

ÖZET

Tüberkülozun kontrolünde, *Mycobacterium tuberculosis complex*'in (MTBC) neden olduğu hastalığın erken tanısı önemlidir. Bu amaçla son yıllarda tüberkülozun hızlı tanısında nükleik asit amplifikasyon yöntemleri yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır. Klinik örnekten direkt MTBC saptamaya yönelik nükleik asit amplifikasyon temelli yöntemlerden biri de PCR-ELISA'dır.

Bu çalışmada, PCR-ELISA yönteminin (ProDect MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS, bcs Biotect S.p.A., Cagliari, Italia) akciğer ve akciğer dışı örneklerde güvenilirliği araştırılmıştır. Çalışmada tüberküloz kuşkulu hastalardan alınan 100 klinik örnek (76 akciğer, 24 akciğer dışı örnek) mikroskopi, kültür ve PCR-ELISA yöntemi ile incelenmiştir. Altın standart yöntem olan kültür ile birlikte değerlendirildiğinde, tüm örneklerden elde edilen sonuçlara göre PCR-ELISA testinin duyarlılığı %68.2, özgüllüğü %94.1, pozitif prediktif değeri (PPD) %95.7 ve negatif prediktif değeri (NPD) %60.4 olarak belirlenmiştir. Akciğer örneklerinde duyarlılık, özgüllük, PPD ve NPD sırası ile %71.1, %93.5, %94.1 ve %69.0; akciğer dışı örneklerde ise %61.9, %100, %100 ve %27.3 olarak saptanmıştır. Yayma pozitif akciğer örneklerinde ise testin duyarlılığı %83.3 ve özgüllüğü %100 olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak; tüberkülozun hızlı tanısında PCR-ELISA yönteminin kısmen çok fazla ekipman gerektirmeyen bir yöntem olması nedeni ile, özellikle yayma pozitif akciğer örnekleri için, mikobakteriyoloji laboratuvarlarında tüberküloz tanısında rutin nükleik asit amplifikasyon testi olarak değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Mycobacterium tuberculosis*, PCR-ELISA, Nükleik asit amplifikasyon testi, Tüberküloz, Tanı.

Evaluation of polimerase chain reaction-enzyme linked immunoassay (PCR-ELISA) for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens

In controlling of Tuberculosis (TB), early diagnosis of disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) is vital. Hence, nucleic acid amplification methods for rapid diagnosis of TB methods came to be used widely in recent years. PCR-ELISA is among nucleic acid amplification based methods that are used for the direct detection of MTBC in clinical samples.

In this study, PCR-ELISA (ProDect MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS-ProDect GEN E.I.A., bcs Biotect S.p.A., Cagliari, Italia) was evaluated for detection of MTBC in pulmonary and extrapulmonary clinical samples.

100 clinical samples (76 pulmonary and 24 extrapulmonary) from patients suspected of TB were assested by microscopy, culture and PCR-ELISA methods. When PCR-ELISA test results were compared to culture results taken as the gold standard, the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values (PPV and NPV) for whole specimens were found to be 68.2%, 94.1%, 95.7% and 60.4%, respectively. The sensitivity, specificity, PPV and NPV were 77.1%, 93.5%, 94.1%, 69.0% for pulmonary specimens and 61.9%, 100%, 100%, 27.3% for extrapulmonary specimens, respectively. For smear positive pulmonary specimens, the sensitivity and specivity were found to be 83.3% and 100%, respectively.

In conclusion, PCR-ELISA method can be utilized cost-effectively, providing results with the use of less equipment, as a routine nucleic amplification test for the rapid diagnosis of tuberculosis in a mycobacteriology laboratory, specifically for smear positive pulmonary samples.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, PCR-ELISA, Nucleic acid amplification test, Tuberculosis, Diagnosis

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın gerçekleşmesinde beni destekleyen, yönlendiren, her türlü yardımını esirgemeyen, bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, titiz, disiplinli ve yenilikçi çalışmalarından dolayı yanında çalışmaktan onur duyduğum, hiçbir zaman, özveri ve hoşgörüsünü esirgemeyen değerli hocam tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Nuri ÖZKÜTÜK'e, yine asistanlık eğitimim süresince bilgilerine başvurduğum, deneyimlerinden çok şey öğrendiğim Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Süheyla SÜRÜCÜOĞLU ve sayın Prof. Dr. Beril ÖZBAKKALOĞLU'na, ayrıca mikrobiyoloji doktoram süresince eğitimimde katkısı olan Celal Bayar Üniversitesi Tıp fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Parazitoloji Anabilim Dalı tüm öğretim üyelerine, tez çalışmam süresince laboratuvar çalışmalarında yardım ve desteklerini hissettiğim ve uyum içinde çalıştığım, her zaman yardım ve dostluklarını gördüğüm Tüberküloz laboratuvarı çalışanları Sibel HURMA, Yeşim SOLAKOĞLU ve Pınar ŞEN'e, bana destek olan tüm asistan arkadaşlarım'a ve her zaman yanımda olan ve destekte bulunan aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iii
SUMMARY	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tüberküloz ve Tarihçesi	3
2.2. Epidemiyoloji	4
2.2.1. Dünyada Tüberküloz	4
2.2.2. Türkiyede Tüberküloz	5
2.3. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 'in genel özellikleri	6
2.3.1. Taksonomi	6
2.3.2. Bakteriyoloji	8
2.3.3. Hücre duvar yapısı	8
2.4. Laboratuvar Tanı	10
2.4.1. Örneklerin İşlemlenmesi	11
2.4.1.1. NALC-NaOH yöntemi	11
2.4.2. Mikroskopik inceleme	12
2.4.2.1. Ziehl-Neelsen boyama	13
2.4.2.2. Kinyoun boyama	13
2.4.2.3. Florokrom boyama	13
2.4.3. Kültür yöntemleri	13
2.4.3.1. Yumurta bazlı besiyerleri	14
2.4.3.2. Agar bazlı besiyerleri	15
2.4.3.3. Sıvı besiyerleri	15
2.4.3.4. Hızlı Kültür Sistemleri	16
2.4.3.4.1. BACTEC 460TB Radyometrik Sistem	16

2.4.4. Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri (NAAT)	17
2.4.4.1. In-house polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)	18
2.4.4.2. Ticari Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri	19
2.4.4.2.1. Amplicor MTB Test	19
2.4.4.2.2. Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct (AMTD) Test	20
2.4.4.2.3. BD ProbeTec ET System	21
2.4.4.2.4. GenoType Mycobacteria Direct test	21
2.4.4.2.5. INNO-LiPA Test	22
2.4.4.2.6. ProDect MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS test	22
2.4.4.2.7. Real-time PCR	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Klinik Örneklerin Seçilmesi	24
3.2. Örneklerin Toplanması ve İşlenmesi	24
3.2.1. NALC-NaOH yöntemi	25
3.3. Mikroskopik İnceleme	25
3.3.1. Erlich-Ziehl-Neelsen boyama yöntemi	25
3.4. Kültür	26
3.4.1. İnokulasyon, inkübasyon ve İdentifikasyon	26
3.5. PCR-ELISA Testi	27
3.5.1. DNA ekstraksiyonu	27
3.5.2. PCR amplifikasyonu	28
3.5.3. ELISA yöntemiyle saptanması	29
3.6. İstatistiksel Analiz	31
4. BULGULAR	32
5. TARTIŞMA	35
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	39
7. KAYNAKLAR	40
8. ÖZGEÇMİŞ	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1: Tüm örneklerde PCR-ELISA Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi	32
Çizelge 2: Akciğer örneklerde PCR-ELISA Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi	33
Çizelge 3: Akciğer dışı örneklerde PCR-ELISA Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi	34
Çizelge 4: Farklı ticari direkt NAAT'leri için çeşitli çalışmalardan bildirilen duyarlılık ve özgüllük aralıkları	38

KISALTMALAR

ARB	: Aside Dirençli Basil
ATS	: Amerikan Toraks Derneği
BAL	: Bronkoalveolar Lavaj
BCG	: Bacille Calmette Guerin
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention (Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi)
CLSI	: Clinical and Laboratory Standarts Institue
DGTS	: Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FDA	: Food and Drug Administration of the United States of America
HPA	: Hibridizasyon koruma tekniği
HRP	: Horseradish peroxidase
IAC	: Internal amplifikasyon kontrol
IDSA	: Amerikan Enfeksiyon Hastalıkları Derneği
LJ	: Löwenstein Jensen
MAC	: <i>Mycobacterium avium</i> kompleks
MTB	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTDT	: Mycobacterium tuberculosis Direct Test
NAAT	: Nükleik asit amplifikasyon testleri
NALC	: N-Asetil-L-Sistein
NASBA	: Nükleik asit dizi bazlı amplifikasyon
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
SDA	: Strand displacement amplification
Taq	: Thermus aquaticus
TB	: Tüberküloz
TDM	: Tüberküloz dışı mikobakteriler
TMA	: Transkripsiyon temelli amplifikasyon
TUTSA	: Türkiye Tüberküloz Sürveyans Araştırması

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tüberküloz (TB) tüm uğraşlara rağmen, dünyada en sık ölüme neden olan enfeksiyon hastalıklarından biri olarak hala en önemli halk sağlığı problemlerinden biridir. TB sadece gelişmekte olan ülkelerin değil, gelişmiş ülkelerin de sorunu olmaya devam etmektedir. Sosyoekonomik düzeyi düşük toplumlarda ve immün yetmezliği olan kişilerde daha sık görülmektedir. Çoğunluğu gelişmekte olan ülkelerde olmak üzere dünya nüfusunun yaklaşık üçte birinin *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) ile enfekte olduğu, her yıl ortalama 2-3 milyon kişinin TB nedeniyle öldüğü tahmin edilmektedir. Kontrol dışı akciğer TB'lu her hasta yılda 10-15 insana hastalığı aktararak TB'un yayılımını körüklemektedir (1, 2).

Etkin TB kontrol programının en önemli aşaması aktif olguların erken ve doğru olarak saptanmasıdır. TB hastalarının erken tanısı ve tedavisi bu hastalıktan toplumun korunmasında en etkili yol olduğu kabul edilmektedir. Bu nedenle tüberküloza yakalandığı düşünülen hastaların tanılarını kanıtlayacak, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, hızlı sonuç veren, uygulaması kolay ve pahalı olmayan laboratuvar yöntemlerinin günlük kullanıma girmesi önemli bir zorunluluktur. Bu nedenle klinik mikobakteriyoloji laboratuvarları, hasta örneğinde *M.tuberculosis*'in aranması, izolasyonu, identifikasyonu ile anti-tüberküloz ilaç duyarlılığını test ederek TB'un yayılımını önlemede ve kontrol altına alabilmede önemli bir rol üstlenmektedir (3, 4).

Tüberkülozda ilk tanı klinik verilerle yapılmış olsa bile kesin tanı için etken mikroorganizmanın konvansiyonel olarak direkt bakıda görülmesi ve kültürde üretilerek tanımlanması esastır. Ancak laboratuvar tanıda mikobakteriler yavaş üreyen mikroorganizmalar olduklarından kültürde üremenin gözlenmesi için ortalama 2-8 haftaya gereksinim duyulur. Ayrıca organizmanın direkt bakıda saptanması da duyarlılığı düşük bir yöntemdir (5).

Son yıllarda dirençli basillerin izolasyonlardaki artış ve tanıya yönelik konvansiyonel testlerin pratik olmamaları, uzun zaman gerektirmeleri, tür

düzeyinde tiplendirme de yetersiz kalmaları, rutin kullanılmama sorunlarının çözümüne yönelik arayışları yeniden gündeme getirmiştir. Bu amaçla CDC hasta takibi ve halk sağlığının koruma amaçlı olarak tanısız mikobakteriyolojide mevcut en hızlı yöntemlerin kullanımını önermektedir. Son 10-15 yıl içinde mikobakteriler hasta örneğinden ve kültür ortamlarından saptanması, tür düzeyinde tanımlanması ve duyarlılık testleri için özgüllük ve duyarlılığı yüksek, güvenilir hızlı sonuç verebilen ve kolay uygulanabilir yöntemlerle ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. Bu süreç içerisinde geliştirilen ticari ürünlerin bir kısmı günümüzde diyagnostik amaçla mikobakteriyoloji laboratuvarı rutin çalışmaları ve epidemiyolojik araştırmalar için kullanılmasına rağmen bir kısmının halen faz çalışmalarını devam ettirmektedir. Bunlar arasında etken mikroorganizmanın nükleik asitlerinin aranmasına yönelik moleküler (genotipik) yöntemler tanı sürecini kısaltmada ve tedaviye yönelik antibiyotik direnci ile ilgili mutasyonların saptanmasında umut verici yöntemler olarak kullanılmaktadır. Günümüzde özellikle yayma preparatın direkt bakıda ARB (aside dirençli bakteri) pozitif akciğer örnekleri için doğrudan klinik örneklerden mikobakterilerin saptanması ve tanımlanması amacı ile geliştirilen nükleik asit amplifikasyon temeline dayalı pek çok ticari ürünler mevcuttur [Nükleik asit amplifikasyon testi (NAAT)]. Bu testler tercihen direkt bakısı pozitif solunum örneklerinde aynı gün içerisinde TB tanısı konulmasına yardımcı olabilen yöntemlerdir (5, 6).

ProDect MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS testi (bcs Biotect S.p.A., Cagliari, Italia) *M.tuberculosis*'in DNA'sını direkt klinik örnekten saptamaya yönelik olarak geliştirilmiş ve PCR-ELISA yöntemini kullanan ticari bir nükleik asit amplifikasyon testidir. Testte *M.tuberculosis*'e spesifik IS6110 gen bölgesi PCR yöntemi ile amplifiye edilmekte ve amplifiye edilmiş spesifik DNA bölgeleri DNA-ELISA yöntemi ile gösterilmektedir.

Bu çalışmada; bir nükleik asit arama testi olan PCR-ELISA yönteminin akciğer ve akciğer dışı klinik örneklerde direkt *M.tuberculosis* saptanmasında da güvenilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Tüberküloz ve Tarihçesi:

Tüberküloz (TB), tedavisindeki ilerlemelere rağmen halen tüm dünyada önemli bir mortalite ve morbidite nedeni olan, multisistemik tutulum gösteren kazeifiye granülomlarla karakterize bir enfeksiyon hastalığıdır (1).

İnsanlık tarihi kadar eski bir hastalık olan TB hakkındaki bilgiler, M.Ö. 3000 yıl öncesine kadar uzanmaktadır (7). Tüberküloz tanımı ilk kez M.Ö. 4. yüzyılda Hipokrat tarafından yapılmıştır (8). İlk tedavi önerilerini M.S II. yüzyılda Galen ortaya koymuştur. Vesalius (M.S.1478) TB hastalarının otopsilerinde kaviter lezyonları bildirmiştir. Sylvius ise TB'dan ölen hastaların akciğerlerinde tüberkül olarak adlandırdığı küçük sert nodüllerin bulunduğunu göstermiştir (9).

Onyedinci ve 18. yüzyıllarda sanayi devrimi, yoksulluk, yetersiz beslenen ve kalabalık barınma koşullarında yaşayan insanların sayısını artırarak TB salgınının genişlemesine neden olmuştur. Bu dönem dünyada TB'dan ölümlerin en yüksek düzeyde yaşandığı dönemdir (10).

19. yy'a kadar sadece klinik olarak tanımlanan tüberkülozun bulaşıcı bir hastalık olduğu ilk defa 1868 yılında bir Fransız askeri doktoru olan Jean Antoin Villemin tarafından saptanmıştır (11, 12).

İlk kez 1882 yılında tüberküloza neden olan etkeni bulduğunu açıklayan Robert Koch, kısa bir süre sonra 1891 yılında, benzer şekilde immunolojide de ciğir açan Koch fenomenini tanımlamıştır. Koch hastaların akciğerlerindeki lezyonlarda basili göstermiş, bunu kültürde üretmiş ve üretilen basil ile deney hayvanlarında tüberküloz oluşturmuştur (13).

1907-1921 yılları arasında çalışan Calmette ve Guerin günümüzde de profilakside en önemli silah olan BCG (Bacillus Calmette Guerin) aşısını bulmuşlardır. Seibert ve Glenn (1939) ise PPD'yi (Tuberculin Purified Derivative) bulmuşlardır (12).

Kemoterapi döneminden önceki tedaviler hastanın doğal direncini arttırmak amacıyla yapılmaktaydı. Selman Walksman'ın 1944 yılında streptomisini bulmasıyla kemoterapi dönemi başlamış oldu. Sonraki yıllarda PAS, INH ve günümüzde de kemoterapide kullanılan diğer ilaçlar bulunmuştur (8, 11, 12).

2.2 Epidemiyoloji:

2.2.1 Dünyada Tüberküloz:

Günümüzde TB dünyada ve ülkemizde çok önemli bir halk sağlığı sorunudur. Bugün dünya nüfusunun üçte biri, yaklaşık 1.7 milyar kişi *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) ile enfekte olduğu ve her yıl yaklaşık 2 milyon kişinin TB nedeniyle öldüğü tahmin edilmektedir. (1, 14).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre 2005 yılında dünya genelinde 8.8 milyon yeni TB olgusu olduğu ve bunların 7.4 milyonunun Asya ve Afrika'nın Güney Sahra ülkelerinden olduğu, 1.6 milyon kişinin TB nedeniyle öldüğü tahmin edilmektedir. Bu kötü senaryoya AIDS epidemisi yaşanan Afrika ve Güneydoğu Asya'nın katkısı büyüktür. Dünyada TB artışında değişik faktörler sorumludur. Bunlardan en önemlileri; sağlık politikalarında TB'a yeterli önemin verilmemesi, HIV epidemisi, sosyoekonomik koşullarda kötüleşme ve demografik değişikliklerdir (2).

Dünyada TB hastalarının %80'ini kapsayan, en çok hastanın olduğu ülkeler yüksek hasta yükü olan ülkeler olarak ele alınmaktadır. Bugün 22 ülke dünyadaki TB hastalarının %80'ini barındırmaktadır. Bunlardan en çok hastanın bulunduğu beş ülke Hindistan, Çin, Bangladeş, Filipinler ve Güney Afrika'dır (15).

TB hasta sayılarındaki artışlar ve TB kontrol çabalarının yeterince başarı sağlayamaması nedeniyle, DSÖ 1993 yılında tüberküloz için acil durum ilan etmiştir. Böylece 1990'lı yıllarda başlayan DGTS (Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi) uygulamaları, dünyada hızlı bir şekilde yayılmıştır. Bu stratejinin hedefleri, belli bir toplumda beklenen balgam yaymasında ARB pozitif hastaların %70'ini saptama ve bulunan hastaların en azından %85'inde kür elde etme olarak belirlenmiştir (16).

TB'a bağlı ölümler dünyadaki tüm ölümlerin %7'sini, az gelişmiş ülkelerde ise %26'sını oluşturmaktadır. Tüberkülozun tek başına tüm diğer enfeksiyon

hastalıklarından daha fazla ölüme sebep olmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde diğer ürkütücü bir gerçek TB hastalarının ancak %46 sının saptanabildiği ve bunlarında yarısından azının tedavi imkânına kavuşabildiğidir (41,17).

2.2.2 Türkiye’de Tüberküloz:

Türkiye’de geçen yüzyılın başında TB ciddi bir epidemi nedeni olmuştur ve bu dönemlerde TB ölümleri, bütün ölüm nedenleri içinde ilk sırada yer almıştır. Ülkemizde TB ile etkin mücadele 1950’li yıllarda başlatılmış ve 1960 yılında Verem Savaş Dispanserleri kurulmuştur. Bunun sonucu olarak 1945 yılında TB ölümleri yüzbinde 262 iken, 1950 yılında yüzbinde 204’ye düşmüştür (10, 17).

Günümüzde ülkemizdeki TB’un durumu değerlendirildiğinde, hastalık insidansı açısından başarılı kontrol programı uygulanmış ülkeler ile kötü programlar uygulamış ülkeler arasında konumumuz olduğu görülmektedir (17). Verem Savaş Daire Başkanlığının 2007 raporuna göre (18); 1965’de yüzbinde 172 olan TB insidansı 2005 yılında yüzbinde 26.0 olarak bildirilmiştir. 2005 yılı toplam hasta sayısı Türkiye genelinde 20.535, yeni vaka sayısı 18.753 olarak bulunmuştur. Bu rakamların Türkiye’de tüm hastaları içermediği bilinmektedir. Aynı rapora göre; ülkemizde tüberküloz hastalarının çoğunluğunun genç yaşta olduğu, hastaların %61.66’sının 15-44 yaş arası hastalar olduğu bildirilmiştir.

Verem Savaş Daire Başkanlığının 2007 raporuna göre; ülkemizde TB’un bakteriyolojik tanısının konulmasında da ciddi eksiklikler olduğu görülmektedir. 2005 yılında akciğer TB’lu hastaların yaklaşık yarısının (%55.6) yayma pozitif olduğu ve %38.1’inin kültür pozitif olduğu bildirilmiştir (18).

Dünyada 1999 yılı kohortunda DGTS uygulanan yerlerde hastaların %96’sının, DGTS uygulanmayan yerlerde %41’inin tedavi sonuçları değerlendirilebilmiştir. Türkiye, DGTS uygulanmayan bir ülke olarak listelenmekte ve Türkiye tedavi sonucu vermeyen, yani değerlendirilemeyen ülke olarak kayıtlara geçmekteydi (16). Ancak 2000 yılında ilk uygulamaları başlayan DGTS, 2003 yılı itibarıyla pilot olarak uygulanmış, 2006 yılında tüm ülke geneline yaygınlaştırılmış bulunmaktadır. 2005-2006 yılında DGTS’ye hazırlık olarak yapılan eğitimler ve formların yenilenmesi, bireysel veri tabanına geçiş ve yapılan değerlendirmeler sonucunda Türkiye DSÖ’ne veri gönderen ülkeler arasında yer almıştır. Sağlık Bakanlığı Verem Savaşı Dairesi Başkanlığı tarafından yürütülen “Türkiye Ulusal

Tüberküloz Sürveyans Araştırması (TUTSA)” ile toplanan ve değerlendirilen veriler 2007 yılı raporu olarak yayınlanmıştır (17, 18).

2.3 *Mycobacterium tuberculosis*'in genel özellikler:

2.3.1 Taksonomi:

Mycobacterium cinsi Mycobacteriaceae ailesindeki tek cinstir. Bu cinsin temel özellikleri yavaş üremeleri, aside dirençli olmaları ve hücre duvarlarında bol miktarda lipid içermeleridir. *Mycobacterium* türlerinin DNA'sındaki G+C oranı % 61-71 olup (*M.leprae* hariç %55), diğer mikolik asit içeren bakteri cinsleri ile benzerlik göstermektedir; *Gordonia* %63-69, *Nocardia* %64-72, *Rhodococcus* % 63-73 ve *Tsukamurella* %68-74. Sadece Mikobakteriler tam olarak aside dirençli boyanma özelliği gösterirken, diğer cinslerde farklı derecelerde aside dirençlilik söz konusudur (1).

DNA-DNA homolojileri %95'den fazla olan ve bakteriyolojik özellikleri benzerlik gösteren *M.tuberculosis*, *M.bovis*, (*M.bovis* BCG dahil), *M.africanum*, *M.microti*, *M.canetti* türleri *M.tuberculosis* kompleks başlığı altında gruplandırılır ve tanımlanır. Ayrıca son zamanlarda *M.caprae* ve *M.pinnipedii* de bu gruba dâhil edilmiştir (1,19). *M.bovis* genellikle akciğer dışı organ tutulumlarına neden olur. Günümüzde sütlerin pastörizasyonu ile birlikte görülme sıklığı azalmıştır. *M.africanum*, Batı Afrikada nadiren hastalık meydana getiren bir türdür. *M.microti*, kemirici hayvanlar için patojendir. *M.canetti*'nin çocuklarda lenfadenit ve HIV olumlu hastalarda jeneralize TB'a neden olabildiği bildirilmiştir. *M.bovis* BCG aşı amaçlı kullanılmaktadır (1). Tüberküloz basili terimi, kompleksin diğer üyelerinin insanlarda çok daha nadir patojen olmaları nedeniyle *M.tuberculosis* ile neredeyse eş anlamlı olarak kullanılmaktadır (9, 1).

M.tuberculosis kompleks dışında kalan tüm mikobakteriler 'tüberküloz dışı mikobakteriler' (TDM) veya 'atipik mikobakteriler' olarak adlandırılır. *M.tuberculosis* kompleks ve *M. lepra* dışındaki mikobakterilerin tümü doğada, toprakta, suda bolca bulunurlar ve çoğu patojen değildir. Ayrıca hasta kişilerden diğer insanlara yayılımlarına nadiren rastlanır (1). Hastalık etkeni olmaksızın vücutta kolonize olabildikleri için ayırımlarının yapılabilmesi zordur. *Mycobacterium* cinsinin standart karakterine uyan 120'den fazla TDM türü vardır (14).

TDM türleri üreme hızlarına göre yavaş üreyen ve hızlı üreyen mikobakteriler olarak iki sınıfta toplanır. Hızlı üreyen türlerde (Runyon grup IV) yedi gün ve daha kısa sürede koloniler görünür hale gelir. Hızlı üreyenlerden patojen olanlar arasında *M.fortuitum* kompleks (*M.fortuitum*, *M.pregrinum*), *M.cheloane* kompleks (*M.cheloane*, *M.abcessus*) sayılabilirken, saprofitik olanlar; *M.thermoresistible*, *M.smegmatis*, *M.vaccae*, *M.phlei*, *M.flavescens*'dir. Yavaş üreyen türlerde ise daha uzun sürelerde üreme gözlenir. Yavaş üreyen TDM grubu pigmentasyon özelliklerine göre fotokromojenler (Runyon grup I), skotokromojenler (Runyon grup II), fotokromojen olmayanlar (Runyon grup III), olarak üçe ayrılmaktadır. Fotokromojen olanlar karanlıkta pigment oluşturmazken gün ışığında sarı veya portakal sarısı koloniler oluştururlar. *M.kansasii*, *M.marinum*, *M.simiae*, *M.asiaticum* bu gruptandır. Skotokromojenler hem ışıkta, hem de karanlıkta sarı ve turuncu pigment meydana getirirler (*M.scrofulaceum*, *M.xenopi*, *M.celatum*, *M.szulgai*, *M.gordonae*). *M.gordonae* dışındakiler potansiyel patojenlerdir. Fotokromojen olmayanlar ışıkta ve karanlıkta pigment oluşturmazlar. Bu grupta *M.avium*, *M.intracelulare*, *M.malmoense*, *M.ulcerans*, *M.paratuberculosis*, *M.haemophilum*, *M.genavense* patojendirler. Ayrıca genellikle saprofitik olup nadiren hastalık yaptığı düşünülenler *M.gastri*, *M.terrae*, *M.triviale*, *M.nonchromogenicum* ve *M.schimodei*'dir (7, 9, 14, 20, 21).

Mikobakterilerin tür tanımlanmasında pigment oluşumu ve üreme hızları ile birlikte pek çok biyokimyasal test uygulanmaktadır. Ancak bu testler günümüzde yeni türleri ayırt etmekte yetersiz kalmaktadır. Tüm klinik mikobakteri izolatlarının yaklaşık %14'ü fenotipik yöntemlerle tanımlanamamaktadır. TDM ayırımında yeni identifikasyon yöntemlerinden olan moleküler ve kromatografik yöntemler de uygulanabilmektedir. Son yıllarda, konvansiyonel tanımlama işlemlerinin yerine DNA dizi analizi gibi moleküler yöntemlerin uygulamaya girmesiyle mikobakterilerin taksonomisinde önemli ilerlemeler sağlanmış, çok sayıda yeni mikobakteri türü bulunmuş ve yeni taksonomik gruplar tanımlanmıştır. Günümüzde 16S rDNA dizi analizi, DNA-DNA hibridizasyonu ve housekeeping genlerin dizi analizi yeni bir tür tanımlanırken kullanılan moleküler kriterlerdendir (22).

TDM türleri hem immun sistemi baskılanmış hem de normal olan konaklarda tüberküloz dışı hastalıklar meydana getirebilir. Sıklık sırasıyla pulmoner enfeksiyonlar, lenfadenitler, diseminasyon enfeksiyonları, lokalize deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, tendon-kemik enfeksiyonları, kateter

enfeksiyonlarına neden olabilirler. HIV epidemileri ile birlikte ABD ve Avrupa'da AIDS hastalarının %25-50'sinin TDM ile enfekte olduğu belirtilmektedir. Bu etkenlerden en sık rastlanılanı *M.avium* kompleks (MAC), ikinci sıklıkla da *M.kansasii*'dir (1, 19).

2.3.2 Bakteriyoloji:

MTB; tipik olarak hafif kıvrık ya da düz çubuk şeklinde bir basildir. 1-4 µm uzunluğunda ve 0,3-0,6 µm çapında, kapsülsüz, sporsuz ve hareketsiz bir basildir. Anilin boyaları ile kolaylıkla boyanmazlar. Gram boyamada çok az mavi boya alarak gram (+) boyanırlar. Hücre duvarının yüksek lipid içeriği nedeniyle sert bir hücre duvarına sahiptirler. Hücre duvarında bulunan mikolik asit, fuksin veya auromine O gibi arilmetan boyalarla stabil bileşikler yapar ve asit-alkol veya güçlü mineral asitler ile karşılaştıktan sonra bile boyayı bırakmazlar. Dekolarizasyon direnci şeklinde açıklanan bu özellikten dolayı "aside dirençli bakteriler" (ARB) olarak tanımlanmaktadır. Zorunlu aerob olması en önemli biyolojik özelliğidir ve oksijen yokluğunda üreyemez. %5-10 CO₂ üremeyi artırır. Oksijen konsantrasyonunun yüksek olduğu dokulara yerleşme eğilimindedir. İstemli hücre içi bir bakteri olan MTB'nin diğer bir özelliği de üreme hızlarının oldukça yavaş olması olup, jenerasyon süresi 18-22 saattir. MTB 37°C'de 2-3 haftalık inkübasyon sonunda üstü ve kenarları girintili çıkıntılı, kuru, sert, kirli beyaz, 1-2 mm çaplı pigmentsiz koloniler oluşturur. Sıvı besiyerlerinde ip yada kordon gibi bir görünüme neden olan kord faktörü oluştururlar. Basilin endotoksini ve ekzotoksini yoktur. Ancak hücre duvarı ve sitoplazmada değişik yapıda antijenler içerdiğinden basil hücrelerinin parçalanması ile açığa çıkan komponentler konakçı immun yanıtını ortaya çıkarırlar (1, 9, 19, 23).

2.3.3 Hücre duvar yapısı:

Mikobakterilerin hücre duvarı yapısı gram negatif veya gram pozitif bakteri hücre duvarlarından oldukça farklı, kompleks bir yapıdır. Bu kompleks yapı diğer bakterilerdeki gibi sitoplazmik membranın üzerinde yer alır. Hücre duvarının ana yapısını, peptidoglikan-arabinogalaktan-mikolik asit kompleksi olarak adlandırılan birbirine kovalent bağlarla bağlı üç polimerden oluşur. Mikobakterilerin

peptidoglikanında yer alan N glikolil muramik asit içeriğindeki glikolil yapısı nedeniyle bakteri lizozoma dirençlidir. Peptidoglikan yapısının tetrapeptid yan zincirinin 3. pozisyonunda diaminopimelik asit yer alır. En içte yer alan peptidoglikan, orta tabakayı oluşturan arabinogalaktana fosfodiester bağı ile bağlıdır. Arabinogalaktan polisakkaridin indirgenmemiş ucunun 2/3'ü mikolik asit ile ester yapar. Arabinogalaktanın terminal uçları lineer oligosakkaridler olup molekülün esas immunojenik determinantını oluşturur (24, 25, 26).

Mikobakteri hücre duvarının kuru ağırlığının %60'ı mikolik asidi de içeren lipidlerden oluşur. Mikolik asitler uzun, kompleks, dallanmış α -alkil, β -hidroksi yağ asitleri olup mikobakteri ve yakın ilişkili türlere özgüdür Peptidoglikana bağlı büyük bir arabinogalaktan molekülü üzerine yaklaşık 30 kadar mikolik asit tutunmuştur. Hücre yüzeyine dik olarak yerleşen mikolik asit zincirleri, eşit uzunlukta olmayan iki karbon zincirine sahiptir. Mikolik asitlerin büyüklüğünün ve kimyasal yapılarının mikobakteri türlerine özgül olması tür düzeyinde tanımlanmalarını sağlar. Mikolik asitler, çok düşük akışkanlığa sahip olduklarından birçok kemoterapötik için direnç sağlarlar. Bu bariyer güçlü asit ve bazlara dayanıklılığın yanı sıra antikor ve komplemanların etkisinden de bakteriyi korurlar ve enfeksiyon sırasında persistansı sağlar. Ek olarak kord faktör (dimikoliltrehaloz) gibi mikolik asit içeren glikolipidler sitokin salınımına bağlı olayları indükleyerek virülans ve patogeneizde rol oynar. Bunlar arasında sistemik toksisite, antitümoral aktivite, granülom oluşturuucu aktivite, makrofajlardan kemotaktik faktörlerin salgılanması, lökosit migrasyon inhibisyonu sayılabilir. Kord faktör ile birlikte virulansta rol oynayan diğer bir yapı hücre duvarında periferik yerleşimli bir glikolipid olan sülfatidlerdir (24, 25, 26).

Mikobakterilerin hücre duvarı, yapıya kovalant bağlı lipidler dışında pek çok farklı tipte lipidleri de içerir. Bu hücre duvar yapılarından pek çoğu basilin virulansında ve patogenezinde önemli rol oynar. Bunlar trehaloz içeren glikolipidler (kord faktörü), balmumu (wax), lipoarabinomannan (LAM), lipomannan(LM), fenolikglikolipidler, lipoglikan, glikopeptidolipidler, lipooligosakkaritler, fosfotidilinozitolmannozidler (PIM), fosfotidiletanolamin ve triaçilgliserollerdir (24, 26).

Hücre duvarının altında yer alan plazma membranı başlıca, ozmotik korunma ile iyonların ve diğer moleküllerin transportunda görevlidir. Mikobakterilerin plazma membranında, LAM ve lipomannanpolisakkaritleri ve

fosfotidilinozitolmannozid (PIM) gibi yapılar yer alır. LAM, sitoplazmik membrandan başlayıp, hücre duvarının tüm katmanlarını kat eder. MTB'in önemli antijenlerinden olan LAM'ın antijenik özelliğini arabinoz ünitelerinin sağladığı gösterilmiştir (24, 26).

Mikobakterilerin hücre duvarında, önemli işlevleri olan pek çok farklı proteinler de yer almaktadır. Hücre bölünmesinde rol alan enzimler ve duvar polimerlerinin sentezinde rol almak, atıkların hücre duvarından geçişinde rol oynamak, porinleri oluşturmak ve antijenik özellik sağlamak şeklinde işlevleri özetlenebilir. Isı şoku proteinleri, MTB kompleksine özgül lipoproteinler (38Kda gibi), sitoplazmik membrana bağlı veya salgılanan proteinler (antijen85 gibi) mikobakterilerin başlıca proteinleridir. (24).

2.4 Laboratuvar tanısı:

Klinik, radyolojik ve/veya histolojik bulgularla bir hastada tüberkülozdan kuşulanılabilir. Ancak hastalığın kesin tanısı sadece klinik örneklerde tüberküloz basilinin varlığının kanıtlanması ile mümkündür (27).

TB tanı yöntemlerinin amacı, klinik örneklerde mikobakterilerin varlığını göstermek ve hastalık etkeni olan türü izole etmektir. Tanının tam ve doğru olarak yapılabilmesi uygun örneğin, uygun yöntemle alınmasına, uygun şekilde laboratuvara gönderilmesine, uygun şekilde işlenmesine bağlıdır. Tanı ve tedavilerinde güvenilir sonuç veren yöntemlere gereksinim duyulmaktadır (1). Amerikan Hastalık Kontrol Merkezi (CDC), Amerikan Toraks Derneği (ATS) ve Amerikan Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (IDSA) tarafından ortak hazırlanan 2005 yılı tüberküloz kontrol hizmetleri için klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında; ARB mikroskopisi, kültür, identifikasyon, birincil ve ikincil seçenek ilaçlar için duyarlılık testleri ve moleküler tanı testlerinin uygulanabilmesi gerekliliği bildirilmektedir (3).

Tüberküloz laboratuvarına gönderilen pulmoner örnekler arasında balgam, indüklenmiş balgam, açlık mide suyu (gastrik lavaj sıvısı), bronkoalveolar lavaj (BAL), bronşiyal fırçalama, transtrakeal aspirat, larenks sürüntüsü gibi örnekler sayılabilir. Ekstrapulmoner örnekler ise idrar, doku biyopsi örnekleri, beyin omurilik sıvısı, periton sıvısı, plevra sıvı ve perikardiyal sıvı gibi örneklerdir (14).

2.4.1. Örneklerin İşlenmesi:

Mikobakterilerle birlikte kontaminasyona neden olan bakteri ve mantarları ve bu mikroorganizmaların etrafını saran lökosit, eritrosit, vücut sıvıları ve doku gibi organik kalıntılar besiyerlerinde üremeyi baskırlar. Balgam gibi normalde steril olmadığı düşünölen örneklere bu organik kalıntıları sindirmek ve kontaminasyona neden olan organizmaları elimine etmek için dekontaminasyon ve homojenizasyon işlemleri uygulanır, daha sonra bakteri yoğunluğunu artırmak amacıyla konsantrasyon işlemleri uygulanır. Laboratuvarda uygulanan işlemler biyogüvenlik kabinlerinde ve belirli standartlara uyularak yapılmalıdır. (14, 28).

Dekontaminasyon amacıyla kullanılan çeşitli yöntemler mevcuttur bunlar arasında Sodyum hidroksit (NaOH), N-Asetil-L-Sistein (NALC) + NaOH, benzolkonium kloride-trisodyum fosfat, oxalic asit yöntemleri sayılabilir. Bugün kontamine örnekler için en çok tercih edilen ve en yaygın kullanılan homojenizasyon ve dekontaminasyon yöntemi NALC-NaOH yöntemidir (14).

BOS, vücut sıvıları ve kan gibi normalde steril kabul edilen örneklere dekontaminasyon işlemleri uygulanmaz, bu örnekler 3000×g, 15 dakika santrifüj işlemleri uygulanarak konsantrasyon işlemleri yapılır. Örneklerin ısısını santrifüj işlemleri sırasında 20°C veya daha düşük kalması için mümkünse de soğutmalı santrifüj tipi kullanılmalıdır. Soğutmalı santrifüj örneklerin izolasyon oranını artırırken, izolasyon süresini de kısalttığı bildirilmiştir (14, 28).

2.4.1.1. NALC-NaOH yöntemi:

Örneğin hacmine eşit miktarda NALC-NaOH solüsyonu (50ml %4 NaOH + 50ml %2.9 Sodyum sitrat + 0.5gr NALC) eklenip vorteks ile iyice karışması sağlandıktan sonra 15 dakika bekletilir. Sonrasında üzerine 50ml işaretine kadar 0.067M fosfat tamponu (pH6.8) eklenip, alt-üst edilerek NaOH'in etkisinin sürmesi engellenirken materyalin viskozitesi de azaltılmış olunur. Yoğunlaştırma amacıyla 3000×g de 15 dakika santrifüj de çevrilir ve üst kısım boşaltılarak elde edilen sedimente 1-2 ml steril fosfat tamponu eklenerek resüspanse edilir (14, 28).

2.4.2. Mikroskopik inceleme

Klinik örneklerden ve kültürden mikobakterilerin varlığının gösterilmesi için aside dirençli boyama yöntemleri sonrası mikroskopik inceleme ile basilin görülmesi en önce uygulanan, en kolay, en ucuz ve en hızlı yöntemdir. Ancak mikroskopik incelemede aside dirençli basilin görülebilmesi için örneğin mililitresinde en az 5000 kadar bakteri bulunması gerekmektedir, bu durum yöntemin duyarlılığını azaltmaktadır (14, 28, 29).

Aside dirençlilik; bakterinin hücre duvarının yapısına bağlıdır ve geliştirilmiş pek çok boyama metodu bu özelliğini gösterebilir. En sık kullanılan boyalar fenol solüsyonu içeren boyalardır. Lipidden zengin hücre duvarına bu boyalar daha iyi penetre olmaktadır ve renk giderici asid-alkol ile işlemlendiğinde, hücre duvarından ilk boyanın uzaklaştırılması çok zordur. Sertleşen hücre duvarı boyayı bırakmaz. Ek olarak zıt renkli bir boya ile tekrar boyama işlemi aside dirençli bakterilerin (ARB) daha rahat görünmesi içinde kontrast sağlayacaktır (14, 28).

ARB boyama için dekontamine ve konsantre edilmiş örneklerden hazırlanmış yayma preparatlar boyama öncesi üç kez alevden geçirilerek yada elektrikli lam ısıtıcısında (65°C-75°C) en az 2 saat süreyle tespit edilir ve daha sonra boyama işlemi uygulanır (14, 28).

Mikobakteriler için başlıca iki ARB boyama tekniği geliştirilmiştir (14, 28).

A. Karbol fuksin boyama; ışık mikroskobu kullanılarak değerlendirilir.

- a. Ziehl-Neelsen (EZN, Erlich Ziehl-Neelsen) boyama
- b. Kinyoun boyama

B. Florokrom boyama; floresan mikroskobu kullanılarak değerlendirilir.

- a. Auramine -rhodamine
- b. Auromin O

Tanıda en hızlı yöntem mikroskopik inceleme olmakla birlikte TB olgularının yarısında basil görülmesi bu yöntemin duyarlılığını düşürmektedir. EZN boyama sonrası mikroskopinin özgülüğünün yüksek olmasına rağmen, duyarlılığı %22-78 arasında değişmektedir. Florokrom boyama ile duyarlılık artmakta ve tarama için harcanan zaman kısalmaktadır. Ancak Florokrom boyama ile pozitif bulunan sonuçların EZN yöntemi ile doğrulanması önerilmektedir (14,19).

2.4.2.1. Ziehl-Neelsen (sıcak karbolfuksin) boyama:

Hazırlanan ve tespit edilen yayma preparat Ziehl-Neelsen karbolfuksin boya ile kaplanır ve buhar çıkana kadar alttan yavaşça ısıtılır. 3-5 dakika süreyle buharlaşması devam ettirilir ve soğumaya bırakılır. Daha sonra sudan geçirilerek, %3 asid alkolle lam kaplanır. Artık lamdan renk akmayıncaya kadar yaymaya renk giderme işlemi uygulanır. Lam suyla iyice yıkanır ve zıt boyayla 20-30 sn boyanır. Lam su ile tekrar yıkanır. Havada kurutulur. Boyalı preparat $\times 100$ 'lük imersiyon objektifinde (X1000 büyütme) incelenir (14).

2.4.2.2. Kinyoun boyama:

EZN boyama yöntemindeki karbolfuksin boyadaki bazik fuksin ve fenol konsantrasyonu artırılarak, ısıtma işlemini gereksiz kılan modifiye bir boyama yöntemidir (14).

2.4.2.3. Florokrom boyama:

Florokrom boya, lipidden zengin hücre duvarına bağlanarak basilleri görünür hale getirir. Bu yöntemde basiller siyah zemin üzerinde sarı veya turuncu floresans verecek şekilde görülürler. Bu boyama yönteminde hazırlanan yayma preparat florokrom boya ile kaplanır. Yaymanın 15 dakika süreyle boyanması sağlanır. Lam suyla yıkanır. Lam asit-alkol ile 2 dakika renksizleştirme işleminden geçirilir. Potasyum permanganat ile 2 dakika zıt boyama yapılır. Lam su ile yıkanır ve havada kurutulur. Floresan mikroskopi ile 20 ve 40 'lık objektifte incelenir (14, 28).

2.4.3. Kültür yöntemleri:

Kültür yöntemleri geç sonuç vermesine rağmen; tür düzeyinde identifikasyon işlemleri için izolatların elde edilebilmelerini, bakterilerin canlılıklarının doğrudan gösterilmelerini, ilaç duyarlılık testlerinin yapılarak hastaların doğru tedavi edilebilmelerini, çoğaltılan izolatların daha sonraki

araştırmalar için saklanmalarını sağlaması açısından, TB'un tanısında halen altın standart olmaya devam etmektedir (30).

Mikobakteri kültürü için sıvı ve katı besiyerleri kullanılabilir. Katı besiyerleri yumurta bazlı besiyerleri ve agar bazlı besiyerleri olarak iki grupta incelenebilir. Bu besiyerlerinin tümü, antibiyotik eklenerek selektif hale getirilebilir. Yumurtalı besiyerlerinde üreme biraz daha iyi olmakla beraber, agar içerenlerde üreme daha hızlıdır. En hızlı üreme ise sıvı besiyerlerinde gözlenmekte, ancak koloni morfolojisini inceleme şansı olmamaktadır. CLSI mikobakterilerin primer izolasyonunda klasik katı besiyerleri yanı sıra sıvı besiyerlerinin de birlikte kullanılmasını ermektedir. Eğer iki katı besiyeri kullanılacaksa besiyerlerinden birinin selektif olması erilir (1, 14, 28, 31).

2.4.3.1 Yumurta bazlı besiyerleri:

Yumurta bazlı katı besiyerlerinden tüm dünyada en yaygın kullanılanı Löwenstein-Jensen (LJ) besiyeridir. İçinde tam yumurta veya yumurta sarısı, patates unu, gliserol, çeşitli tuz ve mineraller ve malaşit yeşili vardır. Bir diğer yumurtalı besiyeri, Pentagrani Löwenstein-Jensen besiyeri'ne göre, inhibitör madde olan malaşit yeşilini daha yüksek konsantrasyonda içerir ve bu nedenle kontaminasyonun çok olduğu örneklere tercih edilebilir. American Thoracic Society Medium ise malaşit yeşilini en düşük konsantrasyonda içerir ve vücut sıvıları gibi steril örneklere erilmektedir. Birçok mikobakteri türünün üremesini ve tipik morfolojisi oluşturmasını sağlayan LJ besiyeri, ayrıca uygun saklama koşullarında uzun raf ömrüne sahiptir. Ucuz ve gvenilirdirler. En önemli dezavantajları ise koloni oluşumunun erken dönemde saptanmasındaki zorluk ve antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılık testlerinde ilacın besiyerinde dengeli konsantrasyonda dağılmaması ve pişirme (koagülasyon) sırasında ilaçların inaktivasyonu olarak bilinmektedir. Opak bir besiyeri olan Löwenstein- Jensen besiyeri'nde kolonilerin görünebilir olması için gerekli süre 18-24 gündür. L-J Gruft, Mycobactosel L-J, antibiyotik içeren daha seçici LJ besiyerleridir. (14, 23, 28).

2.4.3.2 Agar bazlı besiyerleri:

Agar bazlı besiyerlerinden en yaygın olarak kullanılanları Middlebrook 7H10 ve 7H11'dir. Bu besiyerlerinin içine zenginleştirici olarak Oleik asit, albumin, dekstroz ve katalaz karışımı (OADC) eklenmektedir. Besiyerinin saydam olması kolonileri erken saptama şansı verir, besiyerlerinde koloniler 10-12 günde mikroskop altında incelendiğinde saptanabilir. Bu hızlı saptama biotin ve katalazın örnekte bulunabilen zarar görmüş basilleri sitümüle etmesine bağlıdır. Ancak pahalı olması, ısı ve ışıktan etkilenmesi sonucu saklanma sürelerinin nispeten kısa olması besiyerlerinin dezavantajlarıdır (14, 23, 28).

Middlebrook 7H10 en sık kullanılan agarlı primer izolasyon besiyerleridir. Kazein hidrolizatının eklenmesi ile elde edilen 7H11 ise, izoniazide dirençli mikobakterilerin üremesini, buna %2 gliserol eklenmesi ise *Mycobacterium avium-intracellulare*'nin üremesini sağlar. Middlebrook 7H10 ve 7H11 malaşit yeşili içermektedir, ancak yumurtalı besiyerlerinden çok daha düşük konsantrasyondadır. Ancak saydam Middlebrook besiyerlerinde daha erken sonuç vermesine karşın, uzatılmış inkübasyon sürelerinde en yüksek pozitif sonuçları Löwenstein-Jensen besiyeri vermektedir ve bu nedenle vazgeçilmez sayılmaktadır (1, 28).

Mycobactosel Middlebrook 7H10, Mitchison's selektif 7H11 antibiyotik ve antifungal içermeleri nedeniyle kontaminasyonun daha az sıklıkla gözlemlendiği selektif agar bazlı besiyerleridir. (23, 28).

2.4.3.3 Sıvı besiyerleri:

Middlebrook 7H9 ve Dubos Tween albumin gibi sıvı besiyerleri mikobakterilerin primer izolasyonu, stok suşlarının subkültürlerinin yapılması, ilaç duyarlılık testleri ve diğer in vitro testler için inokulum hazırlamak amacıyla yaygın olarak kullanılır. Özellikle Middlebrook 7H9 en sık kullanılan sıvı primer izolasyon besiyeridir Ayrıca ticari olarak kullanılabilen sıvı bazlı besiyeri sistemleride vardır (23, 28).

2.4.3.4 Hızlı Kültür Sistemleri:

Son yirmi yıldır tüm dünyada başarı ile kullanılan hızlı ticari kültür sistemleri mikobakterilerin üreme sürelerini kısaltan yöntemlerdir. Bu sistemlerde genellikle sıvı besiyeri kullanılmakla birlikte, bifazik ve katı besiyerlerinin kullanıldığı sistemler de mevcuttur. Bu sistemlerde genellikle üremenin saptanması, gaz basıncındaki değişiklikler, CO₂ oluşumu ve oksijen kullanımı radyometrik, florometrik veya kolorimetrik olarak ölçülerek yapılmaktadır. Hızlı kültür sistemleri 1-3 haftada üremeyi saptarken, katı besiyerlerinde üreme 3-8 hafta sürebilmektedir. Ancak katı besiyerlerinde koloni morfolojisine ve mikst üremeleri gözlemek mümkündür. Bu sistemler arasında BACTEC 460TB sistemi (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, Md.), BACTEC MGIT 960 sistemi (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, Md.), VersaTREK (ESP culture system II) (Trek Diagnostic Systems, Inc., Westlake, OH), BacT/Alert3D mycobacterial detection system (bioMerieux, Hazelwood, Mo.), Septi-Chek AFB mycobacterial culture system (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Md.) sayılabilir (1, 28).

2.4.3.4.1 BACTEC 460TB Radyometrik Sistem:

Yarı otomatize hızlı kültür yöntemi olan BACTEC 460 radyometrik sistemi hızlı ve güvenilir tanı sağlaması nedeniyle altın standart olarak kabul görmüş bir sıvı besiyeri sistemidir. Ticari kültür sistemleri arasında en sık kullanılanlardan biri olan BACTEC 460TB sistemi gerek primer izolasyon yönünden, gerekse ilaç duyarlılık testi yönünden, katı besiyerlerine üstünlükler sağlamıştır (1, 28).

Bu yöntemde klinik örnekler radyoaktif ¹⁴C-işaretli palmitik asit içeren Middlebrook 7H12 besiyerine (BACTEC 12B) ekilir. Besiyerinde üreyen mikobakteri ¹⁴C-işaretli palmitik asiti metabolize eder ve ¹⁴CO₂ meydana getirir. BACTEC 460 cihazı, kültür şişesindeki radyoaktiviteyi ölçerek ortaya çıkan ¹⁴CO₂'i kantitatif olarak saptar ve üreme indeks (growth index=GI) olarak verir. Bu değer üremenin miktarı ile direkt orantılıdır. Sistem klinik örneklerden mikobakterilerin izolasyonu yanında, antimikrobiyal duyarlılık testlerinde ve TDM'lerden MTB kompleksi ayırt etmede de (NAP testi) kullanılmaktadır (28, 32).

Yapılan çok sayıdaki çalışmaların sonucunda, BACTEC 460TB yöntemi ile *M. tuberculosis* izolasyon oranları %91-100 arasında bildirilmiştir. Yine bu çalışmalara göre, mikobakteri cinsi ve klinik örneğin özelliği göz önünde bulundurulmaksızın, BACTEC 460TB yöntemi ile mikobakterilerin 7-18 günde (ortalama 13 gün) saptanabildiği gösterilmiştir (33, 34).

2.4.4. Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri (NAAT):

TB'un laboratuvar tanısında ARB mikroskopisinin duyarlılığının düşük olması, kültür de üremenin uzun zaman alması, hızlı ve güvenilir sonuçlar veren yeni yöntem arayışlarına neden olmuştur. Moleküler yöntemler, özellikle mikroskopi ile görülmesi, kültürde üretilmesi uzun zaman alan, zor veya olanaksız mikroorganizmaların saptanmasında önemli rol oynamaktadır. Moleküler yöntemler oldukça hızlı olmaları ve tanımlama aralıklarının genişliği nedeniyle Mikobakteri enfeksiyonlarının tanısında da yaygın kullanım alanı bulmuştur Bu moleküler yöntemlerin tüberküloz tanısında kullanımının yaygınlaşması tüberküloz tanısına hız kazandırmıştır. Moleküler testler direkt klinik örneklerden *Mycobacterium tuberculosis*'in saptanması yanında, kültürde üretilen mikobakterilerin türlerinin saptanması veya tiplendirilmesi, antimikobakteriyal ilaçlara karşı dirençli olup olmadıklarının araştırılması ve epidemiyolojik araştırmalarda da kullanılmaktadır (5, 35, 36, 37).

Klinik örnekten direkt TB tanısına yönelik moleküler testler genel olarak nükleik asit amplifikasyonu (NAA) temeline dayanmaktadır. Bu testlerde diğer enfeksiyon etkenlerinde olduğu gibi *Mycobacterium tuberculosis*'in özgül nükleik asit dizisinin, saptanabilecek düzeye gelinceye kadar çoğaltılması amaçlanmaktadır. Bu sistemler için primer amplifikasyon hedefleri *M.tuberculosis*'e özgül IS 6110 insersiyon dizisi ve 16S rRNA geni ile 23S rRNA dır (38, 39, 40, 41).

Klinik örnekten direkt TB tanısına yönelik moleküler yöntemler genellikle üç ana basamaktan oluşur:

İlk basamak klinik örnekten mikroorganizmanın nükleik asitlerinin elde edildiği ekstraksiyon basamağıdır. Değişik ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmiştir: Fenol-kloroform yöntemi, distile suda kaynatma, deterjanlar+proteinaz K, değişik kimyasalların kullanımı (Chelox-100, Guanidin vb.) ve sonikasyon gibi yöntemler

DNA ekstraksiyonu için kullanılır. Ayrıca ticari olarak kullanılan DNA/RNA ekstraksiyon kitleride mevcuttur.

İkinci basamakta hedef nükleik asit bölgesinin (DNA veya RNA) saptanabilir düzeye gelinceye kadar çoğaltılması (amplifikasyon) basamağıdır. Amplifikasyon basamağı değişik tekniklerle gerçekleştirilebilir. Bu tekniklerden en sık kullanılanlar arasında PCR (Polimeraz zincir tepkimesi), TMA (Transkripsiyon temelli amplifikasyon), SDA (Strand displacement amplification) sayılabilir.

Üçüncü basamak ise çoğaltılmış olan hedef bölgenin (amplikon) özgül problemlerle saptanması basamağıdır. Saptama basamağı da değişik tekniklerle gerçekleştirilebilmektedir [hibridizasyon, ters hibridizasyon (revers hybridization), DNA-ELISA, gerçek zamanlı saptama (real-time detection), HPA (hybridization protection assay) gibi] (38, 40).

Klinik örneklerden *M.tuberculosis*'in saptanmasında halen in-house yöntemler kullanılabilmesine karşın, Son yıllarda çok sayıda ticari nükleik asit amplifikasyon testleri piyasaya sürülmüştür ve bunlardan ikisi tanı amaçlı kullanım için FDA (Food and Drug Administration of the United States of America) onayı almıştır. Günümüzde otomatize veya yarı otomatize ticari NAAT giderek artan oranda rutin tanı testi olarak laboratuvarlarda kullanılmaktadır (6, 14, 35, 40).

2.4.4.1. In-house PCR:

Geleneksel in-house PCR, nükleik asitlerin istenilen bölgelerinin, bölgeye özel, sentetik oligonükleotid primerleri kullanılarak, in vitro ortamda kopyalanmasını esas alır. Hedef olarak rRNA veya genomik DNA'nın ayırıcı özellik taşıyan farklı bölgeleri kullanılabilir. Kopyalama işlemi kısa sürer. Bu büyük bir avantajdır. Yöntemin bir diğer avantajı, az miktarlarda hedef molekül olduğu hallerde dahi sonuca gidebilmektir. PCR için, mililitrede 10 basil bulunması tanı için yeterli olmaktadır. Burada en önemli faktör, DNA kontaminasyonudur. DNA dayanıklı bir moleküldür. Laboratuvar uygulamaları sırasında aerosol ile reaksiyona girerek, yalancı pozitiflik yaratabilir. Bununla birlikte, çalışılan materyalin türüne göre, PCR'in inhibe olması söz konusu olabilir ki bu da yalancı negatif sonuçların ortaya çıkmasına neden olur. Yöntemin güvenilirliğinin sağlanması için mutlaka bir negatif ve bir pozitif kontrol çalışılmalı, sonuçlar klinik bulgular ve diğer laboratuvar yöntemleri ile bir arada değerlendirilmelidir (39, 40).

DNA'nın çoğaltılabilmesi için PCR tepkime karışımında olması gereken elemanlar; DNA ekstraktı, primerler, dNTP karışımı, DNA polimeraz, tamponlar ve $MgCl_2$ dir. Tüm karışım thermal cycluser aletine yerleştirilir ve spesifik PCR siklus programı uygulanır. Amplifiye edilen PCR ürünleri değişik yöntemlerle belirlenir. En yaygın kullanılan yöntem agaroz jel elektroforezidir. Agaroz jel elektroforezinde görülebilmesi için flouresan bir boyayla boyanır. Oluşan DNA bantları UV ışığı altında görünür hale gelir (41).

In-house (home-Brew) PCR olarak tanımlanan teknikte standardizasyon eksikliği nedeni ile laboratuvarlardan laboratuvara değişen duyarlılık ve özgüllük sonuçları elde edilmektedir. Bir çalışmada 7 farklı laboratuvarında aynı 200 örnek çalışılmış ve %3-77 arasında değişen yanlış pozitif sonuçlar elde edilmiştir (42). In-house PCR kullanılarak yapılmış 84 çalışmanın bulgularının değerlendirildiği bir meta analiz sonucunda duyarlılık ve özgüllüğün sırasıyla %9-100 ve %6-100 arasında değiştiği görülmüştür (43). Bu nedenle günümüzde klinik örneklerde *M.tuberculosis* saptanmasında daha standardize moleküler testler tercih edilmektedir (38).

2.4.4.2. Ticari Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri:

Moleküler testlerde duyarlılık yüzdelerini arttırabilmek amacı ile yeni yöntemler geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla in-house sistemlerden sonra ticari sistemler de geliştirilmiştir. Ticari sistemlerin kontaminasyon riskinin daha az olması, kantitatif sonuç verebilmesi, daha duyarlı olması ve otomatizasyon kapasiteleri gibi avantajları vardır (44).

2.4.4.2.1. Amplicor MTB Test (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ):

Klinik örneklerde *M.tuberculosis* kompleksinin saptanmasında kullanılan ilk ticari kittedir. Amplicor *M.tuberculosis* testi tüm mikobakteri türlerinde ortak olarak bulunan 16S rRNA geninin 584 bp'lik bölgesinin PCR ile çoğaltılması ve oluşan DNA ampliconlarının *M.tuberculosis* kompleks'e özgü problarla kolorometrik yöntemle saptanması temeline dayanır. Testin örnek hazırlama (ekstraksiyon) basamağı dışındaki tüm basamaklar (amplifikasyon ve saptama) Cobas Amplicor

cihazında otomatik olarak gerçekleşmektedir. Testte kontaminasyonu önlemek için urasil-N-glikozilaz (UNG), inhibisyonun saptanması amacıyla internal amplifikasyon kontrolü bulunmaktadır. Test 6-7 saat içinde sonuçlanır. Amplikor MTD testi, direkt bakısı pozitif solunum örneklerinde tanısal amaçla kullanılması için FDA (Food and Drug Administration of the United States of America) onayına sahiptir (35, 39, 40).

Değişik çalışmalarda, direkt bakısı pozitif solunum örneklerinde testin özgüllüğü %100'e yakınken, duyarlılığı %90-100 arasında bildirilmiş, direkt bakısı negatif solunum örneklerinde ise duyarlılığı %50–95.9 arasında değiştiği gösterilmiştir. Direkt bakısı negatif solunum dışı örneklerde testin duyarlılığı %17.2- 70.8 aralığına düşmektedir (35, 39, 40).

2.4.4.2.2. Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct (AMTD) Test (Gen-Probe Inc., San Diego, CA):

AMTD testi transkripsiyon esasına dayalı amplifikasyon (TMA) ve Gen-Probe hibridizasyon koruma tekniği (HPA) ile birleştirilmiş bir sistem ile çalışır. Hedef Miko"bakteriyal 16S rRNA'nın 42°C'de izotermal olarak TMA ile çoğaltılması ve oluşan RNA ampliconlarının *M.tuberculosis* kompleks'e özgü akridinium esterle işaretlenmiş DNA probları ile kemilüminesans yöntemle saptanması temeline dayanır. Bir mikobakteri hücresinde bir kopya DNA bulunurken 2000'in üzerinde rRNA bulunması yöntemin duyarlılığını artırır. Tüm işlemin tek bir tüpte olması kontaminasyon riskini azaltır. Ayrıca hedefin rRNA olması ve RNA'nın dış ortamda DNA'dan daha labil olması da kontaminasyon riskini azaltan bir faktördür. Testte inhibitör varlığını göstermek için internal amplifikasyon kontrolü bulunmamaktadır. Test 2.5 saatte sonuçlanmaktadır. Yöntemin tüm solunum örneklerinde tanısal amaçla kullanılması FDA tarafından onaylanmıştır (35, 39, 40).

Testin özgüllüğü %100'e yakın, duyarlılığı ise direkt bakısı pozitif solunum örneklerinde %91.7--100, direkt bakısı negatif solunum örneklerinde ise %65.5–92.9 arasında değiştiği bildirilmiştir (35, 40).

2.4.4.2.3. BD ProbeTec ET System (Becton Dickinson, Sparks, Md):

SDA yöntemi (Strand displacement amplification= dizi yer değiştirme amplifikasyonu) ile floresan enerji transfer (ET) saptama teknolojinin birleştirildiği, amplifikasyon ile saptamanın eş zamanlı gerçekleştiği yarı otomatize bir sistemdir. *M.tuberculosis* kompleks'e özgü IS6110 ve mikobakteri türleri için ortak 16S rRNA geninin (rDNA) izotermal olarak birlikte SDA yöntemi ile çoğaltılması ve floresan ET teknoloji ile oluşan DNA amplikonlarının *M.tuberculosis* kompleks'e özgü floresan boya ile işaretlenmiş DNA probları ile saptanması temeline dayanır. floresan ET teknoloji, amplifikasyon ile eş zamanlı gerçekleşen bir gerçek zamanlı saptama (real-time detection) yöntemidir. BD ProbeTec ET testinde internal amplifikasyon kontrolü (IAC) bulunmaktadır ve test 3.5-4 saat içinde sonuçlanmaktadır. Bu yöntem tanısal amaçla kullanılması için henüz FDA onayı almamıştır (35, 40).

Literatürde, testin özgüllüğü %98.5 -100, duyarlılığı ise direkt bakısı pozitif solunum örneklerinde %98.5-100, direkt bakısı negatif solunum örneklerinde ise %33.3–100 arasında bildirilmiştir (35, 40, 46, 47, 48).

2.4.4.2.4. GenoType Mycobacteria Direct test (Hain Lifescience, Nehren-Germany):

DNA strip teknolojisi ile üretilmiş revers hibridizasyon yöntemi olan Line Probe Assay (LİPA) ile doğrudan hasta örneğinden tanı amaçlı kullanılan ticari sistemdir. Bakterinin hedef 16S-23S rRNA bölgesi izotermal olarak NASBA (Nükleik asit dizi bazlı amplifikasyon) yöntemi ile 41°C'de amplifiye edilir. Tek sarmal biyotin işaretli amplikonlar membran strip üzerindeki özgül problara bağlanır. streptavidin/alkalin fosfataz (AP) konjugat eklenmesi ile hibridizasyonun olduğu bantlarda renklenme oluşur. Test bant paterlerine göre görsel olarak değerlendirilir. Testin internal amplifikasyon kontrolü vardır ve test 4-6 saatte sonuçlanmaktadır. Test MTBC dışında 4 tane NTM'nin eş zamanlı olarak saptanmasını da sağlamaktadır. Franco- Alvarez ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada duyarlılık %92, özgüllük %100, bulunmuştur (30, 49).

2.4.4.2.5. INNO-LiPA Testi (Innogenetics NV, Belgium):

Yöntem PCR tabanlı ters hibridizasyon temeline dayanmaktadır. Bu testte, mikobakteriyel 16S-23S rRNA geni nested-PCR yöntemi ile amplifiye edilmekte, amplifikasyon sırasında biyotinle işaretlenen ampikonlar LiPA (line prob assay) yöntemi ile nitroselülöz şerit üzerine yerleştirilmiş rpoB gen bölgesini (81bp'lik parça) kapsayan 10 farklı özgül proba hibridize edilmektedir. Oluşan hibridler alkalen fozfatazla konjuge edilmiş streptoavidin ve kromojen substrat ilavesi ile görsel olarak saptanmaktadır. Bu testte ile klinik örnekten direkt olarak MTBC varlığını saptarken, eşzamanlı olarak rifampisin direnci de saptanabilmektedir. Test yaklaşık 12 saatte tamamlanmaktadır, internal ampifikasyon kontrolü ve FDA onayı yoktur (30, 35, 50, 51).

2.4.4.2.6. ProDect *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* testi (bcs Biotect S.p.A., Cagliari, Italia):

M.tuberculosis'in DNA'sını direkt klinik örnekten saptamaya yönelik olarak geliştirilmiş ve PCR-ELISA yöntemini kullanan ticari bir nükleik asit amplifikasyon testidir. Testte *M.tuberculosis*'e spesifik IS6110 gen bölgesi PCR yöntemi ile amplifiye edilmekte ve amplifiye edilmiş spesifik DNA bölgeleri DNA-ELISA (DNA enzyme immunoassay) yöntemi ile gösterilmektedir.

DNA-ELISA hibridizasyon yöntemi; mikropate kuyucuklara kaplanmış, streptoavidin-biotin bağlı, hedef DNA bölgesine komplementer tek iplikçikli prob DNA ile amplifiye edilmiş tek iplikçikli DNA'ların hibridizasyonu esasına dayanır. Mevcut hibrit üzerine anti-çift iplikli DNA ya bağlanma özelliğinde olan DNA monoklonal antikor ilave edilmekte, hibridizasyon gerçekleşmemiş ise bağlanma olmadığından yıkama ile uzaklaşmaktadır. Daha sonra ilave edilen HRP (horseradish peroxidase) ile konjuge edilmiş Protein A, DNA ile bağlanmış antikorun tesbit etmekte, kromojen-substrat ilavesi ile renklenme oluşmaktadır. Oluşan rengin spektrofotometrede okutulması ile bir absorbans değeri elde edilmekte ve bu absorbans değerinin cut off değerinden yüksek bulunması klinik örnekte *M.tuberculosis* bulunduğu göstermektedir (52).

2.4.4.2.7. Real-time PCR (LightCycler-Roche, iCycler-BIO-RAD, API PRISIM 7000-Applied Biosystem):

Bu yöntemde nükleik asit amplifikasyonu ile birlikte eş zamanlı olarak gerçekleşen saptama DNA'ya bağlanan boyalar veya floresan veren boyalar ile işaretli probalar ile gerçekleşmektedir. Bunlardan biri Tag-Man probalarıdır. Real-time PCR yöntemlerinde sadece sıcaklık döngülerini sağlayan 'thermal cycler' yerine floresan oluşumunu sağlayan ve oluşan floresanı saptayan özel thermal cycler'lar kullanılır. Sinyal şiddeti, PCR ürününün miktarına bağlı olarak artmaktadır. Ayrıca tüpler açılmadan test tamamlandığı için kontaminasyon riski azalmaktadır. Sinyal miktarının her PCR döngüsünde saptanabilmesini ve test süresince takip edilebilmesini sağlayan bilgisayar sistemine gereksinim vardır. Yöntemin avantajları PCR sonrası ürün saptama basamaklarının olmaması, kantitasyon yapılabilmesi ve kontaminasyon riskinin çok düşük olmasıdır. Günümüzde kullanım alanı bulmuş çeşitli real-time PCR yöntemleri mevcuttur. Bunlar TagMan probalarını kullanan, Syber Green Boyası kullanılan ve FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) tekniğini kullanan yöntemlerdir. Diğer tanısal mikrobiyoloji alanlarında kullanımlarının aksine real-time PCR gecikmeli de olsa TB tanısı için adapte edilme noktasında gibi görülmektedir. En büyük beklenti duyarlılıktaki artıştır, ayrıca kantitatif sonuçlar verebilmeleri tedavinin takibinde de kullanılabileceklerini düşündürmektedir. (40, 53-56).

Bununla birlikte bariz yararları ve gelişme potansiyellerine rağmen, NAAT'lerinin, kısa vadede, TB tanısında kültürün yerini alması olası görünmemektedir. Ayrıca tedavinin takibi ve duyarlılık testlerinde halen kültür esastır (40).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Klinik Örneklerin Seçilmesi:

Çalışmaya 02.06.2006 tarihinden itibaren Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikobakteriyoloji laboratuvarına tüberküloz ön tanısı ile gelen 76'sı akciğer örneği, 24'ü akciğer dışı örnek olmak üzere toplam 100 klinik örnek alındı. Çalışmaya alınan akciğer örneklerinin 45'i balgam, 24'ü bronkoalveoler lavaj sıvısı, 7'si açlık mide sıvısı (AMS) iken; akciğer dışı örneklerin; 7'si doku biyopsi örneği, 3'ü perikardiyal sıvı, 2'si BOS, 6'sı eksuda, 5'i plevral sıvı ve 1'i peritoneal sıvı örneği idi. Çalışmaya alınan klinik örnekler rastgele yöntem ile seçilmedi, PCR-ELISA testini değişik gruplarda değerlendirebilmek amacı ile mikroskopik inceleme ve kültür sonuçlarına göre değişik oranlarda klinik örnekler seçildi.

3.2. Örneklerin Toplanması ve İşlenmesi:

Tüberküloz kuşkulu hastalardan genel kurallara ve standartlara uygun şekilde alınan ve laboratuvara gönderilen klinik örneklerden normal flora elamanlarını da içerdiği kabul edilen örneklere (akciğer örnekleri gibi) standart dekontaminasyon- homojenizasyon ve yoğunlaştırma işlemi uygulanırken, normalde steril olduğu kabul edilen BOS, plevral sıvı gibi örneklere sadece yoğunlaştırma işlemi uygulandı. Dekontaminasyon-homojenizasyon yöntemi olarak standart NALC-NaOH yöntemi kullanıldı ve yoğunlaştırma işlemi örnekler 3000×g de 15-20 dakika soğutmalı santrifüj de çevrilerek gerçekleştirildi. Dekontaminasyon-homojenizasyon ve yoğunlaştırma işleminden sonra elde edilen örnekten bir bölümü mikroskopik inceleme ve kültür için kullanıldı. Daha sonra kalan yaklaşık 1ml'lik miktar vida kapaklı örnek ependorf tüplere alınarak PCR-ELISA testi için kullanılıncaya kadar -70 °C'de saklandı.

3.2.1. NALC-NaOH yöntemi:

N-Asetil-L-Sistein (NALC) + Sodyum Hidroksit (NaOH) solusyonunun hazırlanması:

50ml %4 NaOH + 50ml %2.9 Sodyum sitrat + 0.5gr NALC

NALC-NaOH yönteminin uygulanışı:

Klinik örnek 50ml'lik polipropilen, konik tabanlı, kapaklı steril tüplere (Falkon tüpü) aktarılmış ve üzerine örnek hacmi kadar NALC-NaOH solüsyonu ilave edilerek 20 sn vortekslendi ve oda ısısında 15 dakika bekletildi. Sonrasında nötralizasyon amacıyla üzerine 50ml işaretine kadar 0.067M fosfat tamponu (pH6.8) eklendi ve karışım el yardımı ile alt-üst edildi. Yoğunlaştırma amacıyla 3000×g de 15 dakika santrifüj de çevrildi, üst kısım boşaltılarak elde edilen sedimente 1-2 ml steril fosfat tamponu eklenerek resüspanse edildi.

3.3. Mikroskopik İnceleme:

Mikroskopik inceleme için hazırlanan örnek preparatları Erlich-Ziehl-Neelsen (EZN) yöntemi ile boyanarak ARB (aside dirençli bakteri) varlığı yönünden incelendi ve sonuçlar kaydedildi.

3.3.1. Erlich-Ziehl-Neelsen boyama yöntemi:

Boyaların hazırlanması:

Karbolfuksin: 10ml %95 etanolde 0.3gr bazik fuksin çözündürüldü ve üzerine 90ml %5'lik fenol solüsyonu eklendi.

Asit-Alkol: 3ml konsantre hidroklorik asit, 97ml %95'lik etanole eklendi.

Metilen mavisi: 100ml distile suda 0.3g methylen blue chlorid çözündürüldü.

Erlich-Ziehl-Neelsen boyama yönteminin uygulanışı:

Örnekten hazırlanan yayma preparatlar havada kurutuldu ve alevde fikse edildi. Lam karbolfuksin ile kaplanıp, buhar çıkana kadar lam alttan yavaşça ısıtıldı, aralıklı ısı uygulanarak 3-5 dakika süreyle buharlaşması devam ettirildi. Lam soğumaya bırakıldı ve sonrasında su ile yıkandı. %3 asid- alkol ile artık lamdan renk akmayıncaya kadar yaymaya renk giderme işlemi uygulandı (yaklaşık

2 dakika). Lam suyla yıkandı ve metilen mavisi ile 20-30 sn boyandı. Lam su ile tekrar yıkandı, havada kurutuldu ve 100'lük imersiyon objektifi ile incelendi.

3.4. Kültür:

Örneklerin kültürü için radyometrik BACTEC 460TB kültür sistemi ve Löwenstein-Jensen (LJ) besiyeri kullanıldı. Böylece kültür için bir sıvı besiyeri (BACTEC 12B) ve bir de klasik katı besiyeri (LJ) kullanılmış oldu. Kültür işlemi üretici firma önerileri ve standart prosedürlere uyularak gerçekleştirildi.

3.4.1. İnokulasyon, inkübasyon ve İdentifikasyon:

BACTEC 12B şişeleri BACTEC 460TB cihazında ön okutmadan geçirilerek kontaminasyon kontrolü ve CO₂ ilavesi yapıldı. Şişelere 100µl PANTA solüsyonu (Polimiksin B- Amfoterisin B- Nalidiksik asit- trimetoprim ve Azlosilin) eklendi. Dekontamine edilmiş klinik örneklerden 0.2 ml Löwenstein-Jensen besiyerine ve 0.5µl BACTEC 12B şişesine (Middlebrook 7H12 besiyeri;) ekim yapıldı.

LJ besiyerleri tüplerinin ekimden sonra vidalı kapakları hafif aralık bırakılarak; tüpler yatay bir şekilde 1-2 gün 37 °C'de etüvde bırakıldı. Daha sonra kapaklar sıkıca kapatılarak 8 hafta 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Haftalık aralıklarla koloni oluşup oluşmadığı kontrol edildi. Kuşkulu görülen bütün koloniler EZN yöntemiyle boyanarak aside dirençli bakteri olup olmadıkları araştırıldı. Kültürler 8 haftaya kadar ürememişlerse negatif olarak değerlendirildi.

BACTEC 12B şişeleri ekim sonrası 6 hafta süre ile 37 °C'de inkübe edildi ve üretici firmanın önerisi doğrultusunda izlendi. BACTEC 12B kültür şişeleri BACTEC 460 TB cihazında (Becton Dickinson Diagnostik Instruments ,Sparks,Md) ilk 2 hafta haftada 3 kez, daha sonraki 4 hafta süresince haftada bir kez okutuldu ve üreme indeksi (growth index, GI) ölçüldü. Kültür şişesinde üreme saptandığında çikolatamsı agara ekim yapılarak kontaminasyon kontrolü yapıldı, EZN yöntemiyle boyanarak, aside dirençli bakteri olup olmadıkları ve kord oluşumu araştırıldı. LJ veya BACTEC 12B besiyerinden herhangi birinde *M.tuberculosis* üremesi saptandığında kültür sonucu pozitif olarak değerlendirildi.

Kültürde üreyen *M.tuberculosis* izolatlarının tanımlanmasında BACTEC NAP testi ve gerektiğinde biyokimyasal testler kullanıldı.

3.5. PCR-ELISA Testi:

Çalışmaya alınan klinik örneklerde *M.tuberculosis* nükleik asitlerinin aranmasına yönelik olarak kullanılan genotipik testte ProDect MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS BCS6860114/P (bcs Biotect S.p.A., Cagliari, Italia) ve ProDect GEN E.I.A. BCSPDG001 (bcs Biotect S.p.A., Cagliari, Italia) kitleri kullanıldı. Çalışma üretici firmanın önerileri doğrultusunda uygulandı. Test süresince tüm işlemler biyolojik güvenlik kabiniinde gerçekleştirildi.

3.5.1. DNA ekstraksiyonu:

Dekontamine edilmiş klinik örnekten DNA izolasyon kiti (High Pure Viral Nucleic Acid Kit, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) kullanılarak *M.tuberculosis* için kit üreticisinin önerdiği protokole uygun şekilde gerçekleştirildi.

- 1- 1.5 ml lik mikrosantrifüj tüpüne;
 200µl örnek,
 200µl çalışma solüsyonu (Binding buffer eklenmiş poly A: 2.5 ml binding buffer içine Poly A),
 50µl Proteinaz K solüsyonu eklendi, hepsi karıştırılıp 10dk 72C°'de inkübe edildi.
- 2- 100µl Binding Buffer eklenip karıştırıldı.
- 3- Örnek sayısı kadar kitin içindeki collection tüplerden çıkartılıp, her birinin içine high pure filter tüp geçirildi. Filter tüpün üst toplayıcı bölümüne tüm örnek pipetlendi.
- 4- Tüm high pure tüpler standart mikrosantrifüj de 1 dk 8000×g'de santrifüj edildi.
- 5- Collection tüpte biriken sıvı dökülür ve tekrar filter tüpler içine geçirilir.
- 6- 500 µl inhibitör removal buffer filter tüpün üst kısmına eklendi, 1dk 8000×g'de santrifüj yapıldı.
- 7- Collection tüpte biriken sıvı döküldü ve tekrar filter tüpe geçirildi.
- 8- 450 µl Wash buffer filter tüpün üst kısmına eklendi, 1 dk 8000×g'de santrifüje edildi.

9- Collection tüpte biriken sıvı döküldü ve tekrar filter tüpe geçirildi

10- 450 µl Wash buffer filter tüpün üst kısmına eklendi, 1 dk 8000×g'de santrifüje edildi ve tüpler santrifüjden çıkarılmadan 10 sn maksimum hızda santrifüj edildi.

11- Collection tüp içindeki sıvı ile birlikte atıldı ve filter tüp yeni 1.5 ml lik reaksiyon tüpüne alındı.

12- 50 µl Elution Buffer filter tüpün üst toplayıcı kısmına eklenip, 1 dk 8000×g'de santrifüj edildi.

13- Filter tüp atıldı. Mikrosantrifüj tüpünde elde edilmiş stabil viral nükleik asit (DNA) -20°C saklandı.

3.5.2. PCR amplifikasyonu:

M.tuberculosis DNA'sının amplifikasyonu için ProDect MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS BCS6860114/P (bcs Biotect S.p.A., Cagliari, Italia) amplifikasyon kiti kullanıldı ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışıldı.

Kit içeriği;

4000 µl IS6110 EIA probe

400 µl IS6110 EIA Positive Control

525 µl P1IS6110 Oligo

525 µl P2IS6110 Oligo

1- PCR Karışımı (amplifikasyon miksi) aşağıda belirtilen şekilde hazırlandı;

PCR buffer (10×konsantrasyonda) 10 µl

MgCl₂ 6 µl

dNTPs 2 µl

Oligo P1IS6110 5 µl

Oligo P2IS6110 5 µl

DNA Polimeraz 0.5 µl

Steril su 46.5 µl

Final hacim 75µl

2- Çalışılacak örnek sayısı kadar hazırlanan karışım 0.5ml'lik thermal cycler tüplerine 75'er µl dağıtıldı.

3- Üzerlerine 25µl ekstrakte DNA eklendi.

4- Thermal cycler aletine (GeneAmp PCR System 9700, Norwalk CT, USA) yerleştirildi. Thermal cycler aletinde aşağıdaki siklus programı uygulandı.

5- Reaksiyon 4°C'de duruduruldu. Amplifikasyon ürünü saptama basmağının uygulanacağı zamana kadar 2-8°C'de saklandı.

94°C	4dk	1 siklus
94°C	1dk	35 siklus
65°C	30sn	
72°C	1dk	
72°C	10dk	1 siklus

3.5.3. ELISA yöntemiyle saptanması:

Amplifikasyon ürünün saptanmasında ProDect GEN E.I.A. BCSPDG001 (bcs Biotect S.p.A., Cagliari, Italia) kiti kullanıldı ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışıldı.

Kit içeriği;

Streptavidin kaplı mikropate (96 kuyucuklu)

11ml hibridizasyon buffer (Denhardt's solution, SSC, TRIS-HCl buffer, EDTA ve koruyucu)

0.3 ml Anti-ds-DNA antikor (çift zincirli DNA'ya bağlanma özelliğinde olan fare monoklonal antikor, TRIS buffer, fetal sığır serumu ve koruyucu)

0.3ml enzyme tracer (horseradish peroksidaz (HRP) ile konjuge protein A, MES buffer, proteinler, stabilizatör ve koruyucu)

20ml anti-ds-DNA diluent (PBS buffer, fetal sığır serumu ve koruyucu)

20ml Tracer diluent (PBS buffer, fetal sığır serumu ve koruyucu)

1ml Negatif kontrol (TRIS-HCl buffer, MgCl₂, BSA, koruyucu)

2X40ml Wash buffer (PBS buffer, Tween 20, koruyucu)

9 ml Kromojen (sitrat buffer içinde tetramethybenzidine derivesi)

9 ml Substrat (hidrojen peroksit ve sitrat buffer)

30 ml Blocking Reagent (1N sülfirik asit solüsyonu)

Katı fazın hazırlanması;

1. Kit içinden çıkan 96 kuyucuklu plate'in her bir kuyucuğuna 100µl biyotinlenmiş prob solüsyonu (TRIS-EDTA buffer içinde, 5' ucu biyotinlenmiş hedefe spesifik prob dilüsyonu) pipetlenerek kuyucuklar kaplandı.
2. Plate'in üzeri kapatılarak 2-8°C de 18-22 saat inkübasyona bırakıldı.
3. İnkübasyon sonrasında, hazırlanan wash buffer ile 5 kez yıkandı.

Test işlemi;

1. Amplifiye olmuş çift iplikli DNA 94°C'de 15 dakika denatürasyon işlemi uygulanarak tek iplikli DNA'ya dönüştürülür. Denatüre edilmiş örnekler ve kontroller pipetlenene kadar buz banyosunda bekletildi.
2. Her bir kuyucuğa 100µl hibridizasyon buffer eklendi. (blank hariç)
3. 20µl negatif kontrol, pozitif kontrol ve denatüre edilmiş örnekler sırasıyla kendilerine ait kuyucuklara pipetlendi.
4. Kuyucukların üzeri kapatılarak 55°C 1saat inkübasyona bırakıldı.
5. Konsantre Anti-ds-DNA antikorunu Anti-ds-DNA diluent ile 1:50 oranında dilue edildi.
6. İnkübasyon sonrası her bir kuyucuk 300-370 µl hacminde wash buffer ile 5 kez yıkandı.
7. Hazırlanan Anti-ds-DNA antikor çalışma solüsyonu her bir kuyucuğa 100µl eklendi. (blank hariç)
8. Kuyucukların üzeri kapatılarak oda ısısında (20-25°C) 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
9. Konsantre enzime tracer, tracer diluent ile 1:50 oranında dilue edildi.
10. 6'ncı basamaktaki yıkama işlemi tekrarlandı.
11. Hazırlanan enzyme tracer çalışma solüsyonu her bir kuyucuğa 100µl eklendi. (blank hariç)
12. Oda ısısında 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
13. Kromojen solüsyonu substrat solüsyonu ile 1:1 oranında karıştırıldı.
14. 6'ncı basamaktaki yıkama işlemi tekrarlandı.
15. Tüm kuyucuklara 100µl kromojen/substrat solüsyonu pipetlendi.
16. Oda ısısında ve karanlıkta 30 dakika bekletildi.

17. Tüm kuyucuklara 200µl blocking reagent eklenerek 10 dakika içerisinde bir spektrofotometre ile 450/630 nm'de örneklerin absorbans değerleri okutuldu ve kaydedildi.

Sonuçların değerlendirilmesi;

Negatif kontrollerin absorbans değerleri ortalamasına 0.150 eklenerek cut-off değeri bulundu. Absorbans değeri cut-off değerinden küçük olan örnekler negatif, yüksek olan örnekler pozitif olarak değerlendirildi.

3.6. İstatistiksel Analiz:

Çalışmada elde edilen Mikroskobik inceleme, kültür ve PCR-ELISA test sonuçları SPSS 11:5 (SPSS INC, Chicago, IL, USA) programına kaydedildi ve istatistiksel analizleri yapıldı. PCR-ELISA testinin farklı gruplarda duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değerleri, kültür sonuçları altın standart kabul edilerek ve ilgili formüller kullanılarak hesaplandı.

4. BULGULAR

Çalışmada 76 (%76) akciğer ve 24 (%24) akciğer dışı olmak üzere toplam olarak 100 klinik örnek değerlendirilmiştir. Çalışmaya alınan tüm klinik örnekler mikroskopik inceleme, kültür ve PCR-ELISA yöntemleriyle incelenmiştir.

100 klinik örneğin ARB boyama sonrası yapılan mikroskopik incelemesinde direkt bakı 43 (%43) örnekte pozitif saptanırken (16'sı +1, 13'ü +2, 7'si +3 ve 7'si +4), 57 (%57) örnekte negatif olarak değerlendirilmiştir. Kültürde 100 örneğin 66'sında (%66) *M.tuberculosis* üremesi saptanırken, 34'ünde üreme saptanmamıştır. PCR-ELISA testi ile ise 47 (%47) örnek pozitif, 53 (%53) örnek negatif olarak değerlendirilmiştir. PCR-ELISA testinin klinik örneklerde *M.tuberculosis* saptanmasındaki performansı, kültür sonuçları altın standart kabul edilerek değerlendirildiğinde, tüm örneklerden alınan sonuçlara göre duyarlılığı %68.2, özgüllüğü %94.1, PPD %95.7 ve NPD %60.4 olarak bulunmuştur (Çizelge 1).

Çizelge 1. Tüm örneklerde PCR-ELISA Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi

	PCR-ELISA (n)	Kültür (n)			Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	PPD ^a (%)	NPD ^b (%)	Uyumluluk (%)
		Pozitif	Negatif	Toplam					
Tüm örneklerde	Pozitif	45	2	47	68.2	94.1	95.7	60.4	77.0
	Negatif	21	32	53					
	Toplam	66	34	100					
DB ^c Pozitif örneklerde	Pozitif	30	0	30	81.1	100.0	100.0	46.2	83.7
	Negatif	7	6	13					
	Toplam	37	6	43					
DB negatif örneklerde	Pozitif	15	2	17	51.7	92.9	88.2	65.0	71.9
	Negatif	14	26	40					
	Toplam	29	28	57					

^aPozitif prediktif değer; ^bNegatif prediktif değer; ^cDirekt Bakıda ARB

Akciğer örneklerinin %59.2'sinde (45/76) kültür pozitif saptanırken, %44.7'sinde (34/76) PCR-ELISA testi pozitif saptanmıştır. 13 (%17.1) kültür pozitif akciğer örneği PCR-ELISA testi ile negatif bulunurken, 2 (%26.3) kültür negatif akciğer örneği PCR-ELISA testi ile pozitif bulunmuştur. Bu sonuçlara göre akciğer örneklerinde PCR-ELISA testinin duyarlılığı %71.1 ve özgüllüğü %93.5 olarak hesaplanmıştır. Akciğer örneklerinden direkt bakısı pozitif saptanan 36 (%47.4) örneğin %83.3'ü (30/36) kültür pozitif saptanırken, %69.4'ü (25/36) PCR-ELISA testi ile pozitif olduğu görülmüştür. Bu direkt bakısı pozitif akciğer örneklerinden 5'i (%13.9) kültürde pozitif fakat PCR-ELISA testinde negatif bulunmuştur. Direkt bakısı pozitif akciğer örneklerinde PCR-ELISA testinin duyarlılığı %83.3 ve özgüllüğü %100.0 olduğu saptanmıştır. Direkt bakısı negatif 40 akciğer örneğinden alınan sonuçlara göre ise bu grupta PCR-ELISA testinin duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %46.7 ve %92.0 bulunmuştur (Çizelge 2).

Çizelge 2. Akciğer örneklerde PCR-ELISA Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi

	PCR-ELISA (n)	Kültür (n)			Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	PPD (%)	NPD (%)	Uyumluluk (%)
		Pozitif	Negatif	Toplam					
Akciğer örneklerinde	Pozitif	32	2	34	71.1	93.5	94.1	69.0	80.3
	Negatif	13	29	42					
	Toplam	45	31	76					
DB Pozitif örneklerde	Pozitif	25	0	25	83.3	100.0	100.0	54.5	86.1
	Negatif	5	6	11					
	Toplam	30	6	36					
DB negatif örneklerde	Pozitif	7	2	9	46.7	92.0	77.8	74.2	75.0
	Negatif	8	23	31					
	Toplam	15	25	40					

Akciğer dışı 24 örneğin %87.5'inde (21/24) kültür pozitif saptanırken, %54.2'sinde (13/24) PCR-ELISA testi pozitif saptanmıştır. 8 kültür pozitif akciğer dışı örnek PCR-ELISA testi ile negatif bulunmuştur. Akciğer dışı örneklerde PCR-

ELISA testinin duyarlılığı %61.9 ve özgüllüğü %100 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3).

Çizelge 3. Akciğer dışı örneklerde PCR-ELISA Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi

	PCR-ELISA (n)	Kültür (n)			Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	PPD (%)	NPD (%)	Uyumluluk (%)
		Pozitif	Negatif	Toplam					
Akciğer dışı örneklerde	Pozitif	13	0	13	61.9	100.0	100.0	27.3	66.7
	Negatif	8	3	11					
	Toplam	21	3	24					
DB Pozitif örneklerde	Pozitif	5	0	5	71.1	-	100.0	0	71.4
	Negatif	2	0	2					
	Toplam	7	0	7					
DB negatif örneklerde	Pozitif	8	0	8	57.1	100.0	100.0	33.3	64.7
	Negatif	6	3	9					
	Toplam	14	3	17					

5. TARTIŞMA

Tanı, tedavi ve kontrol yöntemlerindeki gelişmelere rağmen, tüberküloz önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. *M.tuberculosis*'in hızlı ve doğru laboratuvar tanısı TB'lu hastaların tedavisinde ve hastalığın kontrolünde çok önemlidir. *M.tuberculosis*'in laboratuvar tanısında yıllardan beri kullanılmakta olan mikroskopi ve kültür, düşük duyarlılık ve geç sonuç verme gibi sınırlamalara sahiptir. Tanıda yaşanan bu sorunların aşılabilmesi için son yıllarda direkt klinik örneklerdeki *M.tuberculosis*'in DNA'sını çoğaltmaya yönelik olarak düzenlenmiş nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT) geliştirilmiştir ve TB tanısında rutin kullanımda yer almaya başlamışlardır (1,2, 30, 40, 56, 57, 58).

Direkt klinik örnekten *M.tuberculosis*'in DNA'sını saptamaya yönelik bir NAAT olan PCR-ELISA testinde *M.tuberculosis*'e spesifik IS6110 gen bölgesi PCR yöntemi ile amplifiye edilmekte ve amplifiye edilmiş spesifik DNA bölgeleri DNA-ELISA yöntemi ile gösterilmektedir. Yam WC. ve arkadaşları akciğer+akciğer dışı örneklerde bu yöntemin duyarlılık ve özgüllüğünü sırasıyla %97 ve %100 olarak saptamışlardır (59). PCR-ELISA testinin günümüzde ticari olarak geliştirilmiş kiti mevcuttur (ProDect *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*, bcs Biotect S.p.A., Cagliari, Italia), fakat literatürde, bu test kitinin değerlendirildiği yeterli sayıda çalışma olmadığı görülmüştür (52). Bu çalışmada direkt klinik örneklerden *M.tuberculosis* saptanmasında ProDect *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* testinin performansı değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda ProDect *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* testinin yalancı pozitiflik oranının oldukça düşük olduğu görülmüş, toplam 100 klinik örneğin sadece 2'sinde kültür negatif- PCR-ELISA testi pozitif saptanmıştır (özgüllük= %94.1). Nükleik asit amplifikasyon testlerinde yalancı pozitiflik nedenleri arasında test süresince çapraz kontaminasyon ve hastanın antitüberküloz tedavisi altında olması sayılabilmektedir (35, 60). Bu nedenledir ki CDC yedi günden fazla

süredir TB tedavisi gören hastalarda alınan klinik örneklerde NAAT çalışılmamasını önermektedir (35). Bu çalışmadaki yalancı pozitif iki örneğin direkt bakıda ARB negatif solunum örneği (balgam) olduğu görülmüş, fakat hastanın klinik ve diğer bulgularla TB tanısı alıp almadığı veya örneği verdiği dönemde ilaç alıp almadığı bilgisine ulaşılamamıştır. Ayrıca yanlış pozitifliğin bir diğer nedeni de altın standart olarak sadece kültür pozitifliğinin kabul edilmesi olabilmektedir. Direkt bakının negatif olduğu az miktarda basil çıkarılan durumlarda basilin örnek içinde dengesiz dağılımına bağlı olarak kültürde üreme olmadığı halde ticari direkt NAAT'leri pozitif olarak saptanabilmektedir (60).

Çalışmada toplam 100 klinik örneğin (76 akciğer ve 24 akciğer dışı) 21'inde kültür pozitif- PCR-ELISA testi negatif saptanmıştır (duyarlılık=68.2). TB tanısında kullanılan ticari direkt NAAT'lerinde çok değişik duyarlılık oranları bildirilmekte ve bu testlerde duyarlılığın istenilen düzeye getirilememesi bu testlerin eksikliği olarak görülmektedir. En başta gelen yalancı negatiflik nedenleri örnekte amplifikasyon inhibitörü maddelerin bulunması ve örnekteki çok az sayıda basilin (direkt bakı negatif örnekler) örnek içinde homojen dağılmamış olmasıdır (35, 38, 60). Bu çalışmada yalancı negatif sonuç veren 21 örneğin 14'ünün direkt bakısı negatif, 3'ünün ise direkt bakısının sadece 1+ olduğu görülmüştür. Yalancı negatifliğe neden olan faktörler örnek türüne göre değişmektedir. Bu nedenle NAAT'lerinin performansı örneğin türüne (akciğer ve akciğer dışı) ve direkt bakı sonucuna göre (pozitif ve negatif) ayrı gruplarda değerlendirilmektedir.

Çalışmamızda, 76 akciğer örneğinden alınan sonuçlar değerlendirildiğinde PCR-ELISA testinin duyarlılığı %71.1 ve özgüllüğü %93.5 bulunmuştur. Akciğer örneklerinden alınan sonuçlar direk bakı sonuçlarına göre değerlendirildiğinde, PCR-ELISA testinin duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla; direk bakısı negatif akciğer örneklerinde %46.7 ve %92.0; direkt bakısı pozitif akciğer örneklerinde %83.3 ve özgüllüğü %100.0 olarak saptanmıştır. TB tanısında kullanılan diğer direkt NAAT'lerinde de akciğer örneklerinde, özellikle de direkt bakısı pozitif akciğer örneklerinde duyarlılık yüksek bildirilmiştir. Bu nedenle FDA onayı almış olan iki ticari NAAT'nin biri sadece akciğer örneklerinde (Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test, Gen-Probe Inc., San Diego, CA) diğeri ise sadece direkt bakısı pozitif akciğer örneklerinde (Amplicor MTB Testi, Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ) tanı amacıyla kullanım için FDA onayı almıştır (35).

Bizim çalışmamızda da PCR-ELISA testinin duyarlılığı ve özgüllüğü diğer ticari NAAT'leri için bildirilen değerlere benzer bulunmuştur (Çizelge 4).

Piersimoni ve ark. TB tanısında kullanılan ticari direkt NAAT'lerinin değerlendirildiği çalışmaların sonuçlarını analiz etmişler ve akciğer dışı örneklerde bu testler için %91.3-100 arasında özgüllük ve %27.3-82.3 arasında duyarlılık sonuçları bildirildiğini saptamışlardır. Yine aynı analizde direk bakısı negatif akciğer dışı örneklerde %17.2'lere kadar düşen duyarlılık sonuçları bildirildiğini görmüşlerdir (Çizelge 4) (35). Bu çalışmada akciğer dışı örneklerde PCR-ELISA testinin duyarlılığı %61.9 ve özgüllüğü %100 bulunmuştur. Akciğer dışı örneklerde duyarlılığın düşük olmasının en önemli nedeni bu tür örneklerde inhibitör maddelerin daha yüksek oranda bulunması ve bu tür örneklerde basil sayısının daha az sayıda bulunmasıdır (38). Bu çalışmada da test edilen 24 akciğer dışı örneğin 17'sinin direkt bakısı negatifti. Kültür pozitif PCR-ELISA negatif olan akciğer dışı 8 örneğin, 6'sı direkt bakısı negatif olan örneklerdi, diğer ikisi ise düşük düzeyde direk bakı pozitifliğine (1+) sahipti. Direkt bakısı 2+ olan tüm kültür pozitif akciğer dışı örnekler PCR-ELISA testi ile pozitif olarak saptanabilmiştir. Bazı ticari direkt NAAT'lerinde bulunan internal amplifikasyon kontrolü (IAC), örnekteki amplifikasyon inhibitörü maddelerin varlığını gösterebilmektedir. PCR-ELISA testinde IAC bulunmamaktadır (35).

Direkt NAAT'lerinin en büyük avantajı hızlı tanıdır. Bu testler ile bir gün içinde (2.5-12 saat) sonuç verilebilmektedir (35). Bu çalışmada değerlendirilen ProDect *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* testi de 6-7 saatte tamamlanmaktadır. Ticari direkt NAAT'lerinin en önemli dezavantajlarından biri ise maliyetlerinin yüksek olmaları ve bu nedenle de özellikle gelişmekte olan ülkelerde rutin tanı testi olarak kullanılmalarının zorluğudur. ProDect *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* testinin amplifikasyon basamağı PCR temellidir ve diğer ticari NAAT'lerinin amplifikasyon basamağına benzer maliyete sahiptir. Fakat saptama basamağı DNA-ELISA tekniği ile gerçekleşmektedir ve pahalı cihaz ve ekipman gerektirmemektedir. ProDect *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* testinin kit maliyeti ise, bir defada çalışılan örnek sayısına göre değişmekle birlikte, test başına yaklaşık olarak 75 \$' dır. Bu testin test başına kit maliyetinin diğer ticari NAAT'leri ile benzer olduğu görülmüştür.

Çizelge 4. Farklı ticari direkt NAAT'leri için çeşitli çalışmalardan bildirilen duyarlılık ve özgüllük aralıkları (35).

Direkt ticari NAAT	Örnek türü	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	Duyarlılık (%)	
				DB ^a pozitif örneklerde	DB negatif örneklerde
Amplicor MTB Testi	Akciğer örneklerinde	83.0 - 92.4	99.0 - 100.0	90.0 – 100.0	50.0 - 71.7
	Akciğer dışı örneklerde	27.3 - 82.3	91.3 - 99.8	87.5 - 100.0	17.2 – 70.8
Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct	Akciğer örneklerinde	90.8 - 97.8	93.2 – 100.0	97.5 – 100.0	75.0 – 83.0
	Akciğer dışı örneklerde	77,3 – 93.8	92.1 – 100.0	90 - 100.0	63.6 – 88.9
BD ProbeTec ET System	Akciğer örneklerinde	82.7 – 100.0	96.5 – 99.8	99.0 – 100.0	33.3 – 100.0
	Akciğer dışı örneklerde	60.7 – 77.8	97.7 – 98.9	90.0 – 100.0	40.3 – 85.7

^aDB: Direkt Bakıda ARB

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak tüberkülozun hızlı tanısında PCR-ELISA testinin (ProDect *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*) kısmen çok fazla ekipman gerektirmeyen bir yöntem olması nedeni ile, özellikle yayma pozitif akciğer örnekleri için, mikobakteriyoloji laboratuvarlarında tüberküloz tanısında rutin nükleik asit amplifikasyon testi olarak değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır. PCR-ELISA testinin yüksek özgüllüğü sayesinde, bu testle elde edilen pozitif sonuçların tanıyı doğrulamada yararlı olacağı, fakat negatif sonuçların klinik bulgularla beraber değerlendirmenin ve kültür sonuçları alındığında kültür sonuçları ile tanıyı doğrulamanın uygun olacağı düşünülmüştür.

7. KAYNAKLAR

1. Pfyffer GE, Brown BA, Swenson JM, Wallace RJ Jr. *Mycobacterium: General Characteristics, Isolation and Staining Procedures*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (Eds:) *Manuel of Clinical Microbiology* 8th edition, ASM Pres, Washington DC, 2003; pp. 532-59.
2. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2007. Geneva, World Health Organization WHO/HTM/TB/2007.376.
3. MMWR. Controlling Tuberculosis in the United States (Recommendations from the American Thoracic Society, CDC, and the Infectious Diseases Society of America). *Morb Mortal Wkly Rep* 2005;54:RR12.
4. Alp A. Mikobakterilerin tanı ve identifikasyonunda moleküler yöntemler. 3. Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Program ve Bildiri Özet Kitabı, Ankara, 2004. s: 95-99.
5. Soini H, Musser JM. Molecular Diagnosis of Mycobacteria. *Clinical Chemistry*, 2001; 47(5): 809–814.
6. Cheng VCC, Yew WW, Yuen KY. Molecular diagnostics in tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2005) 24: 711–720.
7. Daniel TM. *Captain of Death. The Story of Tuberculosis*. University of Rochester Pres. Rochester New York, 1997: 7-8.
8. İmecik O. Tüberküloz Tedavi İlkeleri. Toraks Derneği İkinci Yıllık Kongresi, Tüberküloz kursu notları 1998: 1-5.

9. Kıyan M. *Mycobacteriaceae*. Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö.(Editörler) Temel ve klinik Mikrobiyoloji. Ankara Güneş Kitabevi 1999: 419-454.
10. Kılıçaslan Z. Dünyada ve Türkiyede Tüberküloz Epidemiyolojisi ve Kontrolü. Uzun Ö, Ünal S (eds). Güncel bilgiler ışığında enfeksiyon hastalıkları, cilt 2, Bilimsel Tıp Yayınevi, 2002: 821-33.
11. Kocabaş A. Günümüzde tüberküloz sorunu. In: Kocabaş A.(ed.) Tüberküloz kliniği ve kontrolü. Emel matbaası, Adana. 1991; 3-32.
12. Yazıcıoğlu S. Tüberküloz Teşhis ve Tedavisi. Diyarbakır Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları 1981; 1-112.
13. Barış YZ. Çağlar Boyu Tüberküloz. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu kitabı. Samsun, 2003: 1-7.
14. Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI). *Laboratory Detection and Identification of Mycobacteria; Proposed Guideline*. CSLI document M48-P, Pennsylvania, USA, 2007.
15. WHO. Global DOTS plan. Progress in TB control in high burden countries, 2001. World Health Organization. WHO/CDC/TB/2001.11.
16. World Health Organization. Stop TB, Communicable Diseases. An Expanded DOTS Framework for Effective Tuberculosis Control. World Health Organization. Geneva,2002. WHO/CDC/TB/2002.297.
17. Özkara Ş, Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H (eds.). Türkiyede tüberkülozun kontrolü için başvuru kitabı, Sağlık Bakanlığı, Verem Savaş Daire Başkanlığı 2003.

18. T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Dairesi Başkanlığı. Türkiye’de Verem Savaşı, 2007 Raporu. Ankara, 2007.
19. Haas DW, Des Prez RM. *M.tuberculosis*. in: Mandell GI, Bennet JE, Dolin R (eds.). Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. Pennsylvania, Churchill Livingstone, 2000; 2596-2608.
20. Baron EJ, Petersen LR, Finegold SM. *Mycobacteria* In: Bailey & Scott’s Diagnostic Microbiology. 9th Edition. Mosby-Year Book, Inc. St. Louis, Missouri; 1994:597-640.
21. Brown BA , Wallace RJ jr: Infections due to nontuberculous Mycobacteria. in: Mandell GI, Bennet JE, Dolin R (eds.). Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. Pennsylvania, Churchill Livingstone, 2000; 2630.
22. Drancourt M, Raoult D. Sequence-based identification of new bacteria: a proposition for creation of an orphan bacterium repository. J Clin Microbiol 2005; 43: 4311-4315.
23. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC (eds). *Mycobacteria*. In: The Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed Philadelphia: JB Lipincott Co. 1997: 893-957.
24. Gedikoğlu S. *M.tuberculosis*’in hücre yapısı. İnfeksi Derg 1997;11:13-18.
25. Köksal F, Yaman A. Farklı bir bakteri topluluğu Mikobakterilerde hücre duvar yapısı. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu kitabı. Samsun, 2003: 34-47.
26. Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*, Tüberküloz, 2003; 83(1-3): 91-97.

27. American Thoracic Society. Current approaches to the diagnosis of active pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995; 149: 264-267.
28. Isenberg HD (ed) . *Clinical Microbiology Procedure Handbook*. Vol 2, 2nd ed. Washington DC: ASM Pres. 2004:7.1.2.1.
29. World Health Organization (WHO), *Laboratory Services in Tuberculosis Control* .Part II: Microscopy, (WHO/TB/98.258), Geneva Switzerland. 1998.
30. Guillemin M, Usdin M, Arkininstall J. Tuberculosis Diagnosis And drug sensitivity Testing; An overview of the current diagnostic pipeline. Campaign for Access to Essential Medicines, Geneva, Switzerland. 2006.
31. World Health Organization (WHO), *Laboratory Services in Tuberculosis Control* .Part III: Culture, (WHO/TB/98.258), Geneva Switzerland. 1998.
32. Siddiqi SH. Bactec TB system. Product and procedure manual. Revision B. Becton Dickinson Instruments System, Towson, Md. 1995.
33. Gil-Setas A, Torroba L, Fernandez JL, Martinez-Artola V, Olite J. Evaluation of the MB/BacT system compared with Middlebrook 7H11 and Lowenstein-Jensen media for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10(3): 224-8.
34. Cruciani M, Scarparo C, Malena M, Bosco O, Serpelloni G, Mengoli C. Metaanalysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol*. 2004 May;42(5):2321-5.
35. Piersimoni C, Scarparo C. Relevance of Commercial Amplification Methods for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis Complex* in Clinical Samples. *J Clin Microbiol* 2003;41:5355-5365

36. Katoch VM. Newer diagnostic techniques for tuberculosis. *Indian J Med Res* 2004; 120(4):418-28.
37. Drobniowski FA, Caws M, Gibson A, Young D. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis: *The Lancet Infect Dis* 2003;3:141-7.
38. Huggett JF, McHugh TD, Zumla A. Tuberculosis: amplification-based clinical diagnostic techniques. *Int Biochem Cell Biology* 2003; 35:1407-1412.
39. Woods GL. Molecular Techniques in Mycobacterial Detection. *Arch Pathol Lab Med*. 2001;125: 122-126.
40. Tortoli E, Palomino JC. New Diagnostic Methods. In: Palomino JC, Leao SC, Ritacco V, (Eds.). *Tuberculosis 2007 From basic science to patient care (First Edition)* (www.TuberculosisTextbook.com). 2007; (Chap.14), 441-486.
41. Sarmiento OL, Weigle KA, Alexander J, Weber DJ, Miller WC. Assessment by Meta-Analysis of PCR for Diagnosis of Smear-Negative Pulmonary Tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 3233–40.
42. Noordhoek GT, Kol AH, Bjune G, et al. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. *J Clin Microbiol*. 1994; 32: 277-84.
43. Flores LL, Pai M, Colford Jr JM, Riley LW. In-house nucleic acid amplification tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression. *BMC Microbiology* 2005; 5: 55.
44. Forbes BA, Pfyffer G, Eisenach KD. Molecular Diagnosis of mycobacterial infections. In Cole ST, Eisenach KD, McMurray DN Jacobs, Jr WR eds. *Tuberculosis and the tubercle bacillus*, Washington DC, ASM Press, 2005: 85-98.

45. Kaul K.L. Molecular Detection of *Mycobacterium tuberculosis*: Impact on Patient Care. *Clinical Chemistry*(2001) 47:8: 1553-1558.
46. Bergman JS, Woods GL. Clinical evaluation of the BDProbe-Tec strand displacement amplification assay for rapid diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2766-2768.
47. Mazzarelli G, Rindi L, Piccoli P, Scarparo C, Garzelli C, Tortoli E. Evaluation of the BDProbeTec ET system for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and extrapulmonary samples: a multicenter study. *J Clin Microbiol* 2003; 41(4): 1779-1782.
48. Barrett A, Magee JG, Freeman R. An evaluation of the BD ProbeTec ET system for the direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory samples. *J Med Microbiol* 2002; 51: 895–898.
49. Franco-Alvarez de Luna F, Ruiz P, Gutiérrez J, Casal M. Evaluation of the GenoType Mycobacteria Direct Assay for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and Four Atypical Mycobacterial Species in Clinical Samples. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(8): 3025–7.
50. Ozkutuk N, Gazi H, Surucuoglu S, Gunduz A, Ozbakkaloglu B. Characterization of rpoB mutations by line probe assay in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from the aegean region in Turkey. *Jpn J Infect Dis*. 2007; 60(4): 211-3.
51. Pai M, Kalantri S, Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: Part II. Active tuberculosis and drug resistance. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2006; 6(3): 423-432.
52. ProDect *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*. Product and procedure manual. bcs Biotect S.p.A., Cagliari, Italia, 2004.

53. Savelkoul PHM, Catsburg A, Mulder S, Oostendorp L, Schirm J, Wilke H, van der Zanden AGM, Noordhoek GT. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* kompleks with Real-Time PCR comparison of different primer-probe sets based on the IS6110 element J Microbiol Methods 2006; 66: 177-80.
54. Durmaz R. Polimeraz zincir reaksiyonu tipleri. Durmaz R (Ed.), Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, 2. Baskı, Kozan Ofset, Ankara, 2001: 35-43.
55. Alp A. Tüberküloz tanısında kullanılan moleküler yöntemler. 5. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu kitabı, İzmir, 2004: 79-85.
56. Esen N. Moleküler tüberküloz laboratuvarında tanı testleri, kalite kontrol programları. Moleküler Tanı Dergisi, 2007; 3(1): 39-42.
57. Pai M, Flores LL, Hubbard A, Riley LW, Colford Jr JM. Nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculous pleuritis: a systematic review and meta-analysis. BMC Infectious Diseases, 2004; 4: 1-14.
58. Durmaz R, Çavuşoğlu C. Mikobakterilerin moleküler tanısında karşılaşılan sorunlar. 6. Ulusal mikobakteri Sempozyumu, Sempozyum kitabı, Ankara, 2006; 207-14.
59. Yam WC, Cheng VCC, Hui WT, Wang LN, Seto WH, Yuen KY. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens using single-tube biotinylated nested polymerase chain reaction-enzyme linked immunoassay (PCR-ELISA). Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2004; 48: 271-275.
60. Çavuşoğlu C. Moleküler tanı yöntemlerinde yaşanan sorunlar. IV. Tüberküloz sempozyumu, Sempozyum kitabı, Malatya, 2005: 81-87.

ÖZGEÇMİŞ

EMİNE MÜGE KARAKAYALI

Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara, 26/04/1974
Uyruğu : T.C.

Eğitimi:

1981-1986 : Yavuz Selim İlkokulu
1986-1991 : Suphi Koyuncuoğlu Lisesi
1991-1997 : Ege Üniversitesi Tıp Fakóltesi
1999-2001 : Bodrum Havalimanı Dışhatlar Hekimi olarak çalıştım
2001-2007 : Celal Bayar Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Klinik Mikrobiyoloji ve Mikrobiyoloji Doktora Programı

Yabancı Dili : İngilizce
Sosyal Durumu : Bekar