç erişkinlerde, gelişmiş ülkelerde ise ileri yaşlarda görülür. En sık torakal vertebralar tutulur, bunu lomber, servikal ve sakral vertebralar izler. Periferik osteoartriküler tüberküloz genellikle tek eklemi tutar. Kalça ve diz eklemi gibi ağır yük taşıyan eklemlerde de görülür. Tüberküloz osteomyeliti her kemikte görülebilir. En sık kostalar, kafatası, metacarplar, pelvis kemikleri ve uzun kemikler tutulur. Vertebra tüberkülozunda yaklaşık olarak olguların yarısında apse veya biyopsi kültür pozitifliği vardır. Sinoviyal sıvıda direkt mikroskopide basil pozitifliği % 25'dir. Sinoviyal biyopsinin kültür ve histolojisi ile % 100'e yakın oranda tanı konur (29).

Böbrek tüberkülozu: Hematojen yayılım ile gelişir. Tüberkülozun bütün formlarında semptomatik olmayan renal kortikal tutulum vardır. Genitoüriner tüberkülozlu olguların % 52-76'sında aktif veya geçirilmiş tüberküloz vardır. Çoğunlukla orta yaş grubunda görülür. Erkeklerde 1,5 kat daha fazladır. İdrarda basil miktarı az olduğu için direkt mikrobik inceleme tanıda yardımcı değildir. Ayrıca saprofit mikobakteriler nedeniyle yanlış pozitiflik olabilir. Üç sabah üst üste alınan idrarda *M. tuberculosis* için kültür pozitifliği %80-90'dır. İdrar kültürü negatif olan olgularda biyopsi materyalinin sitolojik incelemesi ve kültürü tanı koydurabilir (29).

Erkek Genital Sistem Tüberkülozu: Tüberküloz basiline lenfohematojen yolla yayılması veya böbrekteki infekte odaktan direkt yayılımı sonucu gelişir. Prostat, vesicula seminalis, epididim ve testisler tutulabilir. En sık orşit ve epididimit görülür. Tanı cerrahi olarak çıkarılan kitlenin incelenmesi ile konur. Genital sistem tüberkülozu şüpheli olan olgular, böbrek tüberkülozu yönünden de araştırılmalıdır (29).

Kadın Genital Sistem Tüberkülozu: Hematojen yolla oluşan endosalpinksteki bir tüberküloz odağının diğer genital organlara yayılımı ile oluşur. Endometrium % 50, overler % 30, serviks % 5-15 ve vajen % 1 oranında

tutulur. Tanıda menstruel kanama, küretaj veya endometrial biyopsi materyallerinden ve varsa tubaovarian apse aspirasyon materyalinden mikrobiyolojik ve histopatolojik inceleme yapılması gerekir (20). Ancak tanı genellikle operasyon ile konmaktadır (29).

Gastrointestinal Sistem Tüberkülozu: Yaygın kaviter akciğer tüberkülozlu ve larinks tüberkülozlu olgularda infekte balgamın yutulması veya hematojen yayılımı ile ortaya çıkar. Tüberküloz gastrointestinal kanalın ağzından anüse kadar her bölgesine yerleşebilir. En sık ileum ve ileoçekal bölgeyi tutar. Daha sonra sırasıyla kolon, apendiks, jejunum, rektum, duodenum, mide ve özafagusa yerleşir. Ağızda tüberküloz nadirdir. Genellikle diş etinde ağrısız ülser lezyonlar şeklindedir.

Gastrointestinal sistem tüberkülozunun laboratuvar tanısı için; ağız, farinks ve anal bölgedeki lezyonlardan, biyopsi, endoskopik inceleme ve biyopsi, radyolojik inceleme yapılır. Tanı genellikle cerrahi olarak konur (1).

Periton Tüberkülozu: Hematojen yolla veya tüberküloz salpenjit, intestinal, abdominal lenf bezi tüberkülozu gibi komşu bölgeden direkt yayılım ile olur. Periton sıvısı eksuda karakterindedir. Periton sıvısında basil pozitifliği nadirdir. Kültürde ise % 25 oranında basil izole edilir. Asit mayiinde adenzin deaminaz aktivitesinin ve IFN γ düzeyinin artmasının tanısai değeri yüksektir. Tanı konamayan olgularda periton biyopsisi yapılmalıdır (29).

Lenf Bezi Tüberkülozu: Hematojen veya direkt yayılım sonucu ortaya çıkar. Adölesan çağda ya da genç erişkinlerde sık görülür. En çok tek taraflı anterior ve posterior servikal zincir ve supraklaviküler lenf bezi tutulur. Mediastinal, mezenterik lenf bezleri ve diğer lenf bezlerinin tutulumu da olabilir. Servikal lenf bezi tüberkülozunda çoğunlukla birden fazla lenf bezi tutulur. Tanıda drene olan materyalden ve biyopsi örneğinden inceleme yapılmalıdır (29).

Deri Tüberkülozları: Tüberküloz basilinin deriye girişi çoğunlukla açık deri alanlarından özellikle yüz ve ekstremitelerde görülür. Sıyrık, çizik, yaralanmalar, böcek ısırıkları basil için giriş kapısı oluşturabileceği gibi, sünnet, dövme, yeterli sterilizasyon yapılmamış injeksiyonlar, kulak delme işlemi gibi uygulamalarla da basil deriye inokule olabilir. Oral kavite ve konjunktivada da görülebilir. İlk lezyon küçük bir papüldür. Daha sonra ağrısız bir ülser gelişir. Bu lezyon tüberküloz şankrı adını alır. Tanı basilin gösterilmesi ve üretilmesi ile konur (30).

Tüberküloz Menenjit: Tüberkülozun en ağır klinik formu, santral sinir sistemi tüberkülozudur. Genellikle primer infeksiyonun komplikasyonu olarak gelişir. Erişkin yaş grubunda ise, her yaşta görülmesine rağmen en fazla 25-45 yaş arasında görülmektedir. Tüberküloz menenjit tanısında beyin omurilik sıvısı (BOS) incelenmesi esastır. BOS oda ısısında bekletildiğinde fibrin ağı oluşumu gözlenir. BOS sedimentinde aside dirençli bakteri (ARB) gösterilmesi erken tanı için çok önemlidir BOS sedimentinin EZN metodu ile boyanan preparatlarında ARB pozitifliği % 10-40 oranında değişir. Ard arda dört ayrı BOS örneğinin incelenmesi ile ARB pozitifliği oranı % 90'a çıkmaktadır. Kesin tanı BOS kültüründe tüberküloz basilinin üretilmesi ile konur (31).

Tüberküloz menenjitin erken tanısında BOS'da adenozin deaminaz aktivitesinin yükselmesinin gösterilmesi, lateks aglütinasyonu veya ELISA ile BOS'da mikobakteriyel antijenlerin gösterilmesi önemlidir (1). Duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek moleküler tekniklerin tanıda yerini alması da tüberküloz menenjitin hızlı tanısında oldukça önemlidir (31, 32).

2.5. TANI YÖNTEMLERİ

Tüberküloz hastalarının erken tanı ve tedavisi bu hastalıktan toplumun korunmasında en etkili yoldur. Tüberküloz tanı yöntemlerinin amacı, klinik örneklerde mikobakterilerin varlığını göstermektir. Tüberküloz ve diğer mikobakteriyel infeksiyonlar arasındaki temel fark *M.tuberculosis'* in insandan

insana bulaşmasıdır. Bu sebepten, tüberküloza mümkün olduğu kadar hızlı tanı konması son derece önemlidir (9).

Bir mikobakteriyoloji laboratuvarı, tüberkülozun laboratuvarında kazanılan infeksiyonlar arasında ilk sırasında yer aldığı göz önünde bulundurularak özel fiziki şartlara sahip olmalıdır. Aerosollerin kontrolü ve laboratuvarlarda diğer mikobakteriyel kontaminantlardan 2B tipinde laminar akımlı biyolojik emniyet kabinleri kullanılarak aşılabılır. Ayrıca çalışmalar negatif hava çekimi altında yapılmalı ve aerosolleşmeyi önleyecek şekilde donatılmış yüksek hızlı soğutmalı santrifüjler kullanılmalıdır (2, 17).

Mikobakterilerin tanısında, her mikrobiyolojik testte olduğu gibi, doğru ve güvenilir laboratuvar sonuçlarının elde edilebilmesi için yeterli ve uygun örnek toplanması ve uygun şekilde taşınması gereklidir. Tanıda kullanılacak örnekler mümkün olduğu kadar tedaviye başlanmadan önce alınmalıdır (2, 16, 17). Mikobakteri tanısında kullanılan örnekler; pulmoner veya ekstrapulmoner, kontamine veya steril bölgelerden alınabilir. Örnekler steril ve tek kullanımlık kaplara alınmalı ve mümkün ise 30 dakika içerisinde laboratuvara ulaştırılmalı, aksi takdirde +2° - +8 °C'da bir geceyi aşmayacak şekilde muhafaza edilmelidir (2, 13, 16, 17).

Tüberküloz tanısında klinik örneklerin alınma ve laboratuvara gönderilme koşulları;

- **Balgam ve diğer pulmoner sekresyonlar:** Tüberküloz tanısında balgam ve bronşiyal aspiratlar gibi pulmoner örnekler en sık kullanılan klinik materyellerdir. Hastadan 5-10 ml tükürük içermeyen sabah balgamı alınması, mümkün ise hasta ilaç veya herhangi bir yiyecek almadan önce ağzını suyla yıkadıktan sonra steril bir kaba alması tercih edilir. Eğer balgam alınamıyor ise, bronkoskopi yapılması uygun görülmektedir. Bronkoalveoler lavaj (BAL), transbronşiyal aspiratlar, bronşiyal yıkama örnekleri ve bronşiyal fırçalamalar tanı koyma şansını arttırmaktadır. Ancak, bronkoskopi esnasında kullanılan lidokainin mikobakteriler üzerine olan inhibitör etkisi ve tuzlu su ile örneğin dilüe

olduğu laboratuvar çalışması sırasında akılda tutulmalıdır. Balgam rneği en az ard arda  gün boyunca alınıp incelenmelidir (2, 17).

•**Açlık mide suyu:** Açlık mide suyu (AMS), gece boyunca yutulan balgamın toplanması amacı ile; bebekler, çocuklar ve koma halindeki hastaların midesinden gastrik lavaj ile alınır. En az 5-10 ml örnek alınmalıdır ve alınır alınmaz veya en geç 4 saat içinde sıvı nötral pH'ya (100 mg sodyum karbonat eklenerek) ayarlanmalıdır. Nötralize edilmemiş örnek, asidik pH mikobakteri yapısını bozduğu için, işleme alınmamalıdır. AMS saprofit mikobakteri içerebileceğinden bu örneklerde yaymalar yanlış pozitif sonuçlar verebilmektedir (2).

•**Kan:** zellikle AIDS'li, immünkompromize hastalardan mikobakterilerin izolasyonunda kan rneği kullanılır. Çoğunlukla yaygın mikobakteri infeksiyonları *Mycobacterium avium* kompleks (MAC)'e bağlıdır. Mikobakteriyel kan kültürleri için isolator lysis centrifugation system (Wampole Lab.) veya radyometrik BACTEC 13 A kan kültür şişeleri (Becton-Dickinson) gereklidir. Isolator tüpler hücreleri eriterek intrasellüler mikobakterinin salınımını sağlayan saponin içerir. BACTEC 13A şişeleri de antikoagülan olarak sodium polyanethol sulfonate veya heparin içerir. EDTA'lı veya koagüle olmuş kan ekim için uygun değildir (2). Kandan mikobakteri izolasyonu için gereken süre ortalama 23-25 gündür (MAC için 22-65 *M. tuberculosis* için 35-33 gün) (33).

•**İdrar:** Sabah alınan orta akım idrarı uygundur. Gece boyu mesanede biriken en az 40 ml idrar kültür uygulamasında kullanılır 12 ve 24 saatlik idrar toplanması kontaminasyon riski açısından uygun değildir (2, 17).

•**Dışkı:** Herhangi bir koruyucu içermeyen, tek kullanımlık kaplara 1 gr'ın üzerinde dışkı alınarak laboratuvara gönderilir. Dışkı rnekleri AIDS'li hastaların gastrointestinal sistemlerinde MAC varlığının gösterilmesi için kullanılmaktadır. nceki alışmalar dışkı kültürünün ancak yayma pozitifliğinde uygulandığını göstermektedir. Ancak son veriler bu yaymaların duyarlılığının ancak % 32-34 olduğunu göstermiştir, yani yayma sonuçları mikobakteri kültürünün yapılip

yapılmayacağını belirleyememektedir. Rutin kültür ve yayma taramaları bu hastaların yaygın MAC enfeksiyonu riski taşıdığını etkili bir şekilde belirleyememektedir. Pozitif dışkı kültürü ve negatif kan kültürü olan hastalarda antibiyotik profilaksisinin etkinliğine ilişkin bir veri yoktur. Bu yüzden MAC için dışkı örneği incelenmesi önerilmemektedir (2).

•**Vücut sıvıları (Beyin omurilik sıvısı (BOS), plevra, perikard, periton, kemik iliği):** Aseptik aspirasyon veya cerrahi yöntemlerle alınır. Az miktarda mikobakteri içerdiklerinden mümkün olduğunca fazla miktarda alınması kültürde üretme şansını artırır. Örneğin BOS örneği en az 2 ml ekilmelidir. Özellikle sıvı besiyerlerine ekim yapılmalıdır (2, 17).

•**Dokular (lenf nodu, deri, diğer biyopsi metaryalleri):** En az 1 gr doku, herhangi bir fiksatif veya koruyucu içermeyen steril kaplara alınarak laboratuvara gönderilmelidir. Kutanöz ülserlerde biyopsi parçası lezyonun çevresinden alınmalıdır (2).

2.5.1. Aside Dirençli Boyama Yöntemleri

Tüberkülozun laboratuvar tanısında, ilk basamak aside-dirençli boyama tekniği uygulanarak hazırlanmış yaymaların değerlendirilmesidir. Pulmoner örneklerdeki tüberküloz basilinin sayısı direkt olarak bulaşma riskiyle bağlantılıdır. Mikroskopi hastaneye yatırılıp izole edilmesi gereken hastaların taranmasında da önemli bir kriterdir. Şu anda iki aside-dirençli boyama tekniği uygulanmaktadır. Birincisi; ışık mikroskobu kullanılan bazik fuksin yöntemidir (Ziehl-Neelsen veya Kinyoun yöntemi). Yaymaların değerlendirilmesi yaklaşık 15 dakika gerektirir ve yaymanın negatif olarak değerlendirilebilmesi için en az 300 saha incelenmelidir. İkinci ve tercih edilen yöntem floresan mikroskobu kullanılan auramine-rhodamine floresan boyamadır (2,8,16,17,34-37). İncelenen örnekler Centers For Disease Control (CDC) kriterlerine göre rapor edilir (Tablo 2).

Aside dirençli boyama yöntemleri özgül değildir. Sadece *M. tuberculosis* değil diğer mikobakterilerde aside dirençli boyanırlar. Mikobakteriler haricinde,

Nocardia, Rhodococcus, *Legionella micdadei*, Cryptosporidium spp ve Cyclospora kistleri de belirli derecelerde aside-dirençli boyanmaktadır. Yöntemin duyarlılığı % 22-81 arasında bildirilmektedir. Negatif bir yayma, ml'de ancak 5×10^3 - 10^4 basil pozitif sonuç verebileceğinden, tüberküloz şüphesini uzaklaştırılmaz (17).

Mikroskopideki bu olumsuzluklar, yöntemin tek başına tüberküloz şüphesini gideremediğini göstermektedir. Mikobakteri infeksiyonlarının tanısında kültür yöntemleri önemli yer tutmaktadır. İzolasyon süresini kısaltan çeşitli kültür yöntemleri mevcuttur. Bunun yanı sıra moleküler teknikler de tüberkülozun hızlı tanısında yüksek duyarlılık ve özgüllükleri ile artan bir öneme sahiptirler.

Tablo 2. Direkt boyalı preparatların değerlendirilmesi ve rapor edilmesi(13).

Sonuç	Aside dirençli basil sayısı/mikroskop alanı		
	EZN	Florokrom boyama	
	(1000x)	(250x)	(450x)
ARB görülmedi	0	0	0
Şüpheli yeni örnek ile tekrar edilmeli	1-2/300	1-2/30	1-2/70
+1	1-9/100	1-9/10	2-18/50
+2	1-9/10	1-9/1	4-36/10
+3	1-9/1	10-90/1	4-36/1
+4	>9/1	>90/1	>36/1

2.5.2. İzolasyon ve İdentifikasyon Yöntemleri

Tüberküloz araştırılması için laboratuvara gönderilen birçok örnek hastanın normal florası ile kontaminedir. Mikobakterilerin yavaş üremeleri dolayısıyla uzun bir inkübasyon periyoduna ihtiyaç duymaları, mikobakteri haricindeki mikroorganizmaların üreyip, mikobakterilerin üremesini baskılamasına yol açar. Bu yüzden kontamine örneklerin kültür yapılmadan önce belirli işlemlerden geçirilmesi gerekir (homojenizasyon-dekontaminasyon).

Aseptik şartlarda alınmış dokular veya vücut sıvıları konsantre edildikten sonra, kültür işlemi uygulanır (2, 16, 17).

2.5.2.1. Homojenizasyon ve Dekontaminasyon Yöntemleri:

Pek çok klinik örnek bakterinin çevresinde mukus, organik kalıntılar ve flora elemanı mikroorganizmaları içerir. Mikobakterinin yüksek lipid içerikli hücre duvarı bakteriyi kimyasalların zararlı etkilerine daha az hassas kılar. Bu özelliğinden yararlanılarak çeşitli homojenizasyon ve dekontaminasyon yöntemleri kullanılmaktadır (16). Mukus içeren örnekler (balgam, AMS, BAL vb) hem homojenizasyon, hem de dekontaminasyon işlemi gerektirirken, kontamine olduğu bilinen idrar, otopsi materyali, abdominal ve diğer sıvılar sadece dekontamine edilmelidir (16). Homojenizasyon-dekontaminasyon için, NaOH, N-asetil L-sistein (NALC), zefiran-trisodyum-fosfat, oksalik asit, sefipiridyum klorit ve sodyum klörür, sülfürik asit yöntemlerinden biri uygulanmaktadır (2, 13, 14, 16, 17).

Sodyum hidroksit, en yaygın kullanılan dekontaminanttır, aynı zamanda mukolitik etkisi de vardır. Ancak, alkaliyi güçlendirmek ve uygulama süresini arttırmak kontamine bakterilerle birlikte mikobakterileri de etkiler. Uygun olmayan bir dekontaminasyon klinik örnekteki mikobakterilerin % 20-90'ını öldürebilir. Homojenizasyonda vorteks kullanılarak örneğin, mümkün olduğu kadar çözülmesi uygundur. Tüm bu işlemler biyolojik güvenlik kabinlerinde yapılmalıdır (2).

En yaygın kullanılan homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemi NALC-NAOH'dir. Bu yöntem özellikle BACTEC ve diğer sıvı besiyerlerine yapılacak inokülasyonlar için uygundur. Mukus yoğunluğu fazla olan klinik örneklerde NALC miktarı artırılabilir. Selektif besiyeri kullanılarak da (antibiyotik ve antimikotik içeren) sert dekontaminasyon yöntemleri uygulanması sınırlandırılabilir (2, 16, 17).

2.5.2.2. Konvansiyonel Kültür Yöntemleri

Mikobakterilerin üretilmesinde kullanılan seçici veya seçici olmayan pek çok besiyeri vardır. Mikobakterilerin ilk izolasyonları için sıvı besiyerleri tercih edilir. Katı besiyerleri ise yumurta veya agar bazlıdır ve hepsi çeşitli oranlarda, kontaminat bakterileri baskılayıcı özelliğine sahip malaşit yeşili veya diğer anilin boya içerirler. Yumurta bazlı besiyerleri; gliserol, tuz, patates unu, süt gibi maddeleri, yumurtanın tümü veya sarısı ile birlikte içerirler. Bu besiyerleri + 4°C'de muhafaza edildiğinde birkaç ay kullanılabilirler. Bu besiyerinin dezavantajı artık maddelerle kolonileri birbirinden ayırma zorluğu ve antimikobakteriyel duyarlılık testlerinin standardizasyon sıkıntısıdır. Yumurta bazlı besiyeri içerisinde en yaygın kullanılan; Löwenstein-Jensen (LJ) besiyeridir. LJ besiyeri *M. tuberculosis* tanısında iyi iken diğer türlerin izolasyonunda güvenilir değildir. Petraghani besiyeri LJ'den iki kat fazla malaşit yeşili içerir. Yoğun kontaminasyonlu örneklerden mikobakteri izolasyonunda LJ'den daha iyi sonuçlar vermektedir. "American Thoracic Society" besiyeri LJ'den daha düşük miktarda malaşit yeşili içerir ve kontamine olmayan veya az kontamine olduğu düşünülen örneklerin kültüründe kullanılır (16).

Agar bazlı besiyerleri; mikobakterilerin üreme sürelerini kısaltmak amacıyla kullanılır. Birçok mikobakteri kültüründe koloniler 7-10 günde mikroskop altında görülebilecek boyutlara ulaşırlar. Middlebrook 7H10 ve 7H11 besiyerleri; tuzlar, vitaminler, kofaktörler, gliserol, malaşit yeşili ve agardan oluşup oleik asit, bovine albümin, glükoz ile zenginleştirilmiştir. Middlebrook 7H11'in 7H10'dan farkı % 0.1'lik enzimatik kazein hidrolizat içermesidir. Bu besiyerinde *M. tuberculosis'* in izoniazid-dirençli suşları gözlenebilir (2, 16, 17).

Seçici besiyerleri; LJ, Middlebrook 7H10 ve 7H11'de antimikrobiyal ajanlar eklenerek kontaminant bakterilerin eliminasyonunu sağlamak için hazırlanır. Seçici besiyerleri, seçici olmayan yumurta veya agar bazlı besiyerleri ile birlikte kullanılmalıdır. Yumurta bazlı seçici besiyerleri; penisilin ve nalidiksik

asit içeren LJ Gruft ve sikloheksimid, nalidiksik asit, linkomisin içeren Mycobaktosel LJ'dir. Mitchison seçici besiyeri ise *Pseudomonas spp.* kontaminasyonunu önlemek için karbenisilin içerir, ayrıca polimiksin B, trimetoprim laktat ve amfoterisin B içerir (2, 16).

Mikobakterilerin klinik örneklerden izolasyonundan sonra, identifikasyonu için ilk olarak; üreme ısısı, koloni morfolojisi, pigmentasyon gibi fenotipik özellikler değerlendirilir. Bu özellikler kesin identifikasyonu sağlamasa da, daha ileri testlerin seçiminde yardımcı olur (16).

Mikobakteri kolonileri düzgün S kolonilerden düzensiz R kolonilere kadar pek çok koloni morfolojisi gösterebilir. Örneğin *M. intracellulare* ortası daha yoğun tavada yumurta görünümünde koloniler yapabilir. Üreme zamanı ve ısısı mikobakteri türleri arasında farklılık gösterir, aynı zamanda kullanılan besiyerlerinden ve ilk inokulumdan etkilenir. İlk belirme süresi geniş bir süreyi kapsar (3-60 gün). Mikobakteriler 7 günden önce ve sonra üreyenler olmak üzere gruplandırılırlar. Mikobakterilerin ilk izolasyonda üreme sıcaklıkları dar bir aralıktadır. *M. marinum*, *M. haemophilum* en iyi 30-32 °C'de ürer. Diğer taraftan *M. xenopi* en iyi 42 °C'de ürer (16). Mikobakteriler pigment oluşturma durumlarına göre gruplandırılırlar. Işıklı ortamda karoten pigment oluşturan türler fotokromojenler (*M. kansasii*, *M. marinum*, *M. simiae*, *M. asiaticum*), ışıklı veya karanlık ortamda pigment oluşturanlar skotokromojenler (*M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. gordonae*, *M. flavescens*) ve pigment oluşturmayanlar fotokromojen olmayanlar olarak isimlendirilir (Tablo 1).

2.5.2.3 Radyometrik Kültür Yöntemleri

BACTEC 460 sistemi (Becton Dickinson) Mycobacterium'un üremesini belirleyen otomatik radyometrik bir kültür sistemidir (2, 16, 17). Sistemde Middlebrook 7H12 ve 7H 13 (Bactec 12B ve Bactec 13 A) sıvı besiyerleri kullanılır. Bactec besiyeri ¹⁴C işaretli palmitik asit içerir. Bu radyoaktif madde mikobakterilerce metabolize edilir ve şişelerde radyoaktif CO₂ oluşur. BACTEC 460 cihazı bu ¹⁴CO₂ miktarını ölçerek "üreme indeksi, GI" olarak değerlendirir.

Besiyerinin içine ek olarak, katalaz, kazein hidrolaz ve bir antimikrobiyal karışım (PANTA) eklenir. PANTA; polimiksin B, amfoterisin B, nalidiksik asit, trimetoprim ve azlosilin'den oluşan bir antimikrobiyal karışımdır. Örnek inokülasyonu yapılmadan BACTEC şişelerine 0.1 ml dağıtılarak kontaminasyon önlenmeye çalışılır (16, 17). Bactec 12 B şişeleri 4 ml besiyeri içerir ve önerilen dekontamine örnek inokülasyonu 0.5 ml'dir (38). BACTEC 13A şişeleri özellikle kan ve kemik iliği inokülasyonları için kullanılır. 30 ml'lik BACTEC 13A şişelerine 5 ml kan inokülasyonu yapılır. Bu şişeler BACTEC 12 B'den farklı olarak bir antikoagülan (sodyum polyanethol sülfonat-SPS) içerirler (2, 16, 17). Bu sistemin avantajı, atipik mikobakterilerde kültür pozitifliği süresini 7 günün altına düşürmesidir. *M. tuberculosis* için de süreyi 9-14 güne indirmesidir. BACTEC sisteminin dezavantajları; koloni morfolojisini gösterememesi, karışık kültürlerde tanımlama zorluğu, kontaminasyon faktörü, radyoizotop kullanımı ve fazla iğne kullanımınıdır (39). Sistemin en büyük avantajı da pozitif şişelerde direkt olarak identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılabilmesidir (2).

2.5.2.4. Radyometrik Olmayan Kültür Yöntemleri

Mikobakterilerin izolmanında kullanılan ve radyometrik olmayan birçok sistem vardır.

- BBL Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT, Becton Dickinson), Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri bazlıdır. Oleik asit, glikoz, albumin ve katalaz (OADC) ile zenginleştirilir ve ekim sırasında PANTA eklenir. Sistemde şişelerin tabanındaki silikona gömülmüş oksijen labil bir floresan belirteç vardır. Ekimden sonra üreyen mikobakteriler oksijeni kullanırlar ve belirteç bileşik uyarılarak ortaya çıkan floresan bir ultraviyole lamba veya ışık ile belirlenir. Sistem idrar ve kan haricinde diğer bütün klinik örneklerle uygulanabilir (2).

- BACTEC 9000 MB/MYCOF (Becton-Dickinson), MGIT sistemdeki floresan belirtecin benzerini içerir. Modifiye 7H9 sıvı besiyerinin zenginleştirilmesi ve PANTA eklenmesiyle şişeler ekime hazır hale getirilir.

Şişeler mikobakteri üremesini gösteren gazların salınımı yönünden izlenir. Sistem sadece balgam ve diğer pulmoner örnekler için uygundur (17).

- ESP Myco System (Difco), sistemde şişelerdeki gaz basıncı devamlı olarak monitörlerle izlenir. Kullanılan besiyeri 7H9 sıvı besiyeridir ve OADC ile zenginleştirilip, bir antimikrobiyal karışım (Myco PVAN) eklenir. ESP sistemi mikobakterileri tanısında son derece etkili ve güvenilir bir sistemdir. Tüm klinik örnekler için uygundur (17).

- MB/BacT System (Organon Teknika), mikrobiyal tanımlama sistemi, her bir şişenin tabanında CO₂ basıncını belirleyecek kolorimetrik bir belirteç kullanılır. Besiyeri Middlebrook sıvı besiyeri bazlı kazein ve katalazla zenginleştirilmiştir. Sistem kan haricinde tüm klinik örnekler için kullanılabilir. BACTEC sistemine en büyük üstünlüğü radyoaktivite gerektirmemesi, tamamıyla otomatize olması ve kapalı bir sistem olduğundan çapraz kontaminasyon riski olmamasıdır (16, 40).

- Septi-Chek Biphasic besiyeri (Becton-Dickinson), Middlebrook 7H9 sıvı besiyeridir. Sistem % 5-8 CO₂ ile zenginleştirilmiş atmosfer içeren üremeyi arttırıcı zenginleştirici maddeler ve antimikrobiyal karışım içerir. Şişeler tepesinde agarlı bir tıkaç kapsamaktadır. Bu tıkaç iki kanattan oluşur. Kanadın bir yüzünde seçici olmayan Middlebrook 7H11 agar (*M. tuberculosis*'i diğer mikobakterilerden ayırmak için), diğer tarafında ise kontaminant bakterileri belirlemek için çikolata agar bulunur. Bifazik besiyeri radyoaktivite ve CO₂ inkübatör gerektirmemesi ve konvansiyonel agar sistemlerinden hızlı üremeyi belirlemesi ile uygun bir sistem iken, üremeyi belirleme süresi BACTEC sisteminden uzundur (16, 41).

- Isolator (Wampole Lab.) Lizis santrifügasyon sistemi, intrasellüler organizmaları ortaya çıkarmak için kullanılan, saponin içeren bir toplama sistemidir. Özellikle kan ürünlerinin (BACTEC 13A şişeleri hariç) ekiminden önce uygulanır. Elde edilen çökelti otomatik sistem şişelerine ekilir (2, 16).

2.5.2.5. Biyokimyasal İdentifikasyon

Biyokimyasal testlerle pek çok mikobakteri izolatu identifiye edilebilir. Fakat mikobakterilerin geç üremeleri bu testlerin birkaç hafta zaman almasına neden olur. Son yıllarda moleküler tekniklerin kullanıma girmesi mikobakterilerin identifikasyonunda biyokimyasal testlerin rutin olarak kullanımını azaltmıştır (42).

Arilsülfataz testi; Arilsülfataz mikobakterilerin pek çoğunun sahip olduğu bir enzimdir. Sülfat grupları arasındaki bağı hidroliz eder. Test şartları değiştirilerek tür tanımına gidilir. Üç günlük test; *M. fortuitum*, *M. chelonae* ve özellikle 42° C da yapıldığında *M. xenopi'* nin tanımlanmasında yardımcı olurken 14 günlük arilsülfataz testi *M. triviale* yanında diğer yavaş üreyen mikobakterileri türlerinin (*M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. marinum* gibi) tanımlanmasında kullanılmaktadır (16).

Katalaz testi; Katalaz, bütün mikobakterilerin sahip olduğu bir enzimdir. Sadece *M. gastri*, belirli INH-dirençli *M. tuberculosis* 'in mutant suşları, *M. bovis* ve bazı patojen olmayan INH-dirençli *M. kansasii* suşları katalaz enzimine sahip değildir. Katalaz üreten mikobakteri türleri katalaz aktivitesindeki kantitatif değişikliklerle ayrılabilirler. Bunun için semikantitatif katalaz testi, 68°C katalaz testi ve INH-dirençli *M. tuberculosis*'in hızlı tanısında katalaz damlatma yöntemi kullanılır (2).

Kristal violesiz Mac Conkey agarda üreme testi; Hızlı üreyen mikobakterilerin ayırımında kullanılır. Potansiyel patojen olan *M. fortuitum* grup üyeleri ve *M. chelonae* grubu kristal violesiz Mac Conkey agar da üreyebilir. Hızlı üreyen diğer mikobakteri türleri genellikle bu besiyerinde üremez. Bu test 3 günlük arilsülfataz testi ile kombine edilerek hızlı üreyen mikobakteri türlerinin ayırımında kullanılır(16).

Niasin akümülayon testi; Niasin (nikotirik asit), nikotinamidadenin dinükleotid ve NADP koenzimlerinin biyosentezinde bir aracıdır. *M. tuberculosis* niasin üretir ve besiyerine salgılar. Ancak niasin testi *M. tuberculosis*'in tanısında tek başına kullanılamaz. Tüberküloz basilinin tanısında testin nitrat redüksiyonu ve 68 °C katalaz testi ile birlikte uygulanması gereklidir. Test *M. simiae*, *M. bovis* BCG de pozitifdir(2).

Nitrat redüksiyon testi; Koloni morfolojisi, üreme zamanı ve pigmentasyon gibi özellikleri benzerlik gösteren mikobakterilerin ayırımında kullanılır. *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. szulgai* ile bazı patojen olmayan nonfotokromojen olmayan türler ve *M. fortuitum* nitrat redüktaz pozitifdir (2).

Pirazinamidaz testi; Bazı mikobakterilerin pirazinamidi 4 günde pirazinoik asite parçalamasının araştırıldığı bir deneydir. Bu deneyde *M. tuberculosis*, *M. marinum* ve *M. avium-intracellulare* olumlu *M. bovis*, *M. kansasii* olumsuz olarak bulunur (14).

Sodyum klorür tolerans testi; Besiyeri olarak içerisinde %5 NaCl bulunan LJ besiyeri kullanılır. *M. triviale*, *M. flavescens*, *M. fortuitum*, *M. phlei*, *M. smegmatis* bu besiyerinde ürer. *M. chlonae subsp chlonae* bu ortamda üremediği halde *M. chlonae subsp abcessus* üreyebilmektedir (14).

Tiyofen-2 karboksilik asit hidrazid (T2H) inhibisyon testi; Tiyofen-2 karboksilik asit hidrazid *M. bovis*' in gelişimini selektif inhibe eder, oysa çoğu diğer mikobakteriler bu maddeyi içeren besiyerlerinde üreyebilir. Bu özellik, *M. bovis* ve diğer benzerlerinin *M. tuberculosis*' den ayırımında kullanılır (14).

Tellürit redüksiyon testi; Tellürit redüktaz renksiz potasyum tellüriti siyah metalik tellüriyum presipitata dönüştürür. MAC 3-4 gün içinde tellürit redüksiyonu yapmaktadır. Test MAC ile diğer fotokromojen olmayan türlerin ayırımında kullanılır (2).

Tween 80 hidrolizi testi; Bazı mikobakteri türleri tarafından üretilen lipaz, Tween 80'i oleik asit ve poliksilen sorbitole parçalar. pH 7 test besiyerinde nötral red Tween 80 tarafından bağlanır ve renk amber rengine döner. Eğer Tween 80 hidrolizi olursa nötral red bağlanmaz, renk kırmızıya döner. Olumlu kontrol olarak *M. kansasii*, olumsuz kontrol olarak da *M. scrofulaceum* kullanılır(2, 14,15).

Bactec NAP testi; P-nitro α asetil amino β hidroksi propiofenon (NAP), kloramfenikol sentezinde bir ara üründür. NAP *M. tuberculosis* kompleks türlerinin üremesini inhibe eder. Diğer mikobakterilerin üremelerine ya çok az veya hiç etki etmez (17, 38).

Kromatografi: Mycobacterium türleri kromatografik olarak belirlenebilen uzun zincirli yağ asitleri (mikolik asitleri) içeren hücre duvarına sahiptir. Mikolik asitlerin tipleri ve miktarları türlere özgüdür. Konuyla ilgili ilk veriler kolon kromatografisi ve ince tabaka kromatografisi ile yapılan çalışmalar iken günümüzde yerini gaz likid kromatografisi ve yüksek düzey lipid kromatografisi (HPLC) bırakmıştır (16).

Tür tanısında HPLC, biyokimyasal testler ve probe identifikasyonu ile uyumlu sonuçlar vermektedir. Kromatografi hızlı ve verimliliği son derece yüksek bir yöntem olmakla birlikte gerekli ekipmanın fiyatının yüksekliği ve uygulamada belirli standartlar gerektirmesi kullanım alanını sınırlamaktadır (2, 43). Kromatografik yöntemler aynı zamanda mikobakteriyal ürünlerin direkt tanısında kullanılmaktadır. Tüberküloz menenjitin hızlı tanısında BOS ve serumda küçük miktarda bulunan yağ asidi (tüberkülostearik asit) gaz-likid kromatografisi ve kütle spektrometri yöntemleri ile belirlenebilir. Tüberkülostearik asit normal şartlarda insan dokularında bulunmaz. Bu yağ asidi bütün mikobakteri ve aktinomisetlerin yapısında bulunur (2, 16, 17).

Kültür Değerlendirmede DNA Probların Kullanımı: Türe özgü rRNA dizilerinin tamamlayıcısı DNA probları *M. tuberculosis* kompleks, MAC, *M. gordonae* ve *M. kansasii*'nin identifikasyonu için 1987'den beri kullanılmaktadır

(Accu Probe, Gen-Probe). Bu problemler Löwenstein-Jensen besiyerinde veya BACTEC 12B, Difco ESP-Myco veya MB/BacT, MGIT şişeleri gibi sıvı besiyerlerinde üreyen izolatların identifikasyonunda kullanılabilir (43-47). 16S rRNA molekülünün değişken bölgelerinin mikobakterilerde türe özgül karakteristikler göstermesi, mikobakteri tür tayininde bu bölgeden yararlanmayı sağlamaktadır (43). Accu Probe yöntemi *M. tuberculosis*, *M. gordonae*, *M. avium*, *M. intracellulare* ve *M. kansasii*'nin identifikasyonunda, pozitif şişelerdeki mikobakteri hücrelerinin sayısı ve tür farklılıkları dolayısıyla %47'den % 100'e kadar değişen duyarlılık şeması gösterebilir (44, 46). Sonuçlar 2 saat içinde elde edilebilir ve kullanılan problemler akridinium ester işaretlidir, duyarlılıkları da 1^{25} ile işaretli orijinal problemler kadar yüksektir (2). Accu Probe hızlı bir test olması ve geniş bir kullanım alanı bulunmasına rağmen sınırlı sayıdaki mikobakteri türünün identifikasyonunda kullanılması ve bazı özgüllük ve duyarlılık problemi göstermesi en büyük dezavantajıdır (42).

Genetik dizi tayini mikobakterilerin identifikasyonunda kullanılabilir. Moleküler identifikasyon 16S rRNA'yı kodlayan genin polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) dayalı olarak dizi analizini yapılmasıdır (42). Belirlenen bilinmeyen izolatın dizini, bilinen dizi ile bilgisayar yada klasik yolla karşılaştırılır. Kültürden yada örnekten dizi analizi bir gün sürmektedir. Mikobakteriyel izolatların identifikasyonunda 16S rRNA dizi analizi rutin olarak başarıyla kullanılmaktadır. Bu tekniğin kullanımı ile Mycobacterium cinsinin düşünülenden çok daha kompleks olduğu ve cinsin içinde *M. interjectum*, *M. conspicuum* gibi yeni tanımlanan patojen türlerin bulunduğu görülmüştür (2, 42, 43,47). DNA dizi analizine alternatif olabilecek pratik bir yöntem ise, 65 kDa "heat shock protein" 'i PCR ile amplifikasyonu sonrası "Restriction Fragment Length Polymorphism" (RFLP) ile incelenmesi ile yapılan tiplendirme (2, 48, 49).

2.5.3. Nükleik Asit Çoğaltma ve Hibridizasyon ile Direkt Tanı Yöntemleri

Nükleik asit çoğaltma ve hibridizasyon yöntemleri, klinik örneklerden kültür kadar uzun zaman gerektirmeden, direkt olarak mikroorganizmayı

belirleyen ve identifiye edebilen yöntemlerdir. Örneklerin genellikle çok az sayıda tüberküloz basili içerdiği göz önünde bulundurulursa, ya kullanılan yöntem son derece hassas ve özgül olmalı ya da hedef organizmanın tanıda kullanılacak parçası tanımlanabilir seviyede "amplifiye" edilmelidir (2).

2.5.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PCR; bir organizmanın veya gen hatasının DNA veya RNA' sının, kültüre gerek olmaksızın *in vitro* şartlarda çoğaltılmasıdır. PCR uygulaması üç basamaklı bir döngüyü kapsar; I. Çift iplikçik DNA'nın ayrılması, II. Primerlerin bağlanması, III. Uzama safhası. Eğer çoğaltma bir RNA dizinine uygulanacak ise PCR' dan önce ters transkriptaz ile bir tamamlayıcı DNA sentezlenir. Her bir döngü 3-5 dakika sürer ve 20-40 defa tekrarlanır (48). Uzama safhasında 30 döngüden sonra tek bir DNA kopyası 1.000.000 kopyanın üzerine çıkar (48). PCR tüberkülozun hızlı tanısında önemli bir yer tutmaktadır. Pek çok araştırmacı, *M. tuberculosis* kompleks organizmalarını diğer mikobakterilerden güvenilir şekilde ayıran IS 6110 DNA dizinini kullanmayı seçmiştir (50- 54).

M. tuberculosis'in rutin tanısında klinik laboratuvarlarda kullanılan PCR'ın klinik önemi açık değildir. Bu uygulamaların hiçbiri Amerikan Besin ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından kabul görmemektedir. Ayrıca laboratuvarların hepsi testlerinin duyarlılık ve özgüllüklerine son derece önem vermekle beraber, testin kalitesi sonuçta çalışan elemana dayalıdır (2, 55). PCR için en önemli dezavantajlar daha önceki PCR'lardan kalan kontamine DNA'ların, çoğaltılmasıyla yanlış pozitif sonuçlar vermesi ve balgam, kan gibi bazı örneklerde bulunan bileşiklerin DNA amplifikasyonunu önlemesidir (51, 52).

Bir kapalı sistem PCR testi olan AMPLICOR Mycobacterium tuberculosis PCR testi (AMPLICOR MTB, Roche Diagnostic), FDA tarafından onaylanmış bir çoğaltma testidir. (2, 9, 56 , 57).

2.5.3.2. Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test (AMTDT)

AMTDT (Gen-Probe) ilk FDA onaylı amplifikasyon testidir. Test transkripsiyona bağılı çoğaltma (TMA) yöntemidir (2, 9, 58, 59)). Üç temel basamak birbirini izler;

- I. Örnek hazırlama (rRNA'nın açığa çıkarılması) AMTDT' de kullanılan dekontamine örnek miktarının 45 µl'den 450µl' ye çıkarılması ve terminasyon safhasının bir saatten yarım saate düşürülmesi 1995' den bu yana AMTDT 2 olarak isimlendirilmektedir (60, 61).
- II. Transkripsiyona bağılı amplifikasyon (RNA amplikonları oluşur).
- III. RNA amplikonları belirleyen hibridizasyon korunum deneyi (9, 59). rRNA bakteri hücrelerinde binlerce kopya olarak bulunduğu için rRNA' nın hedeflenmesi çok daha hassas olmaktadır. Çok yüksek duyarlılıktaki kemilüminesan sinyal ile çalışan hibridizasyon korunum deneyi tayin sistemi ile bu hassasiyet artırılmaktadır (19).

Örneklerin hazırlanması aşamasında, hedef nükleik asitlerin ortaya çıkması için mikroorganizmaların parçalanması gereklidir. Bu işlem için AMTDT' de mekanik bir yöntem, sonikasyon kullanılır. Açığa çıkan nükleik asit (lizat) *in vitro* replikasyon için kalıp görevi yapar. TMA' da çoğaltma aşamasında, RNA polimeraz ve ters transkriptaz olmak üzere iki enzim kullanılır. İki primer kullanılır. Primerlerden biri RNA polimerazın promotor dizisini içerir. İlk çoğaltma aşamasında promotor-primer rRNA hedefine hibridlenir. Ters transkriptaz promotor-primerin 3' ucundan uzatarak hedef rRNA' nın bir DNA kopyasını yapar. Ortaya çıkan RNA, DNA yapısındaki RNA, ters transkriptazın RNAz H aktivitesi ile bozular. Daha sonra ikinci primer DNA kopyasına bağlanır. Yeni DNA ipliği ters transkriptaz tarafından primerin ucundan sentezlenir ve çift iplikli DNA oluşur. RNA polimeraz DNA kalıbı üzerindeki promotor diziyi tanır ve transkripsiyonu başlatır. Her yeni sentezlenen RNA amplikonu yeniden TMA işlemine girer. Her DNA kalıbı bir saatten az sürede 100-1000 RNA amplikonu

yapabilir. Tayin; TMA ile ortaya çıkan amplikon tayin HPA ayırma/tayin işlemi ile gerçekleştirilir. Çoğaltılan RNA amplikonlarının varlığı bunlara özgül akridinyum esteri ile işaretli prob lar aracılığı ile belirlenir. Bu prob lar kendilerine özgül nükleik asit varlığında, buna bağlanarak, molekülün ortasında bulunan akridinyum esterinin iki zincir arasında kalmasını sağlar. Ortam seçici sıvı ile asit hale getirildiğinde, bu şekilde korunmuş olan akridinyum esteri bozulmadan kalır. Oysa özgül RNA amplikonunun bulunmadığı durumda prob serbest olarak dolaşır ve akridinyum esteri korunmadığı için seçici reaktif ile parçalanır. Daha sonra tüpler lüminometreye yerleştirilir ve otomatik pompa ile içlerine sodyum hidroksit ve hidrojen peroksit çözeltileri eklenir. Bazik ortamda okside olan akridinyum esteri ışık üretir(relatif light unit, RLU). Bu aşamaya dek korunmuş akridinyum esteri tüp içinde bulunuyorsa ışık vererek kendisini koruyan RNA amplikonunun varlığı, dolayısı ile de mikobakteri varlığını gösterir (60).

AMTDT 4 saat gibi kısa bir sürede sonuç verebilen duyarlılık ve özgüllüğü son derece yüksek bir testtir. Testin FDA tarafından onaylanan kullanım alanı sadece pulmoner örnekler iken, son yıllarda yapılan çalışmalar pulmoner olmayan örneklerde de bu testin güvenle kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca, rRNA yalnızca canlı hücrelerde bulunduğundan özellikle tedavi sırasında ölü hücre DNA'ların tanınması ile doğacak yanlış pozitif sonuç riski ortadan kalkmaktadır (9, 55, 61- 64).

Son yıllarda üretilen, değişik çoğaltma stratejilerine dayalı ikinci jenerasyon nükleik asit çoğaltma testlerinin bir kısmı uygulamada, bir kısmı ise henüz geliştirme aşamasındadır. Bunlar; ligaz zincir reaksiyonu (LCR), zincir ayırma çoğaltma (SDA) reaksiyonu, dallanan prob teknolojisi ve nükleik asit dizi temelli amplifikasyondur (65- 70).

2.6. EPİDEMİYOLOJİ VE KORUNMA

Mycobacterium tuberculosis dünya nüfusunun 1/3'ünü, yaklaşık 1.7 milyar insanı infekte eden ve her yıl üç milyon insanın ölümüne neden olan infeksiyon hastalığıdır. Tüberkülozun hızlı yayılmasında en önemli iki etken; damlacık yoluyla bulaşma kolaylığı nedeniyle, kalabalık yaşam şartlarında olanlar ve doğal direnci düşük olan popülasyondur (1, 12, 13).

Tüberkülozun epidemiyolojisinin temelinde tarama ve yeni olguları ortaya çıkarma vardır. Taramanın amacı infekte ve aktif hastalığı olan kişileri bulmaktır (13).

Gelişmiş ülkelerde, tüberkülozun yılda % 10-15 oranında azalma ile 2020 yılında eradike olacağı, bu ülkelerde yaşayan kişilere basilin, turizm ve iş seyahatleri gibi nedenlerle bulaşacağı tahmin edilirken, 1982 yılında tanımlanan ve 1990'lı yıllarda adeta epidemi halini alan Human Immundeficiency Virus (HIV) infeksiyonu nedeniyle tüberküloz insidansı da artmaya başlamıştır. HIV, tüberküloz riskini arttıran en güçlü faktördür (3). HIV ile infekte bir bireyde tüberküloz riski, infekte olmayan bir bireyden 10 kat daha fazladır. En sık görülen form pulmoner tüberküloz olmakla birlikte, lenfadenopati, plevral efüzyon, perikardiyal hastalık, miliyer tüberküloz ve menenjit en sık görülen formlar arasındadır (4, 15, 71).

Türkiye'de veremle savaş Prof. Dr. Besim Ömer Paşa tarafından, 1918 yılında başlatılmıştır. Geniş çaplı kitle taraması ve aşı çalışmaları 1953-1956 yılları arasında yapılmış ve bu dönemde taranan kişilerin % 56'sının tüberküloz basilleri ile infekte olduğu belirlenmiştir. Aynı oran 1980'li yıllarda % 0.36'ya düşmüştür. Mortalite oranı 1945 yılında yüzbinde 262; 1960 yılında yüzbinde 55 ve 1982 yılında yüzbinde 8 olarak bulunmuştur. 1950'li yıllardaki ölüm nedenleri arasında ilk sırayı alan tüberküloz, günümüzde 9. sırada yer almaktadır (13).

Tüberkülozda koruma çalışmalarında iki temel yaklaşım bulunmaktadır;

1. Birincil koruma; henüz tüberküloz basili ile karşılaşmamış kişilerde, tüberküloz gelişimini önlemek amacıyla uygulanır. Bunun için iki yöntem uygulanmaktadır:

- a) Tüberkülozlu hastaların özellikle de pulmoner tüberkülozlu hastaların erken dönemde belirlenmesi ve etkin bir şekilde tedavi edilmesi. Böylece kaynak olguların sayısının azaltılarak infekte olmamış kişilerin tüberküloz basilleri ile karşılaşma riskini azaltmak,
- b) BCG ile aşılama; hastalık yapma gücünü kaybetmiş fakat, canlılığını koruyan bir *M. bovis* suşu ile hazırlanmış aşığı uygulayarak henüz infekte olmamış kişide tüberküloz basiline karşı koruyucu immünite oluşturmak, böylece bu kişinin tüberküloz basili ile karşılaşması durumunda infeksiyon ve hastalık gelişiminin önlenmesine yardımcı olmak.

2. İkincil koruma; infekte olan kişilerde hastalık gelişiminin önlenmesi amacıyla uygulanır. Genellikle izoniazid verilerek, infeksiyonun klinik hastalığa dönüşümünü engellemek amaçlanır (13).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarına, Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Devlet Hastanesi, Nuh Naci Yazgan Göğüs Hastalıkları Hastanesi, Sosyal Sigortalar Hastanesi ve Askeri Hastane gibi sağlık kurumlarının takibinde olan pulmoner ve ekstrapulmoner tüberküloz şüpheli hastalardan gönderilen klinik örnekler çalışmaya alındı. Örnekler ilgili klinisyen tarafından tüberküloz ön tanısı olarak gözlem altında bulundurulan ve takip edilen hastalardan seçildi.

Balgam, BAL, plevral mayi, apse materyali, idrar ve BOS gibi toplam 87 klinik örnek üzerinde yürütülen bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Laboratuvara gönderilen hastalara, idrar örneğini sabah ilk idrarı steril kaplara alarak laboratuvara ulaştırmaları, balgam örneğinin ise sabah ağız

temizliği yapıldıktan sonra öksürülerek çıkarılan balgam olması ve steril kaplarda laboratuvara getirmeleri bildirildi. Diğer örnekler ya enjektörde ya da steril cam veya polietilen tüplerde laboratuvara ulaştırıldı.

Toplanan bu örnekler aside dirençli boyama, kültür ve "Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test" uygulanarak çalışıldı.

3.2. ZIEHL-NEELSEN BOYAMA YÖNTEMİ

a. Kullanılan boya eriyikleri ve renksizleştirme işleminde kullanılan solüsyonun içeriği (15):

Karbol Fuksin boyası: bazık fuksin 10 gr, fenol kristalleri 50 gr, saf etil alkol 100 ml, distile su 900 ml.

Metilen mavisi boyası: metilen mavisi 4 gr, etil alkol 200 ml, distile su 900 ml.

% 3'lük Hidroklorik asit (HCl) Alkol solüsyonu: HCl 30 ml, etil alkol 970 ml.

b. Boyama yönteminin uygulanması

- Çalışmaya alınan tüm örneklerden aside dirençli boyama için preparat hazırlandı. İdrar, BOS gibi örneklerin 3500xg'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvıları atılıp dip çökeltilerden preparat hazırlandı. BOS örnekleri için lamın ortasına bir damla sediment damlatılıp havada kurutuldu, aynı damlanın üzerine ikiden fazla olmamak üzere damla damlatıldı ve kurutuldu. Balgam örneğinin ise partiküllü varsa nekroze doku içeren koyu renkli bölgelerinden, yaymaları hazırlandı. Havada kurutuldu.

- Preparatlar 2-3 dakika metil alkol ile tesbit edildi.

- Yüzeylerini kaplayacak şekilde karbol füksin boyası döküldü. Preparatlar buhar çıkacak ancak kaynamayacak şekilde alttan ısıtıldı.

- Boya döküldü, musluk suyunda yıkandı. % 3'lük asit alkolde renksizleştirme işlemi yapıldı, yıkandı.

- Preparatların üzerine zıt boya olarak metilen mavisini döküldü. Bir dakika beklendi. Yıkanan preparat, kurutularak ışık mikroskopunda immersiyon objektifinde incelendi.

Mavi zeminde pembe-kırmızı basiller ARB pozitif olarak değerlendirildi. Preparatların değerlendirilmesinde 300 saha incelendi.

3.3. KÜLTÜR YÖNTEMLERİ

Tüm örneklerin LJ besiyerine ve BACTEC 12B şişelerine ekimi yapıldı. Örnekler ekim işlemine geçilmeden önce (steril vücut boşluklarından alınan örnekler hariç) homojenize ve dekontamine edildi (38).

Homojenizasyon ve Dekontaminasyon Yöntemi

- Kültür ve AMTDT için 5 ml'nin üzerinde örnekler özel 50 ml.lik kapaklı santrifüj tüplerine alınarak 3500 x g'de 15 dakika santrifüj edildi.
- Bu örneklerin dip çökeltilerine ve balgam, püy gibi örneklerin üzerine, örnekle eşit miktarda % 0,29 sodyum sitrat ve % 4 NaOH - % 1'lik NALC eklenerek 15 dakika oda ısısında bekletildi.
- 50 ml oluncaya kadar steril distile su eklendi.
- 15 dakika 3500 x g'de santrifüj edildi.
- Üst sıvılar döküldü, dipte yaklaşık 3 ml örnek bırakıldı. Vortekslenerek ekime hazır hale getirildi.
- Ekimler yapıldıktan sonra AMTDT için dipte kalan yaklaşık 2 ml'lik örneğin üzerine 50 ml'ye tamamlayana kadar steril distile su eklendi.
- 3500 x g'de 15 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı.
- Dipten yaklaşık 500-1000 µl. örnek 1.5 ml.lik eppendorf tüplere alınarak testin uygulanacağı zamana kadar -20°C'lik derin dondurucuda bekletildi.

3.3.1. Löwenstein-Jensen Besiyerine Ekim

Laboratuvarda burgu kapaklı tüplerde, tüpde yatık olarak hazırlanan LJ besiyerine örneklerin ekimi yapıldı.

Besiyerinin hazırlanışı: Löwenstein-Jensen TB medium (Merck Diagnostica) 37.5 gr, gliserin 12 ml üzerine 600 ml distile su eklendi ve 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edildi. Besiyerini sıcaklığı 45-60 °C'a düştüğünde aseptik ortamda hazırlanmış ve homojenize edilmiş 24-25 yumurta eklenerek karışım sağlandı. Burgu kapaklı tüplere 8-10 ml konularak, 85 °C'lik koagülatörde üç gün koagüle ve sterilize edildi. Hazırlanan vasatlar; 4 °C'de bekletildi ve bir ayda kullanıldı.

Besiyerine homojenize ve dekontamine edilmiş veya steril bölgelerden alınan örnekler bir enjektör yardımı ile tüm yüzeyini kaplayacak şekilde ekildi.

Sekiz hafta süreyle 37 °C'lik etüvde inkübasyon sırasında haftada bir örnekler üreme yönünden izlendi. Şüpheli örneklerden aside dirençli boyama yapıldı.

3.3.2. Bactec 12B Şişelerine Ekim

BACTEC 12B şişeleri 4 ml Middlebrook 7H12 sıvı besiyeri içermektedir. Ekim işleminden önce besiyeri BACTEC 460 cihazında okutuldu. Amaç şişe içi atmosferi CO₂'den zenginleştirmek ve yüksek geri plan okumalı şişeleri elemek idi. GI \geq 20 olan şişeler kullanılmadı (38). Diğer şişelere kontaminasyonu önlemek için polimiksin B, amfoterisin B, nalidiksik asit, trimethoprim ve azlosilin içeren özel PANTA solüsyonu 0.1 ml ilave edildi. Homojenize ve dekontamine edilmiş örnekler ve steril bölgelerden alınan örnekler bir enjektör yardımı ile 0.5-1 ml ekildi. Şişeler 37 °C'lik etüvde 4 hafta inkübe edildi. Ekimden sonra ilk iki hafta haftada iki kez, son iki hafta haftada bir kez BACTEC 460 cihazında okunarak GI'leri belirlendi ve kayıt edildi. BACTEC 460 cihazı GI'yi 0-999 arasında verdi. GI \geq 10 olan şişeler pozitif kabul edildi. Pozitif şişelerden GI \geq 100 olduğunda örnekler ARB varlığı bakımından boyanarak incelendi. Pozitif örnekler NAP testi ile tip tayini yayıldı (38).

3.4. AMPLIFIED MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DIRECT TEST

Çalışmada "Amlified Mycobacterium tuberculosis Direct test" kiti (Gen-Probe) kullanıldı (60).

Teste kullanılan malzemeler; Gen-Probe Leader Luminometre, Gen-Probe sonikatör, Gen-Probe tanımlama reaktifleri I ve II, Gen-Probe ısı blokları ($42^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve $95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$), Gen-Probe sonikatör rack, otomatik pipetler (25 μl , 50 μl , 100 μl , 200 μl , 300 μl ve 450 μl), vorteks, santrifüj.

1. Kit içeriği; (60)

- Mycobacterium örnek sulandırım tamponu 1 x 2.5 ml
- Mycobacterium amplifikasyon reaktifi..... 1 x 3 ml (liyofilize)
- Mycobacterium amplifikasyon tamponu 1 x 3 ml
- Mycobacterium yağ reaktifi 1 x 10 ml
- Mycobacterium enzim reaktifi 1 x 1.5 ml (liyofilize)
- Mycobacterium sulandırım tamponu 1.5 ml
- Mycobacterium hibridizasyon reaktifi 6 ml (liyofilize)
- Mycobacterium hibridizasyon tamponu 6 ml
- Mycobacterium seleksiyon reaktifi 15 ml
- Mycobacterium lize tüpleri 2 x 25 tüp

2. AMTDT 'nin Uygulanışı (60)

- Çalışmanın yapılacağı tüm yüzeyler 1/1 sulandırılmış sodyum hipoklorit ile silindi.
- Teste başlamadan bir saat önce kit içeriği ve örnekler oda ısısına ($18-30^{\circ}\text{C}$) getirildi.
- Oda ısısına gelen örnekler vortekslendi.
- Lize tüpleri işaretlendikten sonra, 50 μl örnek sulandırım tamponu ve 450 μl örnek lize tüplerine konuldu.

- Hazırlanan sonikatöre yerleştirilen örnekler 15 dakika sonike edilerek lizatlar elde edildi.
- Amplifikasyon tüpleri işaretlendi. Tüplere 50 µl amplifikasyon reaktifi ve 200 µl yağ konuldu.
- Temiz odada amplifikasyon tüplerine 25 µl lizat eklendi.
- Amplifikasyon tüpleri 95°C'lik ısı bloğunda 15 dakika bekletildi.
- 42 °C'lik ısı bloğuna alınan tüpler 5-8 dakika bekletilerek, üstlerine 25 µl enzim reaktifi eklendi. 30 dakika beklendi.
- Süre sonunda 100 µl hibridizasyon reaktifi eklenen tüpler 15 dakika 60 °C'lik ısı bloğunda bekletildi.
- Son aşamada tüplere 300 µl seleksiyon reaktifi eklenerek 15 dakika beklendi.
- Tüpleri okumaya geçmeden oda ısısına gelmeleri beklendi.
- Deteksiyon reaktifleri luminometre cihazına yerleştirilerek örnekler, bir saat içinde okundu.

Sonuçlar; ≥ 30.000 RLU ise *M. tuberculosis* kompleks rRNA'sı bulunduğu, < 30.000 RLU değerinde ise *M. tuberculosis* kompleks rRNA'sı bulunmadığı şeklinde yorumlandı (60).

3.5. İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

Çalışmada uygulanan üç ayrı yöntem; direkt mikroskopi, kültür ve AMTDT arasındaki istatistiksel farklılık Cochran Q testi ile, bağımlı gruplar arası fark da Ki-kare (Mac Nemar) testi ile belirlendi (72). Yöntemlerin; duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri ilgili klinisyenlerce konan tüberküloz tanısı esas alınarak değerlendirildi. Duyarlılık, özgüllük, pozitif/negatif prediktif değerler aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı.

$$\text{duyarlılık: } \frac{\text{infekte doğru pozitif}}{\text{infekte doğru pozitif} + \text{infekte yanlış negatif}} \times 100$$

$$\text{özgüllük: } \frac{\text{infekte olmayan doğru negatif}}{\text{infekte olmayan doğru negatif} + \text{infekte olmayan yanlış pozitif}} \times 100$$

$$\text{pozitif prediktif değer: } \frac{\text{infekte doğru pozitif}}{\text{infekte doğru pozitif} + \text{infekte olmayan yanlış pozitif}} \times 100$$

$$\text{negatif prediktif değer: } \frac{\text{infekte olmayan doğru negatif}}{\text{infekte olmayan doğru negatif} + \text{infekte olan yanlış negatif}} \times 100$$



4. BULGULAR

M. tuberculosis'in izolasyonunun 87 klinik örnek, boyama (EZN), kültür (Löwenstein-Jensen, Bactec sistem) ve "Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test" (AMTDT) yöntemleri uygulanarak incelendi. Çalışmaya alınan örneklerin 56'u pulmoner: 29 balgam, 27 BAL; 31'i ekstrapulmoner: 10 idrar, 16 BOS, 3 plevral mayi, 2 yara idi.

EZN boyama yöntemi ile incelenen balgam örneklerinin 20'sinde (% 68.9); BAL örneklerinin 4'ünde (% 14.8); idrar örneklerinin 1'inde (% 10); yara örneklerinin 2'sinde (% 100) aside dirençli basil pozitif bulundu (Tablo 3). EZN boyama yöntemi ile incelenen 87 klinik örneğin 27'si (% 31.1) aside dirençli basiller yönünden pozitif bulundu. Diğer örnekler ise genellikle yeterli hacimde gönderilmedikleri için santrifüj edilemedi ve direkt örneklerden hazırlanan preparatlarda aside dirençli basil görülmedi.

Tablo 3. EZN Boyama Yöntemi Bulguları.

Klinik örnek	EZN boyama					
	+	%	-	%	Toplam	%
Pulmoner Örnekler						
Balgam	20	68.9	9	31.1	29	100
BAL	4	14.8	23	85.2	27	100
Toplam	24	42.8	32	57.1	56	100
Ekstrapulmoner Örnekler						
İdrar	1	10	9	90	10	100
BOS	-	-	16	100	16	100
Plevral mayi	-	-	3	100	3	100
Yara	2	100	-	-	2	100
Toplam	3	9.6	28	90.3	31	100

Çalışmaya dahil edilen klinik örneklerin Löwenstein-Jensen ve Bactec 12B besiyerlerinde kültürü yapıldı. Balgam örneklerinin 25'inde (% 86.2); BAL örneklerinin 4'ünde (% 14.8); idrar örneklerinin 3'ünde (% 30); BOS örneklerinin 1'inde (% 6.25); plevral mayilerin 1'inde (% 33.3) ve yara örneklerinin 2'sinde (% 100) LJ ve/veya Bactec besiyerlerinde mikobakteri üredi. Bu izolatlar NAP testi ile incelenerek *M. tuberculosis* oldukları belirlendi (Tablo 4). 87 klinik örneğin LJ ve Bactec kültürlerinin toplam 36'sında (% 41.3) üreme görüldü ve 51'inde (% 58.6) üreme olmadı.

Tablo 4. Kültür Yöntemleri Bulguları.

Klinik örnek	Kültür (LJ ve/veya Bactec)					
	+	%	-	%	Toplam	%
Pulmoner Örnekler						
Balgam	25	86.2	4	13.7	29	100
BAL	4	14.8	23	85.1	27	100
Toplam	29	51.7	27	48.2	56	100
Ekstrapulmoner Örnekler						
İdrar	3	30	7	70	10	100
BOS	1	6.2	15	93.7	16	100
Plevral mayi	1	33.3	2	66.6	3	100
Yara	2	100	-	-	2	100
Toplam	7	22.5	24	77.4	31	100

Çalışmaya alınan tüm örnekler AMTDT uygulanarak *M. tuberculosis* kompleks mikobakterilerine özgü rRNA araştırıldı. Balgam örneklerinin 26'sında (% 86.6); BAL örneklerin 10'unda (% 37); idrar örneklerinin 7'sinde (% 58.3); BOS örneklerinin 3'ünde (% 18.75); plevral mayilerin 2'sinde (% 66.6) ve yara örneklerinin 2'sinde (% 100) pozitif bulundu (Tablo 5). Toplam 87 örneğin 50'sinde (% 57.4) *M. tuberculosis* complex'i rRNA pozitif bulunurken, 37'sinde (% 42.5) negatif idi.

Tablo 5. AMTDT Yöntemi Bulguları.

Klinik örnek	AMTDT				Toplam	%
	+	%	-	%		
Pulmoner Örnekler						
Balgam	26	86.6	3	13.3	29	100
BAL	10	37	17	63	27	100
Toplam	36	64.2	20	35.7	56	100
Ekstrapulmoner Örnekler						
İdrar	7	70	3	30	10	100
BOS	3	18.7	13	81.2	16	100
Plevral mayi	2	66.6	1	33.3	3	100
Yara	2	100	-	-	2	100
Toplam	14	45.1	17	54.8	31	100

Klinik örneklerde uygulanan her üç yöntemin bulguları (EZN, kültür, AMTDT) arasındaki fark Cochran Q testi ile, istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Cochan Q= 24, $p < 0.05$). Uygulanan yöntemlerin birbirleri ile ilişkileri McNemar testi ile belirlendi (Tablo 6, 7,8).

İstatistiksel olarak mikroskopi ve kültür bulguları arasındaki fark anlamsız ($p=0.267$), kültür ve AMTDT bulguları arasındaki fark anlamlı ($p < 0.05$) ve mikroskopi ve AMTDT bulguları arasındaki fark anlamlı ($p < 0.05$) bulundu (Tablo 6, 7, 8).

Tablo 6. Mikroskopi ve Kültür Bulgularının Karşılaştırılması.

Grup	Kültür		X ²	P	
	Mikroskopi	Pozitif			Negatif
Pulmoner	Pozitif	20	4	1.92	p= 0.267
	Negatif	9	23		
Ekstrapulmoner	Pozitif	2	1	2.66	p= 0.219
	Negatif	5	23		

Tablo 7. Kültür ve AMTDT Bulgularının Karşılaştırılması.

Grup	AMTDT		X ²	P	
	Kültür	Pozitif			Negatif
Pulmoner	Pozitif	28	1	5.44	P< 0.05
	Negatif	8	19		
Ekstrapulmoner	Pozitif	6	1	5.44	P< 0.05
	Negatif	8	16		

Tablo 8. Mikroskopi ve AMTDT Bulgularının Karşılaştırılması.

Grup	AMTDT		X ²	P	
	Mikroskopi	Pozitif			Negatif
Pulmoner	Pozitif	22	2	9.30	P< 0.05
	Negatif	14	18		
Ekstrapulmoner	Pozitif	2	1	9.30	p< 0.05
	Negatif	12	16		

Pulmoner örneklerde mikroskopi, yönteminin duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değeri sırasıyla; % 62.8, % 90.4, % 91.6, % 59.3 bulundu. Kültür yönteminin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla; % 82.8, % 100, % 100, % 77.7 olarak bulundu. AMTDT'nin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri ise sırasıyla; % 97.1, % 90.4, % 94.4, % 95.0 olarak belirlendi (Tablo 9).

Tablo 9. Pulmoner Örneklerde Mikroskopi, Kültür ve AMTDT'nin Tüberküloz Klinik Tanısı ile Korelasyonu.

Örneklerin Değerlendirilmesi n= 56	Mikroskopi		Kültür		AMTDT	
	+	-	+	-	+	-
Tüberküloz tanısı alan	22	13	29	6	34	1
Tüberküloz tanısı almayan	2	19	0	21	2	19
Duyarlılık (%)	62.8		82.8		97.1	
Özgüllük (%)	90.4		100		90.4	
Pozitif prediktif değer (%)	91.6		100		94.4	
Negatif prediktif değer (%)	59.3		77.7		95.0	

Ekstrapulmoner örneklerde ise; mikroskopi yönteminin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla; % 14.2, % 94.1, % 66.6, % 57.1 bulundu. Kültür yönteminde ise duyarlılık, özgüllük, pozitiflik ve negatif prediktif değerler sırasıyla; % 50, % 100, % 100, % 70.8 olarak bulundu. AMTDT'nin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla % 92.8, % 94.1, % 92.8 ve % 94.1 olarak bulundu (Tablo 10).

Tablo 10. Ekstrapulmoner Örneklerde Mikroskopi, Kültür ve AMTDT'nin Tüberküloz Klinik Tanısı ile Korelasyonu.

Örneklerin Değerlendirilmesi n= 31	<u>Mikroskopi</u>		<u>Kültür</u>		<u>AMTDT</u>	
	+	-	+	-	+	-
Tüberküloz tanısı alan	2	12	7	7	13	1
Tüberküloz tanısı almayan	1	16	0	17	1	16
Duyarlılık (%)	14.2		50		92.8	
Özgüllük (%)	94.1		100		94.1	
Pozitif prediktif değer (%)	66.6		100		92.8	
Negatif prediktif değer (%)	57.1		70.8		94.1	

Pulmoner ve ekstrapulmoner toplam 87 klinik örnekte mikroskopi yöntemi duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değer ile yöntemin doğruluğu sırasıyla; % 49, % 92.5, % 88.8, % 58.3 ve % 67.8 olarak bulundu. Kültür yönteminin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri ile doğruluk oranı sırasıyla; %73, % 100, % 100, % 74.5 ve % 85 olarak bulundu AMTDT'nin ise duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değeri ve doğruluk oranı sırasıyla; % 96, % 92.1, % 94, % 94.5 ve % 94.2 olarak bulundu (Tablo 12).

Tablo 12. Klinik Örneklerde Mikroskopi, Kültür ve AMTDT'nin Tüberküloz Klinik Tanısı ile Korelasyonu.

Örneklerin Değerlendirilmesi n= 87	Mikroskopi		Kültür		AMTDT	
	+	-	+	-	+	-
Tüberküloz tanısı alan	24	25	36	13	47	2
Tüberküloz tanısı almayan	3	35	0	38	3	35
Duyarlılık (%)	49		73		96	
Özgüllük (%)	92.5		100		92.1	
Pozitif prediktif değer (%)	88.8		100		94	
Negatif prediktif değer (%)	58.3		74.5		94.5	
Doğruluk (%)	67.8		85		94.2	

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tüberküloz yüzyıllardır temel global halk sağlığı sorunlarından biri olmaya devam etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 8 milyon yeni olgu bulunmakta ve 3 milyon kişi her yıl bu hastalıktan ölmektedir. Bu durum tüberkülozu az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki ölümlerin baş sebeplerinden biri yapmaktadır. Gelişmiş ülkelerde ise 1985 yılına kadar düşme gösteren, tüberküloz insidansı, AIDS, göç, fakirlik, evsizler ve ilaç bağımlılarının artmasıyla tekrar yükselmeye başlamıştır (1 - 4, 73).

Tüberküloz, genellikle hayat boyu süren bir infeksiyon hastalığıdır (1). Etken çoğunlukla "*Mycobacterium tuberculosis* kompleks" diye tanımlanan bir grup mikobakteridir. Ancak hastalığın ouşumundan % 97-99 oranında sorumlu olduğu için tüberküloz basili ile *M. tuberculosis* eş anlamda kullanılır olmuştur (1,5).

Vücudun hemen her organ sisteminde hastalık yapabilen tüberküloz basili, % 85 ile en sık akciğere yerleşir. *M. tuberculosis*'in tek rezervuarı insandır. Üremesi son derece yavaş olan basilin, jenerasyon süresi 15-20

saattir. Bu durum basilin (standart besiyerinde) görülebilir koloniler oluşturmaları için en az 3, genellikle 4-6 hafta ihtiyaç duymasını açıklamaktadır (1).

Klinik mikobakteriyoloji laboratuvarları; tüberküloz yayılımının önlenmesinde; *M. tuberculosis*'in hızlı tanısı, izolasyonu, identifikasyonu ve ilaç duyarlılık testleri ile önemli bir rol oynamaktadırlar. Kesin tanı halen kültür ve mikroskopiye dayanmaktadır (1, 2, 55). Ancak her iki yöntemin de kullanımında bazı kısıtlamalar bulunmaktadır. Mikroskopik yöntemler hızlı ve kolay olmasına rağmen duyarlılıkları düşüktür. Katı besiyerinde kültür daha duyarlı ve özgül olmasına rağmen sonuçlar 4-6 haftalık inkübasyon sonucu verilebilmektedir. Radyometrik sıvı besiyerleri ve bifazik kültürlerin, nükleik asit problemler ile birlikte kullanımı tanı süresini kısaltmakla birlikte üremeye dayalı yöntemler olduğundan yine de kesin tanı için en az 2 hafta gerekmektedir (55, 63, 74, 75).

Mikroskopik yöntemlerden EZN yönteminin duyarlılığı yönünden yapılan çalışmalarda pozitiflik oranı % 22-80 arasında bildirilmektedir (2, 68). Uzun (76), balgam örneklerinde yaptığı çalışmada EZN yönteminin duyarlılığını % 63.6, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerlerini sırasıyla % 99.3, % 93.3, % 95; olarak bildirmiştir. Piersimoni ve ark (74) pulmoner örneklerde yaptıkları çalışmada yöntemin duyarlılığını % 77, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla % 100, % 100, % 95 olarak bildirmişlerdir. Bergman ve ark (77) pulmoner tüberküloz şüpheli mahkumlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada florokrom boyama yöntemini kullanmışlar ve yöntemin duyarlılığını % 45.5, özgüllüğünü ise % 98.8; Bodmer ve ark (78) 617 pulmoner örnekte yaptıkları çalışmada florokrom boyama yönteminin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerlerini sırasıyla % 66.7, % 98.3, % 98.8 ve % 58.3; Jonas ve ark (79) ise 758 akciğer tüberkülozu şüpheli olguda yaptıkları çalışmada florokrom boyamanın duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerlerini sırasıyla % 53, % 99.8, % 99.6 ve % 91 olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda EZN yöntemi ile pulmoner örneklerde duyarlılık % 62.8, özgüllük % 90.4, pozitif prediktif değer % 91.6 ve negatif prediktif değer % 59.3 bulundu (Tablo 9). Bu değerler Uzun'un bulguları ile uyumlu görülmektedir. Piersimoni ve ark'larının yaptıkları çalışmada değerlerin yüksek bulunması araştırmacıların seçtikleri

hasta grubunun kesin tüberküloz tanısı almış hastalar olmasından kaynaklanmaktadır.

Uzun'un (76) ekstrapulmoner örneklerde yaptığı çalışmada EZN yönteminin duyarlılığını % 20, özgüllüğünü % 95, pozitif prediktif değerini % 50, negatif prediktif değerini ise % 83 olarak belirlemiştir. Bu bulgular çalışmamızda bulunan değerler ile (duyarlılık % 14.2, özgüllük % 94.1, pozitif prediktif değer % 66.6 ve negatif prediktif değer % 57.1) uyumlu görülmektedir (Tablo 10). Koç ve ark. (80) 2254 klinik örnekte yaptıkları çalışmada EZN duyarlılığını % 43.3 olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda klinik örneklerde EZN duyarlılığı % 49 olarak benzer bulundu.

Löwenstein Jensen ve Bactec sistemlerde pulmoner örneklerin kültürlerinde Piersimoni ve ark (74) duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla % 87, % 100, % 100, % 97,4; Jonas ve ark'ları (79) kültür yöntemlerinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerlerini sırasıyla % 88, % 100, % 100 ve % 97 ve Vuorinen ve ark. (81) duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerlerini sırasıyla % 89.7, % 100, % 100 ve % 98,7 olarak bildirmişlerdir. Pulmoner örneklerde kültür yöntemleri ile bulduğumuz % 82.8 duyarlılık, % 100 özgüllük % 100 pozitif prediktif değer ve % 77.7 negatif prediktif değer araştırmacıların çalışmaları ile uyumludur (Tablo9). Koç ve ark (80) klinik örneklerin bakteriyolojik ve radyometrik kültürlerinde, Bactec TB sistemin duyarlılığını % 76.5, Löwenstein-Jensen yönteminin ise % 49 olarak bildirmişlerdir. Araştırmacılar Bactec TB sistemini, kontaminasyon oranının yüksek olması dışında, daha duyarlı, daha pratik ve izolasyon için daha az zamana gereksinim gösteren bir sistem olarak belirtmektedir.

Hızlı sonuç veren tanı testlerine duyulan ihtiyaç, bazı üretici firmaları harekete geçirmiş ve *M. tuberculosis* komplekse özgül nükeik asit amplifikasyon testleri geliştirmelerine neden olmuştur (77, 82). Bu testler; direkt klinik örneklerden çalışılan PCR, LCR, QB Replikaz testi, SDA, AMTDT gibi testleri kapsamaktadır. Ancak FDA onaylı ve şu an kullanımda olan iki test (AMTDT ve AMPLICOR MTB) bulunmaktadır (2). Tüberkülozun moleküler tanısında

uygulanabilecek ve henüz araştırma safhasında olan LCR, SDA ve QB replikaz gibi testlerde vardır (65, 66, 68, 69, 83- 87).

Moore ve ark (69) 205 pulmoner tüberküloz şüpheli hastanın 493 örneği üzerinde yaptıkları çalışmada LCR'in duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerlerini sırasıyla; % 77, % 99, % 91 ve % 98 olarak bildirmişlerdir. Pfyffer ve ark (67) 799 pulmoner örnekte yaptıkları çalışmada; tamamen otomatik BD Probe Tec olarak bilinen SDA teknolojisi içerikli sistemin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerlerini sırasıyla; % 97.9, % 96.5, % 63.9 ve % 99.9 bulmuşlardır. Tortoli ve ark (83) 697 klinik örneği; Amplicor ve LCR ile çalışmışlar; Amplicor PCR duyarlılığını % 75.5, özgüllüğünü % 99.8; LCR duyarlılığını % 85.7, özgüllüğünü ise % 99.4 olarak bildirmişlerdir. Ichiyama ve ark (87) 530 balgam örneğinde BD Probe Tec-SDA sisteminin duyarlılığını % 94.7, özgüllüğünü % 99.8; Amplicor PCR'in duyarlılığını ise % 89.5, özgüllüğünü % 100 bulmuşlardır. Wobeser ve ark (56) 1155 hastadan alınan 1480 klinik örnekte yaptıkları çalışmada testin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değeri sırasıyla; % 77, % 99, % 81 ve % 98'dir. Smith ve ark (86) pulmoner örneklerde yaptıkları çalışmada QB replikaz testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerlerini sırasıyla; % 79, % 98, % 97 ve % 85 olarak bildirmişlerdir.

AMTDT (Gen-Probe) ilk FDA onaylı amplifikasyon testidir (2). AMTDT pulmoner ve ekstrapulmoner örneklerle uygulanabilmektedir. Ancak ekstrapulmoner örneklerde standardizasyon çalışmaları devam etmektedir. 938 pulmoner örnekte yaptıkları çalışmada, Pfyffer ve ark. (59) iki farklı dekontaminasyon protokolü uygularken, NALC-NaOH protokolü uyguladıkları örneklerde AMTDT duyarlılık, özgüllük ve pozitif ve negatif prediktif değerlerini sırasıyla % 93.9, % 97.6, % 80.7 ve % 99.3; sodyum dodesil sülfat-NaOH protokolü uyguladıklarında ise değerleri sırasıyla % 97.4, % 96.9, % 76.0 ve % 99.7 bulmuşlardır. Pfyffer ve ark (62)'inin 322 ekstrapulmoner ve 1117 pulmoner örnekte yaptıkları diğer bir çalışmada; pulmoner örneklerde AMTDT duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değeri sırasıyla: % 86.6, % 96.4, % 76.8 ve % 98.1; ekstrapulmoner örneklerde ise sırasıyla; % 93.1, % 97.7 ve % 90.0 ve %98.5 olarak bildirmişlerdir. Piersimoni ve ark. (68) 273 pulmoner ve

184 ekstrapulmoner örneğe uyguladıkları AMTDT 2 yöntemi ile pulmoner örneklerde duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla; % 92.8, % 99.4, % 98.5, ve % 97; ekstrapulmoner örneklerde ise sırasıyla; % 78.6, % 99.3, % 95.6, ve % 96.2 olarak bildirmişlerdir. Gamboa ve ark. (61) 410 pulmoner ve 272 ekstrapulmoner örneğe uyguladıkları AMTDT 1 ve AMTDT 2 testlerinde; pulmoner örneklerde duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla AMTDT 1 için; % 83, % 100, % 100 ve % 96; AMTDT 2 için; % 86.8, % 100, % 100 ve % 98.4 olarak bildirmişlerdir. Long ve ark (32) AMTDT 2'yi BOS örneklerinde uygulamışlar ve testin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktiflerini sırasıyla: % 83, % 100, % 100 ve % 94 bulmuşlardır. Araştırmacılar eşik değerini 30.000 RLU'dan 11.000 RLU'ya indirilmesinin BOS örneklerinde duyarlılığı yükselttiğini (% 33'den, % 83'e) göstermişlerdir. Chedore ve ark. (63) 202 pulmoner ve 56 ekstrapulmoner örneğe AMTDT 2 yöntemi uygulamışlar ve duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla: % 100, % 99.6, % 97.4 ve % 100 olarak bildirmişlerdir. Yıldırım ve ark. (88)'nin 20 pulmoner örnekte yaptıkları çalışmada AMTDT duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerler sırasıyla; % 77, % 90, % 88 ve % 82 olarak bildirilmiştir. Ehlers ve ark (64)'ünün 294 ekstrapulmoner örnekte yaptıkları çalışmada AMTDT duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla % 83.9, % 99.6, % 97.9 ve % 96.3'dür. Ichiyama ve ark. (89) 121 *M. tuberculosis* üreyen klinik örneğin tamamının AMTDT ile belirlendiğini (duyarlılık % 100), 284 kültür negatif klinik örnekte de 28 AMTDT pozitifliği bulunduğuna dikkat çekmişlerdir. Bodmer ve ark. (90), 717 pulmoner örnekte yaptıkları çalışmada, AMTDT'nin uygulamasında kullanılan dekontamine örnek miktarının direkt olarak testin duyarlılığını etkilediğini belirtmektedirler. Araştırmacılar yaptıkları çalışmada 500 µl dekontamine örnek kullanarak testin duyarlılığının % 71.4'ten % 83.3'e yükseldiğini, burada testin özgüllüğünün (% 99.4, %99) etkilenmediğini bildirmişlerdir. Piersimoni ve ark. (74) kültür pozitifliği ve klinik tanıyı altın standart olarak aldıkları çalışmalarında ticari olarak satın alınabilen iki amplifikasyon testini karşılaştırmışlar (AMTDT ve PCR (Amplicor)); AMTDT'nin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerini sırasıyla % 95.9, % 98.9, % 94 ve % 99.2 olarak bulmuşlardır. Amplicor PCR'ın ise sırasıyla % 85.4,

% 99.6, % 97.9 ve % 97.1 olarak bildirmişlerdir. Araştırmacılar her iki amplifikasyon yönteminde pulmoner örneklerde *M. tuberculosis* kompleks'in tanısında hızlı ve özgül olmalarına karşın AMTDT'nin Amplicor'dan daha duyarlı olduğunu belirtmektedirler. Gamboa ve ark. (55) 224 ekstrapulmoner örnekte sodyum dodesilsülfat-NaOH dekontaminasyon protokolünü uygulamışlar ve 86 steril vücut boşluğundan alınmış örneğin uygulama sonucunda AMTDT duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerlerini sırasıyla; % 92.1, % 100, % 100 ve % 94.1 olarak bildirmişlerdir. Araştırmacılar sodyum dodesil sülfatın protein ve enzimleri denatüre eden ve vücut sıvılarında bulunan pek çok inhibitör bileşiği elemine eden bir deterjan olduğunu ve özellikle kemik iliği ve diğer vücut sıvıları ile ekstrapulmoner tüm örneklerin AMTDT uygulamalarında sodyum dodesilsülfat ile işlem görmesinin zorunluluğunu bildirmektedirler.

Çalışmamızda pulmoner örneklerde AMTDT ile belirlenen duyarlılık (% 97.1), özgüllük (% 90.4), pozitif prediktif değer (% 94.4) ve negatif prediktif değer (% 95.0); Piersimoni ve ark (68 ve 74) yaptıkları iki çalışma ile uyumlu iken, Pfyffer ve ark (62), Ehlers ve ark. (64) ve Yıldırım ve ark (88)'nin belirledikleri AMTDT duyarlılığından yüksektir. Araştırmacıların dekontamine örnek uygulamalarının 45 µl olması ve çalışmada özel hasta grubu (klinik tanı almış) seçmiş olmamız duyarlılığı yükseltmiştir. Ichiyama ve ark (89)'nin çalışmalarında AMTDT duyarlılığını %100 bulunması, kullanılan örneğin direkt *M. tuberculosis* üreyen gruptan seçilmiş olmasına bağlıdır.

Ekstrapulmoner örneklerde belirlediğimiz duyarlılık (% 92.8), özgüllük (% 94.1), pozitif prediktif (% 92.8) ve negatif prediktif değerler (% 94.1) Pfyffer ve ark. (62) yaptıkları çalışma ile uyumlu görülürken, Gamboa ve ark. (61)'nin AMTDT 2 uygulamasındaki duyarlılık oranlarından yüksek, özgüllük ve pozitif prediktif değerlerden düşük bulunmuştur. Gamboa ve ark. (55)'nin yaptıkları diğer çalışmada duyarlılık ve özgüllük oranları bulgularımızdan daha yüksektir. Bunun nedeni araştırmacıların örnek hazırlamada kullandıkları sodyum dodesil sülfat-sodyum hidroksit dekontaminasyon protokolü olabilir.

Tüberküloz tanısında moleküler yöntemler hızla kullanıma girmektedir. Duyarlılığı çok yüksek olan bu testlerde kontaminasyondan korunmak ve örneğin teste hazırlanması en önemli basamaklardır. Tüberkülozda uygun örnek uygun dekontaminasyon protokolü uygun laboratuvar ve nükleik asit çoğaltma yöntemleri seçimi oldukça önemlidir. Nükleik asit amplifikasyon yöntemleri ile yapılan çalışmalarda; kültür yöntemleri ile üretilmeyen ancak nükleik asit amplifikasyon testi uygulamalarında pozitiflik belirlenen bazı olguların tüberküloz tanısı alıp, antitüberküloz tedaviye olumlu yanıt vermeleri testlerin önemini bir kat daha artırmaktadır. Çalışmamızda pulmoner örneklerde olduğu gibi ekstrapulmoner örneklerde de AMTDT'nin son derece duyarlı ve özgül bir test olduğu belirlendi. Ancak AMTDT'nin diğer tüm nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinde olduğu gibi kültür yöntemleri ile birlikte kullanılma zorunluluğu bulunmaktadır. İleriki dönemlerde antimikrobakteriyel ilaçlara direncin belirlenmesinde nükleik asit amplifikasyon tekniklerinin klinik laboratuvarlarda kolaylıkla uygulanabilir hale gelmesi bu yöntemlerin değerini kat kat artıracaktır.

6. KAYNAKLAR

1. Haas DW, Prez RM. Mycobacterium tuberculosis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Principles and Practice of Infectious Diseases (4th ed). Vol 2. Churchill Livingstone Inc, Washington DC 1995, pp 2213-2243.
2. Metchock BG, Nolte FS, Wallace RJ. Mycobacterium. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH (eds), Manual of Clinical Microbiology (7th ed). American Society for Microbiology, Washington DC 1999, pp 399-437.
3. Winters RE. Guidelines for preventing the transmission of tuberculosis: A better Solution? Clin Infect Dis 1994; 19: 309-310.
4. Sepkowitz KA. How contagious is tuberculosis. Clin Infect Dis 1996; 23: 954-962.
5. Harries AD, Maher D. TB/HIV, A Clinical Manual. World Health Organization, 1996, pp 19-101.
6. Gedikoğlu S. Türkiye'de Mikobakteri laboratuvarlarının durumu, Güncel durum nasıldır? 2. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu Bildiri Kitabı, ss 52-64, 21-22, Nisan 1998, TÜBİTAK Feza Gürsey Salonu, Ankara.
7. Çalışır HC, Őipit T, Öğretensoy M. Tüberküloz: tanı ve tedavisi. Tüberküloz ve Toraks Dergisi 1998; 46 (1): 81-89.

8. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, et al. The resurgence of tuberculosis: Is your laboratory ready? *J Clin Microbiol* 1993; 31(4): 767-770.
9. Catanzaro A, Davidson BL, Fujiwara PL, et al. Rapid diagnostic tests for tuberculosis what is the appropriate use! *AM J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1804-1814.
10. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Stanley JT, Williams ST. The Mycobacteria. In: Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Stanley JT, Williams ST (eds), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9 th ed) Williams and Wilkins, Baltimore 1994, pp 597-603.
11. Wayne LG, Kubica GP. Mycobacteria. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol:2* Williams and Wilkins, Baltimore 1986, pp 1435-1457.
12. Kocabaş A. Akciğer Tüberkülozu. In: Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (eds), *İnfeksiyon Hastalıkları Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., İstanbul 1996, ss 396-443.*
13. Kıyan M. Mycobacteriaceae. In: Ustaçelebi Ş. (ed), *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi Ltd, Ankara 1999, ss 419-455.*
14. Saniç A, Çoban AY. Mikobakteriler ve Laboratuvar Tanı. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun 1999, ss 1-88.*
15. Bilgehan H. Mycobacteriumlar (2 nd ed). *Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları, İzmir 1995, ss 567-578.*
16. Eisenstadt J, Hall GS, Gibson SM, Dunbar DF. Mycobacterium tuberculosis and other nontuberculosis Mycobacteria. In: Mahon CR, Manuselis G (eds), *Textbook of Diagnostic Microbiology. WB Saunders, Philadelphia 1995, pp 635-673.*
17. Della-Latta P, Weitzman I. Mycobacteriology. In: Isenberg HD (ed), *Essential Procedures for Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. Washington DC 1998, pp 169-203.*
18. Aygen B, Doğanay M. Akciğerin Tüberküloz Dışı Mikobakteri İnfeksiyonları. In: Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (eds), *İnfeksiyon Hastalıkları. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., İstanbul 1996, ss 443-448.*

19. Arnold LJ, Hammond PW, Wiese WA, Nelson NC. Assay formats involving acridinium-ester-labeled DNA probes. *Clin Chem* 1989; 35 (8): 1588-1594.
20. Lee LH, Le Vea CM, Graman PS. Congenital tuberculosis in a neonatal intensive care unit: case report, epidemiological investigation, and management of exposures. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 474-477.
21. Sultan N. Mycobacterium tuberculosis'in virulans faktörleri, 2. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu Bildiri Kitabı, ss 10-19, 21-22 Nisan 1998, TÜBİTAK Feza Gürsey Salonu, Ankara.
22. Orme IM, Andersen P, Boom WH. T cell response to Mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis* 1993; 167: 1481-97.
23. Kılıçturgay K. Tüberkülozda immünopatogenez. *İnfeksiyon Dergisi* 1997 (ek yayın-suppl); 11 (4): 7-12.
24. 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.
25. Mehra V, Gang J, Iyer D, Lin YG, Boylen T, Bloom BR, Bares PF. Immune response to recombinant mycobacterial proteins in patients with tuberculosis infection and disease. *J Infect Dis* 1996; 174: 431-434.
26. Freedman AG, Martin JM, Riska PF, Bloom BR, Casa de Vall A. 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.
27. Julian A, Matas L, Ausina V, Laquin M. Detection of lipoarabinomannan antibodies in patients with newly acquired tuberculosis and patients with relapse tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1997; 35 (10) : 2663-2664.
28. Gedikoğlu S. Mycobacterium tuberculosis'in hücre yapısı. *İnfeksiyon Dergisi* 1997 (ek yayın-suppl); 11 (4): 13-18.
29. Aygen B, Doğanay M. Ekstrapulmoner tüberküloz, In: Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (eds), *İnfeksiyon Hastalıkları*. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., İstanbul 1996, ss 448-454.

30. Kundakçı N, Taşpınar A. Lepra ve Diğer Mikobakteriyel Deri Enfeksiyonları. In: Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (eds), *İnfeksiyon Hastalıkları*. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., İstanbul 1996, ss 803-816.
31. Doğanay M, Aygen B. Tüberküloz menenjit. In: Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (eds), *İnfeksiyon Hastalıkları*. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., İstanbul 1996, ss 879-882.
32. Lang AM, Iglesias JF, Pena C, et al. Clinical evaluation of the Gen-Probe Amplified Direct test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in cerebrospinal fluid. *J. Clin Microbiol* 1998; 36(8): 2191-2194.
33. Esteban J, Molleja A, Fernandez-Roblas R, Sorian of. Number of days required for recovery of *Mycobacteria* from blood and other samples. *J Clin Microbiol* 1998; 36 (5); 1456-1457.
34. Wrigt PW, Wallace RJ, Wright NW, Brown BA, Griffith DE. Sensitivity of fluorochrome microscopy for detection of *Mycobacterium tuberculosis* versus nontuberculous mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1998; 36 (4): 1046-1049.
35. Mc Carter YS, Robinson A. Detection of acid fast bacilli in cocentrated primary specimen smears stained with rhodamine –auramine at room temperature and at 37°C. *J. Clin Microbiol* 1994; 32(10): 2487-2489.
36. Miöner H, Ganlöv G, Yohannes Z, Adane Y. Improved sensitivity of direct microscopy for acid fast bacilli: Sedimentation as an alternative to centrifugation for concentration of tubercle bacilli. *J Clin Microbiol* 1996; 34 (12): 3206-3207.
37. Stone BL, Burman WJ, Hildred MV, et all. The diagnostic yield of acid-fast bacillus smear-positive sputum specimens. *J Clin Microbiol* 1997: 35(4): 1030-1031.
38. Siddiqi SH: *Bactec 460 TB System: Products and procedure manual*, revision D. Becton Dickinson and Company, Sparks, Md. 1995.
39. Anargyros P, Astill DSJ, Lim ISL. Comparison of improved BACTEC and Löwenstein-Jensen media for culture of mycobacteria from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1990; 28 (6): 1288-1291.

40. Rohner P, Ninet B, Metral C, et al. Evaluation of the MB/BacT system and comparison to the BACTEC 460 system and solid media for isolation of mycobacteria from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1997; 35(12): 3127-3131.
41. Griethuysen AV, Jansz AR, Buiting AGM. Comparison of fluorescent BACTEC 9000 MB system, septic-check AFB system, and Löwenstein-Jensen medium for detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1996; 34(10): 2391-2394.
42. Springer B, Stockman L, Teschner K, Roberts GD, Böttger EC. Two laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: Molecular versus phenotypic methods. *J Clin Microbiol* 1996; 34 (2); 296-303.
43. Kirchner P, Springer B, Voger U, et al. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: Report of a 2 year experience in a clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1993; 31(11): 2882-2889.
44. Badak S, Göksel S, Sertoz R, Nafie B, et al. Use of nucleic acid probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from MB/BacT bottles. *J Clin Microbiol* 1999; 37(5): 1602-1605.
45. Labombardy VJ, Carter L, Masserella S. Use of nucleic acid probes to identify mycobacteria directly from Difco ESP-Myco bottles. *J Clin Microbiol* 1997; 35(4): 1002-1004.
46. Tortoli E, Simonetti MT, Lavinia F. Evaluation of reformulated chemiluminescent DNA probe (Accu Probe) for culture identification of *M. kansasii*. *J Clin Microbiol* 1996; 34(11): 2838-2840.
47. Böddinghaus B, Rogall T, Flohr T, Blöcker H, Böttger E. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol* 1990; 28(8): 1751-1759.
48. Schochetman G, Ou CY, Jones WK. Polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1988; 158 (6): 1154-1157.
49. Telenti A, Marchesi F, Balz M, et al. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1993; 31 (2): 175-178.

50. Hellyer TJ, Desjardin LE, Assaf MK, et al. Specificity of IS 6110 based amplification assays for *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 1996; 34 (11): 2843-2846.
51. Kox LFF, Rhienthong D, Miranda AM, et al. A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1994; 32 (3): 672-678.
52. Noordhoek GT, Kolk AHJ, Bjune G, et al. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. *J Clin Microbiol* 1994; 32 (2): 277-284.
53. Kam KM, Yip W, Chan MY, et al. IS 6110 Dot blot hybridization for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999, 33: 13-18.
54. Kalpaklıoğlu AF, Hızal N, Kara H, Özdemir N. Tüberküloz tanısında polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) klinik uygulaması. *Diyaliz/Transplantasyon ve Yanık* 1996; 9 (1): 1-7.
55. Gamboa F, Monterola JM, Vinado B, et al. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in nonrespiratory specimens by Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test. *J Clin Microbiol* 1997; 35 (1): 307-310.
56. Wobeser WL, Krajden M, Conly J, et al. Evaluation of Roche Amplicor PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1996; 34 (1): 134-139.
57. Damato RF, Wallman AA, Hochstein LH, et al. Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis by using Roche Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* PCR test. *J Clin Microbiol* 1995; 33 (7): 1832-1834.
58. Doern GV. Diagnostic Mycobacteriology: Where are we today? *J Clin Microbiol* 1996; 34 (8): 1873-1876.
59. Pfyffer GE, Kissling P, Wirth R, Weber R. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens by a target-amplified test system. *J Clin Microbiol* 1994; 32 (4): 918-923.
60. Gen-Probe. Amplified *M. tuberculosis* Direct test for *in vitro* diagnostic use: 50 test kit (revised package insert). Gen-Probe, San Diego, California. 1999.

61. Gamboa F, Fernandez G, Padilla E, et al. Comparative evaluation of initial and new versions of the Gen-Probe Amplified Mycobacterium tuberculosis direct test for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory and nonrespiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1998; 36 (3): 684-689.
62. Pfyffer GE, Kissling P, Jahn EMI, et al. Diagnostic performance of amplified Mycobacterium tuberculosis direct test with cerebrospinal fluid, other nonrespiratory, and respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1996; 34 (4): 834-841.
63. Chedore P, Jamieson FB. Routine use of the Gen-Probe MTD2 Amplification test for detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical specimens in a large public health Mycobacteriology laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 35: 185-191.
64. Ehlers S, Ignatius R, Regnath T, Hahn H. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by Gen-Probe Amplified Mycobacterium tuberculosis direct test. *J Clin Microbiol* 1996; 34 (9):2275-2279.
65. Zwadyk P, Down JA, Myers N, Dey MS. Rendering of mycobacteria safe for molecular diagnostic studies and development of a lysis method for strand displacement amplification and PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 32 (9): 2140-2146.
66. Hellyer TJ, Des Jardin LE, Teixeira L, et al. Detection of viable Mycobacterium tuberculosis by reverse transcriptase-strand displacement amplification of mRNA. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (3): 518-523.
67. Pfyffer GE, Kissling PF, Rundler E, Weber R. Performance characteristics of the BD Probe Tec system for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (1): 137-140.
68. Piersimoni C, Callegaro A, Scarparo C, et al. Comparative evaluation of the new Gen-Probe Mycobacterium tuberculosis Amplified Direct test and semiautomated Abbott LCX M. tuberculosis Assay for direct detection of M. tuberculosis complex in respiratory and nonrespiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1998; 36 (2): 3601-3604.
69. Moore DF, Curry JI. Detection and identification of Mycobacterium tuberculosis directly from sputum sediments by ligase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1998; 36 (4) : 1028-1031.

70. Hellyer IJ, Des Jardin LE, Hehman GL, et al. Quantitative analysis of mRNA as a marker for viability of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (2): 290-295.
71. Maher D, Numan P. Evaluation and determinants of outcome of tuberculosis treatment. *Bull WHO* 1998; 76 (3): 307-308.
72. Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V. Bağımlı gruplarda ki-kare testi (Mc Nemar). *Biyostatistik. Özdemir Yayıncılık*, 4. Baskı, Ankara 1993, s 174.
73. Maurer SS, Kalkut GE. Environmental control of tuberculosis: Continuing controversy. *Clin Infect Dis* 1994; 19: 299-308.
74. Piersimoni C, Callegaro A, Nista D, et al. Comparative evaluation of two commercial amplification assays for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1997; 35 (1): 193-196.
75. Bradly SP, Reed SL, Catanzaro A. Clinical efficacy of amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *AM J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 1606-1610.
76. Uzun M. Tüberküloz tanısında Ehrlich-Ziehl-Neelsen, fluorokrom boyama yöntemleri ile Bactec ve Löwenstein-Jensen, kültür yöntemlerinin sonuçlarının değerlendirilmesi. (Doktora tezi). İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 1994.
77. Bergmann JS, Yuoh G, Fish G, Woods GL. Clinical evaluation of the enhanced Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for rapid diagnosis of tuberculosis in prison inmates. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (5): 1419-1425.
78. Bodmer T, Gurtner A, Schopfer K, Matter L. Screening of respiratory tract specimens for the presence of *Mycobacterium tuberculosis* by using the Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test. *J Clin Microbiol* 1994; 32 (6): 1483-1487.
79. Jonas V, Alden MJ, Curry JI, et al. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol* 1993;31(9):2410-2416.

80. Koç N, Özcan M, Özbal Y, Fazlı ŞA. Comparison of Bactec TB system and conventional methods for recovery of *Mycobacterium tuberculosis* from clinical specimens. *Infeksiyon Dergisi* 1996; 10 (1): 65-67.
81. Vuorinen P, Miettinen A, Vuento R, Hallstrom A. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens by Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test and Roche Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* test. *J Clin Microbiol* 1995; 33 (7): 1856-1859.
82. Dalovisio JR, Montenegro JS, Kemanerly SA, et al. Comparison of the amplified *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) direct test, Amplicor MTB PCR, and IS 6110-PCR for detection of MTB in respiratory specimens. *J Clin Infect Dis* 1996; 23: 1099-1106.
83. Tortoli E, Tronci M, Passerini TC, et al. Multicenter evaluation of two commercial amplification kits (Amplicor, Roche and LCX, Abbott) for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and extrapulmonary specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 33: 173-179.
84. An QI, Baxton D, Hendricks A, et al. Comparison of Amplified Q β replicase and PCR Assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1995; 33 (4) : 860-867.
85. Down JA, Connell MA, Dey MS, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens by strand displacement amplification of DNA. *J Clin Microbiol* 1996; 34 (4): 860-865.
86. Smith JH, Buxton D, Cahill P, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum by using a prototype automated Q-Beta Replicase assay. *J Clin Microbiol* 1997; 35 (6) : 1477-1483.
87. Ichiyama S, Ito Y, Suqiura F, et al. Diagnostic value of the strand displacement amplification method compared to those of Roche Amplicor PCR and culture for detecting mycobacteria in sputum samples. *J Clin Microbiol* 1997; 35 (12): 3082-3085.

88. Yıldırım ŞT, Aydoğan H , Gün H. Smear pozitif örneklere yapılan nükleik asit prob (MTD, Gen-Probe) ve PCR çalışmasından elde edilen sonuçlar. 2. Ulusal Mikobakteri Simpozyumu Bildiri Kitabı.ss 157 , 21-22 Nisan 1998 , TÜBİTAK Feza Gürsey Salonu , Ankara.
89. Ichiyama S, Iinuma Y, Tawada Y, et al. Evaluation of Gen-Probe Amplified Mycobacterium tuberculosis direct test and Roche PCR-Microwell plate hybridization method (Amplicor Mycobacterium) for direct detection of mycobacteria. J Clin Microbiol 1996; 34 (1): 130-133.
90. Bodmer T, Möck LE, Mühlemann K, Matter L. Improved performance of Gen-Probe amplified Mycobacterium tuberculosis direct test when 500 instead of 50 microliters of decontaminated sediments used. J Clin Microbiol 1996; 34 (1): 222-223.



ÖZGEÇMİŞ

1971 yılında Kayseri'de doğdu. İlk orta ve lise öğrenimini T.E.D. Kayseri Koleji Vakfı Özel Lisesinde tamamladı. 1988 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde yüksek öğrenimine başladı. 1992 yılında üniversiteden mezun oldu ve aynı yıl Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalının açmış olduğu yüksek lisans programını kazanarak, öğrenimine devam etti. 1995 yılında, "Brusellozun Serolojik Tanısında Uygulanan Wright Aglütinasyon, Rose-Bengal ve Coombs Testlerinin Karşılaştırılması" adlı tezi ile bilim uzmanı oldu. Aynı yıl Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalının açmış olduğu doktora programı sınavını kazanarak eğitime devam etti. Halen Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak görevini sürdürmektedir.