

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI

***MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* KOMPLEKS  
VE RİFAMPİSİN DİRENCİNİN  
SAPTANMASINDA HIZLI MOLEKÜLER  
YÖNTEMLE KONVANSİYONEL  
YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI**

DR. EMRE ÖZKARATAŞ

UZMANLIK TEZİ

İZMİR – 2017

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI

***MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* KOMPLEKS  
VE RİFAMPİSİN DİRENCİNİN  
SAPTANMASINDA HIZLI MOLEKÜLER  
YÖNTEMLE KONVANSİYONEL  
YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI**

DR. EMRE ÖZKARATAŞ

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ

PROF.DR. NURAN ESEN

## TEŐEKKÜR

Asistanlığım boyunca ve tezimin tamamlanması için geçen süreçte bilgi ve deneyimlerini benimle paylaŐan, desteğini ve çabasını benden esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Nuran ESEN'e, eğitimime katkılarından dolayı baŐta Anabilim Dalı BaŐkanımız Prof. Dr. İbrahim Mehmet Ali ÖKTEM olmak üzere tüm değerli hocalarıma, aynı çalışma ortamını paylaşmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaŐlarıma, bu süreci beraber geçirdiğim merkez laboratuvarı ve anabilim dalındaki çalışma arkadaŐlarıma, yardımları, dostlukları ve bilgi paylaŐımlarından dolayı Dr. Müge Hacer ORHAN, Dr. Yasin SAĞLAM, Dr. Abdurrahman GÜLMEZ, Uzm.Dr. Özgür APPAK, Biyolog Feryal UYSAL ve Macide OYLUM'a çok teŐekkür ederim.

Beni yetiŐtiren, her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen sevgili aileme çok teŐekkür ederim.

Dr. Emre ÖZKARATAŞ

## İÇİNDEKİLER

<b>İÇİNDEKİLER LİSTESİ</b>	<b>I</b>
<b>SEKİL LİSTESİ</b>	<b>III</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b>	<b>IV</b>
<b>KISALTMALAR</b>	<b>V</b>
<b>1. ÖZET</b>	<b>1</b>
<b>2. SUMMARY</b>	<b>3</b>
<b>3. GİRİŞ VE AMAC</b>	<b>5</b>
<b>4. GENEL BİLGİLER</b>	<b>7</b>
<b>4.1. Tarihçe</b>	<b>7</b>
<b>4.2. Dünyada ve Türkiye’de Tüberküloz Epidemiyolojisi</b>	<b>9</b>
<b>4.3. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>’in Genel Özellikleri</b>	<b>13</b>
<b>4.4. Bulaşma ve İmmunopatogenez</b>	<b>17</b>
<b>4.5. Laboratuvar Tanısı</b>	<b>19</b>
<b>4.5.1. Örneklerin Alınması ve İşlenmesi</b>	<b>19</b>
<b>4.5.2. Mikroskopik İnceleme</b>	<b>20</b>
<b>4.5.3. Kültür Yöntemleri</b>	<b>21</b>
<b>4.5.3.1. Katı Besiyerleri</b>	<b>22</b>
<b>4.5.3.1.1. Yumurta Bazlı Besiyerleri</b>	<b>22</b>
<b>4.5.3.1.2. Agar Bazlı Besiyerleri</b>	<b>22</b>
<b>4.5.3.2. Sıvı Besiyerleri</b>	<b>23</b>
<b>4.5.4. Kültürde <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleks’in Tanımlanması</b>	<b>24</b>
<b>4.5.4.1. Fenotipik Yöntemler</b>	<b>24</b>
<b>4.5.4.2. Genotipik Yöntemler</b>	<b>25</b>
<b>4.5.4.3. İmmünokromotografik Yöntemler</b>	<b>26</b>
<b>4.5.5. Klinik Örneklerden <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleks’in Tanısında Kullanılan Moleküler Yöntemler</b>	<b>26</b>
<b>4.5.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)</b>	<b>27</b>
<b>4.5.5.2. Gerçek Zamanlı PCR</b>	<b>28</b>
<b>4.5.5.3. İlmik Aracılı İzotermal Amplifikasyon (LAMP)</b>	<b>29</b>
<b>4.6. İlaç Direnci</b>	<b>30</b>
<b>4.6.1. İlaç Duyarlılık Testi</b>	<b>31</b>
<b>4.6.1.1. Fenotipik Yöntemler</b>	<b>31</b>

<b>4.6.1.1.1. Agar Proporsiyon Yöntemi</b>	<b>32</b>
<b>4.6.1.1.2. BACTEC MGIT 960 Ticari Sıvı Kültür Duyarlılık Yöntemi</b>	<b>33</b>
<b>4.6.1.2. Genotipik Yöntemler</b>	<b>33</b>
<b>5. GEREC VE YÖNTEM</b>	<b>36</b>
<b>5.1. Örnek Alımı ve Taşınması</b>	<b>36</b>
<b>5.2. Örnek İşleme</b>	<b>38</b>
<b>5.2.1. Dekontaminasyon İşlemi</b>	<b>38</b>
<b>5.2.1.1. İşlem Basamakları</b>	<b>38</b>
<b>5.2.2. Dekontaminasyon Uygulanmayan Örneklerin İşlenmesi</b>	<b>39</b>
<b>5.3. Mikroskopik İnceleme</b>	<b>40</b>
<b>5.3.1. Kinyoun Boyasının Hazırlanması</b>	<b>40</b>
<b>5.3.2. Preparatların Boyanma İşlemi</b>	<b>40</b>
<b>5.3.3. Preparatların Değerlendirilmesi</b>	<b>41</b>
<b>5.4. Kültür Yöntemleri</b>	<b>41</b>
<b>5.4.1. Katı Kültür Yöntemi</b>	<b>41</b>
<b>5.4.2. BACTEC MGIT 960 Sistemi</b>	<b>41</b>
<b>5.4.2.1. Pozitif Sinyal Veren BBL MGIT Tüplerinin İşlenmesi</b>	<b>42</b>
<b>5.4.2.2. MTK-TDM Ayrımının Yapılması</b>	<b>42</b>
<b>5.5. İlaç Duyarlılık Testi</b>	<b>43</b>
<b>5.6. GeneXpert MTB/RIF Yöntemi</b>	<b>44</b>
<b>6. BULGULAR</b>	<b>47</b>
<b>7. TARTIŞMA</b>	<b>53</b>
<b>8. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>62</b>
<b>9. KAYNAKLAR</b>	<b>63</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil 1.</b> 2015 yılı Dünyada tahmini TB insidans oranları	10
<b>Şekil 2.</b> Yeni olgulardaki ÇİD/RD-TB olgu yüzdeleri	11
<b>Şekil 3.</b> Daha önce tedavi alan hastalardaki ÇİD/RD-TB olgu yüzdeleri	11
<b>Şekil 4.</b> DSÖ Avrupa Bölgesi TB mortalite ve insidans hızı, 2000-2015	13
<b>Şekil 5.</b> Türkiye TB mortalite ve insidans hızı, 2000-2015	13
<b>Şekil 6.</b> Mikobakterilerin Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyama görüntüsü	15
<b>Şekil 7.</b> Mikobakteri hücre duvar yapısı	17
<b>Şekil 8.</b> Örneklerin kültür, mikroskopi ve GX testi sonuçları	49



## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> Karbol fuksin ve florokrom yöntemiyle boyanmış preparatların değerlendirilmesi ve sonuçların bildirilmesi	21
<b>Tablo 2.</b> BBL MGIT tüplerine eklenen ilaç konsantrasyonları	43
<b>Tablo 3.</b> Örneklerin yıllara ve alındığı bölgeye göre dağılımı	47
<b>Tablo 4.</b> Solunum yolu örneklerinin yıllara ve örnek türüne göre dağılımı	48
<b>Tablo 5.</b> Solunum yolu dışı örneklerin yıllara ve örnek türüne göre dağılımı	48
<b>Tablo 6.</b> Örnek türlerinin kültür, mikroskopi ve GX testi sonuçları	50
<b>Tablo 7.</b> Kültür referans yöntem alınarak MTK saptanmasında GX testinin duyarlılık, özgüllük ve öngörü değerleri	51
<b>Tablo 8.</b> Kültür referans yöntem alınarak MTK saptanmasında mikroskobik incelemenin duyarlılık, özgüllük ve öngörü değerleri	51
<b>Tablo 9.</b> MGIT SIRE yöntemi ve GX testi ile elde edilen RIF duyarlılık sonuçları	52

## KISALTMALAR

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

AIDS: Edinilmiş Bağışıklık Yetmezliği Sendromu – “*Acquired Immun Deficiency Sendrom*”

AMS: Açlık mide sıvısı

ARB: Aside dirençli bakteri

BAL: Bronkoalveolar lavaj

BCG: *Bacille Calmette-Guerin*

BL: Bronş lavaj

BOS: Beyin omurilik sıvısı

CDC: Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi – “*Centers for Disease Control and Prevention*”

CFU: Koloni oluşturan birim – “*colony forming unit*”

Ct: Döngü eşiği – “*cycle threshold*”

ÇİD-TB: Çok ilaca dirençli-TB

DGTS: Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

EMB: Etambutol

EZN: Ehrlich-Ziehl-Neelsen

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi – “*Food and Drug Administration*”

GU: Üreme indeksi – “*growth unit*”

GX: GeneXpert MTB/RIF

HIV: *Human Immunodeficiency Virus*

INH: İsoniazid

İDT: İlaç duyarlılık testi

LAMP: İlmik aracılı izotermal amplifikasyon - “*Loop-mediated isothermal amplification*”

LJ: Löwenstein-Jensen

LPA: Ters hibridizasyon testi – “*Line probe assay*”

MGIT: *Mycobacteria growth indicator tube*

MTK/MTC: *Mycobacterium tuberculosis* kompleks

NALC: N-asetil-L-sistein

NaOH: Sodyum hidroksit



NÖD: Negatif öngörü değeri  
OADC: Oleik asit-albümin-dekstroz-katalaz  
OT: *Old tuberculin*  
PANTA: Polimiksin B, amfoterisin B, nalidiksik asit, trimetoprim, azlosilin  
PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu – “*polymerase chain reaction*”  
PÖD: Pozitif öngörü değeri  
PPD: Pürifiye protein türevi  
PZA: Pirazinamid  
RD-TB: RIF dirençli-TB  
RIF: Rifampisin  
RRDR: RIF direncini belirleyen bölge – “*rifampicin resistance determining region*”  
RT-PCR: Gerçek zamanlı-PCR – “*real time-PCR*”  
SIRE: Streptomisin-İzoniazid-Rifampisin-Etambutol  
SM: Streptomisin  
TB: Tüberküloz  
TDM: Tüberküloz dışı mikobakteri  
TS: Trakeal sekret  
ÜK: Üreme kontrol  
YİD-TB: Yaygın ilaç dirençli-TB

## 1. ÖZET

### ***Mycobacterium tuberculosis* kompleks ve rifampisin direncinin saptanmasında hızlı moleküler yöntemle konvansiyonel yöntemlerin karşılaştırılması**

Bu çalışmada, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda kullanılan GeneXpert MTB/RIF (GX) testinin *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTK) tanısı ve rifampisin (RIF) direncinin saptanmasındaki performansının mikroskopi ve kültür yöntemleri ile karşılaştırılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikobakteriyoloji Birimine, Haziran 2012 ile Kasım 2016 tarihleri arasında, tüberküloz (TB) ön tanısı ile 12086 klinik örnek gönderilmiştir. Bunlardan 1361'i solunum yolu, 2838'i solunum yolu dışı olmak üzere toplam 4199 örneğe klinik istem doğrultusunda Kinyoun boyalı mikroskopik inceleme ve kültür yöntemleri ile birlikte GX testi de çalışılmış ve elde edilen sonuçlar retrospektif olarak değerlendirilmiştir. GX testi ve Kinyoun boyalı mikroskopik inceleme sonuçları, kültür sonuçları (BACTEC MGIT 960 sistemi ve Löwenstein-Jensen besiyeri) ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. GX testi ile elde edilen RIF direncini belirleyen mutasyon sonuçları ile kültürde MTK üremesi saptanan izolatların RIF duyarlılığı MGIT 960 yöntemi ile karşılaştırılmıştır.

MTK saptanmasında kültür yöntemleri referans alındığında; GX testinin duyarlılığı %74.5, özgüllüğü %99.1, pozitif öngörü değeri (PÖD) %68.9 ve negatif öngörü değeri (NÖD) %99.3 olarak bulunmuştur. GX testinin duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla; solunum yolu örnekleri için %82.7 ve %98.7; solunum yolu dışı örnekler için ise %67.2 ve %99.3 olarak hesaplanmıştır. GX testinin mikroskopik incelemede ARB pozitif örneklerde duyarlılığı %100 ve özgüllüğü %64.3; ARB negatif örneklerde ise duyarlılığı %69.6 ve özgüllüğü %99.2 olarak belirlenmiştir. Mikroskopik incelemenin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla; tüm örnekler için %16.4 ve %99.7; solunum yolu örnekleri için %28.8 ve %99.2; solunum yolu dışı örnekler için %5.2 ve %99.9 olarak hesaplanmıştır. Tüm örneklerde ve solunum yolu ile solunum yolu dışı örneklerde GX testi ile mikroskopik incelemenin duyarlılıkları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.001$ ). MGIT yöntemi ile elde edilen RIF duyarlılık sonuçları referans alındığında, GX testinin RIF direncini saptamadaki duyarlılığı %100, özgüllüğü %95.8, PÖD %25 ve NÖD %100 olarak hesaplanmıştır.

Sonuç olarak, GX testinin özellikle mikroskopik incelemede ARB görülen örneklerde güvenilirliği yüksek olup, kolay uygulanabilirliği, iki saat içinde doğrudan klinik örnekten MTK DNA'sı ve RIF direncini birlikte saptayabilmesi, mikroskopik incelemeye göre duyarlılığının daha yüksek olması göz önünde bulundurulduğunda TB hızlı tanısında yararlı bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak, test sonuçlarının daima kültür ve fenotipik ilaç duyarlılık testi sonuçlarıyla doğrulanması önerilmektedir.

**Anahtar kelimeler:** *Mycobacterium tuberculosis* kompleks, GeneXpert MTB/RIF, moleküler tanı, tüberküloz



## 2. SUMMARY

### **Comparison of a rapid molecular method with conventional methods for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and rifampicin resistance**

The objective of this study was to evaluate the performance of the Gene-Xpert MTB/RIF (GX) assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) and rifampicin (RIF) resistance and compare with microscopy and culture methods in Dokuz Eylul University Hospital Central Laboratory.

12086 clinical samples were sent to the Mycobacteriology Unit of Dokuz Eylül University Hospital Central Laboratory with preliminary tuberculosis (TB) diagnosis, between June 2012 and November 2016. A total of 4199 specimens, 1361 of which were pulmonary and 2838 of which were extra pulmonary were stained by Kinyoun method for microscopic examination and applied culture methods in addition to GX test. Results were evaluated retrospectively. GX test and Kinyoun stained microscopic examination results were compared with culture results (BACTEC MGIT 960 system and Lowenstein-Jensen medium). The isolates identified in culture as MTC were evaluated by MGIT 960 method for RIF sensitivity testing.

For the detection of MTC; sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of GX assay were 74.5%, 99.1%, 68.9% and 99.3%, respectively when culture results were used as reference. The sensitivity and specificity of GX test were 82.7% and 98.7% for pulmonary specimens; 67.2% and 99.3% for extra pulmonary specimens, respectively.

The sensitivity and specificity of GX test for acid-fast bacilli (AFB) positive samples were 100% and 64.3%, and for AFB negative samples were 69.6% and 99.2%, respectively. The sensitivity and specificity of microscopic examination were 16.4% and 99.7% for all specimens, 28.8% and 99.2% for pulmonary; and 5.2% and 99.9% for extra pulmonary specimens, respectively. The difference between the sensitivities of the GX assay and the microscopic examination was found to be statistically significant ( $p < 0.001$ ) for all samples, pulmonary and extra pulmonary samples.

For the detection of RIF resistance; sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of GX test were 100%, 95.8%, 25% and 100%, respectively, when MGIT method used as gold standard.

In conclusion, GX assay is a useful assay for rapid diagnosis of tuberculosis considering that the test is reliable for the diagnosis of TB especially for AFB smear-positive samples. GX test is easy to apply and directly detects MTC DNA and resistance to RIF within 2 hours and is superior in sensitivity than microscopic examination. However, test results should always be confirmed by culture and phenotypic drug susceptibility test methods.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis* complex, GeneXpert MTB/RIF, molecular diagnosis, tuberculosis



### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Tüberküloz (TB), her yıl milyonlarca insanda hastalık ve dünya çapında “*Human Immunodeficiency Virus*” (HIV) ile birlikte önde gelen ölüm nedeni olan küresel bir halk sağlığı problemidir. 2015 yılında yaklaşık 10.4 milyon yeni TB vakasının mevcut olduğu, TB nedeniyle 1.4 milyon ölüm olduğu tahmin edilmektedir. Ülkemizde 2015 yılı verilerine göre TB’nin insidans hızı yüz binde 18 ve mortalite hızı yüz binde 0.96 olarak verilmiştir (1).

Rifampisin (RIF) ve izoniazidin (INH) tedavide yanlış kullanımı ile en az bu ilaçlara direnci tanımlayan çok ilaca dirençli-TB (ÇİD-TB), sıklıkla tedavi başarısızlığı ve relapslarla sonuçlanarak halk sağlığını tehdit etmektedir. ÇİD-TB aynı zamanda ek olarak bir kinolon ve bir parenteral ilaca (kapreomisin, kanamisin, amikasin) da direncin olduğu yaygın ilaç dirençli-TB (YİD-TB) için de risk faktörüdür. Bu iki durum dünya çapında TB ve HIV kontrol programlarını olumsuz etkilemektedir (2,3). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından, diğer ilaçlara direnç olsun veya olmasın RIF dirençli-TB (RD-TB) olgularının yönetimi ve tedavi yaklaşımlarının ÇİD-TB olgularındaki gibi olması gerektiği yayınlanmıştır (1).

Küresel TB 2016 Raporu’nda, dünya çapında önceden tedavi edilmiş vakaların yaklaşık %21’inde ve yeni TB vakalarının yaklaşık %3.9’unda, Türkiye’de ise yeni TB olgularının %3.6’sında ÇİD/RD-TB olduğu bildirilmiştir (1).

TB tanısında mikroskopik inceleme ile aside dirençli bakteri (ARB) aranması, hızlı ve ucuz olmasına karşın düşük duyarlılığa sahiptir. Kültür tanıda altın standarttır ve ilaç duyarlılık testi (İDT) kültür yöntemleriyle yapılmaktadır. Ancak kültürün sonuçlanması 2-8 hafta kadar zaman almakta ve ek biyogüvenlik önlemleriyle eğitilmiş personel gerektirmektedir (4,5). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi – “*Centers for Disease Control and Prevention*” (CDC) örnek alınımından sonra 30 gün içinde İDT sonuçlarının rapor edilmesi gerektiğini bildirmektedir (2).

*Mycobacterium tuberculosis* ilaç direncinin ve ÇİD/RD-TB suşlarının hızlı tanısı TB hastalarının etkili tedavisini sağlamak ve direnç gelişimini sınırlamaktadır (2). Bu nedenle standardize edilmiş, özgüllük ve duyarlılığı yüksek, güvenilir ve hızlı yöntemlerin kullanımına ihtiyaç duyulmaktadır. Günümüzde, tedaviye daha erken başlama imkanı ve daha etkin halk sağlığı müdahalelerine olanak sağlamak amacıyla polimeraz zincir reaksiyonu – *polymerase chain reaction* (PCR) gibi moleküler yöntemler, klinik örnekten hızlı tanıyı desteklemek üzere kullanılmaya başlanmıştır (4,5).

Moleküler çalışmalarla RNA polimerazın beta-alt ünitesini kodlayan rpoB geninin *M. tuberculosis*'de RIF direnciyle ilişkili ana hedef olduğu tanımlanmıştır (6). Son yıllarda geliştirilen GeneXpert MTB/RIF (GX) testi (Cepheid, Sunnyvale, CA), gerçek zamanlı-PCR – *real time*-PCR (RT-PCR) yöntemiyle, klinik örnekte hem *M. tuberculosis* varlığını hem de rpoB geninde RIF direncini göstermekte, uygulaması kolay olan bu yöntem yaklaşık iki saat içinde sonuç vermektedir (5).

Bu çalışmada, Haziran 2012'den itibaren Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda kullanılan GX testinin *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTK) tanısı ve RIF direncinin saptanmasındaki performansının mikroskopi ve kültür yöntemleri ile karşılaştırılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.



## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Tarihçe

TB, geçmişi insanlık tarihi kadar eskilere dayanan ve insanlıkla iç içe bir enfeksiyon hastalığıdır. İnsanların mikobakterilerle ilk karşı karşıya gelişinin, M.Ö. 8000 yıllarında ilk yerleşik hayata geçiş ve sığırların evcilleştirilmesiyle birliktelik gösterdiği düşünülmektedir (7,8). Milyonlarca yıl önce Kuzey Afrika’da ortaya çıktığı kabul edilen ilk insan grupları, sığırlar aracılığıyla *Mycobacterium bovis* ile karşılaşmış ve verem hastalığına yakalanmıştır. Afrika’dan daha iyi yaşam koşullarına sahip olma amacıyla Nil Vadisi’ne, Avrupa’ya ve sonra diğer kıtalara göç eden insanlar ve beraberindeki hayvanlar ile mikobakteriler de yayılım göstermiştir (9). Mısır, Hindistan ve Çin’de sırasıyla 5000, 3300 ve 2300 yıl öncesine ait TB düşündüren izlere rastlanmıştır. Mısır mumyalarında TB’ye ait pott deformiteleri gibi tipik iskelet anormallikleri bulunmuş, doku kalıntılarından *M. tuberculosis* DNA’sının çoğaltılması iskelet hastalıklarının nedeni konusunda şüphe bırakmamıştır (10,11).

TB basilinin yaptığı hastalık “Tüketim Hastalığı” olarak da bilinmektedir. Kapadokya’lı Arateus, veremlileri “*Sesleri kısık, bedenleri erimiş olduğundan kemikleri belirginleşmiştir. Gözler soluk ve çökük. Yüzü kadavra gülüşü gibi. Kol ve bacak kasları erimiş*” gibi ifadelerle tanımlamıştır. Önceleri ‘fitizis’ (balgamli öksürük ve hırıltı) olarak bilinen TB’den beyaz ölüm, beyaz veba, ülkemizde ise ince hastalık, teverrüm, zaafiyet, duman olarak da bahsedilmektedir (9).

Andreas Vesalius (M.S.1514-1564) fitizisli hastaların otopsilerinde kaviter lezyonların bulunduğunu rapor etmiştir. F. Sylvius (1614-1672) ise TB nedeniyle ölen hastaların akciğerlerinde küçük sert nodüllerin bulunduğunu belirterek bunları ‘tüberkül’ olarak adlandırmıştır (7,8).

On yedinci ve 18. yüzyıllarda sanayi devrimi; yoksul, yetersiz beslenen ve kalabalık barınma koşullarında yaşayan insanların sayısında artışa ve TB salgınının genişlemesine neden olmuştur. On dokuzuncu yüzyılda, hastalığın anlaşılmasında çok önemli gelişmeler ortaya çıkmıştır. A. Willemin 1865 yılında TB’li hastaların kaviterlerinden alınan örnekleri tavşanlara inoküle ederek TB geliştiğini ortaya koymuştur (7). Robert Koch (1843-1910); 1882 yılında Berlin Fizyoloji Derneği’nde TB’nin sebebini keşfettiğini duyurmuştur. Aynı yıl, deneyleri yaparken çalışmalarını doğrulamak amacıyla, bir organizmanın bir hastalığın nedeni olduğunu belirleyebilmek için gerekli gördüğü bugün “Koch postülatı” olarak bilinen



sistematik metodolojiyi tanımlamıştır. Koch 1890 yılında *M. tuberculosis* ekstresi olan “old tuberculin”i (OT) geliştirmiş ve bu keşif TB için kür sağlamada başarısız olsa da alerji ve immünite üzerine sonraki araştırmalar için öncü olmuştur (12).

1908-1919 yılları arasında Fransa’da Calmette ve Guerin isimli araştırmacılar tarafından 230 pasajla “*Bacille Calmette-Guerin*” (BCG) geliştirilmiştir. İlk olarak 1921 yılında insanlara uygulanan BCG günümüzde hala dünya çapında kullanılmaktadır (11,13). 1939 yılında Florence Seibert ve Glenn, old tüberkülini saflaştırmış ve elde ettikleri pürifiye (saflaştırılmış) protein türevi (PPD) ile TB enfeksiyonunun varlığı tespit edilmeye başlanmıştır (7,8).

TB hastası olan botanik öğrencisi Hermann Brehmer (1826-1889) Himalayalar’daki çalışmaları sonrası kür sağlamış ve 1854 yılında Gorbardsdorf’da hastalara temiz hava ve iyi beslenme imkanının sağlandığı hastaneyi kurmuştur. Bu hastane tüm sanatoryumlar için model oluşturmuş, TB tedavisinde farklı bir yaklaşımla Amerika ve Avrupa’da sanatoryumlar giderek yaygınlaşmıştır. Sanatoryumlar hasta kişilerin toplumdan izolasyonunu sağlamış ve hastalara iyileşme sürecinin parçası olarak yatak istirahati, egzersiz, temiz hava ve iyi beslenme hizmetleri sunmuştur (11). Yirminci yüzyılın ilk yarısında tedavinin ana unsurları olan sanatoryum ve cerrahi kollaps tedavisi yaklaşımı modern antibiyoterapinin ortaya çıktığı 1950’li yıllardan itibaren giderek terk edilmiştir (7).

1940’lı yılların ortalarında Waksman’ın streptomisini (SM) bulmasıyla TB tedavisinde antibiyoterapi dönemi başlamış ancak tek antibiyotik uygulaması nedeniyle kısa zamanda tedaviye direnç gelişmiştir. 1946’da İsveç’te para-amino salisilik asidin (PAS) basile etkisinin ortaya konması, 1952 yılında Robizeg ve Selikof tarafından INH’nin bulunmasıyla 18-24 ay süren üçlü tedavi uygulanmaya başlanmış ve TB tedavi edilir hastalık haline almıştır. 1954 yılında pirazinamid (PZA), 1962 yılında etambutol (EMB), 1966 yılında RIF’in bulunmasıyla tedavi süresi altı aya düşürülmüştür (7,8).

Gelişmiş ülkelerde 1970’li yıllara gelindiğinde TB sorununda sona gelindiği ve hastalık eradikasyonunun gerçekleşeceği düşünülürken, 1985 yılından itibaren insidansın artmaya başladığı görülmüştür (7,11). Bu artışın sosyoekonomik sorunlar, göçler, savaşlar, kontrol programlarının ihmali ve özellikle HIV-Edinilmiş Bağışıklık Yetmezliği Sendromu - *Acquired Immun Deficiency Sendrom* (AIDS) salgını ile ortaya çıktığı gözlenmiştir. Kötü kontrol programları neticesinde ilaç direnci yaygınlaşmış, özellikle de ÇİD-TB insan sağlığı için önemli bir sorun haline gelmiştir (14).

## 4.2. Dünyada ve Türkiye’de Tüberküloz Epidemiyolojisi

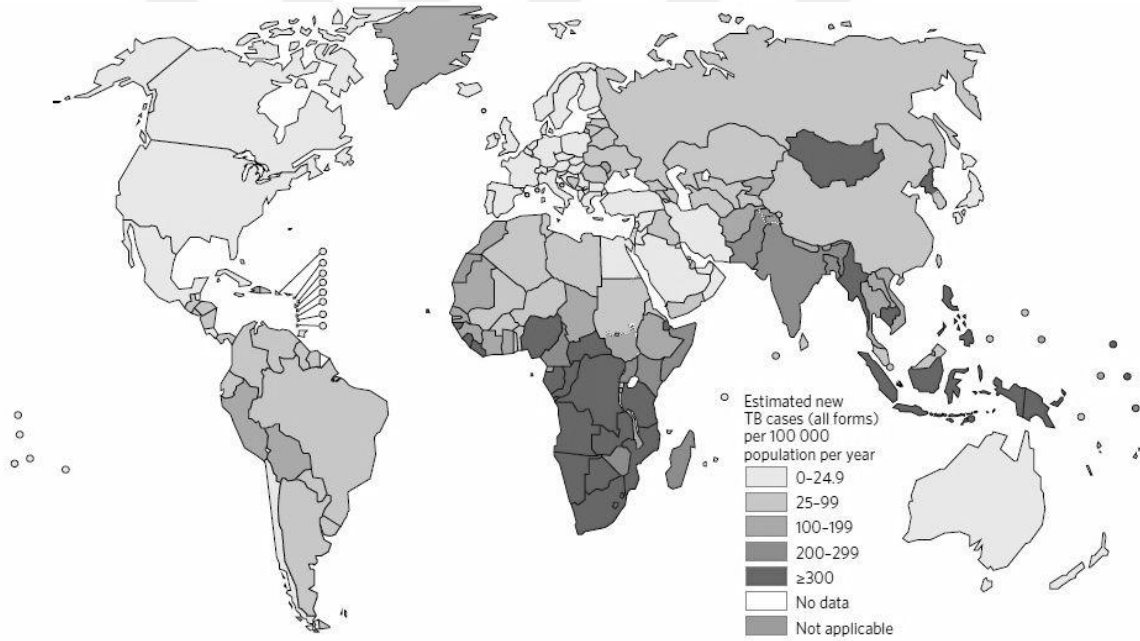
DSÖ, 1993 yılında TB için ‘acil durum’ ilan etmiş ve küresel olarak TB’ye karşı kararlı bir halk sağlığı hareketi başlatmıştır. DSÖ, veremle savaşta “Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi”ni (DGTS) temel almaktadır. Bu strateji; semptomatik hastalarda bakteriyolojik tanı, gözetimli tedavi, kayıt-raporlama-analiz sisteminin kurulması, ücretsiz ilaç ve tümünü idare etmek için politik iradenin ortaya konması ilkelerini kapsamaktadır (15). Bu strateji sayesinde balgamın mikroskopik incelemesinin yaygınlaştırılması ile hastaların saptanması ve ilaçların doğru kombinasyonla düzenli kullanılarak tedavi başarısının sağlanması amaçlanmıştır (14,16).

2000 yılında Birleşmiş Milletler tarafından “Milenyum Gelişim Hedefleri” belirlenmiştir. Bu hedefler arasında; 1990 yılına göre 2015 yılında TB prevalansını ve mortalitesini %50 azaltmak, insidans artışını durdurmak ve azalmaya başlamasını sağlamak, DGTS uygulayarak yeni yayma pozitif olgulardan en az %70’ini saptamak ve bu olgulardan %85’ini başarılı şekilde tedavi etmek yer almaktadır (16,17). 2006 yılı yayma pozitif yeni olgular esas alındığında DGTS programı kapsamındaki bölgelerde tedavi başarısında DSÖ hedefine ulaşıldığı gözlenmektedir. Bu hedefe ulaşılmasında özellikle Güneydoğu Asya ve Batı Pasifik bölgelerinden bildirilen yüksek tedavi başarı oranları (%87, %92) rol oynamaktadır. En düşük tedavi başarı oranı ise %70 ile Avrupa’dan bildirilmiştir. Afrika’nın tedavi başarı oranı ise %75 olarak bildirilmiştir. Avrupa’daki tedavi başarı oranının düşük olması, özellikle eski Sovyet Cumhuriyetlerinde HIV ve yaşlılık nedeniyle ölüm oranlarının yüksekliğine ve yüksek ÇİD-TB oranlarına bağlıdır. Ayrıca Doğu Avrupa’da sosyoekonomik gerekçelerden kaynaklanan tedavi terkleri de yüksek durumdadır. Afrika’da tedavi başarısının düşüklüğü de büyük ölçüde HIV salgını dolayısıyla artmış ölümler ve tedavi terk oranlarının yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Bu dönemde DGTS kapsamında olmayan birçok ülke ve bölge verilerinin eksik olduğu ve birçok olgunun tedavi sonuçlarının DSÖ’ye ulaşmadığı dikkate alındığında gerçek tedavi başarısının hedeflenenin altında olduğu düşünülebilir (13).

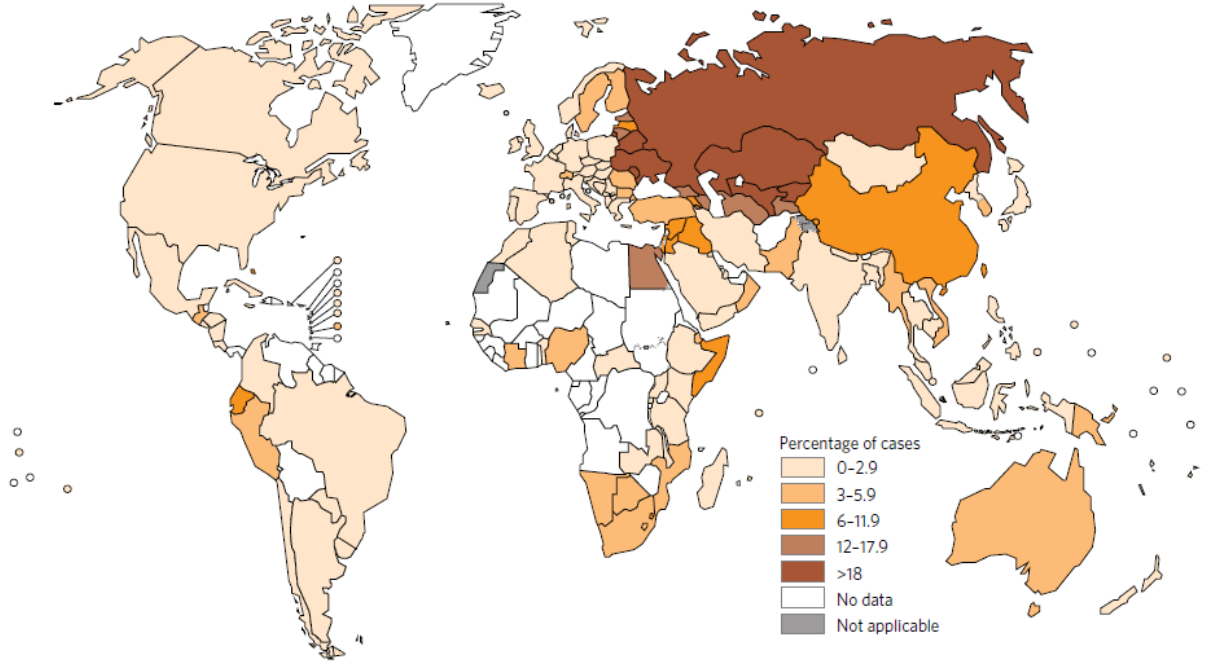
DSÖ Küresel TB 2016 Raporu’nda, 2015 yılı için tahmin edilen yeni olgu sayısının 10.4 milyon olduğu (142/100.000) bildirilmiştir. Olguların büyük çoğunluğu Asya (%61) ve Afrika (%26) bölgesinde görülmüştür. Olguların yüzde %60’ını oluşturan 6 ülke azalan sıklık sırasıyla; Hindistan, Endonezya, Çin, Nijerya, Pakistan ve Güney Afrika’dır (Şekil 1). 2015 yılındaki tahmini vakaların 1.2 milyonu (%11) HIV pozitif hastalardır. HIV ile birlikte TB vaka oranı, DSÖ Afrika bölgesindeki ülkelerde en yüksek olup (%31), Güney Afrika’nın bazı

bölgelerinde %50'yi aşmaktadır. 2015 yılında TB hastalığından ölenlerin sayısı HIV negatif kişilerde 1.4 milyon (19/100.000) olarak bildirilmiş olup, HIV pozitif kişilerde 390.000 (5.3/100.000) 'dir. 2015 yılında yeni vakaların yaklaşık %3.9'u ve önceden tedavi edilmiş vakaların %21'inin ÇİD/RD-TB olduğu bildirilmiştir (Şekil 2, 3). 2015 yılı için, dünya genelinde yaklaşık 580.000 (7.9/100.000) yeni ÇİD/RD-TB vakası bulunmakta olup, ÇİD/RD-TB olgularının %83'ü ÇİD-TB'dir. Saptanan ÇİD/RD-TB olgularının %45'i azalan sıklık sırasıyla Hindistan, Çin ve Rusya Federasyonu'nda görülmektedir. ÇİD/RD-TB nedeniyle ölüm sayısı 2015 yılı için yaklaşık 250.000 olarak bildirilmiştir. ÇİD-TB hastalarının 2013 (%9.0) ve 2014 (%9.7) yıllarındakine benzer şekilde 2015 yılında yaklaşık %9.5'inin YİD-TB hastası olduğu belirtilmiştir. Dünyanın belirli bölgelerinde yüksek direnç oranları ve uygun olmayan tedaviler önemli bir sorun teşkil etmektedir (1).

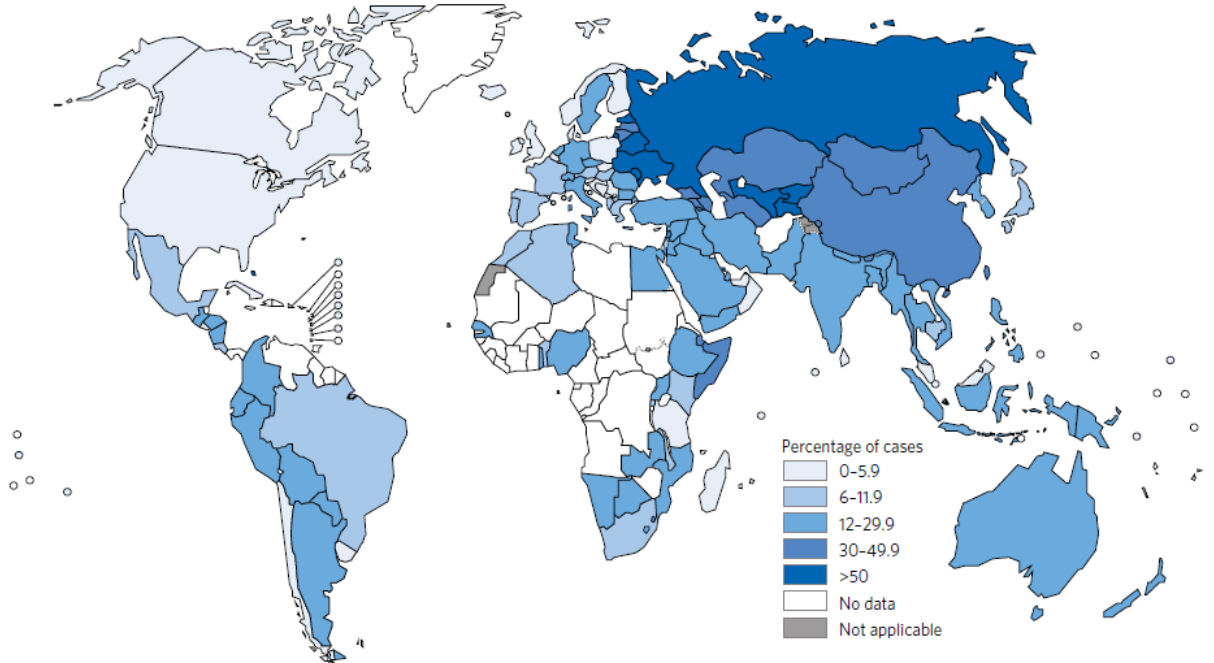
**Şekil 1.** 2015 yılı Dünyada tahmini TB insidans oranları (1).



Şekil 2. Yeni olgulardaki ÇİD/RD-TB olgu yüzdeleri (1).



Şekil 3. Daha önce tedavi alan hastalardaki ÇİD/RD-TB olgu yüzdeleri (1).



Türkiye’de 1930 yılında çıkartılan “Umumi Hıfzıssıhha Kanunu” ile verem savaş faaliyetleri konusunda politik kararlılık ortaya konulmuş, 1949 yılında yayınlanan “Verem Savaşı Hakkındaki Kanun” ile devletin veremle savaş programları netleşmiştir (18).

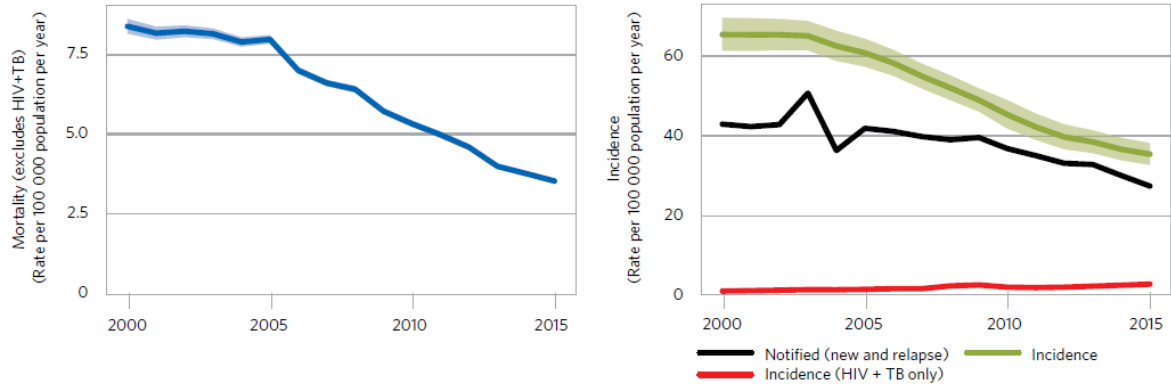
Ülkemizde 20. yüzyılın başında ciddi bir epidemi yaşanmış ve TB en sık ölüm nedeni olmuştur. 1945 yılında TB ölümleri yüz binde 262, 1950 yılında yüz binde 204 idi (19). “Ulusal Verem Savaşı” programı sayesinde TB ölümleri 1981-1982 yıllarında yüz binde 8’e kadar düşmüştür (20). DSÖ’nün hedeflerine paralel olarak Türkiye’de “Ulusal Sağlık 21 Politikası” kapsamında, 2010 yılına kadar aktif TB olgularının %70’inin saptanması, %85’inin tam tedavisinin sağlanması ve insidansın en az %50 azaltılması hedeflenmiştir (16,17). DGTS uygulaması ile ilgili pilot çalışmalar ülkemizde 2002 yılında başlatılmış olup, 2006 yılında önemli ölçüde yaygınlaşarak, uygulama sıklığı %50’ye ulaşmıştır. 2005 yılı verilerine göre yeni olguların belirlenme sıklığı %85 ve tedavi başarısı %89 bulunmuştur (16).

Türkiye’de Verem Savaşı 2014 Raporu’na göre; toplam TB hastası 2011 yılında 15.679 iken, 2012 yılında 14.691’e gerilemiş, toplam olgu hızı 2011 yılında yüz binde 21.0’dan 2012 yılında yüz binde 19.4’e düşmüş ve olgu hızındaki yıllık değişim %7.4 olarak hesaplanmıştır. 14.691 hastadan yeni olguların oranı %92.1 (13.535) iken önceden tedavi görmüş olguların oranı %7.9’dur (1.156). 2012 yılında akciğer TB’si olan 9.391 hastada; mikroskopi yapılma oranı %92.8 (8.712), mikroskopi yapılanlar içinde mikroskopi pozitiflik oranı %64.1 (5.583); kültür yapılma oranı %81.3 (7.633), kültür yapılanlar içinde kültür pozitiflik oranı %80.3 (6.133), kültür pozitif olgularda İDT yapılma oranı ise %83.7 (5.131) bulunmuştur. İDT yapılan toplam 5.399 hastanın %22.1’inde (1.195/5.399) en az bir ilaca direnç saptanmıştır. En yüksek oranda direncin %15.4 ile INH’ye karşı geliştiği (831/5.399) görülmüştür (21).

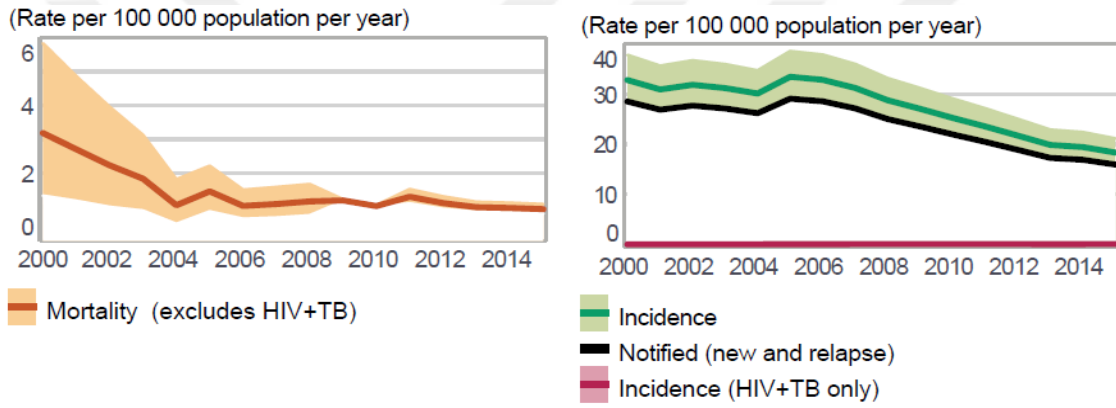
DSÖ Küresel TB 2016 Raporu’nda, Türkiye’de 2015 yılı TB insidans hızı yüz binde 18, mortalite hızı yüz binde 0.96 olarak belirtilmiş, yeni TB olgularında ÇİD/RD-TB oranı %3.6, önceden tedavi edilmiş olgularda ise %21 olarak bildirilmiştir. Türkiye’nin içinde yer aldığı DSÖ-Avrupa Bölgesi’nde ise 2015 yılı TB insidans hızı yüz binde 36, mortalite hızı yüz binde 4.1 olarak belirtilmiş, yeni TB olgularında ÇİD/RD-TB oranı %16, önceden tedavi edilmiş olgularda ise %48 olarak bildirilmiştir (Şekil 4,5) (1).

2014 yılının sonunda, DSÖ Avrupa bölgesinde yer alan 18 yüksek-öncelikli ülkeden aralarında Türkiye’nin de bulunduğu üç ülke TB yükünü azaltmada insidans, prevalans ve mortalite açısından “Milenyum Gelişim Hedefleri”ne ulaşmıştır (22).

Şekil 4. DSÖ Avrupa Bölgesi TB mortalite ve insidans hızı, 2000-2015 (1).



Şekil 5. Türkiye TB mortalite ve insidans hızı, 2000-2015 (1).



### 4.3. *Mycobacterium tuberculosis*'in Genel Özellikleri

*Mycobacterium* cinsi, Prokaryot aleminin, *Firmicutes* bölümünün, *Actinobacteria* sınıfının, *Actinomycetales* takımının, *Mycobacteriaceae* ailesine dahil olup bu ailedeki tek cinstir. *Actinomycetales* takımının diğer üyeleri *Rhodococcus*, *Corynebacteria* ve *Nocardia*'dır (13). *Mycobacterium* türlerinin DNA'sının yüksek Guanin+Sitozin (G+C) içeriği (%61-71 mol), yapısında mikolik asit bulunduran *Tsukamurella*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Rhodococcus* cinsleri ile benzerdir (23).

Mikobakteriler, MTK ve tüberküloz dışı mikobakteriler (TDM) olmak üzere temel olarak iki grupta yer almaktadır. MTK'de fenotipik ve genotipik olarak yüksek benzerliğe sahip olan; *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. bovis*, *M. microti*, TB aşısını oluşturan atenüe *M. bovis* BCG, *M. caprae* ve *M. pinnipedii* türleri yer almaktadır. *M. tuberculosis*, MTK'de yer alan türler arasında TB olgularında en sık karşılaşılan ve en önemli patojendir (24).

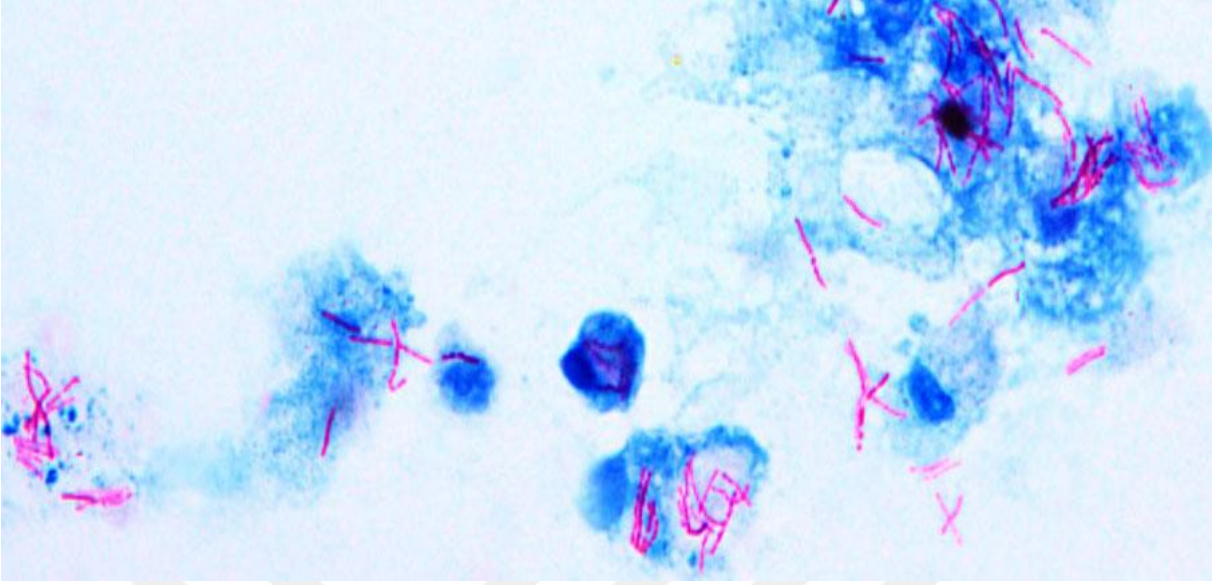
Mikobakteriler; 0.2-0.6 µm genişliğinde ve 1-10 µm uzunluğunda, kapsülsüz, ışık mikroskopunda düzgün ya da hafif kıvrık basiller şeklinde görülmektedir. Basilin boyut ve şekli, üreme koşulları ve kültür pozitifliğinin zamanına bağlı olarak, kısa kokobasilden uzun basillere kadar değişebilmektedir (11).

Mikobakterilerin koloni morfolojisi türler arası S (*smooth*) tipinden R (*rough*) tipine, pigmentsiz koloniden (fotokromojen olmayan) pigmentli koloniye değişebilmektedir. *M. tuberculosis* kolonileri katı besiyerinde kirli beyaz, sert ve pürüklü olmakla birlikte nemli besiyerinde daha düzgün, pürüzsüz olma eğilimi göstermektedir (23).

*M. tuberculosis*, hareketsiz, sporsuz, zorunlu aeroptur. Üreme için ihtiyaç duyduğu optimal şartlar; 37 °C, pH 7 olup, %5-10 CO<sub>2</sub> varlığı üremeyi artırır. İkiye bölünme süresi 15-20 saattir. TB basilleri kuruluğa ve kimyasal dezenfektanlara çoğu sporsuz bakteriye göre daha dirençlidir. Basiller, güneş ışığına direkt maruziyette iki saat içinde ölürken balgam içinde 20-30 saat kadar yaşayabilir (25).

Gram negatif bakterilerin aksine mikobakterilerin hücre duvarı dışında ek bir membran olmamasından dolayı yapısal olarak gram pozitif bakteriler ile daha yakın ilişkili olmasına rağmen, mikobakteri hücre duvarında protein ve polisakkaritlerden çok lipitler bulunmakta ve gram pozitif kategorisine girmemektedir. Sıklıkla kristal viyoleyi muhafaza edemezler ve Gram boyama sonrası 'hayalet hücre' gibi görülürler. Mikobakteri hücre duvarı, fenolle kombine olmadıkça anilin ve diğer yaygın kullanılan boyalara karşı geçirgen değildir. Robert Koch, TB'nin nedenini keşfetmek için alkalin boyalarla özel boyama yöntemi geliştirmiştir. Ehrlich'in, halen günümüzde de mikobakterilerin önde gelen özelliği olan, TB basilinın aside dirençli olduğunu keşfetmesi sayesinde klinik örnekte basilin tanımlanması büyük ölçüde kolaylaşmıştır. Aside dirençlilik; mevcut mikroorganizmaların karbol fuksin gibi arilmetan boyalarla boyandıktan sonra asit-alkol solüsyonları ile renksizleşmeye direnç göstermesi şeklinde tarif edilmektedir (11).

**Şekil 6.** Mikobakterilerin Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyama görüntüsü (26).



Mikobakterilerin hücre duvarı oldukça farklı, kompleks bir yapıdır. Kompleksteki en iç tabaka diğer bakterilerde de görülen plazma membranıdır. Diğer bakterilerin plazma membranları ile benzerdir. Membran tipik olarak protein ve fosfolipidlerden oluşan çift katmanlı bir yapıda olup periplazmik boşluk ile peptidoglikandan ayrılmaktadır (27). Orta tabakanın çekirdeğini ve duvarın iskeletini, peptidoglikan arabinogalaktanın (AGP) mikolik asit esterinden oluşan mikolilarabinogalaktan peptidoglikan (mAGP) oluşturur. Diğer bakterilerden farklı olarak mikobakteri peptidoglikanında, muramik asidin asetillenmiş yapısı yerine glikolik asitle glikozillenmiş formu yer almakta ve tetrapeptid yan zincirlerde diaminopimelik asit (DAP) bulunmaktadır. Peptidoglikan tabaka hücreye şekil verip, hücre duvarına sertlik kazandırır, ayrıca yapısında bulunan DAP nedeniyle lizozimlere dirençlidir. Peptidoglikan tabaka kor bölgesinin iskeletini oluşturmak üzere bir disakkarit fosforil köprü ile heteropolisakkarit yapıdaki arabinogalaktanı (AG) kovalent olarak bağlar. Mikolik asitler, mikobakteri hücre duvarı içerisinde AG'nin arabinan parçası üzerinde tetramikolpentarabinofuranozil esteri şeklinde peptidoglikana dik olarak yerleşirler (27,28). Hücre duvarında mikolik asitler mAGP yapısı dışında trehaloz ile esterleşmiş şekilde, mikolatfosfolipidler ve diğer mikolatlanmış lipidler halinde bulunurlar. Mikolik asitler mikobakterilerde hücre lipidlerinin %60'ını oluştururlar (27). Mikolik asitin trehaloz ile esterleşmiş formu kord faktörünü oluşturmaktadır (27,28). *M. tuberculosis*'in en önemli virülans faktörlerinden biri olan, Trehaloz 6,6' dimikolat olarak bilinen kord faktörü, bakteriyi makrofajların öldürücü etkisinden korumakta ve granülom oluşumunu tetiklemektedir (29). Kord faktörü, sıvı besiyerindeki kültürden hazırlanan preparatlarda



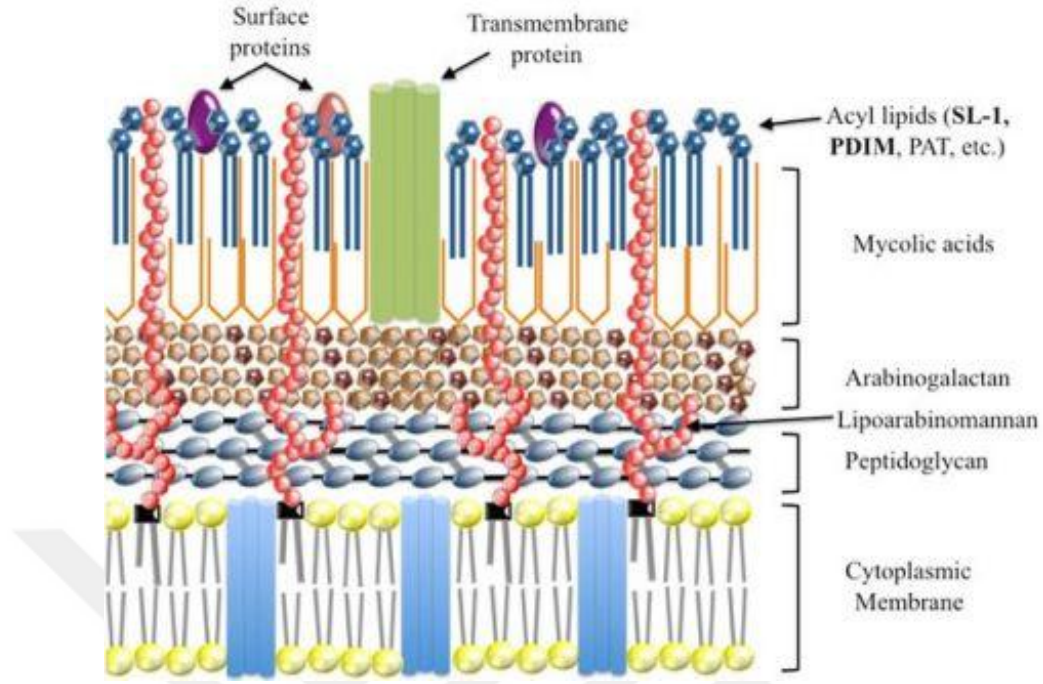
bakterinin demetler halinde bir arada bulunmasından sorumlu olduğu gibi, polimorfonükleer lökosit migrasyonunu önleme, komplemanı alternatif yoldan aktive etme ve antitümöral özelliklere de sahiptir (11,25). Yapısında mikolik asit ile heksoz ve heksozamin polimerlerine bağlı amino asitler bulunan Wax D de hücre duvarında yer almaktadır. İmmünoadjuvan aktiviteye sahiptir (25,30).

Mikolik asitlerin haricinde hücre duvarında çok sayıda farklı polar veya apolar yapıda nonkovalent bağlı lipidler ve glikolipidler bulunmaktadır. Ökaryot hücreler için biyolojik aktif olan bu lipidler ve glikolipidlerin çokluğu ve asimetriye sahip olmaları, hücre duvarına aşırı derecede hidrofobisite kazandırır (27).

*M. tuberculosis* izolatlarında sülfolipidlerin varlığı ile virülans arasında korelasyon mevcuttur. Sülfolipidler, fagolizozomal füzyon oluşmasını engelleyerek bakterinin makrofaj içinde canlı kalmasını sağlar (31). Hücre duvarında yer alan ana lipoglikanlardan lipoarabinomannan ve lipomannan ile bunların öncül molekülleri olan fosfatidil miyo-inozitol mannozidler plazma membranına non-kovalent bağlarla bağlanarak hücre duvarının dışına doğru uzanmaktadır. Bu kompleks moleküller, konağın immün yanıtının modülasyonunda önemli rol oynamaktadırlar (32).

Hücre duvarında en dışta yer alan polipeptidler duvar ağırlığının %15'ini oluşturur. Proteinlerin bir kısmı yapısal olup, bazıları lipid tabakadan, hidrofilik bileşiklerin geçmesi için porin görevi görmektedir. Robert Koch tarafından keşfedilen OT, tüberkülin deri testinde kullanılan ısıya dayanıklı bir proteindir. PPD, OT'nin saflaştırılmasıyla elde edilen, *M. tuberculosis* veya ürünleri ile karşılaşmış kişilerin saptanmasında kullanılan protein derivesidir (11,25).

Şekil 7. Mikobakteri hücre duvar yapısı (33).



#### 4.4. Bulaşma ve İmmunopatogenez

TB'de esas bulaşma hava yolu aracılığıyla olmaktadır. Akciğer veya larenks TB'li bireylerin öksürme, aksırmaları sonucu çıkardıkları sekresyonlarda bulunan damlacık çekirdeklerinin sağlıklı kişilerce inhalasyonu sonucu bulaş olmaktadır. Damlacık çekirdeklerinin büyük kısmı boyutlarına bağlı olarak yere çökerken, bir kısmı saatlerce havada asılı kalır ve 1-5 µm çapında olan, içinde 1-3 basil barındıran çekirdeklerden, solunum yolu savunma mekanizmalarından kaçabilenler alveollere ulaşarak enfeksiyonu başlatırlar (13). Kaynak hastanın yayma pozitifliği, aerosol oluşturma potansiyeli, basilin canlılığı ve virülansı, kaynak kişiye yakınlık derecesi ve birlikte geçirilen süre, hedef kişideki ek hastalıklar veya hastalığa dirençli olma gibi pek çok durum hastalığın bulaşını etkilemektedir (19).

Enfeksiyon veya hastalığın oluşup oluşmaması, konağın direnci ile basilin virülansı arasındaki dengeye bağlıdır. Konağın TB'ye karşı yanıtında hem doğal hem de kazanılmış immünite rol oynamaktadır. Konağın doğal savunmasında; invazyona engel olan silyalı epitel tabakası, lenfosit ve makrofajları içeren lamina propria tabakası ile immunoglobulin A, mukus ve çeşitli immün faktörleri içeren hava yolu yüzeyi sıvısını barındıran solunum mukozası; alveollerde primer savunmadan sorumlu olan alveolar makrofajlar ve dendritik hücreler gibi fagositik hücreler, makrofajların fagositozunu güçlendiren pulmoner sürfaktan ile hidrolitik

enzimlerin üretimi ve salınımında görevli olan tip II epitel hücreleri; fagositik hücrelerin reaktif nitrojen ve oksijen ürünleri, inflamatuvar hücrelerin salgıladıkları sitokinler, apoptoz ve genetik faktörler rol oynar (34,35).

Diğer patojenlerle karşılaştırıldığında *M. tuberculosis*, kazanılmış immün yanıt başlangıcını geciktirme yeteneğine sahiptir. Büyük olasılıkla altta yatan mekanizma, *M. tuberculosis* ile enfekte hücrelerin, enfekte akciğerden, T hücre olgunlaşmasının olduğu lokal direne eden lenf noduna doğru göçünün en az iki hafta boyunca başarısızlığa uğramasıdır (36). *M. tuberculosis* immün yanıtı kaçmak için; fagozom maturasyonunun ve fagozom-lizozom füzyonunun inhibisyonu, fagositik hücrelerde otofajinin inhibisyonu, apoptozun inhibisyonu, immün sistem tarafından tanınmamak için antijen işleme ve T hücrelere sunumunu engellemek, IFN- $\gamma$  reseptör aracılı sinyal iletimini önlemek ile oksijen ve nitrojen ara ürünlerini ortadan kaldırmak gibi çok sayıda strateji kullanmaktadır (36).

Enfekte makrofajlar ve dendritik hücreler; CD4+ (MHC Sınıf II), CD8+ (MHC Sınıf I), CD-1-sınırlı ve  $\gamma\delta$  T hücrelere antijen sunarlar; IL-7, IL-12, IL-15, IL-23 ve TNF- $\alpha$  salgırlar. CD4+ T helper (Th) 1 hücreler tarafından üretilen efektör IFN- $\gamma$  yanıtı ve TNF- $\alpha$  birlikteliğiyle, makrofajlar hücre içi mikobakterileri öldürmek için aktive olurlar. CD4+ Th2 hücreler, IL-4, IL-5, IL-10 ve IL-13 üreterek B lenfositleri stimüle ederken, Th1 tipi immün yanıtı baskırlar. CD4+CD25+FoxP3+ düzenleyici T hücreler IL-10 ve TGF- $\beta$  üreterek mikobakterisidal efektör mekanizmaları baskırlar. IL-23 varlığında üretilen Th17 hücreler, inflamasyonun önemli bir düzenleyicisi olan ve hafıza yanıtını hatırlatan IL-17 üretimiyle karakterizedir. Th17 hücreler nötrofil, monosit ve IFN- $\gamma$  üreten CD4+ T hücreleri inflamasyon bölgesine toplayabilir ve kemokin salınımını tetikleyebilir. Ancak, Th1, Th2, Th17 ve düzenleyici T hücre yanıtlarının çapraz düzenlenmesinde daha karmaşık ilişkiler olduğu düşünülmektedir ve hücrelerin kesin rolü tartışmalıdır (37).

Basilin inhalasyonundan 2-3 hafta sonra organizmanın sergilediği hücresel immün yanıt ile konakçı, ilk enfeksiyona ve TB basilinin yayılmasına engel olma yeteneğini oluşturmakta, makrofajlar vasıtasıyla basillerin sayıca çoğalması ve canlılığı engellenerek enfeksiyonun yayılımı önlenmeye çalışılmaktadır. Bu süreçte gelişen ikinci immün yanıt gecikmiş tip aşırı duyarlılık olup, aktive makrofajlar tarafından salınan IL-12 ile sitotoksik T hücrelerin aktive edilmesi sonucu içlerinde basil bulunduran makrofajlar öldürülür ve ortama dağılan basiller kazeöz dokuya geçerek nekroz oluştururlar. Ancak ortam koşulları nedeniyle çoğalamazlar. Kazeöz dokuda bazı basiller uzun yıllar hatta ömür boyunca dormant olarak

kalabilmektedir. 6-8 haftada gelişen bu süreçte kişinin tüberkülin cilt testi pozitifleşir. Kazeöz nekroz alanlarında artış ve erime enfekte kişilerin %5'inde enfeksiyonun hemen ardından meydana gelir, bu tabloya primer TB denmektedir. Kazeöz lezyon hücrel immün yanıt ile kontrol edilir. Zayıf bir hücrel immün yanıt varlığında dahi basil kazeöz nekrozun merkezinden kaçarak etrafındaki aktive olmamış alveoler makrofajlar içinde hızla çoğalabilir. Enfekte makrofajların sitotoksik gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu sonucu öldürülmesiyle kazeöz nekroz giderek genişleyebilir. Hücrel immünite konak savunmasında faydalı olurken, gecikmiş tipte aşırı duyarlılık reaksiyonu basillerin yanı sıra çevre dokularda da harabiyete, nekroz ve kaviteleşmeye yol açmaktadır (13). Enfekte kişilerin %5'inde yaşamlarının herhangi bir bölümünde ilk lezyon yerinde ya da basillerin lenfo-hematojen yayılımı sonucu herhangi bir organdaki odakta oluşan erime ve takip eden aktivasyonla oluşan hastalık ise postprimer TB-reaktivasyon tüberkülozu olarak tanımlanmaktadır. Primer enfeksiyonun kontrol altında olduğu kişilerde reaktivasyon riski devam etmektedir (13).

#### **4.5. Laboratuvar Tanısı**

Aktif TB tanısı, solunum sistemi veya diğer vücut bölgelerinden alınan klinik örneklerde MTK'nin saptanmasıyla konmaktadır. Aktif TB tanısında, hızlı ve moleküler testleri de içeren birçok yeni yöntem geliştirilmiş olsa da ARB için yayma mikroskopisi ve 'altın standart' yöntem olan kültür standart prosedür olarak karşımıza çıkmaktadır (11).

##### **4.5.1. Örneklerin Alınması ve İşlenmesi**

Mikobakteriyolojik inceleme için çok çeşitli tipte klinik örnek laboratuvara gönderilebilmektedir. Örneklerin büyük kısmı solunum yolu kaynaklı (öksürerek çıkartılan veya indüklenmiş balgam, açlık mide sıvısı, trakeal aspirat ile bronşial ve bronkoalveolar lavaj örnekleri) olmakla beraber idrar, doku, biyopsi örnekleri ile beyin omurilik sıvısı (BOS), plevra ve perikardiyal aspirat gibi normalde steril olan vücut sıvılarına ait örnekler de diğer yaygın gönderilen örnekler arasındadır. Kan ve dışkı örnekleri ise sıklıkla immünsüpre hastalardan gönderilmektedir (23).

Steril olmayan bölgelerden alınan klinik örneklere ve kontamine olduğu düşünülen klinik örneklere; lökosit, eritrosit gibi organik kalıntılardan ve kontaminant mikroorganizmalardan arındırmak amacıyla dekontaminasyon-homojenizasyon işlemi uygulanır (23,38).

Dekontaminasyon-homojenizasyon amacıyla; N-Asetil-L-Sistein (NALC) + Sodyum hidroksit (NaOH), %4'lük NaOH, zefiran-trisodyum fosfat, oksalik asit, setilpridinyum klorid-sodyum klorid gibi yöntemler kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan NALC-NaOH yönteminde; NALC mukolitik, NaOH dekontaminant olarak, sodyum sitrat ise klinik örnekte bulunabilecek ağır metal iyonlarını bağlayarak NALC'ın inaktivasyonunu önlemek amacıyla kullanılır. Çözeltiler hazırlanırken konsantrasyona dikkat edilmeli ve hazırlanmış olan NALC solüsyonu 24 saatten fazla bekletilmemelidir. Bu yöntemde; 5-10 mL örnek 50 mL'lik steril tüpe aktarılır ve örnek hacmi kadar NALC-NaOH eklenerek 30 saniyeyi (sn) geçmeyecek şekilde vortekslenir. 15 dakika (dk) beklendikten sonra nötralizasyon amacıyla fosfat tamponu eklenir. Bakteri yoğunluğunu arttırmak amacıyla santrifüj yapıldıktan sonra elde edilen çökeltiden uygun besiyerlerine ekim yapıp, preparatlar hazırlanır. Santrifüj işlemi sırasında ortaya çıkabilecek ısı artışı TB basilinın ölümüne neden olabileceği için soğutmalı santrifüj kullanılması önerilir (38,39).

#### **4.5.2. Mikroskopik İnceleme**

Mikroskopi, potansiyel bulaştırıcı vakaları saptamanın yanı sıra tedavinin etkinliğinin izlenmesini de sağlar. ARB boyaması yaygın olarak kullanılan; hızlı, basit, ucuz, kolay ve her düzey tanı laboratuvarında uygulanabilen bir yöntemdir. Ancak kültüre göre duyarlılığı balgamin kalitesine, içerdiği bakteri miktarına, uygulanan tekniğe ve uygulayan kişiye bağlı olarak %25 ile %65 arasında değişir. Mikroskopi ile ARB pozitifliğini yakalamak için örneğin mL'sinde 5000-10000 basil olmalıdır (13).

Klinik örnekte aside dirençli mikobakterileri saptamak için başlıca kullanılan iki boyama yöntemi;

1.Karbol fuksin boyama (EZN, Kinyoun): Işık mikroskobunda incelenir. Aside dirençli basiller mavi zeminde kırmızı renkte görülür.

2.Florokrom boyama (Auramine O, Auramine-Rhodamine): Floresan mikroskopta veya Led ataçmanlı ışık mikroskobunda incelenir. Aside dirençli basiller karanlık zeminde sarı-turuncu renkte floresan verir (38,39).

Karbol fuksin boyalı preparat x1000 büyütmede değerlendirilirken, florokrom boyalı preparat x250 – x400 büyütmede incelenir ve belirlenen sürede daha geniş bir alan taranabilir. Karbol fuksin boyamada negatif olarak raporlamak için en az 300 alan taramak gerekirken, florokrom boyamada x250 büyütmede en az 30, x400 büyütmede en az 70 alanın incelenmesi

yeterlidir. Duyarlılığı daha yüksek olmasına rağmen yalancı pozitiflik ihtimali sebebiyle pozitif florokrom boyalı preparatların, karbol fuksin boyama ile doğrulanması önerilmektedir. Bir yaymada pozitiflik saptanması durumunda boyama yöntemi belirtilerek, yaymada gözlenen basil sayısına göre skorlama yapılır (Tablo 1). Pozitif yayma sonuçları, derecesine göre ‘ARB pozitifliği’ olarak raporlanmalı, örneğin gelişinden sonraki 24 saat içinde ilgili klinisyene telefonla bildirilmelidir. Mikroskopik incelemenin duyarlılığı ve özgüllüğü kültüre kıyasla düşük olduğundan tanıda kültür tamamlayıcı olarak kullanılmalıdır (23,38-40).

**Tablo 1.** Karbol fuksin ve florokrom yöntemiyle boyanmış preparatların değerlendirilmesi ve sonuçların bildirilmesi (39).

Sonuç	Görülen ARB sayısı / Mikroskop alanı		
	Karbol fuksin boyama (1000x)	Florokrom boyama (250x)	Florokrom boyama (400x)
<b>Aside dirençli bakteri görülmedi</b>	Negatif	Negatif	Negatif
<b>Şüpheli (Yeni örnek ile tekrar edilmeli)</b>	1-2/300 alan	1-2/30 alan	1-2/70 alan
+	1-9/100 alan	1-9/10 alan	2-18/50 alan
++	1-9/10 alan	1-9/1 alan	4-36/10 alan
+++	1-9/1 alan	10-90/1 alan	4-36/1 alan
++++	>9/1 alan	>90/1 alan	>36/1 alan

#### 4.5.3. Kültür Yöntemleri

Her geçen gün hızlı tanı amacıyla yeni yöntemler geliştirilmesine rağmen TB tanısında günümüzde altın standart kültür yöntemleridir. Mikobakterilerin kültürde üremesi için örneğin mL’inde 10-100 canlı basil olması yeterlidir (13,39). *M. tuberculosis*’in saf kültürü, özellikle İDT yapılabilmesi ve üreyen suşların tiplendirilmesi için gereklidir (40). Mikobakteriyoloji laboratuvarında rutin olarak kullanılan besiyerleri; katı ve sıvı besiyerleri olmak üzere iki ana grupta toplanır. Mikobakterilerin daha kısa sürede üremelerini sağladığından ve kültürde üreme şansını arttırdığından, sıvı besiyerlerinin kullanımı dünya çapında artmaktadır (41). Mikobakterilerin optimal kültürü için katı ve sıvı besiyerlerinin birlikte kullanımı önerilmektedir. MTK izolasyonu için ideal besiyeri, ekonomik olmalı, kolay hazırlanmalı, hızlı üremeyi sağlamalı, kontaminant mikroorganizmaların üremesini engelleyici nitelikte olmalı ve örnekte bulunan az sayıdaki bakterinin üremesini desteklemelidir (39,40).

#### 4.5.3.1. Katı Besiyerleri

Katı besiyerlerinin (tüpte veya plakta) avantajı, karışık üremeleri ve kontaminantları saptamaya uygun olmaları ve koloni morfolojilerini göstermeleridir. Yumurta bazlı ve agar bazlı olmak üzere iki tip katı besiyeri bulunmaktadır (39,40,42).

##### 4.5.3.1.1. Yumurta Bazlı Besiyerleri

Yumurta bazlı besiyerleri, yumurtanın tümü veya sarısı, patates, un, gliserol ve tuzları içerir. Bu besiyerleri iyi tampon kapasitesi ve uzun raf ömrüne (buzdolabında birkaç ay) sahip olup birçok mikobakteri türünün üremesini sağlarlar. Ayrıca inokulumda ve besiyerinde bulunan, mikobakterilere toksik maddeler, nötralize edilmiştir. Besiyerinde kullanılan yumurtanın kalitesinin değişmesi, kolonilerle örneği ayırt etmedeki güçlükler, duyarlılık testinde doğru ve tutarlı ilaç konsantrasyonuna erişmedeki zorluklar dezavantajlar arasındadır. Yumurta bazlı besiyerleri kontamine olduklarında sıvılaşabilmektedir. Yumurta bazlı besiyerlerinden Löwenstein-Jensen (LJ) besiyeri klinik laboratuvarlarda en yaygın kullanılan besiyeridir. LJ besiyeri, kontaminant bakteri ve mantarların üremesini inhibe eden malaşit yeşili içermektedir. LJ besiyerinde *M. tuberculosis* iyi üremekte, ancak TDM'lerin üremesi değişkenlik göstermektedir. *M. tuberculosis*'in ortalama üreme süresi uzun olduğundan inkübasyon süresi 8 haftaya uzatılmaktadır. LJ besiyerine göre iki kat miktarda malaşit yeşili içeren Petraghani besiyeri aşırı derecede kontamine örneklerden mikobakteri izolasyonu için sık kullanılmaktadır. American Trudeau Society besiyeri ise LJ besiyerine göre daha düşük konsantrasyonda malaşit yeşili içermekte, bu nedenle kontaminant mikroorganizmalar daha kolay üremektedir. Ancak mikobakterilerin üremesi daha az inhibe olduğundan daha büyük kolonilerin daha erken sürede üremesi sağlanmaktadır (23,41).

##### 4.5.3.1.2. Agar Bazlı Besiyerleri

Agar bazlı besiyerleri şeffaf olup erken üreyen mikroskopik kolonilerin inokulum kalıntılarından ayrımını sağlar. Ortalama üreme süresi; yumurta bazlı besiyerlerinde 21-42 gün iken, agar bazlı besiyerlerinde 18-28 gündür. Middlebrook 7H10 ve 7H11 agar sık kullanılan agar bazlı besiyerlerindedir. Middlebrook 7H11, güç üreyen ve INH dirençli *M. tuberculosis* izolatlarının üremesine yardımcı olan kazein hidrolizat içerdiği için daha sık kullanılmaktadır. Yumurta bazlı besiyerlerine göre, agar yüzeyinin daha geniş alana sahip oluşu ve 7H10 ve 7H11 besiyerlerinde üremenin daha iyi olması sebebiyle, duyarlılık testinde dirençli popülasyon yüzdesini belirlemek daha kolaydır. Agar besiyerlerine zenginleştirici

olarak eklenen oleik asit-albümin-dekstroz-katalaz (OADC) maliyeti arttırırken, besiyerinin raf ömrünün kısa oluşu (buzdolabında bir ay) ve sıvı besiyerlerine göre mikobakteriyel üremenin yavaş olması dezavantaj yaratmaktadır. Aşırı sıcak ve ışık maruziyeti besiyerlerinin bozulmasına ve mikobakteriler için toksik olan formaldehit salınmasına neden olabileceği için besiyerlerinin hazırlanması, saklanması ve inkübasyonunda dikkatli olmak gerekir (23,39,41).

#### 4.5.3.2. Sıvı Besiyerleri

Sıvı besiyerleri hem primer izolasyonda hem mikobakteri suşlarını canlandırmada kullanılabilir. Sıvı besiyerlerinde ortalama üreme süresi 7-14 gün olup, katı besiyerlerine göre daha hızlı sonuç vermektedir. Aynı zamanda mikobakteri izolasyon oranları yüksektir. Middlebrook 7H9 ve Dubos Tween Albumin besiyeri mikobakteri stok suşlarının canlandırılmasında, İDT ve diğer in-vitro testler için inokulum hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. 7H9 besiyeri birçok biyokimyasal test için bazal besiyeridir. Sıvı besiyerine eklenebilen Tween 80 mikobakteri kümelerinin dağılımını sağlayan sürfaktan görevi görerek besiyerinde daha homojen üreme sağlayabilir. Sıvı besiyerlerinin temel kısıtlılığı koloni morfolojisinin gözlenmemesidir (23,39).

Günümüzde birçok ticari tam otomatize ve yarı otomatize sıvı kültür sistemi mevcuttur. Uzun yıllar kullanımda olan BACTEC 460 sistemi (Becton-Dickinson, ABD) radyoaktif madde kullanımı nedeniyle artık üretilmemektedir. Aynı firma tarafından üretilen BACTEC MGIT (*Mycobacteria growth indicator tube*) 960 sistemi (Becton-Dickinson, ABD), BBL MGIT 7 mL adlı sıvı kültür besiyerinin kullanıldığı radyometrik olmayan tam otomatize yüksek kapasiteli bir sistemdir. MGIT besiyeri, modifiye Middlebrook 7H9 içermekle birlikte kullanımdan önce besiyerine mikobakterilerin üremesini desteklemek için OADC içeren bir üreme desteği ve kontaminantların üremesini engelleyen polimiksin B, amfoterisin B, nalidiksik asit, trimetoprim, azlosilin (PANTA) içeren antibiyotik karışımı eklenmektedir. Üreme desteğinde bulunan, oleik asit mikobakteriyel metabolizmada kullanılır, albümin mikobakteriler için toksik olabilecek yağ asitlerini bağlar, dekstroz enerji kaynağı olarak kullanılır ve katalaz toksik peroksitleri parçalar. Her MGIT tüpünün dip kısmındaki silikonda, besiyerinde çözünen oksijenin varlığına duyarlı rutenyum pentahidrat metal kompleksi içeren bileşik vardır. Başlangıçta, yüksek miktarlardaki çözülmüş oksijen, silikon tabakaya gönderilen ultraviyole (UV) ışınına karşı floresan yayılımını engellemektedir. Üreme sırasında, mikobakteriler besiyerindeki oksijeni tüketmekte ve azalan oksijen, bileşiğin floresan yayımına izin vermektedir. Sistem, devamlı olarak tüpteki floresan



artışını görüntülemekte ve üreme indeksi - *growth unit*- (GU) olarak kaydetmektedir. GU değeri eşik değeri aştığında cihaz pozitif sinyal vermektedir. MGIT 960'ın en önemli avantajları; çapraz kontaminasyon olasılığının düşük olması, enjektör ile inokulasyona ihtiyaç duyulmaması ve radyoizotop içermemesidir. Yüksek kontaminasyon oranları, kan ile floresanın maskelenmesi ve bazı dekontaminasyon yöntemleriyle uyumsuzluğu MGIT 960'ın dezavantajlarıdır (23,40).

#### 4.5.4. Kültürde *Mycobacterium tuberculosis* kompleks'in Tanımlanması

MTK'nin tanımlanması hasta için uygun tedavi seçimini belirlediği için önemli bir basamaktır. Örnek kabulünü takip eden ortalama 21 gün içerisinde MTK tanımlanması raporlanmalıdır. Günümüzde kültürde üremiş izolatların MTK-TDM olarak ayırımında üreme özellikleri ve biyokimyasal testler gibi fenotipik yöntemlerin kullanımı oldukça azalmakla birlikte genotipik ve immünokromotografik yöntemlerin kullanımı yaygınlaşmıştır (39).

##### 4.5.4.1. Fenotipik Yöntemler

**Üreme özellikleri:** MTK; katı besiyerine kültür pasajında 7. günden sonra ürer. R tipi, kuru, devetüyü renginde pigmentsiz koloniler oluşturur. Sıvı kültürden yapılan ARB boyamanın incelenmesinde yılanvari yapılar (kord faktör) görülür. Üreme özellikleri MTK-TDM ayırımına yardımcı olmakla birlikte, MTK'nin kesin tanısı için yeterli değildir (39).

**Katalaz testi:** Katalaz enzimi hidrojen peroksiti ( $H_2O_2$ ) su ve oksijene ayırır. Açığa çıkan oksijen hava kabarcığı şeklinde gözlenir. Bazı INH dirençli *M. tuberculosis* ve *M. bovis* suşlarının dışındaki bütün mikobakteriler katalaz aktivitesi gösterirler. Ancak mikobakterilerin katalaz üretimi ve enzimin ısıya stabilitesi değişkenlik gösterir. Katalaz aktivitesini saptamak için semikantitatif test ve  $68^\circ C$  ısıya stabil katalaz olmak üzere iki test kullanılır. Semikantitatif testte mikobakteriler, hava kabarcıklarının yüksekliğinin 45mm'den az veya çok olmasına göre değerlendirilir. Isıya stabil katalaz testinde ise katalaz enziminin bazı formlarının  $68^\circ C$ 'de 20 dakika ısıtıldığında inaktive olma özelliğinden yararlanır. MTK,  $68^\circ C$ 'de ısıtıldığında katalaz aktivitesini kaybeder. Semikantitatif testte ise hava kabarcıklarının yüksekliğinin 45mm'den az olması MTK lehinedir. Hidrofobik ve kümeli olan mikobakterilerin dağılmasını ve enzimin kolayca açığa çıkmasını sağlamak için, mikobakteri tür tanımlamasında kullanılan katalaz testinde, diğer bakterilerde bulunan enzimin araştırılmasında kullanılan ayraçtan farklı olarak %30  $H_2O_2$  ile güçlü bir deterjan olan %10 Tween-80 karışımı kullanılır (38-40).

**Niasin testi:** Bütün mikobakteriler niasin ribonükleotid üretir. Ancak *M. tuberculosis* ile bazı *M. simiae* ve *M. chelonae* suşları niasini, nikotinamid adenin dinükleotide (NAD) dönüştürecek metabolik yolağa sahip değildir. Bu test besiyerinde biriken niasinin gösterilmesi temeline dayanmaktadır (38-40).

**Nitrat redüksiyon testi:** Mikobakteriler nitroredüktaz enzimi ile nitratları nitritlere indirgeyebilirler. Bu test ile koloni morfolojisi, üreme hızı ve pigment üretimi benzerlik gösteren mikobakteriler ayırt edilebilir. *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. szulgai*, bazı saprofit kromojen olmayan *M. smegmatis* ve *M. fortuitum* grubu nitrat redüktaz pozitifdir (38). Katalaz, niasin ve nitrat redüksiyon testleri bir arada kullanılmalıdır, tek başlarına MTK-TDM ayrımı yapamazlar (39).

**P-nitrobenzoik asit (PNB) testi:** MTK'nin tanımlanmasında 37°C'de PNB'li besiyerinde üreme özelliği kullanılabilir. PNB, MTK'nin üremesini seçici olarak inhibe eder (39).

**Mikolik asit analizi:** Mikobakteri hücre duvarındaki yüksek lipid içeriğinin temel komponentlerinden olan mikolik asitler, sınırlı sayıda cinstе bulunmakta, mikobakteri cinsleri en uzun mikolik asit içeriğini (60-90 karbonlu) sergilemektedir. Her mikobakteri türünde farklı fonksiyonel gruplar ve farklı kombinasyonlarda yer alan yedi tip mikolik asit bulunmaktadır. Mikobakteriyel hücre duvarı lipid içeriğinin analizinden tanımlamada yararlanılmaktadır. Bu amaçla ince tabaka kromatografisi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve gaz sıvı kromatografisi teknikleri kullanılmaktadır (11). Ancak bu yöntemler, uygulama zorluğu ve ek ekipman ihtiyacı nedeniyle yaygın kullanım alanı bulamamıştır (39).

#### 4.5.4.2. Genotipik Yöntemler

**Ters hibridizasyon testi (Line probe assay - LPA):** Kültür izolatından amplifiye edilmiş biyotinle işaretli PCR ürünlerinin, membran şeritler üzerine bağlanmış özgün DNA problemleri ile hibridize edilmesi temeline dayanır (39). INNO-LiPA Mycobacteria v2 testi (Innogenetics, Belgium), 16S-23S rRNA genleri arasında 'spacer region' bölgesini hedef alan bir test olup 16 farklı mikobakteri türü (MTK, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. chelonae* kompleks, *M. genavense*, *M. simiae*, *M. marinum*/*M. ulcerans*, *M. malmoense*, *M. haemophilum*, *M. fortuitum* kompleks ve *M. smegmatis*) tanımlanabilmektedir (11,43). Testin önemli artıları, yaklaşık beş saatte

tamamlanması ve yüksek duyarlılık ve özgüllükle laboratuvarlarda sıklıkla izole edilen mikobakterilerin tanımlanmasını sağlamasıdır (43). GenoType MTBC (Hain Lifescience, Nehren-Germany) testi, MTK üyelerinin ayırt edilmesinde ve *M. bovis* BCG tanımlanmasında kullanılmaktadır. Yöntem, esas olarak gyrB DNA sekans polimorfizmi ve *M. bovis* BCG RD1 delesyonunu değerlendirmektedir. Testin tanısız sonuç verme süresinin oldukça kısa olması ve özel teknik beceri gerektirmemesi önemli avantajlarından (11,44). LPA'lar hızlı, uygulaması ve değerlendirmesi kolay, ancak maliyeti yüksek testlerdir (39).

**PCR restriksiyon enzim analizi (PRA):** Katı veya sıvı kültürden soyutlanan izolatların ısı şok proteini - '*heat shock protein*' (hsp65) geninin 441 bp'lik bir parçasının PCR ile amplifikasyonunu takiben amplifiye ürünlerin BstEII ve HaeIII restriksiyon enzimleri ile kesimi temeline dayanmaktadır. Kesim reaksiyon ürünleri agaroz jel elektroforez yöntemi ile incelenir. Elde edilen restriksiyon paternleri, fragman büyüklüğü algoritması ile kıyaslanarak mikobakteri türü belirlenir. Test bir gün içinde tamamlanabilir. Test maliyet açısından uygun olmakla beraber ekipman, donanım ve deneyimli teknik personel gerektirir (39).

#### 4.5.4.3. İmmünokromotografik Yöntemler

Kültür sırasında salınan predominant proteinlerden olan MTK'ye özgü MPT64 antijenini, MPT64 spesifik monoklonal antikor kullanılarak, immünokromotografik temelli yöntem ile saptamaya dayanmaktadır. Yaklaşık 15 dakikada sonuç veren kalitatif test, kontrol ve test bantlarının pozitifliğine göre yorumlanarak, MTK-TDM ayırımında kullanılmaktadır. Hem katı hem de sıvı kültürden çalışılabilen ek işlem ve ekipman gerektirmeyen test, basit, uygulaması kolay, güvenilir, hızlı ve düşük maliyetlidir (39,41,45,46).

#### 4.5.5. Klinik Örneklerden *Mycobacterium tuberculosis* kompleks'in Tanısında Kullanılan Moleküler Yöntemler

Mikroskobik incelemenin TB tanısında düşük duyarlılığa sahip oluşu, yavaş üreyen mikobakterilerin tanısının kültür yöntemleri ile uzun zaman alması sebebiyle klinik örnekten mikobakterilerin doğrudan saptanmasında nükleik asit çoğaltma yöntemleri yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (39,47,48). Geleneksel yöntemlere göre daha hızlı sonuç verse de, moleküler testlerin klinik örnekte TB varlığının aranmasında direkt bakı ve altın standart olan kültür kombinasyonu ile birlikte uygulanması önerilmektedir. Tüberkülozun moleküler tanısında; geleneksel PCR, RT-PCR, zincir ayrıştırma amplifikasyon, transkripsiyon aracılı

amplifikasyon, ilmiik aracılı izotermal amplifikasyon - 'loop-mediated isothermal amplification' (LAMP), ligaz zincir reaksiyonu yöntemlerine dayanan testler kullanılmaktadır. MTK'nin moleküler yöntemlerle saptanmasında yaygın olarak kullanılan hedef bölgeler; *M. tuberculosis*'in IS6110, 16s rRNA, 16S 23S ITS, rpoB ve hsp65 gen bölgeleridir. Moleküler testlerle canlı-ölü basil ayrımı yapılamamaktadır. Moleküler yöntemlerle MTK tanımlanması örnek kabulünü takip eden ortalama 7 gün içerisinde raporlanmalıdır (39).

#### 4.5.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Bu yöntemle çoğaltılması istenen DNA örneği, replikasyon için gerekli olan primerler, *Thermus aquaticus* (Taq) polimerazı, nükleotitler gibi gerekli maddelerle üç değişik sıcaklıkta, bir döngü içerisinde tutulur. İlk basamakta (denatürasyon), 94°C'ye kadar ısıtılan DNA'nın iki zinciri birbirinden ayrılır. İkinci basamakta (birleşme), sadece çoğaltılmak istenen DNA dizisini özgül olarak tanıyan iki primer, sıcaklığın 55-72°C'ye düşürülmesiyle, ilk basamakta ayrılmış olan kalıp DNA tek zincirlerine bağlanır. Üçüncü basamakta (uzama), optimum çalışma sıcaklığı 72°C olan Taq polimerazı (ya da sığağa dayanıklı başka polimerazlar) bu sıcaklıkta primerlerden başlayarak DNA sentezi yapar. Bu üç basamak bir döngüyü oluşturur ve her tekrarlanışta iki primer arasındaki hedef DNA parçası iki katına çıkarılmış olur. Yeni sentezlenen DNA bir sonraki döngüde kalıp olarak kullanılır ve DNA parçaları geometrik olarak artar. Primerler genellikle 18 - 24 nükleotid uzunluğundadır ve % 50 - 60 oranında G+C içeriğine sahip olmalıdır. Primer çiftinin erime sıcaklığı 5°C' lik aralıkta değişmeli ve ideal olarak 55-65°C olmalıdır. Primerler birbirleri ile komplementer bölge içermemelidir. PCR'de kullanılan DNA polimerazların denatürasyon basamağında denatüre olmaması için 95°C gibi sıcaklıklara dayanıklı olması gerekmektedir (49).

Birçok laboratuvarında kullanılan *in-house* PCR yönteminde ekstraksiyon ve amplicon saptanmasında farklı yöntemlerin kullanılması sebebiyle, duyarlılık ve özgüllükler değişkenlik göstermektedir. Noordhoek ve ark. tarafından yapılan çok merkezli kör çalışmada, *M. bovis* içeren 200 balgam, tükürük ve su örneği yedi farklı laboratuvar tarafından IS6110 hedef bölge seçilerek PCR ile çalışılmış, her laboratuvarın kendi PCR yöntemini kullandığı bu çalışmada, yalancı pozitifliklerin %3-77 oranında değiştiği saptanmıştır (50).

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi – "Food and Drug Administration" (FDA) tarafından 1996 yılında onaylanan PCR tabanlı Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* testinde (Roche

Moleküler Sistemleri, Indianapolis) internal kontrol bulunmakta ve kontaminasyonu önlemek için Urasil-N-Glikozilaz kullanılmaktadır. Bu testin FDA onayı, son bir yıl içerisinde anti-TB ilaçlarla tedavi almamış hastaların ARB pozitif solunum yolu örneklerinde ve *M. tuberculosis* ayırımının yapılabildiği merkezlerde kültür ile birlikte yapılması koşulu ile geçerlidir. Transkripsiyon aracılı çoğaltma temeline dayanan Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct (MTD) Test (Gen-Probe, Inc, San Diego) 1995 yılında FDA tarafından onaylanmıştır. Bu yöntem de Amplicor'da olduğu gibi son bir yıl içerisinde anti-TB ilaçlarla tedavi almamış hastaların solunum yolu örneklerinde ve *M. tuberculosis* ayırımının yapılabildiği merkezlerde kültür ile birlikte yapılması koşulu ile FDA onaylı olup, 1999 yılında onaylanan geliştirilmiş ikinci kuşak MTD testi Amplicor'dan farklı olarak sadece ARB pozitif örneklere değil, negatif örneklere de uygulanabilmektedir (38,41,48).

#### 4.5.5.2. Gerçek Zamanlı PCR

Geleneksel PCR ile amplicon varlığı reaksiyon sonunda araştırıldığı için başlangıçtaki hedef nükleik asit miktarı saptanamaz. RT-PCR, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak floresan sinyalindeki artışın ölçülmesi temeline dayanmaktadır. Yayılan ışığa, sistemin optik parçası vasıtasıyla okunarak saptama işlemi gerçekleşir. Optik düzenden alınan sinyalleri bilgisayar aracılığıyla grafiğe dönüştürüp yorumlayan bir yazılım ve ısı döngüleyici RT-PCR'ın temel öğelerini oluşturur. Ölçülen floresan, reaksiyon sırasında artan amplicon miktarıyla doğru orantılıdır. Amplifiye olan ürünlerin tespitinde, amplicondaki belli bir dizi ile hibridize olan özgül oligonükleotid probaları (*Taqman* veya hidroliz probaları, Floresan Rezonans Enerji Transferi -FRET- probu, *molecular beacon*, *scorpion*) veya amplifiye olan herhangi bir nükleik asiti tespit eden özgül olmayan moleküller (SYBR green I) kullanılabilir (38).

RT-PCR'ı geleneksel PCR'dan farklı kılan temel özellik olan, amplifikasyon ve saptamanın eş zamanlı olarak kapalı reaksiyon ortamında yapılması sayesinde testin hızı artmış olup kontaminasyon riski azalmıştır. RT-PCR'ın duyarlılığı yüksek olup, çok sayıda örnek aynı anda çalışılabilmekte ve DNA ekstraksiyonunu takiben yaklaşık iki saat içinde test sonuçlanmaktadır (38).

2010 yılında DSÖ tarafından onaylanan GX testi, doğrudan klinik örneklerden, MTK DNA'sı ve RIF direncini belirleyen mutasyonları eş zamanlı saptama amacıyla semi-kantitatif *nested* RT-PCR prensibiyle çalışmaktadır. Test, bakteriyel lizis, nükleik asit ekstraksiyonu, amplifikasyon ve amplicon saptama dahil olmak üzere neredeyse tamamen otomatik olarak,

gerekli tüm reaktifleri içeren, tek kullanımlık plastik bir kartuş kullanılarak, GeneXpert platformundaki (Cepheid, Sunnyvale, CA) modüllerde gerçekleştirilmekte, iki saatten kısa sürede sonuçlanmaktadır. Örnekte MTK bulunmaması durumunda, testin çalışıp çalışmadığını kontrol etmek amacı ile kartuş içerisinde pozitif kontrol olarak *Bacillus globigii* sporları ve DNA'sına özgü bir prob bulunmaktadır. Modüller birbirinden bağımsız çalıştığı için örnekleri gruplamak gerekmemekte, her modül farklı zamanda çalışabilmektedir (4,5,13,51,52).

#### 4.5.5.3. İlmik Aracılı İzotermal Amplifikasyon (LAMP)

Tepkime sırasında iki önemli kısmı olan bir primer bir ucu ile kalıp DNA'ya bağlanarak bir DNA zincirinin oluşumunu sağlar. Bunun başlangıç noktasının gerisinden bağlanan bir primer ise yeni bir zincir sentezi yaparken ilk sentezlenen zinciri bağlandığı yerden ayırır. Bu zincirin ucundaki primer kısmı katlanıp, kendi zinciri üzerindeki dizi uygunluğu gösteren kısma bağlanarak bir ilmik oluşturur. Bu ilmik içerisinde kalan tek zincirli DNA bundan sonraki döngülerde primerlerin bağlanıp yeniden DNA sentezini başlatacağı bölümleri oluşturur. Kısa sürede zincirler kendi üzerine katlanarak uzarlar ve çok miktarda büyük DNA zincirleri oluştururlar (53). Hedef nükleik asitte 6 bölgeye özgül 4 primer kullanıldığı için reaksiyonun özgüllüğü oldukça yüksektir. Tüm reaksiyonlar aynı sıcaklıkta (60-65°C) uygulanır. Termal döngüye bağlı zaman kaybı olmadığı için PCR'a kıyasla daha kısa sürede amplifikasyon gerçekleşir. Oldukça yüksek miktarda amplifikasyon ürünü verebilir ve reaksiyon tüpünde sınırlı kalacak saptama teknikleriyle değerlendirilebilir (54).

LAMP temelli ticari moleküler bir yöntem olan TB-LAMP (Eiken, Japonya), bir saatten kısa süren, sonuçların UV ışık altında çıplak gözle değerlendirilebildiği uygulaması kolay manuel bir testtir. Testin performansı balgam yayma mikroskopisinden yüksektir. DSÖ, Küresel TB 2016 Raporu'nda, TB-LAMP testinin, TB ile uyumlu semptom ve bulguları olan erişkinlerde akciğer TB'si tanısında mikroskopinin yerine kullanılabileceğini önermektedir. Özellikle balgam yayma mikroskopisi negatif örneklere ileri inceleme gerektiğinde, akciğer TB'si ile uyumlu semptom ve bulguları olan erişkinlerde mikrobiyoloji takip eden test olarak da kullanılabileceği belirtilmektedir (1).

#### 4.6. İlaç Direnci

HIV enfeksiyonu sıklığında artış ve aktif TB ile ilişkili oluşu, *M. tuberculosis* suşlarında birinci seçenek anti-TB ilaçlara karşı gelişen direncin artması mevcut TB epidemisinin devam etmesinin temel sebepleridir (2).

MTK'de ilaç direnci, düşük frekansta, rasgele ve genellikle tek basamaklı genetik mutasyonlar sonucu meydana gelir, bakteriler arası genetik aktarım söz konusu değildir. TB'de ortaya çıkan direnç diğer patojenlerden farklı olarak plazmidlerle taşınmaz. Geri dönüşümsüzdür. Bu nedenle hastalığı oluşturan mikobakteri topluluğu içinde çok düşük bir oranda dirençli mutantlar bulunabilir. İlaça duyarlı bakterilerin ölmesiyle varolan dirençli mutantlar belirgin hale gelir. Spontan direnç oranları sırasıyla RIF, INH, EMB ve SM için  $10^{-8}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-6}$  ve  $10^{-5}$  olarak gerçekleşmektedir. Kromozomlar üzerindeki direnç bölgeleri birbirleriyle bağlantılı olmadıklarından, bakterinin iki ilaca birden spontan direnç geliştirmesi, olasılıkların çarpımına eşittir (13,23,39,55).

Birçok faktörle birlikte genellikle uygunsuz veya tamamlanmamış tedaviye bağlı tedavi başarısızlığı, esas olarak ilaç direncinin (kazanılmış direnç) ortaya çıkmasına bağlı olan hastalığın persistansı ile sonuçlanır. İlaç direnci gelişimiyle ilgili temel faktörler; kavite varlığıyla beraber yayma pozitif balgam ve pozitif balgam kültürü, tedavi uyumsuzluğu (ilaçların maliyeti, uzun tedavi süresi, çoklu ilaç kombinasyonlarının kullanılması ve ilaç yan etkileri gibi faktörlere bağlı), tedavi başarısızlığı, HIV ile birlikte enfeksiyon, yüksek endemik ülkelerde kaynakların yetersizliği ve anti-TB ilaçlarla tedavi öyküsünü kapsamaktadır. Ortaya çıkan dirençli *M. tuberculosis* suşları ilaç tedavisi başlanmamış yeni bir konağa bulaştığında primer direnç meydana gelmektedir (2).

En etkin anti-TB ilaçlardan RIF ve INH'a dirençli basillerin neden olduğu tüberküloz olguları ÇİD-TB olarak tanımlanmaktadır. YİD-TB ise RIF ve INH direncine ek olarak bir kinolona ve bir de ikinci grup enjeksiyonla verilen ilaca (kanamisin, kapreomisin, amikasin) direnç olmasıdır (39).

ÇİD-TB tedavisi, yaklaşık iki yıl sürmekte, ikinci seçenek ilaçların kapsamlı kullanımına ihtiyaç duyulmakta ve her olgu için bireysel tedavi uygulanmaktadır. Tedavinin maliyeti yüksek olup, hastaların yakın takibiyle daha yoğun gözetim gerekmektedir. Tedavide kullanılan ilaçların yüksek toksisiteye sahip olması nedeniyle yan etkilere sık rastlanmaktadır. ÇİD-TB suşları duyarlı suşlarla kıyaslandığında daha yüksek relaps ve mortalite oranlarına

sahiptir. ÇİD-TB aynı zamanda YİD-TB'nin ortaya çıkması açısından da risk faktörüdür. YİD-TB suşlarının tedavisi ÇİD-TB tedavisine göre daha kapsamlı ve zahmetli olmakla beraber mevcut ÇİD-TB vakalarının başarılı tedavisi ile YİD-TB'nin ortaya çıkışını en aza indirmek amaçlanmalıdır (2).

TB ilaç direncinin doğru ve hızlı tanısı, etkin tedavinin erken başlanmasını sağlayarak ilaç direncinin yayılımını azaltabilir, hastalığın süresini kısaltabilir, kür şansını artırabilir. Uygun klinik takip ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin oluşturulmasında iyi standardize edilmiş ve güvenilir test yöntemlerinin kullanımı son derece önemlidir (39).

#### **4.6.1. İlaç Duyarlılık Testi**

*M. tuberculosis* için İDT'nin temel iki amacı; TB vakalarının bireysel yönetimini (tedavi ve önleme) ve anti-TB ilaç direnci sürveyansını sağlamaktır. Dirençli suşlar tedavi olmamış hastalara bulaşabildiği için MTK için İDT tüm TB vakalarına önerilmektedir (39,56). Her hastadan elde edilen ilk MTK izolatına birinci seçenek ilaçlar (SM, INH, RIF, EMB) için İDT yapılmalıdır. Standart tedavinin önemli bir parçası olan PZA da birinci seçenek ilaçlar arasındadır, ancak güvenilir sonuçlara elde etmekte zorluk sebebiyle ilk test edilecek ilaçlar arasında yer almayabilir. Eğer kültürün negatifleşmesi tedaviden üç ay sonra gerçekleşmezse veya tedaviye başarısız yanıtın klinik kanıtı mevcutsa, İDT tekrar edilmelidir. Örnek alımından sonra 30 gün içinde İDT sonuçlarının rapor edilmesi önerilmektedir (39).

Mikobakterilerin ilaç direncinin belirlenmesinde fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılmaktadır. Fenotipik yöntemlerde antibiyotik eklenmiş besiyerinde MTK suşlarının inhibisyonu belirlenmektedir. Genotipik yöntemlerde ise ilaç direncinde rol oynayan gen mutasyonları moleküler yöntemlerle araştırılmaktadır (11).

##### **4.6.1.1. Fenotipik Yöntemler**

Kritik konsantrasyon, daha önce ilaçla karşılaşmamış mutasyon içermeyen klinik izolatların %95'ini inhibe eden fakat ilaca yanıtı olmayan hastalardan alınan izolatlara etki etmeyen en düşük konsantrasyondur. MTK izolatlarının duyarlılık testinde ilaç, kritik konsantrasyonda besiyerine eklenmektedir. Test edilecek ilacın kritik konsantrasyonu, besiyerinin türüne ve seçilen yönteme göre değişiklik göstermektedir (13,39).

Fenotipik veya kültüre dayalı İDT, katı veya sıvı besiyerinde direkt ve indirekt yöntemlerle uygulanabilir. Direkt yöntem için dekontamine veya konsantre edilmiş klinik



örnek ilaç içeren ve ilaç içermeyen besiyerlerine ekilir. Ancak kontaminasyon olasılığı yüksektir ve başarı oranı düşüktür. İndirekt yöntemde, klinik örnekten izole edilen suşa ait bakteriyel süspansiyondan ilaç içeren ve ilaç içermeyen besiyerlerine inokulasyon yapılır. Bu yöntemle başarı oranı yüksektir ancak zaman alır (3,11,39).

*M. tuberculosis* ilaç direncini saptama amaçlı fenotipik yöntemler arasında; orantı (proporsiyon), direnç oranı, mutlak konsantrasyon yöntemi, ticari sıvı kültür duyarlılık yöntemleri, sıvı besiyeri temelli mikroskopik inceleme İDT, kolorimetrik redoks indikatör yöntemleri, nitrat redüktaz testi, faja dayalı yöntemler, E test ve ince tabaka agar yöntemi (Thin Layer 7H11 agar) yer almaktadır (3,11).

#### **4.6.1.1.1. Agar Proporsiyon Yöntemi**

MTK için PZA dışındaki tüm anti-TB ilaçlara karşı duyarlılığı test etmede agar proporsiyon yöntemi, Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve birçok Avrupa ülkesinde standart yöntem olarak kullanılmıştır. Agar proporsiyon için önerilen besiyeri OADC eklenmiş Middlebrook 7H10'dur. İnokulum kaynağı, izolatın saf kültürü (indirekt yöntem) veya ARB pozitif bir örnek (direkt yöntem) olabilir. İndirekt yöntem için koloni süspansiyonu 1 McFarland standardına eşdeğer olmalı ve mikroorganizma kümesi içermemelidir. Hazırlanan süspansiyonun iki dilüsyonu (genellikle  $10^{-2}$  ve  $10^{-4}$ ) ilaç içeren ve ilaç içermeyen besiyerlerine inoküle edilmelidir. Proporsiyon yönteminde geçerli bir test için, inkübasyon süresinin sonunda, iki dilüsyon setinden en az birinin kontrol kadranında en az 50 koloni olmalı, üreme yetersizse test tekrar edilmelidir. Direnç oranı, üç haftalık inkübasyon süresinin sonunda, önerilen konsantrasyonda ilaç içeren kadrandaki koloni sayısının kontrol kadranındaki koloni sayısına bölümüyle hesaplanır. Direnç yüzdesi kritik proporsiyon olan %1'e eşit veya daha fazla olduğunda izolatın test edilen ilaca dirençli olduğu kabul edilir. Üç haftadan önce dirençli sonuçlar rapor edilebilir ancak duyarlı sonuçları rapor etmek için üç haftalık sürenin tamamlanması beklenmelidir (23,39,40). Agar proporsiyon yöntemi iyi standardize edilmiş güvenilir bir yöntem olmasına rağmen örnek kabulünden sonra indirekt yöntemle sonuçlanma süresi 7-10 haftaya ulaşmaktadır (39).

#### 4.6.1.1.2. BACTEC MGIT 960 Ticari Sıvı Kültür Duyarlılık Yöntemi

BACTEC MGIT 960 sisteminde kültürde izole edilmiş MTK izolatından SM, INH, RIF ve EMB duyarlılık testi, SIRE (SM-INH-RIF-EMB) kiti ile çalışılabilmektedir. MGIT SIRE kiti liyofilize SM, INH, RIF, EMB ve SIRE desteği içermektedir. Testte kullanılan SM (1 µg/mL), INH (0.1 µg/mL), RIF (1 µg/mL) ve EMB (5 µg/mL) kritik konsantrasyonları, yanlış duyarlılık sonuçlarını önlemek amacıyla agar proporsiyon yönteminde kullanılan kritik ilaç konsantrasyonlarından nispeten azdır. İDT için kullanılacak inokulum üretici firma talimatlarına uygun olarak katı veya sıvı kültürden hazırlanabilmektedir. İlaç içermeyen tüp (üreme kontrolü) için hazırlanan inokulum 1/100 oranında sulandırılırken, ilaç içeren tüp inokulumlarında sulandırma yapılmaz. Her tüpe 0.5 mL inokulum eklenir. Bu kalitatif test 4-13 gün sürmektedir. İDT sonuçlarının belirlemek için üreme kontrol (ÜK) tüpünün floresanı ile ilaç içeren tüplerin floresanı sistem tarafından devamlı analiz edilmektedir. İlaçlı tüplerde duyarlı bakteriler inhibe olurken, dirençli bakteriler floresan artışına sebep olmaktadır. 4-13 gün içinde ÜK tüpünün GU değeri 400'ü aştığında sistem İDT'nin tamamlandığı uyarısını verir. İlaç içeren tüpün GU değeri; 100'ü aşmış ise izolat o ilaç için dirençli, 100 veya altında olduğunda ise izolat o ilaç için duyarlı olarak değerlendirilir. ÜK tüpünün GU değeri, 4 günden daha kısa veya 13 günden daha uzun sürede 400'ü aşarsa test geçersiz olarak değerlendirilir. Sonuçlar değerlendirilirken %1'lik kritik proporsiyon temel alınmakta, sistem duyarlılık sonuçlarını otomatik yorumlamaktadır. MGIT 960 SIRE yönteminin agar proporsiyon yöntemine eşdeğer olduğu gösterilmiştir ve DSÖ tarafından kullanımı uygun bulunmuştur. Otomatize sıvı kültür duyarlılık sistemleri ile örnek kabulünden sonra sonuçlanma süresi yaklaşık 3-5 hafta sürmektedir (3,13,23,39,40).

#### 4.6.1.2. Genotipik Yöntemler

İlaç direncine neden olan mutasyonlar tanımlandıkça daha hızlı sonuç veren moleküler yöntemler süre açısından çok daha avantajlı hale gelmiştir. Moleküler yöntemlerle, klinik örnekten ve kültürde üremiş izolatlardan ilaç direncine sebep olan mutasyonlar saptanabilmekte, klinik örnekten direnci göstermek 1-2 günde mümkün olabilmektedir. Direnç saptama duyarlılığı mutasyonların çeşitliliğine ve ilişkili gen bölgesi sayısına bağlı olarak değişmektedir.

RIF dirençli suşların %90-95'inde RIF direncini belirleyen bölge *-rifampicin resistance determining region-* (RRDR) olarak bilinen *rpoB* geninin 81 baz çiftlik bölgesinde mutasyon gözlenmesi, duyarlı izolatlarda ise bu mutasyonun olmaması nedeniyle RIF,

moleküler İDT için ideal hedefdir. RIF dirençli izolatlar aynı zamanda %85-90 INH dirençli olduğundan, RIF direnci ÇİD-TB tanısı için bir marker olarak kullanılabilir. RIF'in aksine, diğer anti-TB ilaçlara karşı direncin genetik temeli daha kompleksdir ve genotipik sonuçlarla fenotipik sonuçların iyi korelasyonu için birçok gende mutasyonun tespit edilmesi gerekir. Relatif olarak çok sayıda gende değişiklik INH direnciyle ilişkilidir, ancak katG ve inhA genlerinde mutasyon INH dirençli suşların %75-85'inde bulunmaktadır (2,13,47).

PCR temelli DNA dizi analizi önceden bilinen ve bilinmeyen mutasyonların saptanmasında en doğrudan ve güvenilir yöntemdir. INH direncinde olduğu gibi birçok farklı genin dirençle ilişkili olduğu durumlarda veya mutasyonlar dağınık ve büyük segmentler halinde gözlemlendiği zaman her izolat için birden fazla sayıda dizi analizi gerekebildiğinden, bu yöntem kolay uygulanabilirliğini yitirmektedir. Buna karşın rpoB gibi korunmuş bir bölgede çok kısa segmentte sınırlı olan direnç genlerinin saptanmasında DNA dizi analizi kullanışlı bir tekniktir (47).

Direnç geni saptamak amacıyla kullanılan moleküler yöntemlerden günümüzde rutin uygulamada en çok LPA ve RT-PCR yöntemleri kullanılmaktadır (39). Yayma pozitif balgam örneklerinde (direkt yöntem) ve kültürde üremiş MTK izolatlarında (indirekt yöntem) direnç ile ilişkili en yaygın tek nükleotid polimorfizmlerini saptayan LPA yöntemlerinden; INNO-LiPA Rif.TB (Innogenetics, NV, Gent, Belçika) ve GenoType MTBDRplus versiyon 1 (Hain Lifesciences, Nehren, Almanya) ticari testleri RIF direncini saptamak için 2008 yılında DSÖ tarafından onaylanmıştır. INNO-LiPA Rif.TB testi, rpoB genindeki mutasyonu saptar. RIF direnci ÇİD-TB için önemli bir marker olduğu için, pozitif sonuç *M. tuberculosis* suşlarının yaklaşık %90'ında ÇİD-TB durumunu ortaya koyar. GenoType MTBDRplus, RIF direnci için rpoB, yüksek düzey INH direnciyle ilişkili katG ve genellikle düşük düzey INH direnciyle ilişkili inhA genlerindeki mutasyonları gösterir. Maliyeti yüksek olan bu testlerin sonuçları, bir çalışma günü içinde klinik örnekten ÇİD-TB saptanması için yüksek insidansa sahip ülkelerde tatmin edicidir (2,3). GenoType MTBDRplus versiyon 1 ile yeni geliştirilen LPA teknolojilerinden; GenoType MTBDRplus versiyon 2 (Hain Lifesciences, Nehren, Almanya) ve Nipro NTM+MDRTB saptama kiti 2 (Nipro, Japonya) 2016 yılında DSÖ tarafından değerlendirilmiş, RIF direnci için 21.225 örnekle 91 çalışmanın meta-analizinde duyarlılık %96.7, özgüllük %98.8; INH direnci için 20.954 örnekle 87 veri setinin meta-analizinde duyarlılık %90.2, özgüllük %99.2 ve ÇİD-TB tanısı için 13.033 örnekle 57 veri setinin meta-analizinde duyarlılık %92.9, özgüllük %99.3 bulunmuştur. RIF ve INH direncini saptamada yayma pozitif balgam örneklerinde direkt testle ve kültürde izole edilmiş MTK

izolatlarında fenotipik İDT yerine LPA'ların kullanılabilceği önerilmiştir. Ancak, bu yöntemlerin yayma negatif örneklerde kullanımı önerilmemektedir. Ayrıca, diğer anti-TB ilaçlara direnci belirlemek ve ek ilaç direncini ortaya koymak için fenotipik İDT ihtiyacı devam etmektedir. Bununla birlikte, özellikle INH direnç prevalansının yüksek olduğu bölgelerde, LPA ile INH direncini belirleyen mutasyon saptanmayan hasta izolatları, yalancı negatiflik göz önünde bulundurularak, fenotipik İDT ile doğrulanmalıdır. Her üç yöntemde de aynı rpoB, katG ve inhA mutasyon problemleri bulunmakla birlikte, Nipro yönteminde ek olarak katG S315N mutasyon probu mevcuttur. Nipro yöntemiyle aynı zamanda *M. avium*, *M.intracellulare* ve *M. kansasii* türlerinin diğer TDM'lerden ayrımı yapılabilmektedir (57).

RT-PCR ile mutasyon gözlenmesi beklenen anti-TB ilacın hedefi olan proteinleri kodlayan genler amplifiye edilir ve amplikonlar *taqman*, FRET, *molecular beacon* gibi çeşitli problemler kullanılarak saptanabilir (11,13). Yüksek endemik ülkelerde tedavi aşamasında hızlı ve basit tanı araçlarına duyulan acil ihtiyaca yanıt vermek için 2009 yılında GX testinin geliştirilmesi, TB ile mücadelede önemli bir dönüm noktası olmuştur. Semi-kantitatif *nested* RT-PCR temelli GX testi, doğrudan klinik örnekten, rpoB geninin MTK özgül dizisini amplifiye ederek, RRDR mutasyonları için beş farklı moleküler prob aracılığıyla, MTK DNA'sı ve RIF direncini saptamaktadır (3,51,58). 1730 hastaya ait balgam örnekleriyle yapılan çok merkezli bir çalışmada, MTK DNA'sını saptamada testin duyarlılığı yayma pozitif hastalarda %99.8, yayma negatif hastalarda %90.2 olarak bulunmuş ve testin %98.1 özgüllüğe sahip olduğu gösterilmiştir. Fenotipik İDT ile karşılaştırıldığında, GX testinin, RIF direncini saptamada duyarlılığı %97.6 ve özgüllüğü %98.1 olarak bulunmuştur (58). 2010 yılında DSÖ tarafından kullanımı onaylanan test, günümüzde çok sayıda ülkede, akciğer TB'si açısından şüpheli hastalarda başlangıç testi olarak ulusal algoritmalara dahil edilmiştir (1).

Genotipik yöntemler, bilinen mutasyonların saptanmasında güvenilir olmasına rağmen, seyrek olarak hedeflenen gen bölgesi dışındaki mutasyonlar da dirence neden olabilmektedir. Bununla birlikte, bu testlerle nadir görülen ve dirence yol açmayan sessiz mutasyonlar saptanarak yalancı pozitif sonuçlar da ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca moleküler test sonuçlarının fenotipik testler ile doğrulanması, ÇİD-TB ilişkili mutasyon saptandığında fenotipik yöntem ile birinci ve ikinci seçenek ilaçlara duyarlılığın test edilmesi önerilmektedir (39).

## 5. GEREÇ VE YÖNTEM

Haziran 2012 ile Kasım 2016 tarihleri arasında, tüberküloz ön tanısı ile Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'na mikroskopik inceleme ve kültür yöntemleri ile birlikte GX testi çalışılması için gönderilen klinik örneklerden elde edilen sonuçlar retrospektif olarak çalışmaya dahil edildi.

Verilerin istatistiksel analizleri SPSS versiyon 15 yazılımı kullanılarak yapıldı. MTK için kültür pozitifliği referans alınarak; GX testi ve mikroskopik incelemenin duyarlılık, özgüllük, pozitif öngörü değeri (PÖD) ve negatif öngörü değeri (NÖD) hesaplandı. GX testi ve mikroskopik inceleme arasındaki istatistiksel açıdan farklılık McNemar testi kullanılarak araştırıldı. MGIT SIRE yöntemi ile elde edilen İDT sonuçları referans alındığında, GX testinin RIF direncini saptamadaki duyarlılık ve özgüllüğü incelendi. GX testinin RIF direncini saptama performansı hesaplanırken; GX testinde MTK DNA'sı saptanmayan örnekler ve MTK DNA'sı saptanıp RIF direnci belirsiz olan örnekler ve MGIT SIRE yöntemi ile İDT sonucu mevcut olmayan örnekler (geçersiz sonuç veya kültürde üreme olmaması) analiz dışı bırakıldı. P-değerinin 0.05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar şeklinde değerlendirildi.

Laboratuvarımızda örnek alımı ve taşınması, örnek işleme, mikroskopik inceleme, kültür, İDT ve GX testi uygulamaları belirlenmiş kurallara göre yapılır.

### 5.1. Örnek Alımı ve Taşınması

**Balgam:** Steril kap kullanılır. En az 3 mL ve vasıflı örnek istenir. Ardışık üç gün, sabah ilk çıkarılan, öksürükle akciğerlerden gelen balgamın alınması ve hasta ağız temizliği yaptıktan sonra örnek vermesi önerilir. Uyarılmış (indüklenmiş) balgam ise balgam çıkaramayan hastalarda; nebülizatör yardımı ile aerosol haldeki 10 mL %3-10'luk hipertonic tuzlu su 15-30 dk boyunca hastaya yavaşça solutulduktan sonra, derin ve kuvvetli öksürük ile yaklaşık 10 mL örnek olacak şekilde alınır.

**Açlık mide sıvısı (AMS):** Laboratuvar teknisyeni tarafından verilen 0.1 gr NaHCO<sub>3</sub> eklenmiş polipropilen dibi konik, burgulu kapaklı steril tüp (falkon tüpü) kullanılır. Örnek miktarı en az 1 mL olmalıdır. Sabah hasta aç karnına ve yataktan kalkmadan (dikey pozisyona geçmeden) gastrik tüp ile 25-50 mL steril su veya serum fizyolojik (SF) verilip aspire edildikten sonra örnek alınmalıdır.

**Trakeal sekret (TS), bronş lavaj (BL) ve bronkoalveolar lavaj (BAL):** Steril tüpe alınarak laboratuvara ulaştırılır. Örnek miktarı en az 1 mL olmalıdır.

**İdrar:** 24 saatlik idrar toplama kabında sabah idrarının tamamı gönderilmelidir. Ardışık üç gün örnek gönderilmesi önerilir. İdrar veremeyen hastalarda mesaneden kateter ile ya da suprapubik aspirasyon ile örnek alınabilir.

**Steril vücut sıvıları (BOS, plevra, periton, perikard, eklem sıvıları):** Aseptik şartlarda, steril tüp/kap içine alınarak laboratuvara ulaştırılır. Örnek miktarı en az 2 mL, PCR istemi varsa 3 mL olmalıdır.

**Kan ve kemik iliği:** Laboratuvar teknisyeni tarafından verilen BACTEC Myco-F şişesi ve 1.5-2 mL steril distile su eklenmiş falkon tüpü kullanılır. Steril şartlarda BACTEC Myco-F şişesine 1-5 mL ve steril distile su eklenmiş tüpe 2 mL kan veya kemik iliği alınarak laboratuvara gönderilir.

**Doku biyopsisi:** Steril tüp/kap kullanılır. Steril şartlarda kazeöz kısımlardan en az 1 gr kadar doku biyopsi örneği alınarak laboratuvara ulaştırılır.

**Apse ve aspirasyon materyalleri:** Steril tüp/kap kullanılır. Örnek miktarı en az 0.5 mL olmalıdır. Aseptik şartlarda, yüzeysel eksuda uzaklaştırıldıktan sonra apse içeriği ve aspire edilen sıvı alınır.

**Dışkı:** Dışkı kabı kullanılır. En az 1 gr dışkı örneği laboratuvara gönderilir.

Hastalardan alınan örnekler aşırı sıcak ve soğuk, ani basınç değişikliği veya aşırı kuruma gibi olumsuz koşullardan korunarak laboratuvara en kısa sürede ulaştırılmalıdır. Örnekler ikincil kap ile gönderilmeli, oda ısısında laboratuvara ulaştırılmalıdır. Örneklerin laboratuvara ulaştırılması bir saati geçecek ise 24 saate kadar +4°C'de bekletilebilir. BOS, kemik iliği, kan örnekleri buzdolabına konulmamalıdır.

Klinik örnekler, barkodlarında örneğin hangi hastadan, ne zaman alındığı ve örnek tipinin yazılı olması ile otomasyon sisteminde hasta ve örnekle ilgili genel bilgilerin belirtilmiş olmasına dikkat edildikten sonra laboratuvarımızda çalışılmak üzere kabul edilir.

## 5.2. Örnek İşleme

Balgam, AMS, TS, BL, BAL, apse ve aspirasyon materyalleri, idrar, dışkı gibi steril olmayan veya steril şartlarda alınmayan örnekler flora bakterilerinin ortadan kaldırılması için dekontaminasyon işlemine alınır. BOS, plevra, periton, perikard ve eklem sıvısı gibi steril vücut sıvılarına, kan ve kemik iliği örneklerine dekontaminasyon uygulanmaz. Doku biyopsi örnekleri Middlebrook 7H9 besiyerinde 37°C'de bir gün bekletildikten sonra ezilerek parçalanır, steril bölgeden alınanlara dekontaminasyon uygulanmaz, steril bölge dışındakiler dekontamine edilir.

### 5.2.1. Dekontaminasyon İşlemi

Her örnek için; içerisinde yaklaşık 40 mg N-asetil-L-sistein (NALC) ve 4 mm çapında cam boncuklar bulunan 50 mL polipropilen tüp, içerisinde %2-4 NaOH ve %1.47 trisodyum sitrat x 3H<sub>2</sub>O çözeltisi bulunan plastik şişe, içerisinde 0.067 M 50 mL (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH= 6.8) steril fosfat tamponu bulunan plastik tüp ve içerisinde dezenfektan çözelti (%2.5 sodyum hipoklorit) bulunan plastik tüplerin yer aldığı Mycoprosafe® (Salubris, Türkiye) kiti kullanılır.

#### 5.2.1.1. İşlem Basamakları

1. İdrar örneği dışındaki örnekler; en fazla 10 mL olacak şekilde cam boncuklu tüp içerisine aktarılır. İdrar örnekleri ise 50 mL çizgisine kadar doldurulup 4000 rpm'de 15 dk soğutmalı santrifüj aletinde santrifüj edilir. Santrifüj sonunda süpernatant dezenfektan içeren kaba cam boncuklar dökülmeyecek şekilde dikkatlice boşaltılır, kalan çökelti ile işleme devam edilir.

2. Tüplere NaOH-sodyum sitrat çözeltisinden örnek miktarı kadar eklenir.

3. Tüplerin kapağı kapatıldıktan sonra 5-10 sn kadar vortekslenerek solüsyon ile materyalin iyice karışması sağlanır (Aerosol riski açısından her vorteksleme işleminden 5 dk sonra tüplerin kapakları açılır). Oda ısısında 15 dk, en fazla 20 dk bekletilir.

4. Tamamı (örnek, dekontaminant solüsyon sıvısı ve tampon) 50 mL olacak şekilde fosfat tamponu eklenir, 5-10 sn vortekslenerek iyice karışması sağlanır. 4000 rpm'de 15 dk soğutmalı santrifüj aletinde santrifüj edilir.

5. Santrifüj sonunda süpernatant dezenfektan içeren kaba cam boncuklar dökülmeyecek şekilde dikkatlice boşaltılır.

6. Çökelti vortekslenerek mikroskopik değerlendirme için 1x2 cm yayma preparatı hazırlanır.

7. Çökeltiye 5 mL fosfat tampon eklenir, 5-10 sn vortekslenerek iyice karışması sağlanır. pH kontrolü yapılır, 7 dışında ise yeniden fosfat tampon eklenerek vortekslenir. pH kontrolü ile 7 olduğu belirlendikten sonra bir adet kullanıma hazır BBL MGIT 7 mL tüpüne 0.5 mL, iki adet LJ besiyerine 0.1 mL ekim yapılır ve GX testi çalışılır.

### **5.2.2. Dekontaminasyon Uygulanmayan Örneklerin İşlenmesi**

BOS örneğinden bir adet kullanıma hazır BBL MGIT 7 mL tüpüne 0.5 mL, iki adet LJ besiyerine 0.1 mL ekim yapılır ve GX testi çalışılır. Mikroskopik değerlendirme için, 300 µL örnek 1700 rpm'de 5 dk sitosantrifüj yapılarak preparat hazırlanır.

Steril vücut boşluklarından alınan örneklerden bir adet kullanıma hazır BBL MGIT 7 mL tüpüne 0.5 mL, iki adet LJ besiyerine 0.1 mL ekim yapılır ve GX testi çalışılır. Mikroskopik değerlendirme için 1x2 cm yayma preparatı hazırlanır.

Kan ve kemik iliği örnekleri için, BACTEC-Myco-F şişesi BACTEC FX inkübatörüne yerleştirilir. Distile su eklenen tüpte gelen örnek, 5 dk kadar vortekslendikten sonra çökeltiden iki adet LJ besiyerine 0.1 mL ekim yapılır, GX testi çalışılır ve mikroskopik değerlendirme için preparat hazırlanır.

Steril bölgeden alınan doku biyopsi örneklerinden bir adet kullanıma hazır BBL MGIT 7 mL tüpüne 0.5 mL, iki adet LJ besiyerine 0.1 mL ekim yapılır ve GX testi çalışılır. Mikroskopik değerlendirme için 1x2 cm yayma preparatı hazırlanır.

Örnekler işlemlendikten sonra kalan çökelti/örnek, steril ependorflara aktarılır ve kültürler sonuçlandırılana kadar -20°C'de saklanır. İşlemi biten tüpler dezenfektan çözelti ile dezenfekte edilip otoklavlanarak atılır.



## 5.3. Mikroskopik İnceleme

### 5.3.1. Kinyoun Boyasının Hazırlanması

**Kinyoun karbol fuksin:** A karışımı (40 gr bazik fuksin + 200 mL %95 etanol) bazik fuksinin üzerine azar azar etanol ilave edilerek, biyogüvenlik kabininde kapakları gerektiğinde açılarak hazırlanır. B karışımı (80 gr fenol kristali + 1 L distile su) hazırlanırken, fenol kristali çeker ocakta kırılır ve distile su ile karıştırılıp hafifçe ısıtılarak eritilir. A ve B karışımının tamamı karıştırılarak koyu renkli bir şişeye aktarılır. Kinyoun karbol fuksin kullanılmadan önce filtre kağıdı ile süzülür.

**Asit-alkol:** 30 mL konsantre HCl dikkatlice ve yavaş bir şekilde 970 mL %95'lik alkol içerisine ilave edilerek hazırlanır.

**Metilen mavisi:** 1 L distile su içerisinde 3 gr metilen mavisi eritilir. Koyu renkli bir şişeye aktarılır. İyice çalkalanarak homojenize edilir.

Hazırlanan boya çözeltileri oda ısısında ve güneş ışığından uzakta saklanarak 6 ay süreyle kullanılabilir.

### 5.3.2. Preparatların Boyanma İşlemi

1. Preparatlar hazırlandıktan sonra biyogüvenlik kabini içinde kurumaya bırakılır ve alevden geçirilerek tespit edilir.

2. Preparatların üzerine yayma alanını kaplayacak şekilde karbol fuksin eklenerek 5 dk bekletilir.

3. Preparatlar çeşme suyunda yıkanır (Çeşme suyu çok az açılmalı, aksi takdirde materyalin kaybına neden olabilir) ve eğilerek üzerinde kalan su süzdürülür.

4. Preparatların üzerine asit-alkol eklenerek 2 dk dekolorize edilir.

5. Preparatlar tekrar çeşme suyunda yıkanır ve eğilerek üzerinde kalan su süzdürülür.

6. Preparatlara yayma alanını kaplayacak şekilde metilen mavisi eklenir, 30 sn kadar bekletilir.

7. Preparatlar tekrar çeşme suyunda yıkanır ve eğilerek üzerinde kalan su süzdürülür.

8. Preparatlar dik bir şekilde oda ısısında kurumaya bırakılır.

### 5.3.3. Preparatların Değerlendirilmesi

Kuruyan preparatlar ışık mikroskopunda x1000 büyütmede en az 300 alan gözlenerek değerlendirilir. Preparatlar değerlendirilirken sonuçlar Tablo 1'e göre yorumlanır.

## 5.4. Kültür Yöntemleri

### 5.4.1. Katı Kültür Yöntemi

LJ besiyerlerinin üremeleri 6 hafta boyunca haftada bir kez kontrol edilerek takip edilir. Koloni gözlenen LJ besiyerlerinden preparatlar hazırlanır.

Preparat hazırlarken; lam üzerine 2-3 damla SF damlatılır. Eküvyon yardımıyla LJ üzerinden koloni alınarak SF içinde ezilir. Preparat güvenlik kabini içinde kurutulup, alevden geçirilerek tespit edildikten sonra Kinyoun boyama yöntemiyle boyanır.

Preparatta ARB görülmezse; örneğin laboratuvara kabul zamanı üç haftayı aşmamışsa tekrar ekim yapılır. Tekrar ekim yönteminde; -20°C'de ependorfta saklanan örnek alınarak falkon tüpüne aktarılıp, eşit miktarda dekontaminasyon sıvısı eklenerek yeni örnekmiş gibi dekontaminasyon ve ekim prosedürü yinelenir ve 6 haftalık inkübasyon süresi başlatılır. Örneğin laboratuvara kabul zamanı üç haftayı aşmışsa inkübasyona devam edilir.

Preparatta ARB görülürse falkon tüpüne 2-3 mL SF konulup, LJ'deki kolonilerden bir miktar eküvyon yardımıyla alınır, SF içinde ezilir ve 1 - 2 dk vortekslenir. Tüpten 0.5 mL kadar enjektörle alınıp kullanıma hazır BBL MGIT 7 mL tüpüne ekim yapılır.

### 5.4.2. BACTEC MGIT 960 Sistemi

**Reaktifler:** BACTEC MGIT 960 sıvı kültür sistemi; BBL MGIT 7 mL tüpü, MGIT PANTA ve MGIT üreme desteği içerir.

**MGIT PANTA:** Her liyofilize şişe 10000 U Polimiksin B, 1000 µg Amfoterisin B, 4000 µg Nalidiksik asit, 1000 µg Trimetoprim, 1000 µg Azlosilin içerir.

**MGIT üreme desteği:** OADC içeren zenginleştirici solüsyonu kullanıma hazırdır.

**MGIT üreme desteği/ PANTA'nın hazırlanışı:** Liyofilize PANTA'ya 15 mL zenginleştirici solüsyon eklenerek tamamen eriyinceye kadar karıştırılır. Böylece zenginleştirici/antimikrobiyal karışımı hazırlanır. BBL MGIT 7 mL tüplerine ekimden önce bu karışımdan 0.8 mL ilave edilir.

Ekim yapılan tüplerin ağızları sıkıca kapatılır ve tüpler 2-3 kez ters düz edilerek besiyeri ve örneğin iyice karışması sağlanır. Cihazda 'Tube Entry' butonuna basılarak, cihaza önce tüp barkodu sonra örnek barkodu okutulur. Cihaz tarafından atanan istasyona tüp yerleştirilerek 6 hafta süreyle inkübe edilir.

İnkübasyon süresi sonunda BBL MGIT tüplerinde ve LJ besiyerlerinde ARB ürememesi durumunda sonuçlar, 'Aside dirençli bakteri üremedi' şeklinde raporlanır.

#### **5.4.2.1. Pozitif Sinyal Veren BBL MGIT Tüplerinin İşlenmesi**

İşlemler biyogüvenlik kabininde uygulanır. BBL MGIT 7 mL vasatı çok az protein içerdiğinden lam üzerine yapışmaz. Yapışması için 1-2 damla insan serumu ile 0.3 mL BBL MGIT 7 mL besiyeri içeriği lamın üzerinde karıştırılarak yayma preparat hazırlanır. Preparatlar, biyogüvenlik kabini içinde en az üç saat süreyle kurutulur, alevden geçirilerek tespit edilir ve Kinyoun boyama yapılır.

Preparatta bakteri/maya görülürse hasta örneği tekrar dekontamine edilerek tekrar işlenir, 6 hafta daha inkübe edilir. Preparatlarda ARB ya da bakteri/maya görülmezse yeni bir BBL MGIT 7 mL besiyerine pasaj yapılır, 6 hafta inkübe edilir. Preparatta ARB varlığında MTK-TDM ayrımı yapılır.

#### **5.4.2.2. MTK-TDM Ayrımının Yapılması**

BD MGIT TBc Identification (TBc ID) testi (Becton-Dickinson, ABD) üretici talimatları doğrultusunda kullanılır. TBc ID testi üreme olan BBL MGIT 7 mL tüplerinden MTK'ye ait MPT64 antijenini kalitatif olarak saptayan, immünokromatografik yöntemle dayalı bir testtir. Kaset test, güvenlik kabini içerisinde düz bir zemine yerleştirilir. Üreme olan BBL MGIT 7 mL tüpü ters düz edilerek iyice karıştırılır. Tüpün dibinden steril pipet ile 100 µL alınarak kaset testin örnek kuyucuğuna aktarılır. 15 dk sonra (maksimum 60 dk) sonuç değerlendirilir.

Test üzerinde 'C' (kontrol) ve 'T' (test) bölgeleri bulunmaktadır. C ve T bölgelerinin her ikisinde de kırmızı çizginin oluşması pozitif sonuç olarak değerlendirilir. Üreyen ARB pozitif mikroorganizmanın MTK olduğu raporlanır. C bölgesinde kırmızı çizginin oluşup, T bölgesinde oluşmaması negatif sonuç olarak değerlendirilir. Üreyen ARB pozitif mikroorganizmanın TDM olduğu raporlanır. C bölgesinde kırmızı çizginin oluşmaması ise geçersiz sonuç olarak değerlendirilir ve yeni bir kaset ile test tekrarlanır.

## 5.5. İlaç Duyarlılık Testi

İDT, BACTEC MGIT 960 SIRE kiti (Becton-Dickinson, ABD) ile üretici firma önerileri doğrultusunda gerçekleştirilir. BACTEC MGIT SIRE kiti; BACTEC MGIT 960 SIRE desteği ile liyofilize halde SM, INH, RIF ve EMB içerir. Her liyofilize antibiyotik şişesi 4 mL steril saf/deiyonize suyla sulandırılıp, tamamen çözünene kadar çalkalanarak kullanıma hazırlanır. Liyofilize antibiyotik şeması ve MGIT 7 mL besiyerindeki son konsantrasyonlar Tablo 2’de belirtilmektedir. BACTEC MGIT 960 SIRE desteği sadece 20 mL OADC zenginleştirici içerir.

**Tablo 2.** BBL MGIT tüplerine eklenen ilaç konsantrasyonları.

İlaç	Liyofilize antibiyotik içeren flakon	Sulandırım sonrası konsantrasyon	BBL MGIT tüpüne eklenmesi gereken volüm	BBL MGIT tüpündeki son konsantrasyon
MGIT SM	332 µg	83 µg/mL	100 µL	1.0 µg/mL
MGIT INH	33,2 µg	8,3 µg/mL	100 µL	0.1 µg/mL
MGIT RIF	332 µg	83 µg/mL	100 µL	1.0 µg/mL
MGIT EMB	1660 µg	415 µg/mL	100 µL	5.0 µg/mL

**Katı besiyerindeki izolata hazırlanması:** LJ besiyerinde üreyen koloniler güvenlik kabini içerisinde steril eküvyon çubuğu ile alınır. Steril boş tüp içerisinde 2 mL steril SF içerisinde homojenize edilerek süspansiyon hazırlanır. Hazırlanan süspansiyonun 0.5 mL’si kullanıma hazır BBL MGIT 7 mL tüpüne aktarılır. Tüp cihaza yerleştirilir ve pozitif sinyal verince buradan İDT çalışılır.

**BBL MGIT 7 mL tüpündeki izolata hazırlanması:** Cihazın pozitif sinyal vermesinden sonra üç gün içinde çalışılmalıdır. Üç günden daha uzun süre önce pozitif sinyal veren tüplerden pasaj yapıldıktan sonra çalışılmalıdır.

**MTK olarak tanımlanmış BBL MGIT 7 mL tüpünden İDT çalışılması:** Her izolat için beş adet MGIT 7 mL tüpü hazırlanır. İlk tüp ÜK, diğerleri sırayla SM, INH, RIF ve EMB olarak etiketlenir. Tüpler doğru sıra numarasıyla uygun boyuttaki antibiyotik duyarlılık testi seti taşıyıcısına yerleştirilir. Her tüpe BACTEC MGIT SIRE desteğinden 0.8 mL eklenir. ÜK

etiketli tüpe ilaç solüsyonu eklenmez. İlaç etiketli olan tüplere, aseptik koşullar altında, sulandırılmış liyofilize ilaç solüsyonlarından (Tablo 2) 0.1 mL eklenir.

ÜK tüpünün bakteri süspansiyonunu hazırlamak için 10 mL steril SF içerisine pozitif BBL MGIT 7 mL tüpünden 100 µL eklenerek 1/100 oranında sulandırım elde edilir. ÜK tüpüne hazırlanan sulandırımından 0.5 mL eklenir. SIRE tüplerinden her birine MTK olarak tanımlanmış BBL MGIT 7 mL tüpünden 0.5 mL inoküle edilir. Tüplerin ağzı sıkıca kapatılır, tüpler iyice karıştırılarak cihaza yerleştirilir.

Sonuçlar cihaz tarafından otomatik olarak yorumlanır ve duyarlı veya dirençli olarak rapor edilir. Test sonuçlarını etkileyen durumlarda cihaz, duyarlılık değerlendirilmesi olmaksızın 'hata' (X) olarak geçersiz sonuç verir.

### 5.6. GeneXpert MTB/RIF Yöntemi

GX yöntemi, GeneXpert cihaz sisteminde üretici talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilir. Sistem; cihaz, bilgisayar ve testleri çalıştırıp sonuçları görüntülemek için bilgisayara yüklenmiş bir yazılımdan oluşur. Test, tek kullanımlık GX kartuşunda çalışılır. Kartuş; MTK varlığı ve RIF direnci saptanması için reaktifleri, örnek işleme kontrolü - *sample processing control* (SPC) ve prob denetleme kontrolünü - *probe check control* (PCC) içerir.

**SPC:** Hedef bakterinin uygun işlemlendiğini kontrol etmek ve PCR reaksiyonunda inhibitör varlığını göstermek için kullanılır. Negatif olarak sonuçlanan bir testte pozitif olmalıdır, pozitif olarak sonuçlanan bir testte, negatif veya pozitif olabilir. Negatif testte SPC sinyali tespit edilemediğinde sonuç geçersiz sayılır.

**PCC:** GeneXpert sistemi reaktif rehidrasyonu, kartuşta PCR tüpünün dolumu, prob bütünlüğü ve boya kararlılığını doğrulamak için kalite kontrol 1-2 problemleri ile rpoB ve SPC problemlerinin floresan sinyallerini ölçer. PCC kabul kriterlerini karşıladığında geçerli sayılır.

#### İşlem Basamakları:

1. Steril olmayan örnekler dekontaminasyon işlemi sonrası, steril olan örnekler doğrudan çalışılır.
2. PCR çalışılacak örnekler, 50 mL'lik falkon tüplerinde 1.2 mL örnek ve 1.2 mL örnek hazırlama solüsyonu (GX örnek reaktifi) olacak şekilde karıştırılır.

3. Falkon tüpleri 5 dk aralıklarla vortekslenerek 15 dk oda sıcaklığında bekletilir.

4. Tek kullanımlık kartuşun kapağı açılır. Hazırlanan karışımdan steril bir pipetle 2 mL kadar (steril pipet üzerindeki çentiğin olduğu yere kadar) alınır, kartuşa yüklenir ve kartuşun kapağı kapatılır. Kartuşların, etiketli olmayan ve cihaza girecek çıkıntılı kısmı olan arka yüzeylerine temas edilmemesine dikkat edilir.

5. GeneXpert cihazının bağlı olduğu bilgisayar ve GeneXpert cihazı açılır. Bilgisayarda bulunan “GeneXpert DX” programında modüllerin uygunluğu gözlemlendikten sonra “Create test” ikonuna tıklanır.

6. Örnek numarası ve kartuş barkodu cihaza tanımlanır. Kartuşun yerleştirileceği modül (A1 veya A2 veya A3 veya A4) seçilir.

7. Yeşil ışık yanıp sönmeye başlayınca kartuş yerleştirilip modülün kapağı kapatılır ve yeşil ışık devamlı yanana kadar kapağa basılı tutularak test başlatılır.

Cihazın sonuç verme işlemi yaklaşık iki saat sürmektedir. Test sonuçlandığında testin çalışıldığı modülde yeşil ışık söner, modülün kapağı otomatik olarak açılır. GeneXpert sistemi ölçülen floresan sinyallere ve mevcut hesaplama algoritmalarına göre sonuçları yorumlar ve sonuçlar GeneXpert Dx programında ‘View Results’ penceresinde görüntülenir.

Örnekte MTK hedef bölgesinin saptanması, PCC'nin geçerli olduğunu ve SPC sinyalinin gerekli olmadığını gösterir. Düşük döngü eşiği – *cycle threshold* (Ct) değerleri, DNA hedefinin başlangıçta daha yüksek bir düzeyde olduğunu; yüksek Ct değerleri, DNA hedefinin başlangıçta daha düşük bir düzeyde olduğunu gösterir. Cihaz yazılımında bu sonuç, ‘*MTB DETECTED*’ metniyle izlenir. “*Mycobacterium tuberculosis* kompleks DNA’sı saptandı” olarak rapor edilir. Bu sonuçlardan “*Rif Resistance DETECTED*” metni ile izlenenler, “Rifampisin direncini belirleyen mutasyon saptandı, ilaç direnç testi ile doğrulanması gerekmektedir” olarak rapor edilir. “*Rif Resistance NOT DETECTED*” metni ile izlenenler, “Rifampisin direncini belirleyen mutasyon saptanmadı, ilaç direnç testi ile doğrulanması gerekmektedir” olarak rapor edilir. “*Rif Resistance INDETERMINATE*” metniyle izlenenler ise “Rifampisin direncini belirleyen mutasyon belirsizdir, ilaç direnç testi ile belirlenmesi gerekmektedir” olarak rapor edilir.

Örnekte MTK hedef bölgesinin tespit edilmediği, SPC ve PCC'nin geçerli olduğu durumlarda, cihaz yazılımında '*MTB NOT DETECTED*' metniyle görüntülenen sonuçlar "*Mycobacterium tuberculosis* kompleks DNA'sı saptanmadı" olarak rapor edilir.

Testin geçersizliği, hata varlığı veya yetersiz veri sebebiyle cihaz sonuç vermediği takdirde örnekte MTK varlığı veya yokluğu belirlenemediği için test tekrar edilir.



## 6. BULGULAR

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'na Haziran 2012 – Kasım 2016 arasında tüberküloz ön tanısı ile 12086 örnek gönderildi. Bu çalışmaya; 12086 örnekten boyalı mikroskopik inceleme, kültür yanısıra PCR (GX testi) testleri için de gönderilen 4199 hasta örneğinin sonuçları dahil edildi. Gönderilen klinik örneklerin Kinyoun boyalı mikroskopik inceleme, kültür ve GX testi sonuçları karşılaştırmalı olarak incelendi.

Çalışmaya dahil edilen 4199 örnekten 1361'i (%32.4) solunum yolu, 2838'i (%67.6) solunum yolu dışı örneklerden oluşmaktaydı (Tablo 3). Solunum yolu örneklerinin; %36.6'sı (498) balgam, %30.3'ü (412) BL, %14.8'i (202) BAL, %12.1'i (165) AMS ve %6.2'si (84) TS örneğiydi (Tablo 4). Solunum yolu dışı örneklerin; %47.9'u (1359) steril vücut sıvısı, %27.2'si (771) doku örneği, %10.7'si (305) abse ve aspirasyon materyali, %8.2'si (234) idrar örneği, %2'si (56) kemik iliği örneği, %1.9'u (53) kan örneği ve %2.1'i (60) ise diğer örnekler (dışkı, sürüntü örnekleri gibi) idi (Tablo 5). Steril vücut sıvılarının; %43.4'ü plevra sıvısı (590), %33.7'si BOS (458), %10'u periton sıvısı (136), %7.2'si eklem sıvısı (98) ve %5.7'si perikard sıvısı (77) örneğiydi. Doku örneklerinin; %82.1'i doku biyopsi örneği (633), %17.1'i (132) lenf nodu biyopsisi ve %0.8'i (6) plevral biyopsi örneğiydi.

**Tablo 3.** Örneklerin yıllara ve alındığı bölgeye göre dağılımı.

Tarih	Solunum yolu örnek sayısı [n(%)]	Solunum yolu dışı örnek sayısı [n(%)]	Toplam [n(%)]
2012*	108 (2.6)	284 (6.7)	392 (9.3)
2013	268 (6.4)	482 (11.5)	750 (17.9)
2014	387 (9.2)	577 (13.8)	964 (23.0)
2015	363 (8.6)	697 (16.6)	1060 (25.2)
2016**	235 (5.6)	798 (19.0)	1033 (24.6)
<b>Toplam</b>	<b>1361 (32.4)</b>	<b>2838 (67.6)</b>	<b>4199 (100.0)</b>
* Haziran 2012'den itibaren gelen örnekleri kapsamaktadır.			
** Ocak – Kasım 2016 arasında gelen örnekleri kapsamaktadır.			



**Tablo 4.** Solunum yolu örneklerinin yıllara ve örnek türüne göre dağılımı.

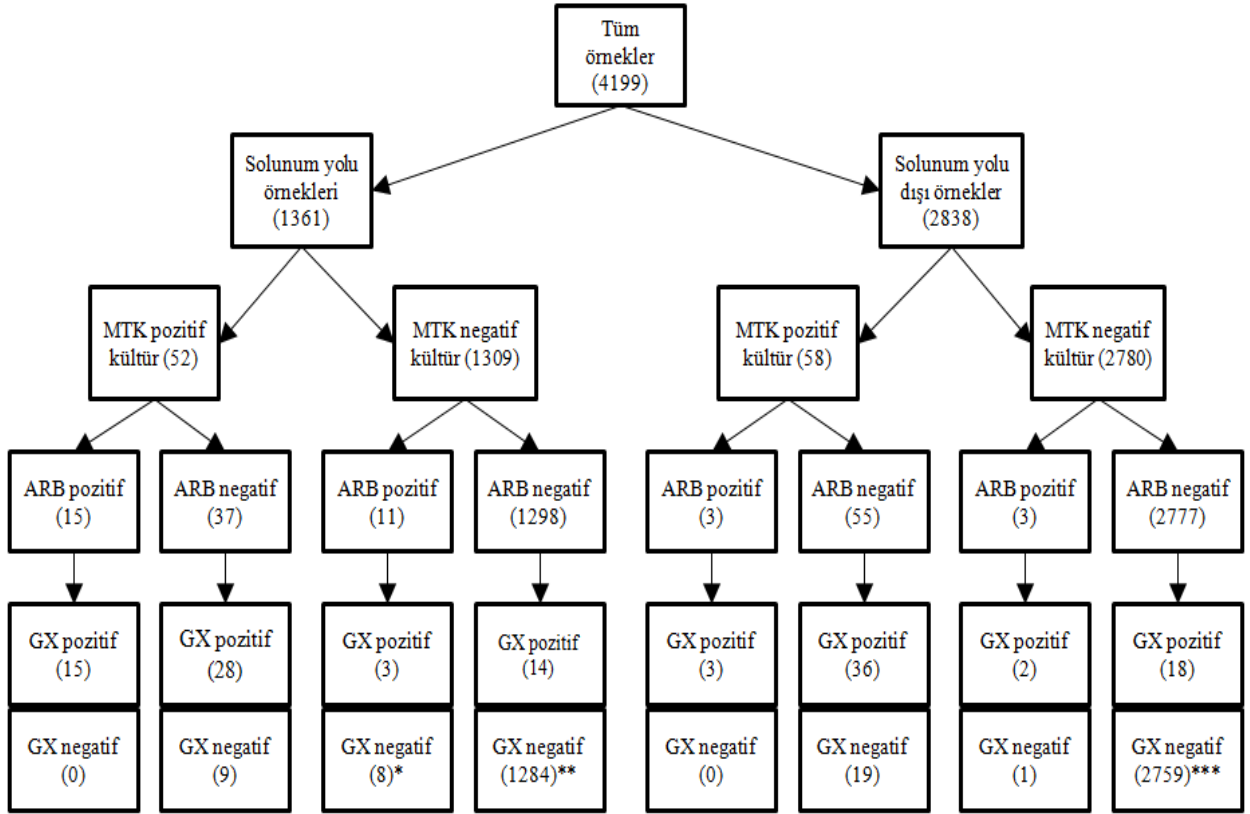
Tarih	Örnek sayısı (n)				
	Balgam	BL	BAL	AMS	TS
2012*	23	28	23	27	7
2013	85	69	34	63	17
2014	149	134	46	38	20
2015	134	125	51	24	29
2016**	107	56	48	13	11
<b>Toplam</b>	498	412	202	165	84
* Haziran 2012'den itibaren gelen örnekleri kapsamaktadır.					
** Ocak - Kasım 2016 arasında gelen örnekleri kapsamaktadır.					

**Tablo 5.** Solunum yolu dışı örneklerin yıllara ve örnek türüne göre dağılımı.

Tarih	Örnek sayısı (n)						
	Steril vücut sıvıları	Doku	Abse/aspirasyon materyali	İdrar	Kemik iliği	Kan	Diğer
2012*	135	85	20	20	6	4	14
2013	241	108	41	47	14	15	16
2014	313	122	54	51	8	11	18
2015	319	176	109	66	10	9	8
2016**	351	280	81	50	18	14	4
<b>Toplam</b>	1359	771	305	234	56	53	60
* Haziran 2012'den itibaren gelen örnekleri kapsamaktadır.							
** Ocak - Kasım 2016 arasında gelen örnekleri kapsamaktadır.							

Çalışmaya dahil edilen 4199 örneğin 110'unda (%2.6) kültürde MTK üremesi saptanırken, bunların 52'si (%47.3) solunum yolu örneği, 58'i (%52.7) ise solunum yolu dışı örnek idi. Kültürde MTK üremesi saptanan örneklerin GX testi ile 82'sinde MTK DNA'sı saptanırken (%74.5), mikroskopik incelemede 18'inde (%16.4) ARB görüldü. Örneklerin 32'sinde (%0.8) mikroskopik incelemede ARB pozitifliği mevcut olup, bunların 26'sı (%81.2) solunum yolu örneği, 6'sı (%18.8) ise solunum yolu dışı örnek idi. Mikroskopik incelemede ARB görülen örneklerin 18'inde (%56.3) kültürde MTK üremesi saptanırken, 5'inde (%15.6) kültürde TDM üremesi mevcuttu, 9'unda (%28.1) ise üreme olmadı. Örneklerin 119'unda (%2.8) GX testi ile MTK DNA'sı saptandı. Bunların 60'ı (%50.4) solunum yolu örneği, 59'u (%49.6) ise solunum yolu dışı örnek idi. GX testi ile MTK DNA'sı saptanan örneklerin 82'sinde (%68.9) kültürde MTK üremesi mevcut olup, 37'sinde (%31.1) üreme olmadı (Şekil 8). Örnek türlerinin kültür, mikroskopi ve GX testi sonuçları Tablo 6'de gösterilmektedir.

**Şekil 8.** Örneklerin kültür, mikroskopi ve GX testi sonuçları.



\*5 örneğin kültür sonucu TDM.\*\*29 örneğin kültür sonucu TDM.\*\*\*7 örneğin kültür sonucu TDM.

**Tablo 6.** Örnek türlerinin kültür, mikroskopi ve GX testi sonuçları.

Örnek türü	Örnek sayısı (n)								Toplam
	Pozitif MTK kültürü				Negatif MTK kültürü				
	ARB (+)		ARB (-)		ARB (+)		ARB (-)		
	GX (+)	GX (-)	GX (+)	GX (-)	GX (+)	GX (-)	GX (+)	GX (-)	
Balgam	10	0	11	4	2	4	8	459	498
BL	5	0	11	5	1	4	5	381	412
BAL	0	0	3	0	0	0	0	199	202
AMS	0	0	0	0	0	0	0	165	165
TS	0	0	3	0	0	0	1	80	84
Solunum yolu örnekleri (tümü)	15	0	28	9	3	8	14	1284	1361
Plevra sıvısı	0	0	2	3	0	0	0	585	590
BOS	0	0	6	3	0	0	2	447	458
Periton	0	0	0	1	0	0	0	135	136
Eklem sıvısı	0	0	0	0	0	0	0	98	98
Perikard sıvısı	0	0	0	0	0	0	0	77	77
Doku biyopsisi	1	0	6	4	0	0	7	615	633
Lenf nodu biyopsisi	2	0	1	6	0	0	0	123	132
Plevral biyopsi	0	0	0	0	0	0	0	6	6
Abse/aspirasyon materyali	0	0	18	1	2	1	4	279	305
İdrar	0	0	1	0	0	0	2	231	234
Kemik iliği	0	0	0	1	0	0	0	55	56
Kan	0	0	1	0	0	0	0	52	53
Diğer örnekler	0	0	1	0	0	0	3	56	60
Solunum yolu dışı örnekler (tümü)	3	0	36	19	2	1	18	2759	2838
Tüm örnekler	18	0	64	28	5	9	32	4043	4199

Örneklerin 41'inde (%1) kültürde TDM üremesi saptandı. Bu örneklerin mikroskobik incelemesi sonucunda ARB 5'inde (%12.2) görülürken, 36'sında (%87.8) görülmedi. Kültürde TDM üreyen örneklerin hiçbirinde GX testi ile MTK DNA'sı saptanmamış olup, çapraz reaktivite gözlenmedi.

MTK saptanmasında kültür referans yöntem alınarak; GX testinin duyarlılığı %74.5, özgüllüğü %99.1, PÖD %68.9 ve NÖD %99.3 (Tablo 7); mikroskobik incelemenin duyarlılığı %16.4, özgüllüğü %99.7, PÖD %56.3 ve NÖD %97.8 (Tablo 8) bulundu.

Tüm örneklerde ve solunum yolu ile solunum yolu dışı örneklerde GX testi ile mikroskopik incelemenin duyarlılıkları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0.001$ ).

**Tablo 7.** Kültür referans yöntem alınarak MTK saptanmasında GX testinin duyarlılık, özgüllük ve öngörü değerleri.

Test - Örnek tipi	Duyarlılık	Özgüllük	PÖD	NÖD
<b>GX testi - Tüm örnekler</b>	%74.5	%99.1	%68.9	%99.3
<b>GX testi - Solunum yolu örnekleri</b>	%82.7	%98.7	%71.7	%99.3
<b>GX testi - Solunum yolu dışı örnekler</b>	%67.2	%99.3	%66.1	%99.3
<b>GX testi - ARB pozitif örnekler</b>	%100.0	%64.3	%78.3	%100.0
<b>GX testi - ARB negatif örnekler</b>	%69.6	%99.2	%66.7	%99.3

**Tablo 8.** Kültür referans yöntem alınarak MTK saptanmasında mikroskopik incelemenin duyarlılık, özgüllük ve öngörü değerleri.

Test - Örnek tipi	Duyarlılık	Özgüllük	PÖD	NÖD
<b>Mikroskopik inceleme - Tüm örnekler</b>	%16.4	%99.7	%56.3	%97.8
<b>Mikroskopik inceleme -Solunum yolu örnekleri</b>	%28.8	%99.2	%57.7	%97.2
<b>Mikroskopik inceleme - Solunum yolu dışı örnekleri</b>	%5.2	%99.9	%50.0	%98.1

Solunum yolu örnek türlerinde GX testinin duyarlılığı; BAL'da %100 (3/3), TS'de %100 (3/3), balgamda %84 (21/25) ve BL'de %76.2 (16/21) bulundu.

Solunum yolu dışı örnek türlerinde GX testinin duyarlılığı; idrarda %100 (1/1), kanda %100 (1/1), diğer örnekler grubunda %100 (1/1), abse-aspirasyon materyallerinde %94.7 (18/19), doku biyopsisinde %63.6 (7/11) ve lenf nodu biyopsisinde %33.3 (3/9) olmak üzere tüm doku örneklerinde %50 (10/20), BOS'ta %66.6 (6/9), plevra sıvısında %40 (2/5) ve periton sıvısında %0 (0/1) olmak üzere BOS dışı steril vücut sıvılarında %33.3 (2/6), kemik iliği örneklerinde ise %0 (0/1) bulundu.

Mikroskopik incelemede ARB görülen ancak kültürde üremesi olmayan ve GX testi ile MTK DNA'sı saptanmayan üç hastaya ait dört örnekten; bir hastaya ait bir örneğin alındığı sırada hastanın anti-TB tedavi aldığı gözlemlendi. Mikroskopik incelemede ARB görülen ve GX testinde MTK DNA'sı saptanan ancak kültürde üremesi olmayan dört hastaya ait beş örneğin tamamında hastaların örnek alımı sırada anti-TB tedavi aldığı izlendi. GX testi ile

MTK DNA'sı saptanan ancak mikroskopik incelemede ARB görülmeyen ve kültürde üremesi olmayan 24 hastaya ait 32 örnekten; 12 hastaya ait 18 örnek alındığı sırada hastaların anti-TB tedavisi altında olduğu saptandı.

Kültürde MTK üremesi saptanan 110 örneğe MGIT SIRE yöntemi ile İDT yapıldı, bunların 14'ünde sonuç geçersiz bulundu. Geri kalan 96 örnekten ikisinde MGIT SIRE yöntemi ile RIF dirençli bulundu, GX testi ile bunlardan birinde RIF direncini belirleyen mutasyon saptandı, diğerinde ise MTK DNA'sı saptanmadığı için RIF direnciyle ilişkili mutasyon belirlenemedi. MGIT SIRE yöntemi ile RIF duyarlı olan 94 örnekten GX testi ile 21'inde MTK DNA'sı saptanmadı, 73'ünde ise MTK DNA'sı saptandı. Yetmiş üç örneğin birinde RIF direnci belirsiz olup, üçünde RIF direncini belirleyen mutasyon saptandı, geri kalan 69 örnekte RIF direncini belirleyen mutasyon saptanmadı. GX testi ile MTK DNA'sı saptanan ancak kültürde üremesi olmayan 37 örnekten birinde RIF direncini belirleyen mutasyon saptandı, birinde RIF direnci belirsiz olup, 35'inde RIF direncini belirleyen mutasyon saptanmadı. GX testinde MTK DNA'sı saptanmayan örnekler, MTK DNA'sı saptanıp RIF direnci belirsiz olan örnekler ve MGIT SIRE yöntemi ile İDT sonucu mevcut olmayan örnekler (geçersiz sonuç veya kültürde üreme olmaması) analiz dışı bırakıldığında; GX testinin RIF direncini saptamada duyarlılığı %100, özgüllüğü %95.8, PÖD %25 ve NÖD %100 bulundu.

**Tablo 9.** MGIT SIRE yöntemi ve GX testi ile elde edilen RIF duyarlılık sonuçları.

(n) GX testi	MGIT SIRE yöntemi		Toplam
	RIF dirençli	RIF duyarlı	
MTK DNA'sı saptandı - RIF direnci saptandı	1	3	4
MTK DNA'sı saptandı - RIF direnci saptanmadı	0	69	69
<b>Toplam</b>	1	72	73

İki testle de RIF dirençli saptanan bir örneğin, GX test sonucu düşük düzey pozitif olup, prob E Ct değeri 0 idi. MGIT SIRE yöntemi ile RIF duyarlı, GX testi ile RIF direncini belirleyen mutasyon saptanan üç örneğin GX test sonucu iki örnekte düşük düzey, bir örnekte çok düşük düzey pozitif olup, üçünde de prob A Ct değeri 0 idi.

## 7. TARTIŞMA

TB, insanlık tarihi kadar eski bir geçmişe sahip olmasına rağmen halen tüm dünyada önemli bir halk sağlığı sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Hava yoluyla bulaşan bir hastalık olması nedeniyle toplum sağlığı açısından TB kontrolü önemlidir (39). 2015 yılında yaklaşık 10.4 milyon yeni TB vakasının mevcut olduğu ve bu nedenle 1.4 milyon ölüm olduğu tahmin edilmektedir (1).

TB kontrolü; insidans, prevalans, morbidite ile mortalitenin azaltılması ve bu azalmada devamlılığın sağlanması olarak ifade edilebilir. Hastalara erken ve doğru tanı konulması, doğru ve etkili tedavi başlanması, tedavide DGTS uygulanması ve tedavinin kür sağlanarak tamamlanması TB kontrolünün temelini oluşturmaktadır (39). ÇİD/RD-TB ve YİD-TB olguları ise dünya çapında TB ve HIV kontrol programlarını olumsuz etkilemektedir (2,3).

Konvansiyonel laboratuvar yöntemlerinden direkt mikroskopi TB tanısında düşük duyarlılığa sahiptir. Tanıda altın standart olan ve ardından İDT'nin de yapılabildiği kültür yöntemi ise zaman alıcı olup ek biyogüvenlik önlemleriyle eğitilmiş personel gerektirmektedir (4,5,52). MTK ilaç direncinin ve ÇİD/RD-TB suşlarının hızlı tanısı; TB hastalarının doğru tedavi almasını sağlamakta, direnç gelişimini sınırlayarak etkin TB kontrolünde rol almaktadır (2). Günümüzde, tedaviye daha erken başlama imkanı ve daha etkin halk sağlığı müdahalelerine olanak sağlamak amacıyla PCR gibi moleküler yöntemler, klinik örnekten hızlı tanıyı desteklemek üzere kullanılmaya başlanmıştır (4,5). Ülkemizde; TB şüpheli ARB negatif olgular ve mikroskopi duyarlılığının düşük olduğu akciğer dışı TB şüpheli olgularda moleküler yöntemlerin tanıda kullanılması önerilmektedir (39). DSÖ; 2010 yılından itibaren erişkinlerde akciğer TB'si tanısında, 2013 yılından itibaren ise çocuklarda ve akciğer dışı TB'nin belirli formlarında; HIV-TB birlikteliği olan veya ÇİD-TB şüpheli vakalarda ve TB şüpheli olgularda GX testinin ilk test olarak kullanılmasını önermektedir. Ayrıca mikroskobik incelemede ARB negatif örneklere ileri inceleme gerektiğinde, GX testinin ek test olarak kullanılabileceği bildirilmektedir. Bu test, günümüzde akciğer TB'si şüpheli vakalarda ilk test olarak kullanılmak üzere birçok ülkenin ulusal tanı algoritmalarına dahil edilmiştir (1,59).

Laboratuvarımızda MTK tanısında Kinyoun boyalı mikroskobik inceleme, kültür için LJ besiyeri ve MGIT 960 sistemi ile moleküler yöntem olarak GX testi kullanılmaktadır. Çalışmamızda kültür altın standart kabul edilerek mikroskobik inceleme ve GX testinin etkinliği retrospektif olarak değerlendirildi.

Ülkemizde Özkütük ve ark. tarafından 2639 klinik örnek (1611 solunum yolu, 1028 solunum yolu dışı örnek) yapılan retrospektif bir çalışmada, kültür ile karşılaştırıldığında mikroskopik incelemenin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla, tüm örnekler için %56.7 ve %98.7; solunum yolu örnekler için %63.2 ve %98.6; solunum yolu dışı örnekleri için ise %41.8 ve %99 bulunmuştur (60). Zeka ve ark. tarafından 429 örnek (253 solunum yolu, 176 solunum yolu dışı örnek) yapılan çalışmada ise, kültür ile karşılaştırıldığında mikroskopik incelemenin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla; solunum yolu örneklerinde; %46.5 ve %99.7; solunum yolu dışı örneklerde ise %12.9 ve %100 bulunmuştur (5). İspanya'da Bunsow ve ark. tarafından 595 örnek (290 solunum yolu, 305 solunum yolu dışı) yapılan çalışmada, kültür ile karşılaştırıldığında mikroskopik incelemenin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla; solunum yolu örneklerinde %89.5 ve %96.8; solunum yolu dışı örneklerde %16.6 ve %99.6; tüm örneklerde ise %78.5 ve %98.3 bulunmuştur (4). Çalışmamızda; MTK için kültür pozitifliği altın standart kabul edilerek Kinyoun boyalı mikroskopik incelemenin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla, tüm örneklerde; %16.4 ve %99.7; solunum yolu örneklerinde; %28.8 ve %99.2; solunum yolu dışı örneklerde %5.2 ve %99.9 bulunmuştur. Çalışmamızda mikroskopik incelemenin duyarlılık sonuçları, Özkütük ve ark., Zeka ve ark. ile Bunsow ve ark. tarafından yapılan çalışmalara göre düşük bulunmuş, özgüllük sonuçları ise benzer bulunmuştur. Boyama yöntemi olarak; Özkütük ve ark. tarafından yapılan çalışmada EZN kullanılmışken, Zeka ve ark. ile Bunsow ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda florokrom boyama kullanılmıştır. Laboratuvarımızda ise mikroskopik inceleme için boyama yöntemi olarak Kinyoun boyama kullanılmaktadır. Çalışmamızda mikroskopik incelemenin duyarlılığının daha düşük saptanması, diğer çalışmalarda boyama yöntemi olarak Kinyoun yönteminden göreceli daha duyarlı olduğu bilinen florokrom ve EZN boyamanın kullanılması yanısıra çalışmamızdaki örneklerde basil yükünün daha düşük olması ile (39,41,61) açıklanabilir.

Mikroskopik inceleme hem tanı amacıyla, hem de tedavi alan hastaların izleminde kullanılan basit, ucuz ve kolay bir yöntem olup bir gün içerisinde sonuçlanmaktadır. Yöntemin güvenilirliği büyük ölçüde örnekte bulunan basil yüküne bağlı olup, ARB pozitifliğini saptayabilmek için yayma yapılan örneğin mL'sinde 5.000-10.000 bakteri bulunması gerekmektedir. Kültür ile karşılaştırıldığında, bu yöntem genel olarak solunum yoluna ait örneklerde daha yüksek duyarlılık göstermektedir. Ayrıca mikroskopik incelemede ARB görülmesiyle klinik örnekte canlı-ölü basil ve MTK-TDM ayrımı yapılamamaktadır. Kültür ile karşılaştırıldığında, yöntemin özgüllüğü yüksek olmasına karşın duyarlılığı; örneğin miktarı, türü, kalitesi, içerdiği bakteri miktarı, uygulanan boyama tekniği, değerlendirilen

hasta popülasyonu ile uygulama ve değerlendirme yapanların deneyimine bağlı değişkenlik göstermektedir. Yöntemin yalancı negatifliği, hastalardan genel popülasyona mikroorganizma bulaşı açısından önem arz etmektedir. TB'nin mikrobiyolojik tanısında temel yöntem olan mikroskopinin tanıda yetersiz kalması nedeniyle ve İDT yapılabilmesi için mutlaka altın standart olan kültür işlemi uygulanmalıdır (23,39,61,62).

Çalışmamızda MTK için kültür pozitifliği referans alındığında, tüm örnekler için GX testinin duyarlılığı %74.5, özgüllüğü %99.1 bulundu. Ülkemizde Özkütük ve ark. (60) tarafından yapılan çalışmada, GX testinin duyarlılığı %73.9, özgüllüğü %98.6; Zeka ve ark. (5) tarafından yapılan çalışmada, GX testinin duyarlılığı %79.7, özgüllüğü %98.2 bulunmuş, çalışmamızdakine benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ülkemizde yapılan bir başka çalışmada, Çiftçi ve ark. (63) tarafından GX testinin duyarlılığı %96, özgüllüğü %98 olarak saptanmıştır. Söz konusu çalışmada örneklerin çoğunluğunu (%88) solunum yolu örneklerinin oluşturması, kültürde MTK üremesi saptanan (%29) ve mikroskopik incelemede ARB görülen (%13) örnek oranının yüksek olması, testin duyarlılığının diğer çalışmalara göre daha yüksek bulunmasını açıklayabilir. Yine ülkemizde Albay ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, GX testinin duyarlılığı %95, özgüllüğü %99 bulunmuştur (64). Söz konusu çalışmada örnek sayısının daha az olması (389 örnek), kültürde MTK üremesi saptanan (%5.7) ve mikroskopik incelemede ARB görülen (%2.1) örnek oranının çalışmamızdan daha yüksek olması, testin duyarlılığının daha yüksek saptanmasına neden olabilecek etkenlerdir. Dünyanın birçok bölgesinde yapılmış çalışmalarda, GX testinin tanı performansı açısından oldukça değişken sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmalarda GX testinin duyarlılığı %58-100, özgüllüğü %86-100 arasında değişmektedir (65). Bu değişkenlik çalışmaya alınan örnek sayısı, çalışma grubundaki TB insidansı, örnek türlerinin dağılımı gibi çalışma tasarımıyla ilişkili özelliklere ve çalışmalarda mikroskopik incelemede ARB görülen örnek oranındaki farklara bağlı olmaktadır (65,66). Çalışmamızda GX testinin duyarlılık sonucuna; örneklerin sadece %0.8'inin mikroskopik incelemesinde ARB görülmesi ve örnek grubunun %67.6'sının solunum yolu dışı örneklerden oluşmasının etki etmiş olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda örneklerin %32.4'ü solunum yolu örneklerinden oluşmaktadır. Solunum yolu örnekleri için GX testinin duyarlılığı %82.7, özgüllüğü %98.7 bulundu. Ülkemizde yapılan çalışmalarda; solunum yolu örneklerinde GX testinin duyarlılığı %80.8-100 ve özgüllüğü %98.8-99.4 arasında değişmektedir (5,60,64,67). Dünyada yapılan çeşitli çalışmalarda; solunum yolu örneklerinde GX testinin duyarlılığı %67.9-%97.1 ve özgüllüğü %98-%99.6 arasında değişmektedir (4,68,69). Steingart ve ark. tarafından 22 çalışmanın



değerlendirildiği bir meta-analizde; solunum yolu örneklerinde GX testinin toplam duyarlılığı %89 (%95 CI: %85-92) ve özgüllüğü %99 (%95 CI: %98-99) olarak hesaplanmıştır (65). Çalışmalarda duyarlılık sonuçlarının değişkenlik göstermesinin solunum yolu örneklerinin de türü ve dağılımı arasındaki farklılıktan kaynaklandığı bildirilmektedir. Çalışmamızdaki 1361 solunum yolu örneğinin; 498'i balgam, 412'si BL, 202'si BAL, 165'i AMS ve 84'ü TS örneğidir. Çalışmamızda solunum yolu örnek türlerinde GX testinin duyarlılığı; BAL'da %100 (3/3), TS'de %100 (3/3), balgamda %84 (21/25) ve BL'de %76.2 (16/21) bulunmuştur. Agrawal ve ark. tarafından 149 BAL ve 21 balgam örneğiyle yapılan bir çalışmada, GX testinin duyarlılığı balgamda %100 ve BAL'da %81.4 olarak bulunmuş ancak balgam örneklerinin sayıca daha az olmasından kısıtlılık olarak bahsedilmiştir (70). Sharma ve ark. tarafından yapılan çalışmada, GX testinin farklı solunum yolu örneklerindeki tanı performansı araştırılmış ve bronşial yıkama, öksürükle çıkarılan balgam, BAL, endotrakeal aspirat ve indüklenmiş balgam örneklerinde testin duyarlılığı sırasıyla %100 (2/2), %96.9 (380/392), %90 (18/20), %87.5 (14/16) ve %84.2 (16/19) olarak bulunmuş, öksürükle çıkarılan balgam örneklerinde duyarlılığın daha yüksek olduğu bildirilmiş fakat bronşial yıkama ve indüklenmiş balgam örneklerinin sayısının azlığından dolayı bu örneklerde testin tanı değeri tam olarak yorumlanamamıştır (69). Çalışmamızda balgam örneklerinde GX testinin duyarlılığının, Sharma ve ark. ile Agrawal ve ark. tarafından yapılan çalışmalara göre düşük olduğu gözlenmektedir. Çalışmamızda kültürde MTK üremesi saptanıp GX testi ile MTK DNA'sı saptanmayan balgam örneklerinin tamamında mikroskopik incelemede ARB görülmedi. Bu örneklerde düşük basil yükü, testin duyarlılığına etki etmiş olabilir. Özkütük ve ark. tarafından yapılan çalışmada, GX testinin duyarlılığı balgamda %86.2, BAL/bronşiyal aspiratta %79 olarak çalışmamızdaki bulgularla uyumlu bulunmuş, endotrakeal/transtrakeal aspiratta %60 olarak çalışmamızdan farklı saptanmıştır (60). Ancak söz konusu çalışma ve çalışmamızda kültürde MTK üremesi saptanan trakeal bölge örneklerinin sayıca az olması ve bu örneklerin uygun olmayan şekilde alınabileceği düşünüldüğünde bu örneklerin duyarlılığı açısından çalışmalar arasındaki farkı karşılaştırmak uygun olmayabilir.

Çalışmamızda solunum yolu dışı örnekler, tüm örneklerin %67.6'sını oluşturmaktadır. Çalışmamızda solunum yolu dışı örnekler için GX testinin duyarlılığı %67.2 ve özgüllüğü %99.3 bulunmuştur. Ülkemizde yapılan çalışmalarda solunum yolu dışı örneklerde kültür ile karşılaştırıldığında GX testinin duyarlılığı %58.2-83.3 ve özgüllüğü %96.5-99.5 arasında değişmektedir (5,60,64,67). Dünyada yapılan çeşitli çalışmalarda; solunum yolu dışı örneklerde GX testinin duyarlılığı %33.3-83.6 ve özgüllüğü %98.2-99.9 arasında

değişmektedir (4,52,71,72). Maynard-Smith ve ark. tarafından 23 çalışmanın değerlendirildiği bir meta-analizde; solunum yolu dışı örneklerde GX testinin medyan duyarlılığı %83, özgüllüğü %98 olarak bulunmuş, duyarlılık sonuçları %25-100, özgüllük sonuçları %73-100 arasında değişkenlik göstermiştir (73). Solunum yolu dışı örneklerde GX testinin duyarlılığının çalışılan örnek türlerinin oldukça çeşitli olmasına, örnekteki mikobakteriyel yükü yansıtan yayma durumuna, örneklem boyutuna, çalışılan hasta grubuna ve örnek işleme prosedürüne bağlı değişkenlik gösterdiği düşünülmektedir. Düşük duyarlılık, özellikle mikroskopik incelemede ARB negatif olan örneklerde akciğer dışı TB tanısını dışlamada testin kullanımını kısıtlamaktadır. Ancak bu meta-analizde elde edilen sonuçlar ışığında GX testinin akciğer dışı TB tanısı için önemli bir gelişme olduğu kanısına varılmış ve DSÖ'nün GX testi ile ilgili 2014 yılında yayınlanan kılavuzları desteklenmiştir (73).

Çalışmamızdaki 2838 solunum yolu dışı örneğin; 590'ı plevra sıvısı, 458'i BOS, 136'sı periton sıvısı, 98'i eklem sıvısı ve 77'si perikard sıvısı olmak üzere 1359'u steril vücut sıvısı, 771'i doku (633'ü doku biyopsisi, 132'si lenf nodu biyopsisi ve 6'sı plevral biyopsi), 305'i abse ve aspirasyon materyali, 234'ü idrar, 56'sı kemik iliği, 53'ü kan ve 60'ı diğer örneklerden oluşmaktadır. Çalışmamızda solunum yolu dışı örnek türlerinde GX testinin duyarlılığı; idrarda %100 (1/1), kanda %100 (1/1), diğer örnekler grubunda %100 (1/1), abse-aspirasyon materyallerinde %94.7 (18/19), doku biyopsisinde %63.6 (7/11) ve lenf nodu biyopsisinde %33.3 (3/9) olmak üzere tüm doku örneklerinde %50 (10/20), BOS'ta %66.6 (6/9), plevra sıvısında %40 (2/5) ve periton sıvısında %0 (0/1) olmak üzere BOS dışı steril vücut sıvılarında %33.3 (2/6), kemik iliği örneklerinde ise %0 (0/1) bulunmuştur. Maynard-Smith ve ark. tarafından yapılan meta-analizde; GX testinin toplam duyarlılığı; plevral sıvı örneklerinde %34 olarak çalışmamızdaki sonuçlara benzer bulunmuş, lenf nodu biyopsi örneklerinde %96, lenf nodu biyopsisi de dahil olmak üzere tüm doku örneklerinde %88 olarak çalışmamızdakinden yüksek bulunmuştur (73). Mazzola ve ark. tarafından yapılan çalışmada GX testinin duyarlılığı; BOS örneklerinde %100, püü örneklerinde %95.6, idrar örneklerinde %88.2, biyopsi örneklerinde %83.6, plevral sıvı örneklerinde ise %38 olarak bulunmuştur (72). Çalışmamızda doku örneklerinde duyarlılığın düşük olması örnek homojenizasyonunun tam olarak sağlanamamasından ve örnekte PCR inhibitörü varlığından kaynaklanmış olabilir. Çalışmamızda kültürde MTK üremesi saptanan BOS ve diğer steril vücut sıvısı örneklerinin tümünün mikroskopik incelemede ARB negatif olması göz önünde bulundurulduğunda, bu örnek türlerinde mikobakteriyel yükün az olmasına bağlı olarak duyarlılığın düşük bulunduğu düşünülebilir. Bununla birlikte, DSÖ özellikle hızlı tanının

hayati olacağı TB menenjit şüpheli hastalarda BOS örneklerinde GX testinin başlangıç testi olarak tercih edilmesi gerektiğini önermektedir (59).

GX testinin değerlendirildiği çalışmalarda elde edilen sonuçlardaki değişkenliğin en önemli nedenlerinden biri çalışılan örneklerin mikroskopi sonuçlarıdır (59,65,73). Çalışmamızda örneklerin %0.8'inde (32/4199) mikroskopik incelemede ARB görülmüştür. Çalışmamızda GX testinin; ARB pozitif örneklerde duyarlılığı %100 ve özgüllüğü %64.3, ARB negatif örneklerde duyarlılığı %69.6 ve özgüllüğü %99.2 bulundu. Üretici firma tarafından GX testinin analitik saptama alt sınırı, 131 koloni oluşturan birim – *colony forming unit* (CFU)/mL (%95 CI: 106.2-176.4 CFU) olarak bildirilmektedir (74). GX testi ile MTK DNA'sının saptanması, örnekteki mikobakteriyel yüke bağlı olup, düşük mikobakteriyel yükü işaret eden ARB negatifliği testin duyarlılığını etkilemektedir. Ayrıca, Özkütük ve ark., ARB negatif örneklerde GX testi ile duyarlılığın düşük bulunmasının, sıvı ve katı olmak üzere iki farklı kültür yönteminin birlikte kullanılması ile kültür duyarlılığının artmış olmasına bağlı olabileceğini belirtmiştir (60). Bununla birlikte, GX testi sadece MTK DNA'sını saptadığı için özellikle mikroskopik incelemede ARB görülen örneklerde MTK-TDM ayırımında hızlı ve güvenilir bir araçtır (73).

Çalışmamızda GX testi ile yalancı pozitif sonuç elde edilen 37 örneğin (%0.9), 17'si solunum yolu örneği (10 balgam, 6 BL, 1 TS), 20'si solunum yolu dışı örneklerden (7 doku biyopsisi, 6 abse/aspirasyon materyali, 3 diğer örnekler, 2 BOS ve 2 idrar) oluşmaktadır. Toplam 27 hastaya ait bu 37 örnek incelendiğinde 15 hastaya ait 23 örneğin alındığı sırada hastaların TB tanısı nedeniyle anti-TB tedavi aldığı gözlemlenmiş, bu örneklerde tedavi sonrası ölü basil DNA'sına bağlı GX testi ile MTK DNA'sı saptandığı düşünülmüştür. Ayrıca bu örneklerden 4 hastaya ait 5 örnekte mikroskopik incelemede ARB pozitifliği saptanmıştır. Albay ve ark. tarafından yapılan çalışmada, 171 solunum yolu örneğinden bir BAL örneğinde ve 218 solunum yolu dışı örnekten bir lenf nodu biyopsisinde GX testi ile yalancı pozitif sonuç elde edilmiş; BAL örneği araştırıldığında, hastanın geçmişinde TB öyküsü olduğu, ancak uzun süredir ilaç tedavisi almadığı ve klinik iyileşmenin sağlandığı öğrenilmiştir. Dolayısı ile bu pozitifliğin ölü basil DNA'sına bağlı olabileceği düşünülmüştür (64). Özkütük ve ark. tarafından yapılan çalışmada GX testi ile 34 örnekte (%1.3) yalancı pozitiflik saptanmış, yalancı pozitif örneklerin ait olduğu hastalar araştırıldığında, 20'sinin daha önceki örneklerinde kültürde üreme olduğu, TB tanısı ile anti-TB tedavi aldığı saptanmıştır (60). Chang ve ark. tarafından 15 çalışmanın değerlendirildiği meta-analiz sonuçlarına göre GX testinin yalancı pozitiflik oranı %1.6 olarak belirlenmiş ve yalancı pozitifliğin TB öyküsü olan

hastalarda ölü basil DNA'sına veya subklinik relapsa bağlı olabileceği ifade edilmiştir (66). Bununla birlikte Hillemann ve ark., GX sisteminde kapalı reaksiyon ortamına bağlı olarak kontaminasyon riski düşük olmasına rağmen kontaminasyonun da yalancı pozitifliğin nedeni olabileceğini ifade etmiştir (52).

Çalışmamızda GX testi ile yalancı negatif sonuç elde edilen 28 örneğin (%25.5) 9'u solunum yolu örneği (5 BL, 4 balgam), 19'u solunum yolu dışı örneklerden (6 lenf nodu, 4 doku biyopsisi, 3 plevra sıvısı, 3 BOS, 1 periton sıvısı, 1 abse/aspirasyon materyali, 1 kemik iliği) oluşmaktadır. Bu örneklerin tamamında düşük mikobakteriyel yükün göstergesi olarak mikroskopik inceleme ile ARB negatifliğinin mevcut olmasının yanı sıra özellikle doku örneklerinde homojenizasyonun istenilen düzeyde sağlanamamış olması, GX testinin yalancı negatif sonuç vermesine neden olmuş olabilir. Chang ve ark. tarafından yapılan meta-analizde GX testinin yalancı negatiflik oranı %9.6 olarak belirlenmiş, kültür ile örnekteki 10-100 CFU/mL kadar az miktardaki mikroorganizmanın saptanabilmesi ve GX testinin saptama alt sınırının 131 CFU/mL olması nedeniyle yalancı negatif sonuçların ortaya çıkabileceği belirtilmiştir (66,74).

Çalışmamızda MTK için kültür pozitifliği referans alınarak GX testi ve mikroskopik incelemenin duyarlılıkları sırasıyla; tüm örneklerde %74.5 ve %16.4; solunum yolu örneklerinde %82.7 ve %28.8; solunum yolu dışı örneklerde %67.2 ve %5.2 olarak bulunmuştur. Tüm örneklerde ve solunum yolu ile solunum yolu dışı örneklerde GX testi ile mikroskopik incelemenin duyarlılıkları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.001$ ). Kültürde MTK üremesi saptanan 110 örneğin 92'sinde mikroskopik incelemede ARB görülmemiş ancak GX testi ile bu 92 örneğin 64'ünde (%69.6) MTK DNA'sı saptanmıştır. İki testin de özgüllüğü yüksek bulunmuştur. Steingart ve ark. tarafından gerçekleştirilen meta-analizde GX testi ve yayma mikroskopisinin karşılaştırıldığı 21 çalışma değerlendirildiğinde yayma mikroskopisinin toplam duyarlılığı %65 olarak bulunmuşken, GX testinin toplam duyarlılığı %88 olarak hesaplanmış, kültür ile doğrulanmış vakalarda TB saptanmasının GX testi ile %23 oranında arttığı gözlenmiştir (65).

Doğrudan klinik örnekten RIF direnci ile ilişkili mutasyonları saptayabilmesi, GX testinin önemli bir avantajıdır. RIF dirençli suşların %90-95'inde RRDR olarak bilinen rpoB geninin 81 baz çiftlik bölgesinde mutasyon gözlenmesi, duyarlı izolatlarda ise bu mutasyonun olmaması nedeniyle RIF, moleküler İDT için ideal hedeftir. RIF dirençli izolatlar aynı zamanda %85-90 INH dirençli olduğundan, RIF direnci ÇİD-TB tanısı için bir marker olarak

kullanılabilmektedir (2,47). Çalışmamızda kültürde MTK üremesi saptanan 110 örnekten 14'üne sonuç geçersizliği-hata nedeniyle MGIT SIRE yöntemi ile sonuç verilememiştir. Geri kalan 96 örnekten 22'sinde GX testi ile MTK DNA'sı saptanmadı. GX testi ile 5 örnekte RIF direncini belirleyen mutasyon saptanırken, iki örnekte RIF direnci belirsiz olarak sonuçlandı. GX testi ile RIF direncini belirleyen mutasyon saptanan 5 örnekten MGIT SIRE yöntemi ile üçünde RIF duyarlı bulunurken, birinde RIF direnci saptandı, birinde ise kültürde üreme olmadığı için İDT yapılamadı. GX testi ile RIF direnci belirsiz olan iki örnekten birinde MGIT SIRE yöntemi ile RIF duyarlı bulunurken, diğer örnekte kültürde üreme olmadığı için İDT yapılamadı. Çalışmamızda GX testinde MTK DNA'sı saptanmayan örnekler ve MTK DNA'sı saptanıp RIF direnci belirsiz olan örnekler ile MGIT SIRE yönteminde İDT sonucu mevcut olmayan örnekler (geçersiz sonuç veya kültürde üreme olmaması) analiz dışı bırakıldığında; GX testinin RIF direncini saptamada duyarlılığı %100, özgüllüğü %95.8, PÖD %25 ve NÖD %100 bulundu. Steingart ve ark. tarafından yapılan meta-analizde; GX testinin RIF direncini saptamada duyarlılığı %33-100, özgüllüğü %83-100 arasında değişirken, toplam duyarlılık %95, özgüllük %98 olarak hesaplanmış ve testin yalancı dirençli ve yalancı duyarlı sonuçlara sebep olabileceği belirtilmiştir (65). Boehme ve ark. tarafından yapılan çalışmada, GX testinin RIF direncini saptamada düşük PÖD'ye sahip olması nedeniyle özellikle ÇİD-TB prevalansının düşük olduğu bölgelerde konvansiyonel yöntemlerle doğrulama testi yapılmasının gerekli olduğu üzerinde durulmuştur (75). Rahman ve ark. tarafından 92 balgam örneğiyle altın standart yöntem olarak LJ proporsiyon İDT kullanılarak iki moleküler İDT yönteminin karşılaştırıldığı çalışmada; GX testi ile LJ-İDT sonuçları arasında %93.5 uyum bulunmuş, LJ-İDT ve moleküler İDT arasındaki uyumsuzluğun moleküler yöntemlerle vakaların daha dirençli saptanmasına bağlı olarak ortaya çıktığı ifade edilmiştir. Buna neden olarak; moleküler yöntemlerin fenotipik İDT'yi etkilemeyen sessiz mutasyonları saptayabilmesi ve GX testinin Ct değerleri arasındaki farkı temel alarak direnci öngören kantitatif bir yöntem olmasından dolayı bu testle LJ-İDT gibi kalitatif yöntemlerden daha değişken sonuçlar elde edilebileceği bildirilmiştir (76). Ioannidis ve ark. da GX testinin spesifik mutasyonları saptamayan ama vahşi-tip sekansından sapmaları saptayan bir test olmasından dolayı mikst enfeksiyon veya sessiz mutasyonların olduğu vakalarda uyumsuz sonuçların ortaya çıkabileceğini ifade etmiştir (77). Bunsow ve ark. tarafından yapılan çalışmada; çalışmamızdaki sonuçlara benzer şekilde GX testinin RIF direncini saptamada duyarlılığı %100, özgüllüğü %96 hesaplanmış, yalancı dirençli üç sonuçtan ikisinde prob B Ct değerinde gecikme saptanmıştır. Bu bulgunun fenotipik İDT ile ilişkili olmayan kodon 514'teki sessiz mutasyona bağlı olabileceği düşünülmüş ve bu örneklerin birinde bu mutasyon

saptanmıştır (4). Çalışmamızda GX testi ile RIF direncini belirleyen mutasyon saptanan ancak MGIT SIRE yöntemi ile RIF duyarlı bulunan 3 örneğin prob A Ct değeri 0 idi. Ancak bu örneklerde dizi analizi yapılamadığı için uyumsuzluğun nedeni tam olarak ortaya çıkarılamamıştır.

Sonuç olarak, GX testinin mikroskopik incelemede ARB görülen örneklerde TB tanısında güvenilir bir yöntem olduğu; özellikle solunum yolu dışı örnekler olmak üzere az sayıda basil içeren mikroskopik incelemede ARB görülmeyen örneklerde ise duyarlılığının daha düşük olduğu belirlenmiştir. Testin basit bir eğitimle uygulanabilirliği ve çok fazla deneyim gerektirmemesi, iki saat gibi kısa bir sürede doğrudan klinik örnekten MTK DNA'sı ve RIF direncini birlikte saptayabilmesi, mikroskopik incelemeye göre duyarlılığının daha yüksek olması göz önünde bulundurulduğunda TB hızlı tanısında yararlı bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak, test sonuçlarının daima kültür ve fenotipik İDT sonuçlarıyla doğrulanması önerilmektedir.

## 8. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Çalışmamızda MTK için kültür pozitifliği referans alındığında, mikroskopik incelemenin duyarlılığı düşük bulunmuştur. Yöntemin özgüllüğü yüksek olmasına rağmen yalancı negatiflik, hastalardan topluma bulaş açısından önem arz etmektedir. Ayrıca mikroskopik incelemede ARB görülmesiyle klinik örnekte canlı-ölü basil ve MTK-TDM ayrımı yapılamamaktadır. Mikroskopik inceleme, tanıda yetersiz kalması nedeniyle mutlaka altın standart yöntem olan kültür ile birlikte uygulanmalıdır.

2. Çalışmamızda MTK için kültür pozitifliği referans alındığında, aynı gün içerisinde sonuç veren iki yöntemden GX testinin TB tanısında mikroskopik incelemeden daha iyi performans sergilediği gözlenmektedir.

3. GX testinin; mikroskopik incelemede ARB görülen örneklerde TB tanısında oldukça güvenilir bir yöntem olduğu, ancak özellikle solunum yolu dışı örnekler olmak üzere az sayıda basil içeren mikroskopik incelemede ARB görülmeyen örneklerde duyarlılığının daha düşük olduğu gözlenmektedir. GX testinin; kullanıcı becerilerine çok az bağlı olması, kolay uygulanabilirliği, hasta örneklerinin bekletilmeden tek tek çalışılabilmesi ve iki saatten kısa sürede sonuç vermesi gibi avantajları göz önünde bulundurulduğunda, çalışmamızdaki sonuçlar bu testin TB şüpheli vakalarda ilk test, mikroskopik incelemede ARB görülmeyen örneklerde ileri inceleme gerektiğinde ek test olarak kullanılmasını öneren DSÖ önerilerini desteklemektedir.

4. GX testi ile bakteri canlılığı belirlenemediği için TB hastalarında tedavinin takibinde yararlı olmayabilir.

5. GX testinin, TB olgularında RIF direncinin hızlı tespitinde bir tarama testi olarak önemli işlev göreceği düşünülse de yalancı dirençlilik durumu gereksiz ÇİD-TB tedavisi ve tedavide kullanılan ilaçlara ciddi yan etki gelişimi ile sonuçlanabileceği için test sonuçları mutlaka fenotipik İDT ile doğrulanmalıdır.

6. Kültür yöntemleriyle ortalama üreme sürelerinin (sıvı besiyerlerinde 7-14 gün, LJ kültürü için 21-42 gün) uzun olması, ek biyogüvenlik önlemlerine ve eğitimli personele gereksinim duyulmasına rağmen, TB tanısında altın standartın hala bakteriyolojik kültür yöntemi olduğu unutulmamalıdır ve GX testi kültür sistemlerini destekleyerek uygulanmalıdır.

## 9. KAYNAKLAR

1. World Health Organization: Global Tuberculosis Report 2016. WHO/HTM/TB/2016.13.
2. Ahmad S, Mokaddas E. Recent advances in the diagnosis and treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Respir Med.* 2009;103(12):1777-90.
3. O'Grady J, Maeurer M, Mwaba P, Kapata N, Bates M, Hoelscher M, Zumla A. New and improved diagnostics for detection of drug-resistant pulmonary tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med.* 2011;17(3):134-41.
4. Bunsow E, Ruiz-Serrano MJ, López Roa P, Kestler M, Viedma DG, Bouza E. Evaluation of GeneXpert MTB/RIF for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* and resistance to rifampin in clinical specimens. *J Infect.* 2014;68(4):338-43.
5. Zeka AN, Tasbakan S, Cavusoglu C. Evaluation of the GeneXpert MTB/RIF assay for rapid diagnosis of tuberculosis and detection of rifampin resistance in pulmonary and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol.* 2011;49(12):4138-41.
6. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, Matter L, Schopfer K, Bodmer T. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet.* 1993;341(8846):647-50.
7. <http://celalkarlikaya.trakya.edu.tr/TBdernot.htm>. Karlıkaya C. Tüberküloz ders notları. 1998.
8. Seber E. Tüberkülozun dünü. *ANKEM Derg.* 2010;24(2):52-60.
9. Barış İY. Çağlar boyu tüberküloz. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı, s1-7. Samsun, 2003.
10. Daniel TM. The history of tuberculosis. *Respir Med.* 2006;100(11):1862-70.
11. Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. From Basic Science to Patient Care Tuberculosis 2007. [www.TuberculosisTextbook.com](http://www.TuberculosisTextbook.com). First Edition, Brazil.
12. Ligon BL. Robert Koch: Nobel laureate and controversial figure in tuberculin research. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2002;13(4):289-99.
13. Türk Toraks Derneği. Özkara Ş, Kılıçaslan Z, Bilgiç H, Karadağ M. Toraks Kitapları – Tüberküloz. 2010;Sayı 11. Aves Yayıncılık/ İstanbul.
14. Kılıçaslan Z. Dünyada ve Türkiye’de tüberküloz. *ANKEM Derg.* 2007;21(2):76-80.



15. Bilgiç H. Türkiye’de tüberkülozun durumu ve eradikasyon (kontrol) programı. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı, s18-33. Samsun, 2003.
16. Kara B. Tüberkülozun kontrolünde başlıca sorunlardan biri: Tedaviye uyum [One of the major problems in tuberculosis control: Adherence to therapy]. *TAF Prev Med Bull.* 2009;8(1):75-82.
17. Kara İH. Tüberküloz: Güncel epidemiyoloji ve hastalık yönetimi. *Türkiye Aile Hek Derg.* 2007;11(1):33-42.
18. <http://tuberkuloz.thsk.saglik.gov.tr/2013-08-28-13-18-43/yonetim.html>
19. Özkara Ş, Ecevit H, Aktaş Z, Özkan S. T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı: Türkiye’de Tüberkülozun Kontrolü İçin Başvuru Kitabı. Ankara, 2003.
20. Zaloğlu N. Türkiye’de verem savaşın geçmişi ve oluşu. *Klimik Derg.* 1989;2(1):45-47.
21. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu: Türkiye’de Verem Savaşı 2014 Raporu. Ankara, 2015.
22. European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2016. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control, 2016.
23. Versalovic J, Carroll CK, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW. Manual of Clinical Microbiology 10th edition. ASM Press, Washington DC, 2011.
24. Reddington K, O’Grady J, Dorai-Raj S, Maher M, van Soolingen D, Barry T. Novel multiplex real-time PCR diagnostic assay for identification and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium canettii*, and *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *J Clin Microbiol.* 2011;49(2):651-657.
25. Kıyan M. *Mycobacteriaceae*. Cengiz AT, Ustaçelebi Ş (Editör). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, s419-457. Güneş Kitabevi, Ankara, 1999.
26. <http://veterinarymicrobiology.in/acid-fast-staining/>
27. Köksal F, Yaman A. Farklı bir bakteri topluluğu mikobakterilerde hücre duvarı yapısı. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı, s34-47. Samsun, 2003.
28. Chatterjee D. The mycobacterial cell wall:Structure,biosynthesis and site of drug action. *Curr Opin Chem Biol.* 1997;1(4):579-588.

29. Hunter RL, Armitige L, Jagannath C, Actor JK. TB research at UT-Houston—A review of cord factor: New approaches to drugs, vaccines and the pathogenesis of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2009;89(1):18-25.
30. Badur S, Abacıoğlu H, Öngen B. Enfeksiyon Patogenezi ve Bağışıklık. Akademi Yayınevi, İstanbul, 2015.
31. Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 2003;83(1-3):91-7.
32. Briken V, Porcelli SA, Besra GS, Kremer L. Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Mol Microbiol*. 2004;53(2):391-403.
33. <https://pharmchem.ucsf.edu/research/chembio/drug-targeting>
34. Özbal Y. Tüberküloz immünolojisi. *Erciyes Tıp Derg*. 2006;28(1):25-34.
35. Lerner TR, Borel S, Gutierrez MG. The innate immune response in human tuberculosis. *Cell Microbiol*. 2015;17(9):1277-85.
36. Ottenhoff TH. The knowns and unknowns of the immunopathogenesis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2012;16(11):1424-32.
37. Dheda K, Schwander SK, Zhu B, van Zyl-Smit RN, Zhang Y. The immunology of tuberculosis: From bench to bedside. *Respirology*. 2010;15(3):433-50.
38. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği. VIII.Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kurs Kitabı. Erzurum, 2009.
39. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları. Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi (UTTR). Aydoğdu Ofset Matbaacılık. Ankara, 2014.
40. Leber AL. *Clinical Microbiology Procedures Handbook, Fourth Edition*. ASM Press, Washington DC, 2016.
41. Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI). Laboratory detection and identification of Mycobacteria. Approved guideline. CLSI document M48-A; Vol. 28, No. 17, CLSI, Pennsylvania, 2008.
42. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases 7th Edition, Churchill Livingstone, Philedelphia, 2009.
43. Padilla E, González V, Manterola JM, Pérez A, Quesada MD, Gordillo S, Vilaplana C, Pallarés MA, Molinos S, Sánchez MD, Ausina V. Comparative evaluation of the new version of the INNO-LiPA Mycobacteria and Genotype Mycobacterium assays for

identification of *Mycobacterium* species from MB/BacT liquid cultures artificially inoculated with mycobacterial strains. *J Clin Microbiol.* 2004;42(7):3083-8.

44. Richter E, Weizenegger M, Rüsç-Gerdes S, Niemann S. Evaluation of Genotype MTBC assay for differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol.* 2003;41(6):2672-5.

45. Martin A, Bombecck D, Fissette K, de Rijk P, Hernández-Neuta I, Del Portillo P, Palomino JC. Evaluation of the BD MGIT TBc Identification Test (TBc ID), a rapid chromatographic immunoassay for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex from liquid culture. *J Microbiol Methods.* 2011;84(2):255-7.

46. Yu MC, Chen HY, Wu MH, Huang WL, Kuo YM, Yu FL, Jou R. Evaluation of the rapid MGIT TBc identification test for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex strain detection. *J Clin Microbiol.* 2011;49(3):802-7.

47. Soini H, Musser JM. Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clin Chem.* 2001;47(5):809-14.

48. Woods GL. Molecular methods in the detection and identification of mycobacterial infections. *Arch Pathol Lab Med.* 1999;123(11):1002-6.

49. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-50.

50. Noordhoek GT, Kolk AH, Bjune G. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. *J Clin Microbiol.* 1994;32:277-284.

51. World Health Organization: Xpert MTB/RIF implementation manual. Technical and operational 'how-to': practical considerations. WHO/HTM/TB/2014.1.

52. Hillemann D, Rüsç-Gerdes S, Boehme C, Richter E. Rapid molecular detection of extrapulmonary tuberculosis by the automated GeneXpert MTB/RIF system. *J Clin Microbiol.* 2011;49(4):1202-5.

53. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(12):E63.

54. Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. *J Clin Microbiol.* 2003;41(6):2616-22.

55. Kiraz N. Antitüberküloz İlaçlara Direnç Mekanizmaları ve Yeni İlaçlar. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı, s173-177. Samsun, 2003.

56. Schön T, Miotto P, Köser CU, Viveiros M, Böttger E, Cambau E. *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistance testing: challenges, recent developments and perspectives. *Clin Microbiol Infect.* 2017;23(3):154-160.

57. World Health Organization: The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to isoniazid and rifampicin. Policy update. WHO/HTM/TB/2016.12.

58. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, Allen J, Tahirli R, Blakemore R, Rustomjee R, Milovic A, Jones M, O'Brien SM, Persing DH, Ruesch-Gerdes S, Gotuzzo E, Rodrigues C, Alland D, Perkins MD. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med.* 2010;363(11):1005-15.

59. World Health Organization: Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children. Policy update. WHO/HTM/TB/2013.16.

60. Özkütük N, Sürücüoğlu S. Orta prevalanslı bölgede akciğer ve akciğer dışı tüberküloz tanısında GeneXpert MTB/RIF testinin değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul.* 2014;48:223-32.

61. European Centre for Disease Prevention and Control. Mastering the basics of TB control: Development of a handbook on TB diagnostic methods. Stockholm: ECDC; 2011.

62. Noori MY, Ali Z, Ali Wahidi SA, Mughal MN, Sharafat S, Masroor M, Khanani MR. False negativity in AFB Smear microscopy: An insight into the caveats of the most widely used screening tool for tuberculosis. *J Pak Med Assoc.* 2016;66(9):1116-1119.

63. Çiftçi IH, Aslan MH, Aşık G. Evaluation of GeneXpert MTB/RIF results for the detection *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *Mikrobiyol Bul.* 2011;45:43-7.

64. Albay A, Güney M, Tekin K, Kısa Ö, Sığ A. Pulmoner ve ekstrapulmoner örneklerde tüberkülozun erken tanısı ve rifampisin direncinin tespiti için GeneXpert MTB/RIF testinin değerlendirilmesi. *Cukurova Med J.* 2016;41(3):548-553.

65. Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC, Dendukuri N. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;21(1):CD009593.

66. Chang K, Lu W, Wang J, Zhang K, Jia S, Li F, Deng S, Chen M. Rapid and effective diagnosis of tuberculosis and rifampicin resistance with Xpert MTB/RIF assay: a meta-analysis. *J Infect.* 2012;64(6):580-8.

67. Çavuşoğlu C, Soylu M. Klinik örneklerden tüberküloz tanısı ve hızlı rifampisin direnci saptanmasında GeneXpert MTB/RIF testinin performansının değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2014;44(2):61-64.
68. Park KS, Kim JY, Lee JW, Hwang YY, Jeon K, Koh WJ, Ki CS, Lee NY. Comparison of the Xpert MTB/RIF and Cobas TaqMan MTB assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *J Clin Microbiol.* 2013;51(10):3225-7.
69. Sharma SK, Kohli M, Yadav RN, Chaubey J, Bhasin D, Sreenivas V, Sharma R, Singh BK. Evaluating the diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF assay in pulmonary tuberculosis. *PLoS One.* 2015;10(10):e0141011.
70. Agrawal M, Bajaj A, Bhatia V, Dutt S. Comparative study of GeneXpert with ZN stain and culture in samples of suspected pulmonary tuberculosis. *J Clin Diagn Res.* 2016;10(5):DC09-12.
71. Armand S, Vanhuls P, Delcroix G, Courcol R, Lemaître N. Comparison of the Xpert MTB/RIF test with an IS6110-TaqMan real-time PCR assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens. *J Clin Microbiol.* 2011;49(5):1772-6.
72. Mazzola E, Arosio M, Nava A, Fanti D, Gesu G, Farina C. Performance of real-time PCR Xpert® MTB/RIF in diagnosing extrapulmonary tuberculosis. *Infez Med.* 2016;24(4):304-309.
73. Maynard-Smith L, Larke N, Peters JA, Lawn SD. Diagnostic accuracy of the Xpert MTB/RIF assay for extrapulmonary and pulmonary tuberculosis when testing nonrespiratory samples: a systematic review. *BMC Infect Dis* 2014;14:709.
74. Cepheid® 2012. Xpert® MTB/RIF Operator Manual. 301-0191 Rev. C, May 2012. Cepheid, Sunnyvale, CA, ABD.
75. Boehme CC, Nicol MP, Nabeta P, Michael JS, Gotuzzo E, Tahirli R, Gler MT, Blakemore R, Worodria W, Gray C, Huang L, Caceres T, Mehdiyev R, Raymond L, Whitelaw A, Sagadevan K, Alexander H, Albert H, Cobelens F, Cox H, Alland D, Perkins MD. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralised use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multicentre implementation study. *Lancet.* 2011;377(9776):1495-505.
76. Rahman A, Sahrin M, Afrin S, Earley K, Ahmed S, Rahman SM, Banu S. Comparison of Xpert MTB/RIF assay and GenoType MTBDRplus DNA probes for detection of mutations associated with rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One.* 2016;11(4):e0152694.

77. Ioannidis P, Papaventsis D, Karabela S, Nikolaou S, Panagi M, Raftopoulou E, Konstantinidou E, Marinou I, Kanavaki S. Cepheid GeneXpert MTB/RIF assay for *Mycobacterium tuberculosis* detection and rifampin resistance identification in patients with substantial clinical indications of tuberculosis and smear-negative microscopy results. *J Clin Microbiol.* 2011;49(8):3068-70.

