

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

**TÜBERKÜLOZ BASİLLERİNİN İZOLASYONUNDA,  
İDENTİFİKASYONUNDA VE ANTİMİKROBİYAL DİRENCİN  
SAPTANMASINDA BACTEC MGIT 960 VE BACTEC 460TB  
KÜLTÜR SİSTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ  
Dr. Nuray ÇALIŞKAN GÜRSEV

Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Nuri ÖZKÜTÜK

Manisa 2011

## ÖNSÖZ

Asistanlığım boyunca eğitimimde ve tezimle ilgili çalışmalarım sırasında her türlü desteğini ve bilgisini esirgemeyen değerli hocam, tez danışmanım Doç. Dr. Nuri Özkütük'e ve yine tez çalışmalarımda ve asistanlığım süresince yetişmemde büyük emeği geçen değerli hocam Prof. Dr. Süheyla Sürücüoğlu'na; eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, mesleki gelişimimde büyük katkıları olan değerli hocam Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr.Tamer Şanlıdağ'a ve eğitimime büyük katkısı olan her zaman destek ve hoşgörüsünü esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Kenan Değerli, Doç. Dr. Semra Kurutepe, Doç. Dr. Sinem Akçalı, Doç. Dr. Hörü Gazi, Yrd. Doç. Dr. Talat Ecemiş'e ve emekli olarak aramızdan ayrılan Prof. Dr. Beril Özbakkaloğlu'na; tezimin istatistik çalışmalarında yardımları olan Prof. Dr. Gönül Dinç Horasanlı'ya; ihtisas süresi boyunca sevgi, saygı ve anlayışı paylaştığım değerli asistan arkadaşlarıma; tezimin laboratuvar çalışmaları sırasında her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen uyum içinde çalıştığım Tüberküloz Laboratuvarı'ndan sevgili Sibel Hurma'ya ve Tüberküloz PCR Laboratuvarı'ndan sevgili Yeşim Solakoğlu'na, her zaman uyum içinde çalıştığımız sevgili laborant arkadaşlarıma ve isimlerini sayamadığım tüm çalışma arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Gösterdiği sonsuz sabır ve anlayış ile hayatımın her aşamasında bana destek olan sevgili eşim Dr. H. Vedat Gürsev'e, canım oğlum Doruk Kaan'a ve beni bugünlere getiren değerli anne ve babama sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Nuray Çalışkan Gürsev

# İÇİNDEKİLER

## ÖNSÖZ

## İÇİNDEKİLER

	<u>sayfa</u>
<b>I. GİRİŞ</b>	1
<b>II. GENEL BİLGİLER</b>	3
<b>2.1. Mikobakterilerin Genel Özellikleri ve <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleks</b>	3
2.1.1. Mikobakterilerin genel özellikleri	3
2.1.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleks	4
2.1.3. Tüberküloz dışı mikobakteriler	6
2.1.4. Tüberküloz	7
2.1.5. Epidemiyoloji	8
2.1.6. Antimikobakteriyel ajanlar ve direnç	9
<b>2.2. Tüberkülozun Mikrobiyolojik Tanısı</b>	11
2.2.1. Klinik örneklerin alınması ve laboratuvara gönderilmesi	12
2.2.2. Örneklerin işlenmesi	13
2.2.3. Mikroskopik inceleme	14
2.2.4. Kültür yöntemleri	16
2.2.4.1. Besiyerleri	16
2.2.4.2. Hızlı kültür sistemleri	17
2.2.4.2.1. Bactec 460 TB (Becton Dickinson Diagnostic Instruments, Sparks, MD) sistemi	18
2.2.4.2.2. BACTEC Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) 960 (BD, Sparks, MD)	19
2.2.4.2.3. VersaTREK (ESP Culture System II) (Trek Diagnostics, Inc., Ohio)	19
2.2.4.2.4. BacT/ALERT 3D (bioMerieux, Lyon, France)	20
2.2.4.2.5. Bactec 9000 MB (BD, Sparks, MD)	20
2.2.5. İdentifikasyon testleri	20
2.2.5.1. Üreme özelliklerinin incelenmesi	20
2.2.5.2. Biyokimyasal özelliklerin incelenmesi	21
2.2.5.3. BACTEC NAP testi (Becton Dickinson, Diagnostic Systems, Sparks, MD)	21
2.2.5.4. TBc ID testi (BD MGIT TBc Identification Test; Becton Dickinson, Diagnostic Systems, Sparks, MD)	22

2.2.5.5. GenoType Mycobacterium CM (Hain Lifescience, Nehren-Germany)	23
2.3. Duyarlılık Test Yöntemleri	24
2.3.1. Agar proporsiyon yöntemi ile duyarlılık testi	25
2.3.2. BACTEC 460TB sistemi ile duyarlılık testi	25
2.3.3. BACTEC MGIT 960 sistemi ile duyarlılık testi	26
<b>III. GEREÇ-YÖNTEM</b>	<b>28</b>
3.1. Örnek Seçimi	28
3.1.1. İzolasyon karşılaştırması için örnek seçimi	28
3.1.2. İdentifikasyon karşılaştırması için örnek seçimi	28
3.1.3. Duyarlılık testi karşılaştırması için örnek seçimi	29
3.2. Örneklerin İşlenmesi	29
3.2.1. İzolasyon karşılaştırması için örneklerin işlenmesi	29
3.2.1.1. Dekontaminasyon-homojenizasyon-konsantrasyon işlemi	29
3.2.2. İdentifikasyon karşılaştırması için örneklerin işlenmesi	30
3.2.3. Duyarlılık testi karşılaştırması için örneklerin işlenmesi	30
3.3. Direkt Mikroskopik İnceleme	31
3.3.1. Erlich-Ziehl-Neelsen (EZN) yöntemi	31
3.4. Kültür (izolasyon)	32
3.4.1. Lövenstein-Jensen besiyerinde kültür işlemi	32
3.4.2. BACTEC 460TB sisteminde kültür işlemi	32
3.4.3. BACTEC MGIT 960 sisteminde kültür işlemi	33
3.5. İdentifikasyon	33
3.5.1. BACTEC NAP testi	34
3.5.2. TBc ID testi (BD MGIT TBc Identification Test)(TB Ag MPT64 Hızlı Testi)	35
3.5.3. GenoType Mycobacterium CM test	35
3.6. Antibiyotik Duyarlılık Testi	37
3.6.1. BACTEC 460 TB sistemi ile duyarlılık testi	37
3.6.2. BACTEC MGIT 960 sistemi ile duyarlılık testi	39
3.7. İstatistik	40
<b>IV. BULGULAR</b>	<b>41</b>
4.1. Primer İzolasyona Ait Bulgular	41
4.2. İdentifikasyona Ait Bulgular	44
4.3. Antitüberküloz İlaç Duyarlılık Testine Ait Bulgular	45

<b>V. TARTIŞMA</b>	47
<b>VI. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	59
<b>VII. ÖZET</b>	60
<b>VII. SUMMARY</b>	61
<b>IX. KAYNAKLAR</b>	62

## I. GİRİŞ

Tüberküloz (TB) dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunudur (1). Günümüzde dünya nüfusunun üçte birinin tüberküloz basili ile enfekte olduğu tahmin edilmekte ve her saniye bir kişi *Mycobacterium tuberculosis* ile enfekte olmaktadır. Basili taşıyan kişilerin 30 milyonu aktif TB hastası olup, hastalık her yıl yaklaşık iki milyon kişinin ölümüne neden olmaktadır (2). Elli yıldan uzun süredir hastalığı tedavi edecek ve kür sağlayacak etkili ilaçlar var olmasına karşın, dünyada her 15 saniyede bir kişi TB'dan ölmektedir (3).

Gelişmekte olan ülkelerde halen TB insidansında artış gözlenmektedir. 1980'lerden sonra HIV, lösemiler, diyabet, alkol ve uyuşturucu bağımlılığının yarattığı kazanılmış immün yetmezliği olan kişilerin sayısının artışına bağlı olarak gelişmiş ülkelerde de TB enfeksiyonu önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Yetersiz veya düzensiz tedavi sonucu Çoklu İlaça Dirençli TB olgularının (ÇİD-TB) artışı da tedavide sorunların yaşanmasına neden olmaktadır. Ayrıca günümüzde bildirilmeye başlanan Yaygın İlaça Dirençli TB (YİD-TB) olgularında tedavi başarısı daha da düşüktür (4).

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 TB hastalarının tanıları 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 izolasyonu, identifikasyonu ve antitüberküloz ilaç duyarlılığını test ederek TB'un yayılımını önlemede ve kontrol altına alabilmede önemli bir rol üstlenmektedir (5,6).

Hastaların tedavisi ve sağlık çalışanları ile toplum için gerekli önlemlerin erken dönemde alınabilmesi için, *M.tuberculosis*'in identifikasyonu ve antitüberküloz ilaçlara direncinin en kısa sürede belirlenmesi hayati önem taşımaktadır. Tanı ve tedavinin olmaması durumunda hasta %50'nin üzerinde ölür (mortalite %50 üzeri) ve yaşadığı sürece her yıl 10-15 kişiye hastalığı bulaştırır. Buna ilaveten, çoklu ilaca dirençli TB giderek daha yaygın hale gelmekte, özellikle gelişmekte olan ülkeler olmak üzere dünyanın birçok bölgesinde daha ciddi bir sorun oluşturmaktadır (3).

*Mycobacterium tuberculosis*'in izolasyon, identifikasyon ve duyarlılık testleri için 20 yılı aşkın süredir sıvı bazlı, ticari bir kültür sistemi olan BACTEC 460 TB Sistemi güvenle kullanılmakta ve standart bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Fakat BACTEC 460 TB sisteminin yarı-otomatize ve radyometrik olmasından ötürü radyoaktif atıklarının ortadan kaldırılmasında yaşanan sıkıntılar nedeni ile son yıllarda BACTEC MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) 960 gibi radyoaktif olmayan ve otomatize kültür sistemlerinin kullanımını yaygınlaştırmıştır. Çalışmamızda, BACTEC 460TB sistemi ile BACTEC MGIT 960 sistemini izolasyon, identifikasyon ve duyarlılık testleri açısından karşılaştırmayı amaçladık.

## II. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Mikobakterilerin Genel Özellikleri ve *Mycobacterium tuberculosis* kompleks

#### 2.1.1. Mikobakterilerin genel özellikleri:

*Mycobacterium* cinsi, yüksek G+C içerikli gram pozitif bakterilerin içinde, *Corynebacterium* ve *Nocardia* ile birlikte, *Actinomycetales* takımında sınıflandırılmış olup *Mycobacteriaceae* ailesinde yer alan tek cinstir (7). Genus içinde insanlar için patojen (*M.leprae*, *M.tuberculosis*), potansiyel patojen (*M.avium*, *M.intracellulare*, *M.kansasii*, *M.xenopi*, *M.fortuitum*, *M.chelonae*) ve saprofit (*M.gordonea*, *M.gastri*, *M.flavescens*) birçok tür bulunmaktadır (8).

*Mycobacterium* cinsinin tüm üyeleri aerop, katalaz üreten, hareketsiz ve spor oluşturmeyen bakteriler olup, diğer bakterilerden belirgin olarak küçüktürler; enleri 0,2-0,6 µm, boyları 1-10 µm arasında değişmektedir. Görünüm olarak hafif kıvrık veya düzgün çomak şekilli bakteriler olup, bazen filamentöz formda veya kokobasil şeklinde görülebilirler ve mikobakteri türleri arasında sıklıkla pleomorfik morfolojiye rastlanır. Koloni morfolojileri türler arasında çeşitlilik göstermekte olup, S (*smooth*) tipi koloniden, R (*rough*) tipi koloniye ve pigmentli koloniden (kromojenik), pigmentsiz koloniye (non-kromojenik) kadar değişen morfolojide kolonileri vardır (1, 9). Üremeleri için gerekli en uygun ısı derecesi, türler arasında geniş çapta değişkenlik göstermektedir (<30-45°C). Mikobakteri türüne göre değişmekle beraber uygun ısılarda kolonilerin görülmeye başlaması 2-60 gün almaktadır (1, 10).

Mikobakteriler hücre duvar yapılarında bol miktarda lipid bulunduğu için, boyayı zor alırlar; ancak bir defa boyandıklarında boyayı kolay bırakmaz ve asit-alkol karışımı ile yapılan dekolorizasyona direnç gösterirler. Bu



nedenle aside dirençli bakteriler (ARB, Asido Rezistan Bakteri) olarak anılırlar (1, 8). Yüzey lipitlerinin hidrofobik etkileri, boyanın suda kolay eriyen organik bir madde (fenol) içinde eritilmesi ve ısıtılması ile en aza indirilir. Fenollü fuksin içine yüzey gerilimini azaltan tween 80, dimetil sülfonat ve propilen glikoz gibi maddelerin eklenmesi de boyanma özelliğini kuvvetlendirir (8).

Gram yöntemi ile kolayca boyanmamalarına rağmen mikobakteriler genellikle gram pozitif kabul edilirler (1). Hücre duvarının temel yapısı tipik gram pozitif bakterilerin hücre duvarına benzer, temel yapı peptidoglikandır. Ancak peptidoglikan tabaka arabinogalaktan-mikolik asit moleküllerine kovalan olarak bağlanmıştır ve bu tabakanın da üzerinde serbest lipitler ve polipeptitler bulunur. Hücre duvarı %60 lipit, %15 polipeptit, %25 de karbonhidrat içerir. Bu özellikleri ile kendilerini hücre içi ve hücre dışı zararlılara karşı koruyan *M.tuberculosis* insanda kronik granülomatöz bir hastalık olan tüberküloza neden olur (4).

Hücre duvarının yüksek lipid içermesi mikobakterilere özgü aside direnç, konak hücreler tarafından salınan litik enzimlere, dezenfektanlara ve bakterisidal ilaçlara direnç gibi bazı temel özelliklerin oluşmasına yol açmaktadır (11).

### **2.1.2. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks:**

Bakteriyolojik özellikleri ve DNA homolojileri yönünden benzerlik gösteren türler kompleks tanımı altında gruplandırılmaktadır. *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi (MTBC) *M.bovis*, *M.tuberculosis*, *M.africanum*, *M.microti*, *M.canetti*, *M.pinnipedii* ve *M.caprae* oluşturmaktadır. Bunlardan *M.bovis* ve *M.africanum* ile meydana gelen enfeksiyon oranı %1-3'tür (4,8,12,13,14). Kompleksin en geniş konak çeşitliliğine sahip üyesi ve sığır tüberkülozunun etkeni olan *M.bovis* insan dahil çok sayıda memeli türünü enfekte edebilmektedir (7). Sıklıkla akciğer dışı organ tutulumlarına neden olur. Sütlerin pastörizasyonu ile birlikte görülme sıklığı çok azalmıştır (8,12,13). BCG (bacillus Calmette-Guerin) *M.bovis* 'in 230 kez pasajı sonucu elde edilen atenüe bir varyanttır (7). *Mycobacterium africanum* Batı Afrika'da

nadiren hastalık oluşturan bir türdür. *Mycobacterium microti* ise kemirici hayvanlar için patojendir (8,12,13). Kompleksin en yeni üyesi, 1997'de Somali'li bir çocuktan izole edilen *M.canetti*'nin insan enfeksiyonlarının nadir olduğu tahmin edilmektedir. *Mycobacterium pinnipedii* ve *M.caprae* son yıllarda izole edilen ve MTBC üyeleri ile yüksek düzey nükleotid benzerliği gösteren iki mikobakteri türüdür (7).

Tüberküloz basili terimi, kompleksin diğer üyelerinin insanlarda çok daha nadir patojen olmaları nedeniyle *M.tuberculosis* (MTB) ile neredeyse eş anlamlı olarak kullanılmaktadır (8,12,13). MTBC üyeleri, *Mycobacterium* cinsinin iki karakteristik özelliğine sahiptir; yavaş üreme hızı ve asit-alkol dekolarizasyonuna gösterdiği direnç. Kompleks üyelerinin hepsinin bölünme zamanı yaklaşık 20 saat olup besiyerinde gözle görünür koloni oluşturmaları için geçen süre 3-4 haftadır. *Mycobacterium tuberculosis* LJ besiyerinde tipik olarak pürtüklü, sert koloniler oluştururken; *M.bovis*'in kolonileri daha pürtüksüzdür. Tablo 2.1'de MTBC üyelerinin bazı fenotipik özellikleri görülmektedir (1, 7).

**Tablo 2.1.** MTBC üyelerinin bazı fenotipik özellikleri

Tür	Koloni Morfolojisi	Niasin depolama	Nitrat redüksiyonu	TCH (10 µg/ml)	Pirazinamidaz
<i>M.tuberculosis</i>	pürtüklü	+	+	R	+
<i>M.bovis</i>	pürtüklü	-	-	S	-
<i>M.bovis</i> BCG	pürtüklü	-	-	S	-
<i>M.africanum</i>	pürtüklü	+/-	+/-	R/S	+
<i>M.canetti</i>	düz	-	+	R	+
<i>M.microti</i>	çok küçük	+	+/-	S	+
<i>M.caprea</i>	düz	-	-	S	+
<i>M.pinnipedii</i>	pürtüklü	+/-	-		+

R, Dirençli; S, Hassas; TCH, thiophene-2-carboxylic acid hidrazide

*Mycobacterium tuberculosis* ince çomak şeklinde, bazen hafif kıvrık, hareketsiz, kapsülsüz, sporsuz, aerop koşullarda yavaş üreyen bir bakteridir. Uzunluğu 2-4 µm, eni 0.2-0.5 µm olup, klinik örneklerden yapılan preparatların ARB boyama yöntemi ile boyamasında tek veya ikili-üçlü gruplar halinde birbirine paralel ya da açığı yapacak şekilde bir arada görünürler (11).

Hücre duvar yapısı; sitoplazmik membranın hemen üstünde hücrenin şeklini ve rijiditesini sağlayan peptidoglikan (mürein) tabakanın yapısında N-asetil glikozamin ve N-glikolil muramik asit yer alır. Glikolil yapısı nedeniyle bakteri lizozime dirençlidir. Bunun dışında, hücre duvarı kuru ağırlığının %25-35'ini oluşturan arabinogalaktan-mikolat tabakası vardır. Bu tabaka koruyucu bariyer görevi görür ve hidrofobik özelliktedir. Arabinogalaktanlara bağlanan mikolik asit, mikobakteriyel hücre duvarındaki en önemli lipittir ve bakterinin aside dirençli boyanma özelliğinden sorumludur. En dış tabaka ise, serbest lipidlerin yer aldığı bölümdür. Balmumu yapısındaki maddeler, kord faktör ve türe özgü mikozitler (peptidoglikolipitler, oligoliposakkaritler) burada bulunurlar. Kord faktör (trehaloz dimikolat) *M.tuberculosis* virulansında görev alan en önemli faktörlerden biridir. Ayrıca basillerin birbirlerine paralel şekilde yerleşmelerine neden olur ve virulan *M.tuberculosis* suşları için tipiktir. Hücre duvarında yağ tabakasının da dışında polipeptidler bulunur. Tüberkülozda hastada hücrel immün yanıtın gelişimine neden olur (11).

### **2.1.3. Tüberküloz dışı mikobakteriler:**

*Mycobacterium tuberculosis* kompleksi ve *M.leprae* dışındaki mikobakterilerin tümü doğada serbest olarak yaşar ve insanlarda nadiren hastalık oluştururlar. Hastalık etkeni olmaksızın vücutta kolonize olabildikleri için ayrımlarının yapılması zordur. Ayrıca hasta kişilerden diğer insanlara yayılımlarına nadiren rastlanır. Bu bakterilere “tüberküloz dışı mikobakteriler” (TDM) veya “atipik mikobakteriler” adı verilmiştir (12,13).

Tüberküloz dışı mikobakteriler 16S rRNA geni dizin analizine göre “yavaş üreyen” ve “hızlı üreyen” olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Hızlı üreyen türlerde yedi günden kısa sürede (Runyon grup IV), yavaş üreyen türlerde ise daha uzun sürede koloniler görünür hale gelir (8,12,14). Yavaş üreyen grup pigmentasyon özelliklerine göre fotokromojenler (Runyon grup I), skotokromojenler (Runyon grup II) ve nonkromojenler (Runyon grup III) olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Fotokromojenler karanlıkta pigment oluşturmazken gün ışığında sarı veya portakal rengi koloniler oluştururlar. *Mycobacterium kansasii*, *M.marinum*, *M.simiae*, *M.asiaticum* bu gruptandır.

Skotokromojenler ise hem karanlık hem de aydınlıkta pigment oluştururlar. *Mycobacterium scrofulaceum*, *M.xenopi*, *M.szulgai*, *M.flavescens* bu grup içinde yer alır. Karanlık ve aydınlıkta pigment oluşturmayan nonkromojen grupta da *M.avium* kompleks ve *M.gastri* bulunur. Hızlı üreyen türlerden ise *M.fortuitum*, *M.chelonae* ve *M.abscessus* nadiren hastalık etkeni olabilirler (Tablo 2.2). Mikobakterilerin tür tanımlanmasında pigment oluşumu ve üreme hızları ile birlikte pek çok biyokimyasal testin yanı sıra moleküler ve kromotografik yöntemler de uygulanabilmektedir (1,14,15).

**Tablo 2.2.** İnsanlara patojen olabilen atipik mikobakterilerin sınıflaması

<p><b>Runyon Grup I: (Fotokromojenler)</b> <i>M.kansasii</i> <i>M.marinum</i> <i>M.simiae</i> <i>M.intermedium</i></p>	<p><b>Runyon Grup III: (Nonkromojenler)</b> <i>M.avium-</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. gastri</i> <i>M.malmoense</i> <i>M.haemophilum</i> <i>M.genavense</i> <i>M.ulcerans</i> <i>M.shimoidei</i> <i>M.celatum</i> <i>M.branderi</i></p>
<p><b>Runyon Grup II: (Skotokromojenler)</b> <i>M.scrofulaceum</i> <i>M.xenopi</i> <i>M.flavescens</i> <i>M.szulgai</i> <i>M.lentiflavum</i> <i>M.interjectum</i> <i>M.gordonea</i></p>	<p><b>Runyon Grup IV: (Hızlı Üreyenler)</b> <i>M.fortuitum</i> <i>M.chelonae</i> <i>M.abscessus</i> <i>M.mucogenicum</i> <i>M.peregrinum</i> <i>M.smegmatis</i></p>

#### 2.1.4. Tüberküloz

Tüberkülozun (TB) tek doğal kaynağı insandır (4). *Mycobacterium tuberculosis* genellikle akciğer tüberkülozlu hastaların hapşırma, öksürük ve konuşması ile ortaya saçılan; içinde canlı basil bulunan damlacık çekirdeklerinin, duyarlı kişilerce inhale edilmesi ile bulaşır (16). Bu partiküller 1-5 µm çapında olup, normal hava akımında asılı kalırlar. İn hale edilen bu partiküllerle alveollere ulaşan basiller, alveoler makrofajlar tarafından yutulur. Genellikle konak hücrel bağışık yanıtı *M.tuberculosis*'in çoğalmasını ve

yayılmasını engeller. Bununla beraber, bazı basiller ilk enfeksiyondan sonra yıllarca canlı fakat “dormant” basiller olarak kalabilirler. Latent *M.tuberculosis* enfeksiyonu (LTBE) olan hastalar genellikle PPD cilt testi pozitif olup asemptomatikler ve bulaştırıcı değildirler. HIV enfeksiyonu latent enfeksiyonun aktif tüberküloza dönüşmesinde bilinen en önemli risk faktörüdür (1).

Basiller alveoler makrofajlar tarafından fagosite edildikten sonra hücre içinde çoğalabilirler ve enfekte makrofajlar aracılığı ile lenf nodlarına veya uzak organlara (kemik iliği, dalak, böbrek, santral sinir sistemi) taşınabilirler. Makrofajların bakterisidal aktivitesi ile basil virülansı ve yoğunluğu arasındaki denge olayları belirler. Basil az ise doğal savunma mekanizmaları ile basil ortadan kaldırılır ve minimal doku hasarı ile atlatılır. Basil miktarı fazla ise bu kez hücrel immün yanıt sonucu doku nekrozu gelişir (primer enfeksiyon). Doku nekrozunun nedeni sitokin toksisitesi, iskemi, makrofajlardan çıkan hidrolitik enzimler ve reaktif oksijen metabolitleridir (4).

Aktive makrofajlar 3 mm’den küçük granülomlar içine penetre olarak basilleri öldürebilirler. Ancak daha büyük nekrotik veya kazeöz granülomlar fibrin ile çevrili olduğundan bu odaktaki basiller makrofajların etkisinden kurtulurlar. Bu durumda hastalık kontrol altına alınamaz ise primer tüberküloz gelişir, ya da hastalık kontrol altına alınır, fakat basiller kazeöz nekroz içinde içinde canlı halde (dormant basil) kalır (latent tüberküloz). Kazeöz nekroz içindeki canlı kalan basiller hayatın herhangi bir döneminde, herhangi bir nedenle reaktif olabilirler (sekonder tüberküloz) (4).

Primer hastalık genellikle alt solunum yollarını tutar. Aktif hastalık sırasında tek veya her iki üst lobta pnömoni ya da apse oluşumu ve kaviteleşme gelişebilir. Ekstrapulmoner tüberküloz basilin ilk çoğaldığı odaktan hematojen yolla diğer organlara yayılması ile ortaya çıkar (4).

### **2.1.5. Epidemiyoloji**

Günümüzde TB dünyada ve ülkemizde çok önemli bir halk sağlığı sorunudur. Dünya Sağlık Örgütü’nün (DSÖ) 2009 yılı verilerine göre küresel olarak 9.4 milyon yeni TB olgusu olduğu tahmin edilmektedir (137/100 000).

Tüberküloza bağlı toplam ölüm sayısı 2009 yılında tahminen 1.7 milyon kişi (26/100 000) olmak üzere; HIV negatif tüberküloz olguları arasında 1.3 milyon, HIV pozitif yeni tüberküloz olguları arasında tahmini 0.4 milyon olarak bildirilmiştir (17).

T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı'nın 2011 raporuna göre; Türkiye'de 2009 yılındaki toplam TB hastası 24/100 000 (17.402), yeni olgu oranı ise 22/100 000 (15.943) olarak açıklanmıştır (18).

### **2.1.6. Antimikobakteriyel ajanlar ve direnç:**

Tüberküloz için primer ilaçlar, komplike olmayan olguları tedavi etmek için kullanılan ilaçlardır. "The Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI) mikobakterilerin ilaç duyarlılık testi dosyasında primer ilaç olarak etambutol (EMB), rifampin (RIF), izoniazid (INH)'nin iki konsantrasyonu ve pirazinamid (PZA)'i kapsamaması gerektiğini bildirmektedir. Sekonder ilaçlar primer ilaçlar ile tedavinin yetersiz kaldığı veya uygun olmadığı durumlarda kullanılırlar (1,19).

*Mycobacterium tuberculosis*'te iki tip ilaç direnci görülür: primer (yeni olgularda ilaç direnci) ve kazanılmış (tedavi almış olgularda ilaç direnci). Primer ilaç direnci, ilaca dirençli organizmalar önceden tedavi edilmemiş bir kişide bulunduğu ortaya çıkar. Direncin en yaygın türü olan kazanılmış direnç, kemoterapi sırasında antitüberküloz ajanlardan herhangi birine karşı ortaya çıkabilir (1). *Mycobacterium tuberculosis*'in antimikrobiyal direnci spontan mutasyonlar ile olmaktadır (1). Çoklu ilaca direnç (ÇİD) en az INH ve RIF'e karşı birlikte görülen dirençtir. Yaygın ilaca direnç (YİD) ise ÇİD'e ilave olarak sekonder ilaçlardan enjeksiyon yoluyla verilen antibiyotiklerden herhangi bir aminoglikozite ve florokinolonlara direnci ifade eder (7).

İzoniazid: (INH, İzonikotinic asit hidrazid) tüberküloz basili için belirgin derecede özgül ve potansiyel bakterisidal aktiviteye sahiptir (1). Ucuz olması, biyoyararlılığı, mükemmel hücre içi penetrasyonu ve dar etki spektrumunu ile ideal bir antimikobakteriyel ilaçtır. Ancak *M.tuberculosis* bu ilaca karşı yüksek oranda direnç geliştirme özelliğine sahiptir. Tedavinin ilk iki gününde bakteri

ölümünü sağlayan “erken bakterisidal etki” INH tarafından oluşturulmaktadır (20).

İsoniazidin etki mekanizması üç basamakta gerçekleşir: ilacın aktivasyonu, “aktif” formun inhibe edilecek hedeflere bağlanması ve inhibitör etkinin ortaya çıkması (1). İsoniazid normalde inaktif formda olup *M.tuberculosis*' in *katG* geni tarafından kodlanan katalaz-peroksidaz enzimi tarafından okside edildikten sonra aktif hale geçerek hücre duvarı biyosentezini inhibe etmektedir. *katG* geninde ortaya çıkan bir mutasyon, INH'in aktif formunun oluşumunu önler (7).

İsoniazid sadece oksijen varlığında yavaşça replike olan basillere etkilidir. İsoniazid direnci hastalara monoterapi verilmesi durumunda hızla gelişir. *M.tuberculosis*'in sokak tipi izolatları INH'in 0.2 µg/ml'den düşük konsantrasyonları ile inhibe olurlar (1).

Rifampisin (RİF); kazeöz lezyonlardaki hücre içi replike olan basilleri ve açık kaviteleredeki aktif replike olan basilleri etkiler. Lipofilik yapısı nedeniyle mikobakteri hücre duvarından kolaylıkla geçer ve bakteriyel RNA polimeraza bağlanarak RNA sentezini inhibe eder. 0.5 µg/ml RİF konsantrasyonu sokak tipi *M.tuberculosis* izolatları için bakterisidaldir. Rifampisin direnci *M.tuberculosis* RNA polimerazının β alt ünitesini kodlayan *rpoB* geninin 81 baz çiftlik bir bölgesindeki mutasyonlar sonucunda gelişmektedir (1).

Etambutol (EMB); mikobakteri hücre duvarını oluşturan arabinogalaktan ve LAM'da bulunan arabinan sentezini inhibe ederek etki gösteren bakteriyostatik bir ilaçtır. Hedefi arabinozil transferaz enzimidir. Genellikle bakteriyostatik olmasına karşın yüksek dozlarda bakterisidal etkilidir. Etambutolün *M.tuberculosis* sokak tipi izolatlarına karşı test edilmiş MIK değerleri 1-5 µg/ml arasında değişir. İlaç sadece aktif olarak çoğalan basillere karşı etkilidir (1,20).

Pirazinamid (PZA); nikotinamidin sentetik bir derivesidir (pirazin analogu) ve INH ile kombine edildiğinde, *M.tuberculosis*'in replike olan ve olmayan şekillerine karşı ortalama 20 µg/ml MIK değeriyle hızlı bakterisidal aktiviteye sahiptir. Sadece fagolizozom içindeki asidik ortamda aktiftir ve

enfeksiyon bölgesindeki konsantrasyonuna bağılı olarak bakteriyostatik veya bakterisidal olabilir (1). Pirazinamide duyarlı *M.tuberculosis* suşları, PZA'ı aktif formu olan pirazinoik asite çeviren pirazinamidaz enzimi üretirler. *Mycobacterium tuberculosis*'de bu enzimi kodlayan *pncA* geninde ortaya çıkan mutasyonlar, pirazinamidaz aktivitesinin kaybına neden olur. Pirazinamide doğal (intrinsik) olarak dirençli olan *M.bovis* izolatlarında bu enzim üretilmemektedir (7).

Streptomisin (SM); primer etki mekanizması aminoaçil tRNA'nın bağlanmasını bloke ederek protein sentezinin post-pretranslokasyon basamağının inhibisyonu olan bir aminoglikozittir. Streptomisin hücre dışı, alkali ortamda bakterisidal etkiye sahiptir (20). *M.tuberculosis*'te SM'e karşı direnç, ribozomda ilacın hedef bölgesinde mutasyon olmasıyla ortaya çıkar. Streptomisin primer ilaçlar içinde iken artık günümüzde sekonder olarak kabul edilmektedir (1,7,20).

Sekonder antimikobakteriyal ajanlar; Kanamisin, Amikasin Sikloserin, Etionamid, Dapson, Makrolidler ve Ketolidler, Kinolonlar, P-Aminosalik asit, Klofazimin, Amitiazon'dur. Primer ilaçlarla tedavinin yetersiz kaldığı durumlarda tercih edilen bu ajanlar daha toksik, ciddi yan etkilere neden olabilen, daha az etkin, daha uzun süreli tedavi rejimi gerektiren ve daha pahalı ilaçlardır (1,19,21).

## **2.2. Tüberkülozun Mikrobiyolojik Tanısı**

Tüberkülozun hastalığının tanısı klinik, histopatolojik, immünolojik ve mikrobiyolojik olarak konulmaktadır. Tüberküloz kesin tanısı ise mikrobiyolojik olarak klinik örneklerde tüberküloz basilinin gösterilmesi ile konur. Mikroskopik inceleme, kültür ve moleküler testler mikrobiyolojik tanıda kullanılan yöntemlerdir (4,16). Mikobakteriyoloji laboratuvarlarının tanı ve tedaviye katkısı; mikobakterinin saptanması ve identifikasyonu, tür tayini ve üretilen basilin ilaç duyarlılığının saptanmasıyla olur (8). Bu süreç; incelenmesi istenen klinik örneğin hastadan uygun şekilde elde edilip, laboratuvarında homojenize ve dekontamine edildikten sonra mikroskopik incelemesinin yapılması, kültürünün yapılarak tanımlanması ve antibiyotik



duyarlılık testlerinin yapılması ile sonuçlanır. Centers for Disease Control (CDC) bu işlemlerin örnek laboratuvara kabul edildikten sonra 28 gün içinde sonuçlanmasını önermektedir (22).

### **2.21. Klinik örneklerin alınması ve laboratuvara gönderilmesi**

Tüberküloz tanısı için klinik örneklerin alınma, laboratuvara gönderilme ve işlenmesinde belirli kurallar vardır. Örnekler temiz, steril, sızdırmaz, burgulu kapaklı, dayanıklı ve tek kullanımlık kaplar içine yeterli miktarda alınmalıdır. İlk örnekler antimikrobiyal tedavi başlamadan önce alınmalıdır (23). Kontaminant bakteri ve mantarların üremesinden kaçınmak için alınan örnekler olası en kısa zamanda laboratuvara gönderilmeli ve işlenmelidir (24,25).

Pulmoner örnekler içinde balgam, indüklenmiş balgam, bronkoalveoler lavaj (BAL), bronşial fırçalama, transtrakeal aspirat, açlık mide suyu örnekleri sayılabilir. Balgam birbirini izleyen 3 ayrı günde 5-10 ml sabah balgamı alınması tercih edilir. Biriktirilmiş balgam örnekleri, yüksek kontaminasyon riski nedeniyle kabul edilmemelidir. Pulmoner tüberkülozun tanısında öksürükle çıkarılan veya indüklenmiş balgam en önemli örnektir (1). Hasta balgam çıkaramazsa indüklenmiş balgam örneği alınabilir, sulu olduğu için reddedilme riskine karşı indüklenmiş balgam olduğu istek kağıdına belirtilmelidir. BAL invaziv bir örnektir, kullanılan bronkoskobun musluk suyu ile kontaminasyonu ve bronkoskopi yapılan daha önceki hastalardan çapraz kontaminasyonu önlemek için dikkatli olunmalıdır. Örnek en az 5 ml alınmalıdır (1,14). Açlık mide suyu, tüberküloz olduğu radyolojik olarak kanıtlanmış balgamı negatif olan hastalarda; bebek ve küçük çocuklarda; nörolojik hastalıklar, koma hali gibi durumlar nedeniyle balgam çıkaramayan ya da balgamını yutan hastalarda, başka yöntemlerle pulmoner örnek alınamıyorsa tercih edilebilir. Birbirini takip eden 3 gün boyunca, sabah aç karnına, tercihen yatağından kalkmadan önce alınmalıdır (14).

Ekstrapulmoner örnekler; idrar, steril vücut sıvıları, abse örnekleri ve aspirasyon sıvıları, kan-kemik iliği, dışkı ve doku örnekleridir. İdrar örnekleri birbirini izleyen en az 3 gün süre sabah idrarı alınmalıdır. Örnek miktarı en az 40 ml olmalı, yirmi dört saat biriktirilen idrarlar kabul

edilmemelidir. Steril vücut sıvıları; beyin omurilik sıvısı (BOS), plevral, perikardiyal, peritoneal veya sinovyal sıvılardır ve en az 5 ml olmalıdır. Abse örnekleri ve aspirasyon sıvıları aseptik koşullarda mümkün olduğu kadar çok materyal aspire edilmelidir. Kutanöz lezyonlarda optimal üreme ısısı daha düşük olan mikobakterilerden biri (*M.haemophilum*, *M.marinum*, *M.ulcerans*) enfeksiyon ajanı olabileceğinden, ikinci bir kültür seti 30°C'de inkübe edilmelidir. Doku örnekleri, steril bir kap içine eğer mümkünse en az bir gram olacak şekilde alınmalıdır. Kan-kemik iliği örneklerinin, MYCO/F LYTIC şişeleri (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD) veya BacT/ALERT MB kan besiyeri (bioMerieux SA, Lyon, France) gibi alternatif besiyeri kullanılarak tüberküloz kültürleri yapılabilmektedir. BACTEC 460TB sisteminde kan ve kemik iliği kültürü için standardize edilmiş olan BACTEC 13A şişesi günümüzde artık kullanılmamaktadır. BACTEC 460TB (12B şişelerinde) sisteminde mikobakteriler için inhibitör etki gösteren polipropilen glikol komponenti bulunmaktadır. Mikobakterilerin üremesi üzerine benzer etki, Septi-Chek AFB sıvı besiyeri ve MGIT sıvı besiyerinde de bildirilmiştir. Dışkı örnekleri *M.tuberculosis* tanısında çok tercih edilen bir örnek değildir. Sadece AIDS'li hastalarda *M.avium* kompleks tanısında yararlı olabileceği belirtilmiştir; tercih edildiğinde de en az bir gram olmalıdır (1).

### **2.2.2. Örneklerin işlenmesi**

Tüberküloz basillerinin izolasyonu için alınan klinik örneklerin içerebileceği lökosit, eritrosit, doku gibi organik kalıntıları sindirmek ve kontaminasyona neden olabilecek bakteri ve mantarları ortan kaldırmak amacıyla homojenizasyon / dekontaminasyon işlemi uygulanır. Daha sonra örnekteki bakteri yoğunluğunu arttırmak için santrifüj edilerek konsantrasyon işlemi uygulanır (14). Dekontaminasyon işlemi, floralı bölgelerden gelen, kontamine olduğu düşünülen balgam, BAL, AMS gibi örneklerle uygulanır. Aseptik olarak alınan plevra sıvısı, BOS gibi steril vücut sıvıları veya doku örneklerinde genellikle dekontaminasyon işlemi gerekmez, sadece konsantrasyon işleminden geçirilir (1).

Yapılan kültürlerde hiç kontaminasyon olmaması veya çok düşük (<%2) kontaminasyon oranları, ön işlem koşullarının çok sert olduğunu ve sadece bakterileri değil aynı zamanda mikobakterileri de elimine ettiğini gösterirken; %5'i geçen kontaminasyon oranları, aşırı kontaminasyon olarak tanımlanır (1).

Dekontaminasyon işlemlerinde en sık N-Asetil-L-Sistein (NALC) + Sodyum hidroksit (NaOH) ve %2-4'lük Sodyum hidroksit (NaOH) gibi yöntemler kullanılmakla birlikte zefiran (benzalkonyum klorid) -trisodyum fosfat yöntemi, oksalik asit yöntemi, CPC yöntemi, sülfürik asit yöntemi gibi farklı yöntemlerden de yararlanılabilir (1,4,23,25)

NALC-NaOH yönteminde NALC mukolitik, NaOH dekontaminant ve Na-sitrat klinik örnekte bulunabilecek ağır metal iyonlarını bağlayarak NALC'in inaktive olmasını önlemek amacıyla kullanılır (23). Yöntemde örnek miktarı kadar NALC-NaOH tüpe eklenir ve vortekslenir, karışım 15-20 dakika oda ısısında bekletilir, daha uzun süren işlem, kontaminant mikroorganizmalarla beraber mikobakterileri de öldüreceği için kültürde üretme şansını azaltacaktır. Bu süreçte, karışım bir karıştırıcıda hafif döndürülerek veya birkaç kez elle çalkalanarak homojenizasyon kolaylaştırılır (1). Daha sonra karışıma fosfat tamponu ilave edilerek dekontaminasyon işlemi durdurulur. Karışım soğutmalı santrifüjde 15-20 dakika 3000Xg'de santrifüj edilerek konsantrasyon işlemi gerçekleştirilir. Üstteki sıvı dezenfektan bulunan bir atık kabına boşaltıldıktan sonra tekrar fosfat tamponu ilave edilerek sediment tekrar süspansiyon edilir. Tüm işlemler biyolojik emniyet kabininde yapılmalıdır. Dekontaminasyon ve konsantrasyon işlemlerinden geçirilmiş örnekler daha sonra mikroskopik inceleme, kültür ve moleküler testler için kullanılabilir (1,25,26).

### **2.2.3. Mikroskopik inceleme**

Tüberkülozun tanısında direkt mikroskopik inceleme hala en ucuz, hızlı ve ilk başvuru olan yöntem olmaya devam etmektedir. Mikroskopik olarak ARB saptanabilmesi için balgam örneğinin 1 ml' sinde en az 5000-10000 bakteri bulunması gerekmektedir. Duyarlılığı düşük olmakla birlikte, bir klinik

örnekte aside dirençli bakteri görülmesi, antimikobakteriyel tedaviye başlanması için yeterli özgüllükte bir kriterdir. Mikroskopik incelemenin duyarlılığı genelde %22-80 arasında bildirilmektedir. Duyarlılığı etkileyen önemli faktörler arasında; laboratuvara gelen örnek miktarı, test edilen örneğin tipi, yaymanın kalınlığı, boyama yöntemleri ve okuyucunun deneyimi gibi faktörler sayılabilir. En yüksek yayma pozitiflik oranı solunum örneklerinde saptanır. Boyama işlemi esnasında lamların çapraz kontaminasyonu ve TDM ile kontamine suyun kullanılması yanlış pozitif sonuçlara neden olur, mikroskopi için kullanılan immersiyon yağından da ARB geçişi olabilir (1,7,23).

Aside dirençli boyanma özelliği, mikobakterilerle özdeşleşmiş bir özelliktir; bugüne dek tanımlanan mikobakterilerin tamamı aside dirençli boyanmaktadır. Bu özellik kullanılarak başlıca iki tip boyama tekniği geliştirilmiştir; bunlar karbol fuksin boyama ve florokrom boyama tekniğidir (9).

Erlich Ziehl- Neelsen (EZN) yöntemi ve Kinyoun yöntemi, Karbol fuksin boyama tekniklerindedir. En yaygın kullanılan yöntem Erlich Ziehl- Neelsen yöntemidir (sıcak karbol fuksin boyama) Bu yöntemde karbol fuksin ile ısıtılarak boyanan preparata %3'lük asit-alkol karışımı ile dekolorizasyon işlemi uygulanır ve sonra zıt bir boya (metilen mavisi, brillant yeşili) ile ilk aşamada rengini kaybetmiş hücreler mavi renge boyanır. Boyanan preparat immersiyon objektifi (1000X büyütme) ile incelendiğinde diğer hücreler ve bakteriler mavi görünürken, mikobakteriler mavi zemin üzerinde kırmızıya boyanmış olarak ortaya çıkar. İnceleme sonunda yaymada gözlenen ARB sayısı kantitatif olarak rapor edilir (Tablo 2.3). Yaymanın negatif olarak rapor edilmesinden önce, en az 300 alan incelenmelidir (1,4).

**Tablo 2.3.** EZN boyama sonrası yayma preparatın değerlendirilmesi

Sonuç	ARB sayısı/inceleme alanı (1000x)
Negatif	0
Şüpheli (örnek tekrarı)	1-2/ 300 alan
1+	1-9/ 100 alan
2+	1-9/ 10 alan
3+	1-9/ 1 alan
4+	>9/ 1 alan

Kinyoun boyama yöntemi; EZN yöntemine benzer, fakat kullanılan karbol fuksin ve fenol konsantrasyonu artırılarak, ısıtma işlemini gereksiz kılan modifiye bir boyama yöntemidir (soğuk karbol fuksin boyama) (10).

Florokrom boyamada (Auromin O, Auromin-rhodamin ) ise ana ilke fenollü fuksin yerine floresan boyaların kullanılmasıdır. Floresan boyalar, mikobakterilerin lipitten zengin hücre duvarına bağlanarak, görünür hale gelmesini sağlar (23). Auramin O'nun yapısı da karbol fuksine benzer, mikobakteri duvarına bağlandıktan sonra asit alkol karışımı ile buradan ayrılmaz (7). ARB'ler floresan mikroskopunda sarımsı-turuncu renkte floresan verirler. Bu boyama yönteminde, daha küçük bir büyütme ile daha geniş bir alan taranarak daha hızlı ve daha duyarlı inceleme yapılabilir. Bu nedenle özellikle iş yükü fazla laboratuvarlarda tercih edilebilir (23). Bu yöntemin duyarlılığının yüksek olmasına karşın özgüllüğü düşüktür. Bu nedenle pozitif yaymaların, karbol fuksin boyama yöntemi ile doğrulanması önerilir (1,23).

#### **2.2.4. Kültür yöntemleri**

Tüberküloz tanısında kültür yöntemleri halen altın standart olarak kabul edilmektedir. Aside dirençli basillerin kültürde üretilmesi için örneğin her mililitresinde 10-100 canlı basil olması yeterlidir. Ancak, mikobakterilerin ikiye bölünmesi için gerekli süre yaklaşık 16-18 saat kadardır ve izole edilmeleri için 7-21 gün gibi uzun bir süre gerekir. Üreme olmadığına karar vermeden önce besiyeri 35-37 °C'de, 6-8 hafta inkübe edilmelidir. Kültür yöntemi geç sonuç vermesine rağmen, bakterilerin canlılığının doğrudan gösterilmesine, tür düzeyinde tanımlamaya ve ilaç duyarlılık testlerinin yapılarak hastaların doğru tedavi alabilmesine olanak sağlamaktadır (24, 27)

##### **2.2.4.1. Besiyerleri**

Mikobakterilerin izole edilmeleri ve çeşitli özelliklerinin incelenmesi amacıyla kullanılan besiyerleri katı ve sıvı olmak üzere iki tiptir. Katı özellikteki besiyerlerini ise yumurta bazlı ve agar bazlı olmak üzere iki bölümde incelemek mümkündür. Yumurta bazlı besiyerleri arasında bugün

en yaygın kullanılanı Löwenstein-Jensen (LJ) besiyeridir. Ancak Petragnani ve American Trudeau Society gibi besiyerleri de farklı durumlarda tercih edilebilen yumurta bazlı besiyerlerindedir. Özellikle primer izolasyonda LJ besiyerinin tercih edilme nedenleri arasında, tipik koloni morfolojisi oluşturmaları ve ekonomik olmaları gibi nedenler sayılabilir (1).

Yumurta bazlı besiyerlerinin opak görünümlü olmasına karşın, agar temelli besiyerleri şeffaftır. Bu nedenle, ekim yapılan besiyerleri 10-12 gün sonra mikroskop altında incelenirse, oluşan kolonileri görmek mümkündür. Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11 en çok tercih edilen agar bazlı besiyerleridir (1).

Kontaminasyona neden olan mikroorganizmaların üremesini etkin bir şekilde engellemek amacıyla selektif besiyerleri olan, L-J Gruft, Mycobactosel LJ, Mitchison selektif 7H11 de kullanılabilir. Primer izolasyonda besiyerlerinden en az birisinin selektif olması önerilir (1).

Mikobakterilerin izolasyonunda kullanılan sıvı besiyerleri katı besiyerlerine göre belirgin olarak daha kısa sürede (7-14 gün) sonuç veriler. Ancak koloni morfolojilerinin görülememesi dezavantajlarıdır. Middlebrook 7H9 ve Dubos Tween albumin besiyerleri en sık kullanılan sıvı besiyerleridir. Bunun yanında modifiye sıvı bazlı besiyerlerini kullanan ticari hızlı kültür sistemleri *M.tuberculosis*'in izolasyonunda, tür tayininde ve duyarlılık testlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (1). Mikobakterilerin izolasyon şansını arttırmak için, primer izolasyonda sıvı besiyerlerine ilave olarak bir de katı besiyeri kullanılması önerilmektedir (28).

#### **2.2.4.2. Hızlı kültür sistemleri**

Günümüzde birçok laboratuvarında, konvansiyonel besiyerlerinin yanısıra tüberküloz basillerinin izolasyon süresinin çok daha kısa ve izolasyon oranının çok daha yüksek olduğu hızlı kültür sistemleri rutin inceleme amacıyla kullanılmaktadır. Çoğunda sıvı besiyeri kullanılmakla birlikte, bifazik ve katı besiyerlerinin kullanıldığı sistemler de mevcuttur ve bu sistemlerde gaz basıncındaki değişiklikler, CO<sub>2</sub> oluşumu ve oksijen kullanımı fluorometrik veya kolorimetrik olarak ölçülür. BACTEC 460 TB (Becton

Dickinson, Sparks, MD), BACTEC MGIT 960 (BD Biosciences, Sparks, MD), VersaTREK (ESP Culture System II) (Trek Diagnostics, Inc., Ohio), BacT/ALERT 3D (bioMerieux, Lyon, France) mikobakterilerin tanısı için geliştirilmiş ticari, otomatize kültür sistemlerinden bazılarıdır (24,25).

#### **2.2.4.2.1. BACTEC 460 TB (Becton Dickinson, Diagnostic Instruments, Sparks, MD) sistemi**

BACTEC 460 TB sistemi hızlı kültür sistemleri içinde yer alan uzun yıllardır başarı ile kullanılan yarı otomatize, radyometrik, sıvı bazlı ticari bir kültür sistemidir; sistemde izolasyonun yanısıra, *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi (MTBC) ile tüberküloz dışı mikobakterilerin (TDM) ayrımı yapılabilmekte ve MTBC suşlarının antitüberküloz ilaçlara duyarlılığı test edilebilmektedir. BACTEC 12B (Middlebrook 7H12) ve Bactec 13A (Middlebrook 7H13) olmak üzere iki tip besiyeri içeren bu sistem; besiyerlerinde bulunan C<sup>14</sup> işaretli palmitik asitin kullanılması ve metabolize edilmesi sonucu oluşan <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> nin 0-999 sayısal değerleri arasında üreme indeksi (GI) olarak ölçülmesi prensibi ile çalışmaktadır. Ekim işleminden önce kontaminasyonu engellemek amacıyla besiyerlerine polimiksin B, azlosilin, nalidiksik asit, trimetoprim ve amfoterisin B (PANTA) içeren antibiyotik karışımı ilave edilmelidir. Ekim yapılan 12B şişelerin inkübasyonları etüvlerde gerçekleştirilir. Ekim yapıldıktan sonra ilk iki hafta, haftada üç kez; sonraki altı hafta boyunca haftada bir kez olacak şekilde etüvden çıkarılıp BACTEC 460 cihazına yerleştirilerek GI değerleri ölçülür. Cihazda bulunan okuma iğnesi her şişenin kauçuk kapağından şişeye girip oluşan <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>'in ölçümünü yapar ve şişeden çıktıktan sonra kor derecesine kadar gelip soğur ve sonra ikinci bir şişeye girer. Sistem başarı ile kullanılmakla beraber; bu okuma sırasında çapraz kontaminasyon riski vardır. Besiyerlerinin radyoaktif madde içermesi ve bunların ortadan kaldırılmasında yaşanan sıkıntılar, ekim sırasında enjektör kullanılması gerektiği için potansiyel iğne batma riski ve yarı otomatize olması sistemin diğer dezavantajlarıdır (24,25,29).

#### **2.2.4.2.2. BACTEC Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) 960 (BD, Sparks, MD)**

BACTEC MGIT 960 sistemi, kültür tüplerinin inkübasyonunun cihaz içinde gerçekleştiği ve üreme kontrolünün otomatik olarak yapıldığı, radyometrik olmayan tam otomatize bir ticari hızlı kültür sistemidir (1).

BACTEC MGIT 960 sisteminde kullanılan tüplerde (BBL MGIT 7ml tüp), Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri ve dip kısımlarında oksijene duyarlı rutenyum metal kompleksi içeren silikon bulunur. Klinik örnekler ekilmeden önce besiyerlerine OADC ve PANTA ilave edilir. Kullanılan besiyerlerinde herhangi bir üreme olmadığında oksijen varlığına bağlı olarak silikon tabakaya gönderilen UV ışınına karşı floresans oluşmazken; mikobakteri veya diğer mikroorganizmalar ürettiğinde oksijenin kullanılması sonucunda UV ışınına karşı floresans oluşmakta ve oluşan floresans miktarı üreme birimi (growth unit) olarak değerlendirilmektedir. Sistemin olmadığı durumlarda manuel kullanıma uygun, UV ışığı altında makroskobik olarak değerlendirme yapılabilen BBL MGIT 4ml tüp besiyerleri mevcuttur. Kan dışındaki diğer tüm klinik örnekler için kullanılabilir. Fazla sayıda örneği aynı anda kontrol edebilen BACTEC MGIT 960 (960 örnek), genellikle yüksek kapasite ile çalışan laboratuvarlarda tercih edilmekle birlikte; daha düşük kapasiteli laboratuvarlarda manuel besiyerleri önerilmektedir (1,30).

#### **2.2.4.2.3. VersaTREK (ESP Culture System II) (Trek Diagnostics, Inc., Ohio)**

VersaTREK, selüloz sünger ve Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içeren bir sistemdir. Sistemde mikroorganizmaların üremesi sonucu oluşan gaz basıncındaki değişiklikler ölçülerek değerlendirme yapılır. Bilgisayar destekli bir sistemdir ve besiyerinde oluşan gaz basıncındaki değişiklik grafiksel olarak görüntülenir. Besiyerlerine ekim yapılmadan önce, mikobakterilerin üremesini destekleyen OADC ve kontaminasyonu engellemek amacıyla antibiyotik karışımı ilave edilir (25).



#### **2.2.4.2.4. BacT/ALERT 3D (bioMerieux, Lyon, France)**

MB/Bac T, besiyerinin dip kısmında kolorimetrik bir sensor içeren ve oluşan CO<sup>2</sup> düzeyini ölçerek üremeyi değerlendiren bir sistemdir. Bilgisayar desteği bulunan sistemde besiyerleri sürekli kontrol altındadır (25).

#### **2.2.4.2.5. Bactec 9000 MB (BD, Sparks, MD)**

Bactec 9000 MB serisi, besiyerlerindeki oksijen kullanımının floresans ile belirlendiği bir kan kültür sistemidir. Modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyerlerine ekimden önce PANTA ilave edilir. Sistemde balgam ve diğer solunum yolu örnekleri için Myco/F sputa, kan ve diğer steril vücut bölgelerinden alınan örnekler için MycoF/lytic besiyeri kullanılır (24).

### **2.2.5. İdentifikasyon testleri**

Kültürde üreyen mikobakterilerin tür tayini, bakterilerin üreme ısısı, üreme süreleri, koloni morfolojisi, pigment üretimi, biyokimyasal özelliklerine dayalı klasik yöntemler kullanılarak ve/veya serolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak yapılabilir (10).

*Mycobacterium tuberculosis*'in sıvı besiyerinde çoğunlukla "serpentin cord" oluşturması ayırimda yararlanılabilen bir özelliktir. Ancak kord oluşumu bazı TDM türlerinde de görülebilir. BACTEC NAP testi, BACTEC 460TB cihazında pozitif sonuç alınmış ve ARB varlığı mikroskopik inceleme ile kanıtlanmış olan saf kültürlerle uygulanır. BACTEC NAP testi MTBC ile TDM ayırımında kullanılmaktadır. TBc ID testi ise aynı ayırımı MTBC'ye özgül antijen varlığını saptayarak yapmaktadır. Moleküler bir yöntem olan GenoType Mycobacterium CM testi ile en sık izole edilen mikobakterilerin tür ayırımı yapılabilir (1,29,31).

#### **2.2.5.1. Üreme özelliklerinin incelenmesi**

*Mycobacterium tuberculosis*; LJ besiyerinde veya Middlebrook agarda 37 °C'de 14-28 günlük inkübasyondan sonra pigmentsiz, düzensiz, kuru, krem renkli koloniler oluşturur. Middlebrook 7H10 veya 7H11 agarda 5-10 günlük inkübasyondan sonra oluşan mikrokoloniler mikroskop altında

incelendiğinde “yılanvari kordon” görünümü izlenir. Tüberküloz basilleri yavaş üreyen, nonkromojen koloniler yapar (23).

#### **2.2.5.2. Biyokimyasal özelliklerin incelenmesi:**

Niasin testi: Bütün mikobakteriler niasin ribonükleotid üretir. Ancak *M.tuberculosis* niasini nikotinamid adenin dinükleotide (NAD) dönüştürecek enzime sahip değildir. Besiyerinde biriken niasin bu test ile gösterilir.

Nitrat redüksiyonu testi: *Mycobacterium tuberculosis* gibi bazı mikobakteriler nitroredüktaz enzimi üreterek nitratları nitritlere indirgeyebilirler. Bu test nitroredüktaz enziminin varlığını araştırır.

Katalaz testi: Bazı mikobakterilerde bulunan katalaz, hidrojen peroksidi ( $H_2O_2$ ) su ve oksijene ayırıştırır hücre içi bir enzimdir. Semikantitatif katalaz test ile oluşan hava kabarcıklarının yüksekliği ölçülerek katalaz enzimi miktarı hakkında fikir edinilebilir. Hava kabarcığının olmaması negatif sonuç olarak değerlendirilir. *Mycobacterium tuberculosis* ve bazı diğer mikobakterilerdeki katalaz enzimleri ise  $68^{\circ}C$ 'de 20 dakika ısıtıldığında inaktive olur. Isıya stabil katalaz testi bu özelliği araştıran bir testtir.

TCH (Thiophene-2-Carboxylic Acid Hydrazide; T2H) İle Üremenin İnhibe Edilmesi: *Mycobacterium tuberculosis* ve diğer yavaş üreyen mikobakterilerin çoğu  $10 \mu g/ml$  TCH konsantrasyonuna dirençlidir. Bu test özellikle *M.bovis* ile *M.tuberculosis*'in ayırımında yardımcıdır.

Pirazinamidaz Testi: Pirazinamidaz enzimi pirazinamidi (PZA) pirazinoik asit ve amonyağa hidrolize eder. Pirazinoik asit, pirazinamidin aktif formudur. *Mycobacterium tuberculosis*'in prazinamidaz testinin pozitif olması bu türü *M.bovis*'ten ayırır. PZA direnci olan *M.tuberculosis* suşlarında ise test sonucu negatiftir (1,23).

#### **2.2.5.3. BACTEC NAP (p-Nitro-a-acetylamino-β-hydroxypropiophenone) testi (Becton Dickinson, Diagnostic Systems, Sparks, MD):**

BACTEC 460TB kültür sistemi kullanılarak uygulanan bir identifikasyon testidir.

Yöntemde, NAP diski içeren bir flakona inokulum eklenir, bir de sadece inokulum içeren kontrol flakonu kullanılır. Şişeler 35-37 °C'de inkübe edilirken, BACTEC 460TB cihazında 2-7 gün süre ile her gün okutulur. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks'in üremesi NAP ile selektif olarak inhibe olurken; diğer mikobakteri türleri inhibe olmaz ya da kısmen inhibe olabilir. Kontrol besiyerinde üreme olmasına karşın, NAP diski içeren besiyerinde üreme yoksa bakterinin MTBC'e ait olduğu düşünülür. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks sonucuna 4 günden önce karar verilmemelidir. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks dışında diğer mikobakterilerden *M.kansasii*, *M.gastri*, *M.szulgai*, *M.terra* ve *M.triviale*'nin bazı suşları NAP ile kısmen inhibe olabilir. Bu durumda ilk 2-4 günlük okuma sonuçları yanlış değerlendirilebilir. Sonuç vermeden önce inkübasyonun 2-3 gün daha uzatılması bu hatayı önleyecektir (1,25).

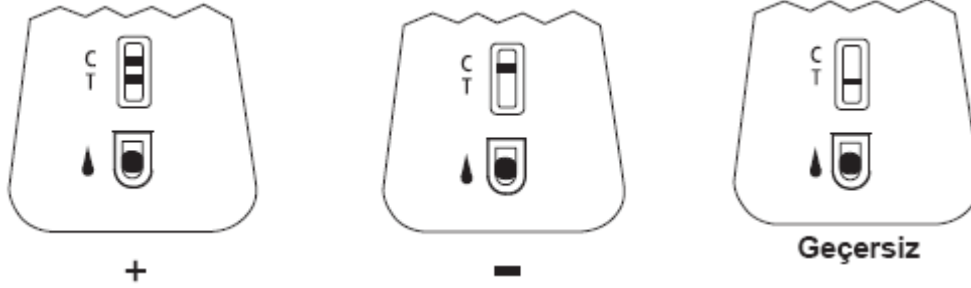
Kontrol şişesindeki günlük GI değeri artış göstermiyorsa, NAP sonucu değerlendirmeye alınmamalıdır. Kültürlerin birden fazla mikobakteri türü ile veya diğer bakteriler ile kontamine olması, GI değerinin yükselmesine neden olur ve yanlış olarak TDM olarak değerlendirilir. NAP testinin nükleik asit prob, kromatografik yöntemler veya konvansiyonel yöntemler ile doğrulanması önerilmektedir (1,25).

#### **2.2.5.4. TBc ID testi (BD MGIT TBc Identification Test; Becton Dickinson, Diagnostic Systems, Sparks, MD):**

TBc ID testi, yayma sonuçları pozitif kültürlerin MGIT tüplerinden alınan MTBC'nin kalitatif tespiti için kullanılan kromatografik immüno hızlı bir testtir (TB Ag MPT64 Hızlı Testi). Bu test *M.tuberculosis* kompleks'e özgü mikobakteriyel bir antijen olan MPT64'ü tespit eder.

Pozitif sıvı besiyerinden test cihazına 100 µL eklendiğinde, MPT64 antijeni, test stripindeki partiküllere konjuge olmuş MPT64 antikörlerine bağlanır. Antijen-konjugat kompleksi, test stripi üzerinden reaksiyon alanına ilerler ve membrana uygulanmış ikinci bir özel MPT64 antikoru tarafından yakalanır. Uygulanan sıvı besiyerinde MPT64 antijeni varsa, etiketli koloidal

altın partikülleri tarafından bir renk reaksiyonu gerçekleşir ve pembe-kırmızı renklere ikinci bir çizgi olarak görülür (28,31,32)



#### 2.2.5.5. GenoType Mycobacterium CM (Hain Lifescience, Nehren-Germany)

*Mycobacterium tuberculosis* kompleks ile birlikte yaygın olarak izole edilen diğer 13 patojen mikobakterinin aynı anda identifikasyonuna olanak sağlayan moleküler bir yöntemdir. Bu türler, *M.avium*, *M.chelonae*, *M.fortuitum*, *M.gordonae*, *M.intracellulare*, *M.kansasii*, *M.malmoense*, *M.marinum*, *M.peregrinum*, *M.scrofulaceum*, *M.interjectum*, *M.tuberculosis complex*, *M.xenopi* ve *M.abcessus*'ü kapsar. Test üç aşamada çalışılır:

DNA izolasyonu; öncelikle bakteriyel DNA katı ya da sıvı besiyerinden izole edilmelir.

Amplifikasyon (multipleks-PCR); izolasyon aşamasından sonraki aşama elde edilen genomik bölgeden hedefe özgü DNA'nın amplifikasyonudur. İşlem sonrasında elde edilen ürün (DNA parçaları) revers hibridizasyon için başlangıç materyalidir.

Revers Hibridizasyon; saptanacak olan çeşitli DNA bölgelerini belirlemek için gerekli gen problemleri membran stripleri üzerinde sabitlenmiştir. Denatüre edilmiş DNA ampikonları, hibridizasyon sırasında gene özgü sabitlenmiş problemlere bağlanırlar. Biotin işaretli ampikonların uygun problemlerle bağlanması ile oluşan hibritler, biyotin/streptavidinalkalin fosfataz kompleksi oluşumundan sonra NBT/BCIP (nitro-blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt) ile renklenirler. Oluşan bant

paternlerinin, sağlanan kalıp ile karşılaştırılması sonuçların hızlı ve kolay yorumlanmasını sağlar (33).

### 2.3. Duyarlılık Test Yöntemleri

*Mycobacterium tuberculosis* kompleks'in antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılığını belirlemede en güvenilir ve en hızlı yöntemi bulmak amacıyla çok sayıda duyarlılık test yöntemi geliştirilmiştir. Bunlar arasında proporsiyon yöntemini temel alan, kültüre dayalı klasik testler en yaygın kullanılan testlerdir. Proporsiyon yönteminde katı besiyeri olarak sıklıkla yumurta bazlı besiyerlerinden LJ, agar bazlı besiyerlerinden Middlebrook 7H10 kullanılmaktadır. Modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyerinin kullanıldığı antimikobakteriyel duyarlılık test yöntemlerinden BACTEC 460TB ve BACTEC MGIT 960 gibi hızlı ticari sistemler de yaygın olarak kullanılmaktadır. Middlebrook 7H10'un kullanıldığı agar proporsiyon yöntemi ile BACTEC 460TB ve BACTEC MGIT 960 yöntemleri CLSI tarafından önerilen yöntemlerdir. LJ' nin kullanıldığı proporsiyon yöntemi ise ekonomik olması nedeni ile DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından önerilmektedir (19, 21,23)

Tüberküloz basillerinin duyarlılık testi direkt veya indirekt yöntemle yapılabilir. Direkt testte, yayma pozitif işlenmiş hasta örneği direkt olarak antibiyotikli ve antibiyotiksiz besiyerlerine ekilir. İndirekt testte ise, primer izolasyon besiyerinde üreyen mikroorganizmanın saf kültürü test edilir. İndirekt test standardizasyonun daha iyi sağlanabilmesi nedeni ile önerilen yöntemdir (23,19).

Mikobakterilerin duyarlılık testi için CLSI her hastadan izole edilen ilk *M.tuberculosis* izolatının primer antitüberküloz ilaçlara (Rifampisin [RİF], izoniyazid [INH], etambutol [EMB], pirazinamid [PZA], streptomisin [SM]) karşı duyarlılığının test edilmesi gerektiğini belirtmektedir. Üç aylık tedavi sonrasında kültür negatifliği sağlanamaması durumunda veya tedaviye yanıt alınmadığına dair klinik kanıt bulunması durumunda, duyarlılık testi tekrarlanmalıdır (1).

### **2.3.1. Agar proporsiyon yöntemi ile duyarlılık testi**

Yavaş üreyen mikobakterilerin duyarlılık testi için agar proporsiyon yöntemi 1960'ların başında G. Canetti tarafından geliştirilmiştir. Yöntem A.B.D.'de modifiye ve standardize edilmiştir ve yıllardan beri hem A.B.D.'de hem de birçok Avrupa ülkesinde *M.tuberculosis* kompleksinin pirazinamid dışındaki tüm ilaçlara karşı duyarlılık testinde standart yöntem olarak kullanılmaktadır. Pirazinamid (PZA) duyarlılık testi için referans yöntem BACTEC 460TB yöntemidir (1, 19,25).

Proporsiyon yönteminde prensip; belli bir ilaç konsantrasyonunda (Kritik Konsantrasyon) dirençli olan organizmaların oranının belirlenmesini sağlar. Test edilecek bakteri suşu ilaçlı ve ilaçsız katı besiyerlerine ekim yapılarak inkübe edilir. İlaçlı besiyerinde üreyen kolonilerin sayısı, kontrol besiyerindeki kolonilerin sayısı ile karşılaştırılır. Belli ilaca dirençli basillerin oranı hesaplanıp, test edilen popülasyona yüzdesi olarak belirtilir. Bu oran %1'e (Kritik Proporsiyon) eşit veya daha yüksek ise test edilen suş ilaca karşı dirençli olarak rapor edilir. CLSI, katı besiyeri olarak Middlebrook 7H10 besiyerinin kullanıldığı proporsiyon test yöntemini (Agar Proporsiyon Yöntemi) referans yöntem olarak kabul etmektedir (19).

### **2.3.2. BACTEC 460TB sistemi ile duyarlılık testi**

BACTEC 460TB sistemi tüm primer ve çoğu sekonder ilaçların test edilmesi için kullanılabilir. Primer ilaçlar BACTEC 460TB cihazında 12B besiyerinde kullanılmak üzere geliştirilmiş BACTEC SIRE kitinde liyofilize toz halinde mevcuttur (1,25,29).

Mikobakteriler <sup>14</sup>C palmitik asit içeren BACTEC 12B besiyerinde kolaylıkla ürerler. Bu bileşiğin metabolize edilmesi sonucunda <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> oluşur. Böylece üreme veya üremenin önlenmesi, üremeye bağımlı CO<sub>2</sub> üretimindeki değişikliklerin ölçülmesi ile anlaşılır (1,25,29).

İndirekt duyarlılık test yönteminde inokulum hazırlanırken örnek olarak BACTEC 12B besiyeri, diğer sıvı besiyerleri veya bir katı besiyerinde üremiş saf kültür kullanılabilir. Test edilecek olan kültürler, antibiyotik (S,I,R,E) içeren ve içermeyen (kontrol) BACTEC 12B (Middlebrook 7H12)

şişelerine ekilir ve 37°C'de inkübe edilir. Kontrol şişesine ekilen mikroorganizma sayısı ilaç içeren şişeye göre 100 kat azdır. Kontrol ve ilaçlı şişelerin günlük GI farkları karşılaştırılarak yorumlanır (23,25,29).

Yöntemde, laboratuvarın kapasitesi ve çalışma şekline göre günlük (haftanın 7 günü) veya hafta içi (hafta sonu dahil olmayan iki ayrı program vardır. Günlük programda şişeler hergün yaklaşık aynı saatte ( $\pm 2$  saat) ve en az 4 gün okutulur. Hafta sonu dahil olmayan programda test Cuma günü yapılır, pazartesten itibaren hergün yaklaşık aynı saatte ( $\pm 2$  saat) ve en az 3 gün okutulur. Kontrol şişesinin GI değeri pazartesi okumasında 30'u geçmiş ise muhtemelen inokulum çok yoğun olmuştur; test tekrar edilmelidir. Salı günü kontrol şişesinin GI değeri 30'u geçmiş ise, çarşamba günü de okutulduktan sonra sonuçlar yorumlanır; pazartesi gününe ait GI değeri hafta sonu birikmiş olan değeri ifade ettiği için dikkate alınmaz. Her iki programda da kontrol şişesinin GI değeri 14 gün içinde 30'a ulaşmaz ise test tekrar edilmelidir (23,25,29).

Kontrol şişesinin GI değeri 30'u aştığında, kontrol ve antibiyotik içeren şişelerin bir gün önceki GI değeri ile farkları ( $\Delta GI$ ) hesap edilerek sonuçlar yorumlanır. Kontrol şişesinin  $\Delta GI$ 'i, antibiyotikli şişenin  $\Delta GI$ 'den büyük ise test edilen suş o antibiyotiğe duyarlı; küçük ise dirençlidir. Antibiyotik içeren şişenin GI değeri 500'ü geçer ve bir sonraki gün de 500'ün üzerinde kalırsa, kontaminasyon olmadığından emin olunduktan sonra,  $\Delta GI$  değerine bakmaksızın o antibiyotiğe dirençli olarak yorumlanır (23,25,29).

### **2.3.3. BACTEC MGIT 960 sistemi ile duyarlılık testi**

MGIT 1995'te mikobakterilerin klinik örneklerden saptanması amacıyla kullanıma girmiştir. Her MGIT tüpü modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içerir ve tabanında floresans absorbe edici bir oksijen sensörü (rutenyum pentahidrat emdirilmiş silikon kauçuk) bulunur. Floresans bileşik, besiyerinde çözünen oksijen varlığına duyarlıdır. İndikatörün floresansı oksijen varlığında absorbe edilir, fakat aktif olarak solunum yapan mikroorganizmalar çözünmüş oksijeni kullandıkça floresans artar. Floresans bir 365 nm UV transiluminatör

kullanılarak saptanır. BACTEC MGIT 960 Sisteminde primer ve sekonder ilaçları duyarlılıkları test edilebilir (1,25,30).

BACTEC MGIT 960 SIRE kiti kültürde izole edilen *M.tuberculosis*'i test etmek için 4-13 günde sonlanan nonradyometrik bir duyarlılık testidir. Kullanılan besiyerleri BBL MGIT 7 ml MGIT tüp mikobakterilerin üremesini ve saptanmasını sağlayan modifiye Middlebrook 7H9 besiyerini içerir. Katı besiyerinde veya MGIT tüpünde üremiş saf kültürden inokulum hazırlanabilir. Dört adet antibiyotikli (S,I,R,E) ve bir adet kontrol tüpü hazırlanır. Üretici firma önerilerine göre test yapıldıktan sonra AST (antibiyotik duyarlılık testi) set taşıyıcısına uygun sırayla (K, S, I, R, E) yerleştirilir. Bundan sonra artık inkübasyon da, üreme kontrolü de cihaz tarafından otomatik olarak gerçekleştirilir. Kontaminasyon kontrolü için de kanlı agara ekim yapılır (1,23,25,30). Antibiyotik içeren tüpün floresansı kontrol tüpünün floresansı ile karşılaştırılır. Antibiyotik içeren tüp ve üreme kontrol tüpü arasındaki relatif üreme oranı, bilgisayar yazılım algoritmaları tarafından yorumlanır; sonuçlar veri rapor formlarında otomatik olarak listelenir (1,23,25,30).



### III. GEREÇ-YÖNTEM

#### 3.1. Örnek Seçimi:

##### 3.1.1. İzolasyon karşılaştırması için örnek seçimi:

Her iki sistem ile klinik örnekten özellikle MTBC (*M.tuberculosis* kompleks) olmak üzere mikobakterilerin izolasyonlarındaki performanslarının karşılaştırılması amacı ile, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüberküloz Laboratuvarına, hastanemizin çeşitli servislerinden tüberküloz ön tanısı ile Haziran 2010 - Mayıs 2011 tarihleri arasında gönderilen, 607 hastaya ait 1066 klinik örnek çalışmaya dahil edildi. Bu örneklerin 694'ü solunum yolu örneği, 372'si solunum yolu dışı örneklerdi. Solunum yolu örneklerinin 337'si balgam, 297'si bronkoalveolar lavaj sıvısı (BAL), 7'si endotrakeal aspirat (ETA), 5'i transtrakeal aspirat (TTA), 48'i açlık mide sıvısıydı (AMS). Solunum yolu dışı örneklerin 153'ü idrar, 96'sı plevral sıvı, 42'si doku (biopsi materyali), 32'si beyin omurilik sıvısı (BOS), 22'si abse, 16'sı peritoneal sıvı (ascites), 6'sı perikardial sıvı ve 5'i eklem sıvısı örnekleriydi. Çalışmaya kan, kemik iliği örnekleri alınmadı.

##### 3.1.2. İdentifikasyon karşılaştırması için örnek seçimi:

TBc ID testi (BD MGIT TBc Identification Test) ve NAP testinin (BACTEC NAP TB Differentiation Test) MTBC ve TDM (Tüberküloz Dışı Mikobakteri) ayırımındaki performanslarını karşılaştırmak amacıyla, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüberküloz Laboratuvarı, kültür koleksiyonundan sağlanan 30'u MTBC ve 21'i TDM (12 *M.fortuitum*, 3 *M.gordonea*, 2 *M.abcessus*, 2 *M.chelonae*, 1 *M.kansasii*, 1 *M.avium*) olmak üzere toplam 51 mikobakteri suşu çalışmaya alındı. Suşların 47'si daha önce klinik örneklerden izole edilmiş, moleküler yöntem ile (GenoType

Mycobacterium CM, HAIN Life Science, GmbH, Germany) tür tayini yapılmış ve -70 °C'de stoklanmış örneklerdi. Dört örnek ise standart suştu [*M. tuberculosis* H37RV (ATCC 27294), *M.gordoniae* (ATCC 14470), *M.kansasii* (ATCC 12478) ve *M.chelonae* (ATCC 14472)].

### **3.1.3. Duyarlılık testi karşılaştırması için örnek seçimi:**

Her iki sistemin, MTBC'in primer antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılıklarını belirlemedeki performanslarını karşılaştırmak amacı ile tüberküloz laboratuvarı kültür koleksiyonundan sağlanan 50 MTBC suşu çalışma için seçildi. Suşlar daha önce klinik örneklerden izole edilmiş, BACTEC 460TB sistemi ile primer antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılık testleri yapılmış, duyarlılık test panelleri belirlenmiş ve -70 °C'de stoklanmış örneklerdi. İstatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edebilmek için 50 suşun 34'ü en az bir ilaca direçli olan suşlardan seçildi, seçilen suşlardan biri ise tüm primer seçenek ilaçlara duyarlı kontrol suşuydu (*M. tuberculosis* H37RV (ATCC 27294) .

## **3.2. Örneklerin işlenmesi:**

### **3.2.1. İzolasyon karşılaştırması için örneklerin işlenmesi:**

Balgam, BAL, açlık mide suyu ve apse mateyalleri gibi steril olmayan veya steril şartlarda alınmayan örnekler homojenizasyon ve dekontaminasyon işlemlerinden sonra; beyin omurilik sıvısı (BOS), periton - plevra sıvısı, biyopsi materyali gibi steril vücut örnekleri de dekontamine edilmeden, bakteri yoğunluğunu arttırmak için soğutmalı santrifüj satirfüjde 3000xg'de 15-20 dakika santrifüj edildi ve işleme alındı (28).

#### **3.2.1.1. Dekontaminasyon- homojenizasyon- konsantrasyon işlemi:**

Klinik örneklerin dekontaminasyon ve homojenizasyonu için NALC - NaOH yöntemi hazır ticari kit (Mycoprosafe Dekontaminasyon ve

Konsantrasyon kiti, Salubris A.Ş., İstanbul) kullanılarak uygulandı. Klinik örnek, içinde 40 mg NALC (N-asetil-L-sitein) ve 4 mm çapında cam boncuklar bulunan, 50 ml'lik polipropilen, dibi konik, burgulu kapaklı steril tüplere (Falkon tüpü) aktarıldı ve üzerine klinik örneğin miktarı kadar NaOH (%4'lük) ve trisodyum sitrat (0.1 M, %2.94) karışımı ilave edildi. İdrar gibi, miktarı 10 ml'den fazla olan örnekler için karışımı ilave etmeden önce tüpler 3000xg'de 15 dakika santrifüj edildi ve üst sıvı dezenfektan içeren bir kaba döküldükten sonra kalan 5 ml'lik örnekten işleme devam edildi. Örnek + NALC-NaOH karışımı içeren tüpler 30 saniyeyi geçmeyecek şekilde vortekslendi. Tüpler oda ısısında, bir çalkalayıcıda hafif döndürülerek 15 dakika bekletildi. Süre tamamlandığında nötralizasyon amacı ile falkon tüpünün 50 ml işaretine kadar 0.067M fosfat tamponu (PH 6.8) ilave edilip, dekontaminasyon işlemi durduruldu. Fosfat tamponu ilave edilmiş tüpler, bakteri yoğunluğunu arttırmak için soğutmalı santrifüj satirfüjde 3000xg'de 15-20 dakika santrifüj edildi. Süpernatant, içinde dezenfektan içeren bir kaba boşaltıldı. Elde edilen sediment 1-2ml fosfat tamponu ile süspanse edildi Elde edilen işlemlenmiş örnek süspanسیونu mikroskopik inceleme ve kültür için kullanıldı. Tüm işlemler biyolojik güvenlik kabininde yapıldı (23,25,28).

### **3.2.2. İdentifikasyon karşılaştırması için örneklerin işlenmesi:**

Vida kapaklı mikrosantrifüj tüplerinde (cryovial), -70 °C'de, saklanan, kültür koleksiyonundaki toplam 51 mikobakteri suşu çalışma öncesi oda ısısında bekletilerek çözülmesi sağlandı. Daha sonra suşlar BACTEC MGIT tüpe ve BACTEC 12B şişesine inoküle edildi. Üretici firma önerilerine uyarak her iki sistemde inkübasyonları ve takipleri yapıldı. BACTEC MGIT 960 sisteminde pozitif sinyal veren tüplerden TBc ID testi (BD MGIT TBc Identification Test, Becton Dickinson, Sparks, ABD), BACTEC 460 TB sisteminde GI'i 100'ü geçen şişelerden NAP testi (BACTEC NAP TB Differentiation Test, Becton Dickinson, Sparks, ABD) uygulandı (25,29,32).

### **3.2.3. Duyarlılık testi karşılaştırması için örneklerin işlenmesi:**

Vida kapaklı mikrosantrifüj tüplerinde (cryovial), -70 °C'de, saklanan, kültür koleksiyonundaki toplam 50 MTBC suşu çalışma öncesi oda ısısında bekletilerek çözülmesi sağlandı. Daha sonra suşlar BACTEC MGIT tüpe ve BACTEC 12B şişesine inoküle edildi. Üretici firma önerilerine uyararak her iki sistemde inkübasyonları ve takipleri yapıldı. BACTEC MGIT 960 sisteminde pozitif sinyal veren ve BACTEC 460 TB sisteminde GI'i 500'ü geçen şişelerden primer antitüberküloz ilaçlara (streptomisin [SM], izoniazid [İNH], rifampisin [RİF] ve etambutol [EMB]) karşı duyarlılık testleri çalışıldı (25,29,30).

### **3.3. Direkt Mikroskopik İnceleme:**

İşlemlenmiş örnek süspansiyonu lam üzerine oval tarzda yayılarak preparat hazırlandı. Preparat biyolojik güvenlik kabiniinde havada kurumaya bırakıldı. Örneklerden hazırlanan preparatlar Erlich-Ziehl-Neelsen (EZN) yöntemi ile boyanarak mikroskopik inceleme yapıldı.

#### **3.3.1. Erlich-Ziehl-Neelsen (EZN) yöntemi:**

Hazırlanan yayma preparatlar alevden üç kez geçirilerek fikse edildi. Boyama ızgarasına yerleştirilen preparatlar karbol fuksin ile kaplandı. Buhar çıkıncaya kadar lam alttan yavaşça ısıtıldı (kuruma ve kaynamaya izin vermeden aralıklı ısı ile 3-5 dakika). Preparatlar soğumaya bırakıldı ve su ile yıkandı. %3'lük asit-alkol ile renk akmayana kadar (yaklaşık 2 dakika) yıkanarak dekolorizasyon işlemi uygulandı. Preparatlar su ile yıkandı ve zıt boya olarak metilen mavisi ile 20-30 sn boyandı. Preparatlar tekrar su ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Her boyamada bir negatif kontrol (*Escherichia coli*), bir pozitif (*M.tuberculosis*) kontrol boyamaya dahil edildi (23,25,28).

Boyanan yayma preparat immersiyon objektifi ile (X1000) mikroskopta ARB yönünden incelendi. Yayma preparatı negatif olarak değerlendirmeden önce en az 300 alan incelendi. Sonuçlar kaydedildi.

### **3.4. Kültür (izolasyon):**

Tüberküloz kuşkulu hastalardan alınan, toplam 1066 işlemlenmiş klinik örneğin BACTEC MGIT 960 sistemi, BACTEC 460TB sistemi (Becton Dickinson, Sparks, ABD) ve Löwenstein-Jensen (LJ) besiyerinde (Salubris AŞ, İstanbul) üretici firma önerilerine uygun olarak kültürü yapılmıştır. Tüm inokülasyon işlemleri biyolojik güvenlik kabininde yapıldı.

#### **3.4.1. Löwenstein-Jensen besiyerinde kültür işlemi:**

Tüm örneklerden LJ katı besiyerine 0.2 ml ekim yapıldı ve örneğin besiyeri yüzeyine yayılması sağlandı. Ekim yapılan besiyerleri kapakları gevşetilerek etüvde 1-2 gün yatık konumda, daha sonra kapakları sıkılarak, dik konumda 37 °C'de inkübe edildi. Haftada bir gün üreme kontrolü yapıldı. Kuşkulu kolonilerden yayma preparat hazırlandı ve EZN yöntemi ile boyanarak ARB yönünden incelendi. ARB pozitif bulunan koloniler identifikasyona alındı. Üreme olmadığı takdirde 8 haftanın sonunda kültür sonucu negatif olarak değerlendirildi (23,25,28).

#### **3.4.2. BACTEC 460TB sisteminde kültür işlemi:**

Ekim yapmadan önce, BACTEC 460 TB Kültür sistemine ait bir besiyeri olan, tüm BACTEC 12B şişeleri, şişede CO<sub>2</sub>'den zenginleştirilmiş atmosfer temin etmek için BACTEC 460 cihazında okutuldu. Başlangıç GI≥ 20 olan şişeler kullanılmadı. Daha sonra, kontaminasyon kontrolü amacı ile PANTA (Polimiksin B, Amfoterisin B, Nalidiksik asit, Trimetoprim, Azlosilin) ekim öncesi şişelere 0.1 ml eklendi.

PANTA eklenmiş BACTEC 12B besiyerine, tüberkülin enjektörü kullanarak, işlemlenmiş örneklerden 0.5 ml ekim yapıldı. Ekim öncesi ve sonrası şişelerin lastik tıparları dezenfektan ile silindi. Ekim yapılan şişeler 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyondaki şişeler ilk 2 hafta haftada 3 kez, sonraki 6 hafta boyunca haftada 1 kez olmak üzere BACTEC 460 cihazında GI'leri (growth index) okutularak değerlendirildi. GI'i 10 ve üzeri olan şişeler

ise günlük okutulmaya alındı. GI 100 ve üzerinde olduğunda şişeden yayma preparat hazırlandı ve EZN yöntemi ile boyama yapılarak üreyen mikroorganizmaların ARB olup olmadığı mikroskopik yönden incelendi. Ayrıca aynı şişeden kontaminasyon kontrolü için kanlı agar plağına da ekim yapıldı. ARB pozitif bulunan ve kontamine olmayan şişeler NAP testi ile identifikasyona alındı. Altı haftanın sonunda GI değeri 10'un altında olan şişeler negatif olarak değerlendirildi (23,25,28,29).

#### **3.4.3. BACTEC MGIT 960 sisteminde kültür işlemi:**

BACTEC MGIT 960 sisteminde besiyeri olarak kullanılan tüplere (Mycobacterium Growth Indicator Tube, MGIT 7ml) ekimden önce zenginleştirici ve antimikrobiyal olarak OADC + PANTA karışımı 0.8 ml eklendi. Tüplere daha sonra işlenmiş örneklerden 0.5 ml ekim yapıldı. Tüpler inkübasyon ve üreme takibi için firma önerilerine göre MGIT 960 cihazına yerleştirildi.

Cihazda üremenin varlığına ve oluşan floresansa bağlı olarak pozitif sinyal alınan MGIT tüpünden preparat hazırlandı ve EZN yöntemi kullanılarak boyama yapıldı, üreyen mikroorganizmaların ARB olup olmadığı araştırıldı. Ayrıca aynı tüpten kanlı agar plağına da kontaminasyon kontrolü için ekim yapıldı. ARB pozitif bulunan ve kontamine olmayan tüplerden TBc ID testi ile identifikasyon yapıldı. Altı hafta sonunda üreme yoksa cihaz negatif sonuç vererek kültürü sonuçlandırdı (23,25,28,30).

#### **3.5. İdentifikasyon:**

Kültüründe saf olarak ARB üremesi saptanan besiyerlerinden identifikasyon testi yapılarak MTBC ve TDM ayırımı yapıldı. BACTEC 460 TB sisteminde GI'i 100'ü geçen şişelerden NAP testi (BACTEC NAP TB Differentiation Test), BACTEC MGIT 960 sisteminde pozitif sinyal veren tüplerden TBc ID testi (BD MGIT TBc Identification Test) uygulandı. Ayrıca bu izolatların moleküler tür tayini yapılarak (GenoType Mycobacterium CM, HAIN Life Science, GmbH, Germany) identifikasyon test sonuçları moleküler

yöntemle doğrulandı. Tüm identifikasyon testleri biyolojik güvenlik kabiniinde yapıldı.

### 3.5.1. BACTEC NAP testi:

12B şişesinin GI'i 50-100'e ulaştığında, besiyeri iyice karıştırıldıktan sonra 1 ml'si tüberkülin enjektörü kullanılarak NAP flakonuna aktarıldı. Kalan 3 ml besiyeri kontrol olarak kullanıldı. GI > 100 olan kültürler için NAP testinden önce ekim yapılmamış BACTEC 12B besiyeri ile tablo 3.1'de belirtilen oranlarda dilüsyonu yapıldı. Dilüsyon yapıldıktan sonra besiyerinin 1 ml'si NAP flakonuna aktarıldı. Kalan besiyeri kontrol olarak kullanıldı. Hem kontrol şişesi, hem de NAP flakonları 37 °C'de inkübe edildi, günlük olarak 2-7 gün süre ile BACTEC 460 cihazında okutuldu ve GI'leri kaydedildi.

Kontrol şişesindeki günlük GI değeri artış göstermeyen NAP sonuçları değerlendirmeye alınmadı. Kontrol şişesinin GI'i artmasına rağmen NAP şişesinin GI'i azalıyor veya değişmiyorsa MTBC, artış gösteriyorsa TDM olarak değerlendirildi. Test sonucu 4 günden daha kısa sürede MTBC olarak değerlendirilmedi.

İnokulasyondan sonra NAP şişesinin ardışık iki GI'de önemli bir azalma (%20); ilk iki gün hafif, fakat önemli olmayan bir artış ve ardından artışın olmaması veya azalma olması MTBC olarak değerlendirildi.

NAP şişesinin GI'inin dört gün içinde 400 ve üzerine çıkması; inokulasyondan sonra ilk 1-2 gün içinde artış olmaması veya hafif bir azalma, iki günün ardından önemli bir artış (%20) olması durumlarında test edilen izolat TDM olarak değerlendirildi (23,25,29).

**Tablo 3.1.** Dilüsyon Oranları

GI Miktarı	Dilüsyon
50-100	Dilüsyon yapılmaz
101-200	0.8 ml
201-400	0.6 ml
401-600	0.4 ml
601-800	0.3 ml
801-999	0.2 ml
999> 1 gün	0.1 ml

### **3.5.2. TBc ID testi (BD MGIT TBc Identification Test) (TB Ag MPT64 Hızlı Testi):**

Pozitif MGIT besiyerlerinden, TBc ID test cihazına 100 µL eklendi ve reaksiyonu tespit etmek için 15 dakika beklendi. 15 dakikanın sonunda okuma penceresinde iki çizgi (kontrol "C" + test "T") olan izolatlar pozitif (MTBC) olarak kabul edildi, okuma penceresinde tek çizgi (C) olan izolatlar negatif (TDM) olarak kabul edildi ve kaydedildi. Okuma penceresinde kontrol "C" konumunda pembe-kırmızı çizgi görülmezse veya arka plan rengi test yorumunu engellerse test geçersiz sayıldı. Geçersiz izolatların TBc ID testi tekrar edildi (31,32).

### **3.5.3. GenoType Mycobacterium CM test:**

DNA izolasyonu için sıvı besiyerinden direkt 1 ml kültür alındı ve 15 dakika 10000Xg'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve bakteri çökeltisi 100-300 µl distile su içerisinde vortekslenerek çözüldü. Hazırlanan bakteri süspansiyonları 95 °C'de 20 dakika ısı bloğunda inkübe edildi. Onbeş dakika sonikasyona (Gen-Probe D-78224 Singen/HtW) bırakılır. Örnekler 5 dakika 14000Xg'de santrifüj edildi. Süpernatandan 5 µl alınarak direkt PCR da kullanıldı.

Ayrı bir odada, örnek sayısı dikkate alınarak tablo 3.2'de göre PCR ana karışımı (master mix) hazırlandı. Negatif kontrol (DNA yerine 5 µl su pipetlenir) de dikkate alınarak PCR ana karışımı toplam örnek sayısından 1 adet fazla hazırlandı. PCR amplifikasyonu termal döngüde (Gene Amp PCR System 9700) tablo 3.3'te verilen protokole göre gerçekleştirildi.

Twincubator'de (TwinCubator®; Hain Lifescience GmbH) uygun autoLipa programı açıldı. Hybridization buffer (HYB) ve yıkama solusyonu (X-STR ) 37- 45 °C'ye kadar su banyosunda ısıtıldı. Konsantre konjugat (CON-C) ve konsantre substrat (SUB-C) (+4 °C'de korundu) dışındaki diğer tüm solüsyonların oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. Uygun tüpler kullanılarak CON-C ve SUB-C kendi sulandırma solüsyonları (CON-D ve SUB-D) ile



1:100 oranında (Her bir strip için; 10 µl konsantre + 1 ml (1000 µl) sulandırma solüsyonu) sulandırıldı.

**Tablo 3.2.** PCR ana karışımı (master mix) oranları

Reaktif	Miktar (1 tüp için)
PN Miks (PNM)	35 µl
10X PCR Buffer	5 µl
MgCl	5 µl
Taq Gold Polimeraz	0.2 µl
Örnek	5 µl

**Tablo 3.3.** PCR protokolü

95 °C	5 dakika	1 döngü
95 °C	30 saniye	10 döngü
58 °C	2 dakika	
95 °C	25 saniye	20 döngü
53 °C	40 saniye	
70 °C	40 saniye	
70 °C	8 dakika	1 döngü

20 µl denatüasyon solüsyonu (DEN) her tray'in (striplerin yerleştirildiği plate) örneklerin çalışılacağı kuyucuklarının köşelerine pipetlendi. 20 µl PCR ile çoğaltılmış örnekler DEN solüsyonuna pipetlenerek karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Bu sırada pens ile her bir örnek için bir strip alındı ve striplerin işaretli ucu numaralandırıldı. Örneklerin konulduğu kuyucuklara dikkatlice önceden ısıtılmış 1 ml HYB solüsyonu konuldu ve homojen renk elde edilene kadar yavaşça çalkalandı. Stripler dikkatlice trayin kuyularına yerleştirildi. Tray Twincubator'da 45 °C'de 30 dakika çalkalanarak inkübe edildi. Hibridizasyon solüsyonu pasteur pipet kullanılarak tamamen kuyucuklardan boşaltıldı. Her bir kuyucuğa 1 ml X-STR solüsyonu (Stringent Wash Solution) eklendi ve 15 dakika 45 °C'de inkübe edildi. Bu basamak dan itibaren oda sıcaklığında çalışıldı. STR solüsyonu, tray dikkatlice ters çevrilerek tamamen boşaltıldı. Stripler Twincubator'da çalkalanarak 1 ml durulama solüsyonu (RIN, Rinse Solution) ile yıkandı. Kuyucuklar da ki striplerin üzerine 1 ml sulandırılmış konjugat eklendi ve 30 dakika Twincubator'da çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon sonrası konjugat

dökülerek boşaltıldı ve her bir strip 2 kez 1 ml RIN, 1 kez de 1 ml distile su ile 1'er dakika Twincubator'da çalkalanarak yıkandı. Her bir strip üzerine 1 ml sulandırılmış substrate solüsyonu eklendi ve karanlıkta, çalkalamadan 3-20 dakika bant oluşumu takip edilerek inkübe edildi. Bant oluşma işlemi stripleri iki kez distile su ile yıkanarak sonlandırıldı. Son olarak, stripler kuyucuklardan alındı, kurutma kağıdının arasında kurutuldu. Test sonunda oluşan bantlar kullanım klavuzundaki yorumlama cetveline göre değerlendirildi (33).

### 3.6. Antibiyotik Duyarlılık Testi:

Kültür koleksiyonundan sağlanan, BACTEC MGIT 960 ve BACTEC 460 TB sisteminde kültürleri yapılan suşların her iki sistem ile primer antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılık testleri çalışıldı.

#### 3.6.1. BACTEC 460 TB sistemi ile duyarlılık testi:

Antibiyotik solüsyonlarının hazırlanması için, BACTEC SIRE kiti olarak, liyofilize halde üretici firma tarafından sağlanan antibiyotik şişelerinin kapağı alkollü pamuk ile silindi. Her antibiyotik şişesine 5 ml distile su eklendi ve homojen olana kadar karıştırıldı (Tablo 3.4). Hazırlanan stok antibiyotik solüsyonları küçük miktarlar halinde -20°C'de saklandı ve duyarlılık testi yapılacağı zaman gerektiği kadar çıkarılıp çözüldükten sonra kullanıldı.

**Tablo 3.4.** Bactec 460TB duyarlılık testinde liyofilize antibiyotiklerden stok solüsyonlar hazırlama ve 12B besiyerindeki final antibiyotik konsantrasyonları.

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

Her bir antibiyotik duyarlılık testi için 5 adet BACTEC 12B şişesi ve 1 adet BACTEC Dilüsyon Sıvısı (DF) şişesi hazırlandı. Tüm şişelerin üzerine hasta kültür numarası ve tarih yazıldı. Beş adet 12B şişesinin birine kontrol, diğer dördüne ise çalışılacak olan antibiyotiklerin ismi yazıldı (K ve S,I,R,E). SM ve EMB'nin daha önce hazırlanmış stok solüsyonlarınının 1 ml'si 2ml distile su ile sulandırılarak 1/3 dilüe edildi. İNH ve RİF için direkt stok solüsyonundan, SM ve EMB için dilüe edilmiş stok solüsyonundan üzerinde antibiyotiğin adı yazılı 12B şişelerine, tüberkülin enjektörü kullanarak 0.1 ml eklendi. Kontrol şişesine herhangi bir antibiyotik eklenmedi.

İnkübasyondaki subkültürü yapılan suşların 12B şişesi GI değeri >500 olana kadar günlük olarak okutulmaya alındı. GI değeri 500'ü geçen şişe direkt inokulum kaynağı olarak kullanıldı. GI >800 ise, 1ml pozitif kültür 1ml DF ile dilüe edildikten sonra, inokulum olarak bu dilüsyon kullanıldı.

İnokulasyon için dört adet antibiyotikli bir adet kontrol şişesi ve bir adet Bactec DF şişesi alındı. Şişelerin kapakları alkollü pamukla silindi. İnokulum kaynağı olarak kullanılan şişe iyice karıştırıldı ve antibiyotikli dört 12B şişesine ve DF şişesine tüberkülin enjektörü ile 0.1 ml ekim yapıldı ve karıştırıldı. İnokulum eklenmiş DF şişesinden 0.1 ml kontrol şişesine eklendi. Kontaminasyon kontrolü için bir kanlı agar plağına birkaç damla inokulum süspansiyonunu ekildi. Her şişenin lastik kapağını dezenfektan emdirilmiş pamukla ve alkollü pamukla silindi. Ekim yapılmış şişeler 3-4 kez hafifçe alt üst edilerek içeriğinin karışması sağlandı. Şişeler 37°C'de inkübe edildi.

Duyarlılık testleri cuma günleri yapıldı. Şişeler pazartesi gününden itibaren günlük ve yaklaşık olarak her gün aynı saatte ( $\pm 2$  saat), en az 3 gün BACTEC 460 cihazında okutuldu. Kontrol şişesinin GI değeri > 30 olduğunda sonuçlar yorumlandı. Kontrol şişesinin GI değeri 14 günlük inkübasyondan sonra 30'a ulaşmadığında duyarlılık testleri tekrarlandı.

Kontrol ve antibiyotikli şişelerin, bir gün önceki GI'leri ile arasındaki fark ( $\Delta GI$ ) hesaplandı. Kontrol şişesinin  $\Delta GI$ 'i, antibiyotikli şişeninkinden büyükse suşun test edilen antibiyotiğe karşı duyarlı olduğuna, aksi durumda ise dirençli olduğuna karar verildi.

Antibiyotikli şişenin GI değeri 500'ü geçer ve bir sonraki gün de 500'ün üzerinde kalırsa,  $\Delta GI$ 'e bakmaksızın sonuç dirençli olarak yorumlandı. Kontrol şişesinde inokulumun yoğun olmadığından (kontrol GI değerinin 3 günden daha kısa sürede 30'u aşmadığından) ve herhangi bir kontaminasyon olmadığından emin olduktan sonra sonuçlar kaydedildi (23,25,29).

### 3.6.2. BACTEC MGIT 960 sistemi ile duyarlılık testi:

Antibiyotik stok solüsyonlarının hazırlanması için, BACTEC MGIT SIRE kiti olarak, liyofilize halde üretici firma tarafından sağlanan antibiyotik şişelerinin kapağı alkollü pamuk ile silindi. Her antibiyotik şişesine 4 ml steril distile su eklendi ve tamamen çözünene kadar karıştırıldı.

Liyofilize haldeki antibiyotiklerin dilüsyon şeması ve MGIT 7 ml besiyerindeki final konsantrasyonları tablo 3.5'de verilmiştir.

**Tablo 3.5.** MGIT liyofilize antibiyotiklerinin dilüsyon şeması ve 7 ml'lik MGIT tüpteki final konsantrasyonları

Liyofilize antibiyotik	Sulandırım (steril distile su)	Sulandırıldıktan sonraki ilaç konsantrasyonu	MGIT tüpe eklenen miktar	MGIT tüpteki final konsantrasyon
SM	4 ml	83 µg/ml	100 µl	1.0 µg/ml
INH	4 ml	8.3 µg/ml	100 µg	0.1 µg/ml
RIF	4 ml	83 µg/ml	100 µl	1.0 µg/ml
EMB	4 ml	415 µg/ml	100 µl	5.0 µg/ml

Her test suş için beş MGIT tüpü kullanıldı (Kontrol, S, I, R, E). Her tüpün üzerine K, S, I, R, E harfleri içerdiği antibiyotiğe göre yazıldı. Her tüpe 0.8 ml BACTEC MGIT SIRE supplementi eklendi. SIRE tüplerinin her birine, üzerine yazdığımız antibiyotik adına uygun şekilde, daha önce hazırladığımız antibiyotik solüsyonlarından 0.1 ml eklendi. Kontrol tüpüne antibiyotik eklenmedi.

Pozitif MGIT tüpü, MGIT 960 cihazında pozitif sinyal verdikten sonraki gün (1.gün) dahil 5. güne kadar duyarlılık testine alındı. Tüpler 1-2 gündür pozitif ise iyice karıştırılıp inokulum olarak kullanıldı. Tüpler 3-5 gündür pozitif

ise iyice karıştırıldı, 1 ml'si 4ml SF ile dilüe edildi ve bu 1/5 dilüsyon inokulum olarak kullanıldı.

İnokulum süspansiyonundan, dört adet antibiyotikli MGIT tüpünün her birine 0.5 ml ve 9.9 ml'lik serum fizyolojik (SF) içine 0.1 ml eklendi. Elde edilen 1/100'lük kontrol süspansiyonundan K (kontrol) olarak etiketlenmiş MGIT tüpüne 0.5 ml aktarıldı. Tüpler sıkıca kapatılıp 3-4 kez hafifçe alt üst edildi. Tüpler uygun büyüklükte AST (antibiyotik duyarlılık testi) set taşıyıcısına uygun sırayla (K, S, I, R, E) yerleştirildi. Kullanım kılavuzuna göre, BACTEC MGIT 960 cihazına setin giriş kaydı yapıldı ve cihazın gösterdiği konuma yerleştirildi. Kontaminasyon kontrolü için de kanlı agara birkaç damla ekim yapıldı.

BACTEC MGIT 960 cihazı otomatik olarak sonuçları "duyarlı" veya "dirençli" olarak yorumladı. Alınan sonuçlar kaydedildi. Test sonucunun etkilenebildiği sıcaklık artışı, kontrol tüpündeki üreme biriminin (growth unit) 13 günde hala 400'e ulaşamaması gibi bazı durumlarda cihaz sonucu hata (X) olarak verdi. Bu durumda test subkültür yapılarak tekrarlandı (23,25,30).

### **3.7.İstatistik**

Elde edilen bulgular SPSS programına girildi ve ki-kare testi uygulandı;  $p < 0.05$  olan değerler anlamlı kabul edildi.

Verilerin analizi "SPSS for Windows 15.0" istatistik paket programında yapılmıştır, tanımlayıcı istatistikler nominal değişkenler için sayı ve yüzde dağılımları şeklinde, sayısal değişkenlerin ortalama, minimum-maksimum değerlerle tanımlanmıştır.

Farklı besiyerlerinde üreme oranları, kontaminasyon oranları ve duyarlık test sonuçları kikare testi ile karşılaştırılmıştır. Üreme süreleri tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile karşılaştırılmıştır.

## IV. BULGULAR

### 4.1. Primer İzolasyona Ait Bulgular:

Çalışmamızda, 607 hastadan toplanan, 1066 klinik örnekten 62'sinin (%5.8) kültüründe üç farklı kültür yönteminden en az birinde mikobakteri türü üremiştir. Kültüründe mikobakteri üreyen örneklerin 50'si (%80.6) solunum yolu (28'i BAL, 20'si balgam, 1'i AMS, 1'i ETA), 12'i (%19.4) solunum yolu dışı örneğiydi (7'si doku biyopsisi, 3'ü peritoneal sıvı, 2'si idrar). Bu örneklerin 19'u (%30.6) yayma direk bakı incelemesinde ARB-pozitif, 43'ü ise (%69.4) ARB-negatif (2'si kuşkulu pozitif) olarak değerlendirilmiştir. Kültürde izole edilen mikobakteri türlerinin 37'si (%59.7) *M.tuberculosis* kompleks (MTBC), 25'i (%40.3) Tüberküloz Dışı Mikobakteri (TDM) olarak tanımlanmışlardır (18'i *M.fortuitum*, 3'ü *M.chelonae*, 2'si *M.gordonae*, 1'i *M.intracellulare* ve 1'i *Mycobacterium* spp.).

Mikobakteri izolasyon oranı BACTEC MGIT 960'da %82.3 (n=51), BACTEC 460TB'de %62.9 (n=39) ve Löwenstein-Jensen (LJ) besiyerinde %43.5 (n=27) olarak saptanmıştır. BACTEC MGIT 960 ve BACTEC 460TB kültür sistemlerinin mikobakteri izolasyon oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (p=0.196). Löwenstein-Jensen besiyeri, BACTEC MGIT 960 ve BACTEC 460TB sistemleri ile izole edilen mikobakteri sayıları ve izolasyon oranları Tablo 4.1'de görülmektedir.

Kültüründe MTBC üreyen 37 örneğin 26'sı (%70.3) solunum yolu (18'i balgam, 6'sı BAL, 1'i AMS, 1'i ETA), 11'i (%29.7) solunum yolu dışı örneği (7'si doku biyopsisi, 3'ü peritoneal sıvı, 1'si idrar), Kültüründe TDM üreyen 25 örneğin 24'ü (%96.0) solunum yolu (22'si BAL, 2'si balgam), 1'i (%4.0) solunum yolu dışı örneğiydi (idrar).

Tek bir besiyeri olarak, LJ besiyeri, 37 MTBC izolatının 20'sini (%54.0), BACTEC MGIT 960 32'sini (%86.5), BACTEC 460TB 31'ini (%83.8) izole etmiştir. Beş örneğin kültüründe sadece BACTEC MGIT 960'da, dört örneğin kültüründe sadece BACTEC 460TB'de, bir örneğin kültüründe ise sadece LJ besiyerinde üreme olmuştur. Sistemlerin MTBC izolasyon oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p=0.898$ ). BACTEC MGIT 960 + LJ kombinasyonu ile 33 (%89.2) MTBC izole edilirken, BACTEC 460TB + LJ kombinasyonu ile 32'si (%86.5) izole edilmiştir. Kültür yöntemlerine göre ve kombinasyonlara göre izolasyon oranları Tablo 4.2'de verilmiştir.

Besiyerlerinin kontaminasyon oranları BACTEC MGIT 960'da %6.6 ( $n=70$ ), BACTEC 460TB'de %2.6 ( $n=28$ ) ve LJ besiyerinde %7.7 ( $n=82$ ) olarak hesaplanmıştır. Kontaminasyon oranının BACTEC MGIT 960 sisteminde, BACTEC 460TB sistemine göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu görülmüştür ( $P<0.05$ ) (Tablo 4.1). BACTEC MGIT 960 sisteminde kontaminasyon ile sonuçlanan sadece bir örnekte BACTEC 460TB sisteminde MTBC üremiştir.

**Tablo 4.1:** BACTEC MGIT 960, BACTEC 460TB ve LJ besiyeri için izolasyon oranları ve kontaminasyon oranları

Besiyeri	Üreyen izolatların sayısı [n(%)]			kontaminasyon	Üreme yok
	Mikobakteri	MTBC	TDM		
BACTEC MGIT 960	51 (%82.3)	32 (%86.5)	19 (%76.0)	70 (%6.6)	945 (%88.6)
BACTEC 460TB	39 (%62.9)	31 (%83.8)	8 (%32.0)	28 (%2.6)	999 (%93.7)
LJ	27 (%43.5)	20 (%54.0)	7 (%28.0)	82 (%7.7)	957 (%89.8)

**Tablo 4.2:** Kültür yöntemlerinin ve kombinasyonların izolasyon oranları

	Besiyerlerin tümü	960	460TB	LJ	960 + LJ	460TB+LJ
Mikobakteri	62	51 (%82.3)	39 (%62.9)	27 (%43.5)	56 (%90.3)	44 (%71.0)
DB (+)	19	18 (%94.7)	18 (%94.7)	14 (%73.7)	18 (%94.7)	18 (%94.7)
DB (-)	43	33 (%76.7)	21 (%48.8)	13 (%30.2)	38 (%88.4)	26 (%60.5)
MTBC	37	32 (%86.5)	31 (%83.8)	20 (%54.0)	33 (%89.2)	32 (%86.5)
DB (+)	18	17 (%94.4)	18 (%100)	14 (%77.8)	17 (%94.4)	18 (%100)
DB (-)	19	15 (%78.9)	13 (%68.4)	6 (%31.6)	16 (%84.2)	14 (%73.7)
TDM	25	19 (%76.0)	8 (%32.0)	7 (%28.0)	23 (%92.0)	12 (%48.0)
DB (+)	1	1 (%100)	0 (%0.0)	0 (%0.0)	1 (%100)	0 (%0.0)
DB (-)	24	18 (%75.0)	8 (%33.3)	7 (%29.2)	22 (%91.7)	12 (%50.0)

960, BACTEC MGIT 960 sistem; 460TB, BACTEC 460TB sistem; LJ, Löwenstein-Jensen besiyeri; DB, Direkt bakı.

*Mycobacterium tuberculosis* kompleks ortalama izolasyon süresi BACTEC MGIT 960 için 13,7 (5-35) gün, BACTEC 460TB için 14,6 (4-26) gün ve LJ besiyeri için 20,7 (12-43) gün olarak hesaplanmıştır. BACTEC MGIT 960 ve BACTEC 460TB sistemleri arasındaki izolasyon süresi farkının istatistiksel yönden anlamsız olduğu  $P>0,05$ , LJ besiyerinin de ise bu sistemlere göre daha geç üreme olduğu görülmüştür ( $p<0.001$ ). Direkt bakı incelemesinde ARB-pozitif saptanan örneklerde üreme sürelerinin, ARB-negatif olan örneklerle göre izolasyon süresinin, beklenildiği gibi, her iki sistemde de daha kısa olduğu görülmüştür (Tablo 4.3).



**Tablo 4.3:** Klinik örneklerden *M. tuberculosis* kompleksin ortalama izolasyon süreleri.

Besiyeri	Tüm örneklerde* (gün)	Direkt bakı (+) örneklerde (gün)	Direkt bakı (-) örneklerde (gün)
BACTEC MGIT 960	13.7 (5-35)	10.4 (5-19)	17.5 (12-35)
BACTEC 460TB	14.6 (4-26)	12.7 (4-26)	17.4 (12-25)
LJ	20.7 (12-43)	20.4 (12-43)	21.6 (20-26)

\*ANOVA,  $p < 0.001$ . Ortalama izolasyon süreleri arasındaki fark; . BACTEC MGIT 960 - BACTEC 460TB,  $P > 0,05$  (anlamsız); BACTEC MGIT 960 – LJ,  $p < 0.001$  (anlamlı); BACTEC 460TB – LJ,  $p < 0.001$  (anlamlı).

#### 4.2. İdentifikasyona Ait Bulgular:

Kültür koleksiyonundan sağlanan 30'u MTBC ve 21'si Tüberküloz Dışı Mikobakteri (TDM) olmak üzere toplam 51 mikobakteri suşunun her iki sistem ile pasajları yapılmıştır. Kültürde üreme saptanmasından sonra BACTEC MGIT 960 sistemdeki üremeden TBc ID testi (BD MGIT TBc Identification Test), BACTEC 460TB sistemdeki üremeden ise NAP testi (BACTEC NAP TB Differentiation Test) kullanılarak identifikasyonları yapılmıştır. BD MGIT Tbc identifikasyon testi ve BACTEC 460 NAP testi ile 51 mikobakteri suşunun tamamı doğru olarak tanımlanmıştır. Kültürde saf olarak üreyen mikobakteri izolatlarının MTBC ve TDM ayırımını yapmadaki performansları yönünden her iki sistem arasında fark olmadığı görülmüştür (Tablo 4.4).

**Tablo 4.4:** TBc ID testi ve NAP testi ile MTBC-TDM identifikasyonu.

Suşlar (n)	TBc ID testi		NAP testi	
	MTBC pozitif (n)	MTBC negatif (n)	MTBC pozitif (n)	MTBC negatif (n)
<i>M.tuberculosis</i> kompleks (30)	30	-	30	-
TDM (21)	-	21	-	21
<i>M.abscessus</i> (2)	-	2	-	2
<i>M.avium</i> (1)	-	1	-	1
<i>M.fortuitum</i> (12)	-	12	-	12
<i>M.chelonae</i> (2)	-	2	-	2
<i>M.gordoniae</i> (3)	-	3	-	3
<i>M.kansasii</i> (1)	-	1	-	1
TOPLAM	30	21	30	21

#### 4.3. Antitüberküloz İlaç Duyarlılık Testine Ait Bulgular:

Her iki sistemle SM, INH, RIF ve EMB'ye karşı, duyarlılıkları test edilen 50 klinik suşun 11'inde uyumsuz sonuçlar elde edilmiştir. BACTEC 460TB sistem altın standart kabul edildiğinde, BACTEC MGIT 960 sistem ile bir suшта yanlış duyarlı sonuç (bir suшта EMB), 10 suшта yanlış dirençli sonuçlar (9 suшта SM, 1 suшта EMB) alınmıştır. Sonuç olarak 50 klinik suшта çalışılan toplam 200 ilaç duyarlılık testinin (4X50) 11'inde (SM 9, EMB 2) uyumsuz sonuçlar alınmıştır (Tablo 3.5). Bu sonuçlara göre, üç primer seçenek ilaç için (INH, RIF ve EMB), iki sistem arasındaki yüksek düzeyde uyum olduğu, fakat SM için iki sistem arasında orta düzeyde uyum olduğu saptanmıştır. BACTEC 460TB sistem altın standart kabul edildiğinde, BACTEC MGIT 960 sistemin direnç belirlemedeki duyarlılığı, özgüllüğü ve iki sistem arasındaki uyum sırasıyla SM için %100.0, %76.3, %82.0; EMB için %85.7, %97.7,

%96.0 INH ve RIF için %100.0, %100.0, %100.0 olarak hesaplanmıştır. Kontrol suşu her iki sistemde de tüm ilaçlara duyarlı olarak saptanmıştır.

**Tablo 4.5:** 50 klinik izolatin BACTEC 460TB ve BACTEC MGIT 960 sistemleri ile elde edilen ilaç duyarlılık test sonuçlarının karşılaştırılması<sup>a</sup>.

	BACTEC 460TB							
	SM		INH		RIF		EMB	
BACTEC MGIT 960	R	S	R	S	R	S	R	S
R	12	9	29	0	29	0	6	1
S	0	29	0	21	0	21	1	42

<sup>a</sup>Kullanılan ilaç kritik konsantrasyonları; BACTEC 460TB sistem için SM 2 µg/ml, INH 0.1 µg/ml, RIF 2 µg/ml, EMB 2.5 µg/ml, BACTEC MGIT 960 sistem için SM 1 µg/ml, INH 0.1 µg/ml, RIF 1 µg/ml, EMB 5 µg/ml. SM, streptomisin; INH, izoniazid, RIF, rifampin; EMB, ethambutol.

## V. TARTIŞMA

Tüberkülozun hızlı tanısı ve tedavisi hastalığın kontrolünde kritik öneme sahiptir. Bu nedenle *M.tuberculosis*'in klinik örneklerden saptanması, identifikasyonu ve ilaç direncinin belirlenmesinde hızlı ve güvenilir yöntemlerin kullanılması zorunluluktur. Konvansiyonel yöntemler uzun zaman aldığından sıvı besiyeri bazlı, ticari hızlı kültür sistemlerinin kullanımı yaygınlaşmıştır. Bu sistemlerden BACTEC 460 TB sistemi uzun yıllardır başarıyla kullanılan, iyi standardize edilmiş bir yöntemdir. Ancak, yöntemin yarı otomatize olması, radyometrik bir yöntem olması gibi dezavantajları nedeni ile üretici firma tarafından alternatif yöntem arayışına yol açmış ve BACTEC MGIT 960 sistemi piyasaya sürülmüştür. Tam otomatize ve non radyometrik bir yöntem olması gibi avantajları olan ve gün geçtikçe yaygınlaşan bu sistemin her yönüyle BACTEC 460 TB sisteminin yerini alabileceğın kanıtlanması gereklidir (27, 34, 35, 36).

Bu çalışmada 1066 klinik örneğın 62'sinden BACTEC MGIT 960 sistemi, BACTEC 460 TB sistemi ve LJ besiyerlerinden en az birinde bir mikobakteri izole edilmiştir. Sıvı besiyeri bazlı hızlı kültür sistemleri olan BACTEC MGIT 960 ve BACTEC 460 TB'nin klinik örneklerden mikobakteri izolasyon oranı LJ besiyerlerine göre belirgin yüksek bulunmuş (P=0,022), en iyi izolasyon oranının BACTEC MGIT 960 sistemine ait olduğu görülmüştür (BACTEC MGIT 960'da %82.3; BACTEC 460TB'de %62.9; LJ besiyerinde %43.5 ). Klinik örneklerden mikobakteri izolasyonu yönünden katı bir besiyeri olan LJ besiyerini, sıvı bazlı kültür sistemleri ile karşılaştıran daha önceki çalışlarda da sıvı besiyerinin üstünlüğü gösterilmiştir (34, 37-43). Bu farka neden olabilecek etkenler arasında; i) hızlı kültür sistemlerinde kullanılan besiyerlerinin daha zengin ortam sağlaması, ii) kullanılan inokulum miktarının

daha fazla olması (BACTEC MGIT 960 ve BACTEC 460TB için 0.5ml, LJ için 0.2ml), iii) üremenin saptanmasında kullanılan teknoloji sayılabilir (39).

Bu çalışmada BACTEC MGIT 960'ın çeşitli klinik örneklerden mikobakteri izolasyon oranı (%82.3), BACTEC 460TB'ye (%62.9) göre istatistiksel olarak anlamlı olmamakla ( $p=0.196$ ) beraber daha yüksek bulunmuştur. Cruciani ve arkadaşlarının (44) yaptığı 10 çalışmanın değerlendirildiği meta analiz sonucunda da BACTEC MGIT 960'ın mikobakteri izolasyon oranı benzer şekilde %81.5 olarak hesaplanmıştır. Mikobakteri izolasyon oranı yönünden BACTEC MGIT 960 ve BACTEC 460TB sistemlerini karşılaştıran bazı çalışmalarda BACTEC 460TB sistemini istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte daha üstün bulan çalışmalar olsa da ((35, 36, 37, 45), bizim çalışmamıza benzer şekilde BACTEC MGIT 960 sistemini üstün bulan çalışmalar da vardır (38, 40, 43). Bu hafif fark BACTEC MGIT 960 sisteminde kullanılan besiyerinin (BACTEC MGIT 7ml), BACTEC 460 TB sisteminde kullanılan besiyerine (BACTEC 12B) göre daha zengin olmasından kaynaklanabilir (46). Bizim çalışmamızda bu üstünlüğü oluşturan tüberküloz dışı mikobakterilerdi (TDM).

Çalışmamızda, kültürde izole edilen mikobakteri türlerinin 25'i Tüberküloz Dışı Mikobakteri (TDM) olarak tanımlanmışlardır. Klinik örnekten TDM izolasyon oranı BACTEC MGIT 960 sisteminde %75.0 ( $n=19$ ) iken, BACTEC 460TB sisteminde %32.0 ( $n=8$ ), LJ'de ise %25 ( $n=7$ ) saptanmıştır. BACTEC MGIT 960 sisteminde üreyip, BACTEC 460 TB sisteminde üremeyen 13 TDM'nin 10'u *M.fortuitum*, 2'si *M.chelonae*, 1'i *M.gordoniae*; BACTEC 460 TB sisteminde üreyip, BACTEC MGIT 960 sisteminde üremeyen 3 TDM'nin 2'si *M.fortuitum*, 1'i *M.gordoniae*; sadece LJ besiyerinde üreyen 3 TDM'nin 2'si *M.fortuitum*, 1'i *M.intracellulare* olarak tanımlandı. Bizim çalışmamızın aksine, bazı çalışmacılar bazı TDM'ler için (*M.xenopi*, *M.fortuitum*, *M.kansasii*, *M.gordoniae*, *M.chelonae*,) klinik örnekten izolasyon oranının BACTEC 460TB'da BACTEC MGIT 960' a göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (35, 36, 37, 44). Hanna ve arkadaşları (38) ise bizim çalışmamıza benzer şekilde, özellikle *M.avium* kompleks (MAC) olmak üzere TDM'ler için izolasyon oranını BACTEC MGIT 960'da daha yüksek

bildirmişlerdir. Çalışmamızda üreyen TDM'lerin hiçbirinin etken olduğu kanıtlanamamış ve tümünün kontaminant olduğu düşünülmüştür. Kültüründe TDM üreyen 25 klinik örneğin 22'sinin BAL örneği olduğu görülmüş ve bronkoskop kontaminasyonuna bağlanmıştır. Her ne kadar saptanan TDM'ler çoğu zaman kontaminant olarak karşımıza çıkmasa da bunların çoğunun özellikle immun yetmezlik gibi durumlarda insan için potansiyel patojen olması, klinik örnekte varolan TDM'lerin saptanabilmesinin önemini artırmaktadır (35).

Çalışmamızda kültürde izole edilen mikobakteri türlerinin 37'si *M.tuberculosis* kompleks (MTBC), olarak tanımlanmışlardır. Klinik örnekten MTBC izolasyon oranı BACTEC MGIT 960'da %86.5, BACTEC 460TB'de %83.8, LJ besiyerinde ise %54.0 olarak saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da ( $p=0.898$ ) BACTEC MGIT 960'da MTBC izolasyon oranı, BACTEC 460TB'ye göre biraz daha yüksekti. Daha önceki çalışmacılar BACTEC MGIT 960 için %77.0 - %97.9 arasında MTBC izolasyon oranları bildirmişlerdir (34-41, 43, 46-49). Rodrigues ve arkadaşlarının (46) bildirdiği %97.9 gibi yüksek izolasyon oranları bu çalışmalarda sadece iki yöntem kullanılmış olmasından kaynaklanabilir. Karşılaştırılan yöntem sayısı arttıkça toplam izole edilebilen MTBC sayısının da artması beklenir, dolayısı ile bu artmış toplam miktar içindeki tek bir yöntemin izolasyon oranı daha düşük çıkabilecektir. Cruciani ve arkadaşlarının (44) yaptığı meta analizde BACTEC MGIT 960 için MTBC izolasyon oranı bizim çalışmaya benzer şekilde %81.5 olarak hesaplanmıştır. Chien ve arkadaşları (50) ise diğer çalışmalardan oldukça düşük bir oran (%58,7) bildirmişlerdir. MTBC izolasyon oranı yönünden BACTEC MGIT 960 ile BACTEC 460TB sistemlerini karşılaştıran çalışmalar arasında, bizim çalışmanın aksine BACTEC 460TB sistemi lehine sonuç bildirenler olduğu gibi (35-38), bizim çalışmamıza benzer şekilde BACTEC MGIT 960 sistemi lehine sonuç bildirenlerde vardır (40, 43).

Dünya sağlık örgütü, mikobakteriyoloji laboratuvarında bir sıvı bazlı besiyeri ile bir katı bazlı besiyerinin kombine kullanılmasını önermekte, bu kombinasyonun izolasyon oranını artırdığı belirtilmektedir (51, 52, 53). Daha önceki çalışmalar da bu bilgiyi desteklemektedir (34, 35, 37-40, 43, 47, 48).

Bizim çalışmamızda da BACTEC MGIT 960 sistemi, LJ besiyeri ile kombine edildiğinde MTBC izolasyon oranı %86.5'den %89.2'ye; BACTEC 460TB sistemi, LJ besiyeri ile kombine edildiğinde ise %83.8'den %86.5'e yükselmiştir, ancak kombinasyonların izolasyon oranına katkısı istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p>0.05$ ). Her iki kombinasyon arasında MTBC izolasyon oranı yönünden anlamlı bir fark saptanmadı ( $p>0.05$ ).

Çalışmamızda direkt yayma mikroskopik incelemesinde ARB pozitif saptanan örneklerde (toplam 18 üreme) MTBC izolasyon oranı BACTEC 460TB sisteminde %100 (18/18) iken, BACTEC MGIT 960 sisteminde bir kültürün kontaminasyonu nedeni ile %94.4 (17/18) olarak saptanmıştır. Yayma negatif örneklerde ise (18'i yayma negatif, biri kuşkulu pozitif toplam 19 üreme) MTBC izolasyon oranı BACTEC 460TB sisteminde %78.9 (15/19), BACTEC MGIT 960 sisteminde %68.4 (13/19) saptandı. Alcaide ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada (43) bizim çalışmaya benzer şekilde yayma negatif örneklerde BACTEC MGIT 960 sisteminin BACTEC 460TB sistemine göre izolasyon oranı biraz daha iyi olduğunu, düşük basilli örneklerde bu sistemin iyi bir mikobakteriyel üreme sağladığını bildirmişlerdir. Fakat BACTEC 460TB sistemi lehine sonuç bildiren çalışmalar da vardır (44).

Klinik örneklerden MTBC'nin hızlı saptanması TB hastalarının tedavisine daha erken başlamak ve daha iyi bir prognozu sağlar, hastalığın yayılımını azaltarak TB'un kontrolünde de önemli rol oynar. Bu nedenle, kültür sistemlerinde MTBC'nin izolasyon süresi sistemin önemli bir performans özelliğidir. Sıvı bazlı kültür sistemlerinin, katı besiyeri ile kıyaslandığında en önemli avantajlarından biri üremenin saptanması için daha kısa süre gerektirmesidir (43, 48). Daha önceki çoğu çalışma da bu bilgiyi desteklemektedir (35-37, 39, 40, 42, 44, 46, 50, 54). Bizim çalışmamızda da MTBC ortalama izolasyon süresi BACTEC MGIT 960 için 13,7 (5-35) gün, BACTEC 460TB için 14,6 (4-26) gün ve LJ besiyeri için 20,7 (12-43) gün olarak hesaplandı. Her iki sıvı bazlı kültür sisteminin de LJ besiyerinden anlamlı düzeyde hızlı olduğu görüldü (her ikisi için de  $P<0.001$ ). Her iki sistemin MTBC için ortalama izolasyon süreleri karşılaştırdığımızda ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı, ancak BACTEC MGIT 960

sisteminin ortalama izolasyon zamanı, BACTEC 460TB sisteminden 0.9 gün kısaydı. Bu sonuç daha önceki çoğu çalışma ile benzerdi (0.6-4.4 gün) (35-38, 40). BACTEC 460TB sistemindeki bu hafif gecikme iki sistem arasındaki okuma işlemindeki farklılıktan kaynaklanabilir (37, 50). Tam otomatize BACTEC MGIT 960 sisteminde şişeler 60 dakikada bir okunmakta ve üremenin gerçek zamanlı saptanmasına olanak sağlamaktadır. Oysaki yarı otomatize BACTEC 460TB sisteminde şişeler inokulasyondan sonraki ilk iki hafta haftada 3 kez, daha sonraki haftalarda ise haftada bir kez cihazda okutulmaktadır. Bu durum üremenin saptanmasında birkaç günlük bir gecikmeye neden olabilmektedir. Ayrıca çoğu çalışmada (37, 40) olduğu gibi bizim çalışmada da BACTEC 460TB sisteminde okutma sonucu elde edilen üreme indeksi (GI, Growth index) değeri  $\geq 10$ ' e ulaştığında pozitif kabul edilmedi, günlük okutmaya alındı,  $GI \geq 100$ ' e ulaştığında ise üreme pozitif olarak kabul edildi. Bu durum da üremenin saptanmasındaki birkaç günlük gecikmeyi açıklayabilir. Her iki sistemde de ARB yönünden mikroskopik inceleme sonucu yayma pozitif olan örneklerde ortalama izolasyon süresi (BACTEC MGIT 960 için 10.4 gün; BACTEC 460TB için 12.7 gün), yayma negatif olan örneklerdekine göre kısaydı (aynı sırayla, 17.5 gün; 17.4 gün). Yayma negatif örneklerde daha az sayıda bakteri olması, dolayısı ile de üremenin saptanmasının daha uzun zaman olması beklenen bir sonuçtu ve daha önceki çalışmalarla benzerdi (35, 38, 40, 48-50, 55). CDC (56) örnek kabul edildikten sonra 14 gün içinde *M.tuberculosis* pozitif kültür sonucunun raporlanmasını önermektedir. Bizim çalışmamızda BACTEC MGIT 960 sistemindeki MTBC pozitifliklerinin %50'si, BACTEC 460TB sisteminde ise %43'ü ilk iki haftada saptanmıştır. Fakat LJ besiyeri için bu oran çok daha düşüktür (%21). BACTEC MGIT 960 için bu oranı William-Bouyer ve arkadaşları (49) %69, Rodrigues ve arkadaşları (46) ise %91 olarak bulmuşlardır. Yayma pozitif örneklerde MTBC pozitifliklerinin BACTEC MGIT 960 sisteminde %71'i, BACTEC 460TB sisteminde %61'i, yayma negatif örneklerde ise sırasıyla %27'si ve %17'si ilk iki haftada saptanmıştır. Örneklerin türü de ortalama izolasyon zamanına etkili olabilir. Çalışmamızda solunum örneklerinde MTBC için ortalama izolasyon zamanı BACTEC MGIT



960 sisteminde 12.0 gün, 460TB sisteminde 14.3 gün; solunum dışı örneklerde ise aynı sırayla 17.5 gün ve 15.7 gün saptanmıştır. Rodrigues ve arkadaşları (46) BACTEC MGIT 960 sistemi için bu süreleri solunum örneklerinde 8.7 gün, solunum dışı örneklerde ise 13.2 gün bildirmişlerdir.

Çalışmamızda BACTEC MGIT 960 sisteminde kontaminasyon oranı (%6.6) BACTEC 460 TB sistemine göre yüksek bulunmuştur. Bu bulgu iki sistemi karşılaştıran daha önceki çalışmalarla benzerdir (35-38, 40, 43, 45). Daha önceki çalışmacılar bu farkın olası nedenlerinden biri olarak, BACTEC MGIT 960 sisteminde kullanılan besiyerinin (BBL MGIT 7ml), BACTEC 460 TB sisteminde kullanılan besiyerine (BACTEC 12B) göre daha zenginleştirilmiş olmasına bağlamışlardır. BBL MGIT 7ml besiyeri zengin içeriği ile dekontaminasyon işleminden kaçan ve antibiyotik supplementinden etkilenmeyen çoğu bakteri için uygun bir üreme ortamı oluştururken, BACTEC 12B besiyeri radyoaktif işaretli palmitik asit dışında çok az besin içermekte, bu substratı kullanamayan çoğu bakteri için optimal bir üreme ortamı oluşturmamakta ve sadece radyoaktif işaretli palmitik asit metabolize edebilen bakteriler saptanabilmektedir (35, 37, 38, 46). İki sistem arasındaki kontaminasyon oranının farkının diğer bir olası nedeni ise işlem farkıdır. BACTEC 460 TB sisteminde BACTEC 12B besiyeri lastik tıpalıdır, inokulasyon ve antibiyotik supplementi eklenmesi tüberkülin enjektörü ile yapılmakta ve kapakların açılması gerekmemektedir. Bu durumda çevresel kontaminasyon riski düşüktür, fakat enjektör kullanılması potansiyel olarak iş kazası riskini artırmakta, laboratuvar çalışanının güvenliğini azaltabilmektedir. Bu nedenle BACTEC MGIT 960 sisteminde BBL MGIT 7ml besiyeri vida kapaklı olarak üretilmiş, inokulasyon, zenginleştirici ve antibiyotik supplementlerinin ilavesi pipet ile yapılabilmektedir. Bu durum güvenlik yönünden bir avantaj oluşturmakla birlikte, vida kapak kullanımı çevresel kontaminasyon açısından büyük risk oluşturmaktadır ve yüksek kontaminasyon oranlarının nedenlerinden biri olduğu iddia edilmektedir (37, 54). Bazı çalışmalarda laboratuvar çalışanlarının sistemi kullanmaya başladıktan bir süre sonra vida kapak kullanımına alıştıkları ve kontaminasyon oranlarının düştüğünü belirtmişlerdir (37, 49). Bu da BACTEC

MGIT 960 sisteminde çalışılırken dikkatli işleme gerektiğini göstermektedir (46). Bizim çalışmamızda laboratuvar çalışanlarımız ilk defa BACTEC MGIT 960 sistemi ile çalışıyordu, bu durum çalışmamızda kontaminasyon oranının kabul edilebilir düzeyin (%5) biraz üzerinde (%6.6) çıkmasının nedenlerinden biri olabilir.

Çeşitli çalışmalarda BACTEC MGIT 960 sisteminde kontaminasyon oranı %3.3-%17.1 arasında bildirilmiştir (34-43, 45, 47-50, 55). Bu çalışmaların çoğunda dekontaminasyon amacı ile kullanılan NaOH konsantrasyonu belirtilmezken, bazılarında ise farklı konsantrasyonlarda NaOH kullanılmıştır. Biz çalışmamızda NaOH başlangıç konsantrasyonu olarak %4 oranını kullandık (final konsantrasyonu %1). Dekontaminasyonda kullanılan NaOH konsantrasyonu artırmak kontaminasyon oranını düşürmek için bir çözüm olabilir, ancak canlı mikobakteri sayısında azalmaya da neden olabilir. Bu nedenle Scarparo ve arkadaşları (35) sistemin kontaminasyon sorununun çözümü için NaOH konsantrasyonunu artırmak yerine kullanılan antibiyotik supplementinin uygun yeni antibiyotiklerin eklenmesi ile revizyonunun daha uygun bir çözüm olabileceğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde Alcaide ve arkadaşları (43) sistemler arasındaki antibiyotik supplement farklılıklarının da kontaminasyon oranlarındaki farklılığa neden olabileceğini bildirmişlerdir.

Çeşitli çalışmalardaki kontaminasyon oranlarındaki bu geniş varyasyonlara örneklerin farklı transport zamanı, farklı hasta popülasyonu, farklı örnek kalitesi ve koşullar neden olabilir (40, 50). Uzamış transport zamanı kontaminasyon oranını artırabilirken aynı zamanda izolasyon oranını da azaltabilir (40, 42, 47, 50). Bazı çalışmacılar, çalışmalarında örnek alındıktan sonra 24 saatten kısa sürede örneğin işlemlendiğini ve bunun çalışmalarında kontaminasyon oranının kabul edilebilir düzeyde olmasının nedenlerinden biri olduğunu belirtmişlerdir (40, 50). Pardini ve arkadaşları (47) da çalışmalarında; oda ısısında uzun süre bekleyen örneklerde, daha kısa sürede işlenen örneklerle göre kontaminasyon oranının daha yüksek, izolasyon oranının daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda bazı örneklerin alınmasından inokulasyona kadar olan süre 2 günü

aşmaktaydı. Leitritz ve arkadaşları çalışmalarında (36) BACTEC 460 TB sistemi ve LJ için transport süresi ile kontaminasyon oranı arasında anlamlı bir ilişki olmadığını, BACTEC MGIT 960 sistemi için ise lineer bir ilişki olmadığını bulmuşlardır. Rishi ve arkadaşları (42) çalışmalarındaki yüksek kontaminasyon oranının nedenlerinden birinin ülkelerindeki (Hindistan) sıcak iklim şartları olabileceğini belirmişlerdir. Bizim çalışmamızın gerçekleştiği bölge de (Manisa) Türkiye'nin oldukça sıcak bir bölgesidir.

Çalışmamızda örnek türüne göre kontaminasyon oranları farklılık gösterdi. BACTEC MGIT 960 ve BACTEC 460 TB sistemi için kontaminasyon oranları solunum yolu örneklerinde sırasıyla %6.9 ve %3.0 iken, solunum dışı örneklerde %5.9 ve %1.9 bulundu. Her iki sistem arasında istatistiksel olarak en anlamlı farklar solunum yolu örneklerinde balgam örneğinde (%9.5; %3.6), solunum dışı örneklerde ise idrar örneğinde gözlemlendi (%9.8; %3.3) ki en yüksek farklar BACTEC MGIT 960 sisteminde kontaminasyon ile sonuçlanan 70 örneğin 32'si balgam, 15'i idrar ve 10'u BAL örneğiydi. Hillemann ve arkadaşları (34) da benzer şekilde solunum dışı örneklerinde en yüksek kontaminasyon oranını dışkı (%30.8) ve idrar (%14.9) örneklerinde saptamışlar, yüksek bakteriyel yük nedeni ile bu durumun beklenen bir sonuç olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmalarında idrar ve dışkı örneklerini dahil etmediklerinde solunum dışı örneklerdeki kontaminasyon oranı %7.5'ten %2.7'ye düşmüştür. Bizim çalışmamızda kontaminasyon ve izolasyon oranlarının olumsuz etkileyeceği, ayrıca tüberküloz tanısında çok tercih edilen bir örnek olmadığı gerekçesiyle dışkı örnekleri çalışmaya alınmamıştır. Balgam örneklerinde ise örneğin kalitesi kontaminasyon oranını etkileyebilir. Huang ve arkadaşları (45) kalitesiz balgamlarda (skvamöz epitelyal hücre sayısı  $\leq 25$ /küçük büyütme alanı) kontaminasyon oranını %13.9 bulurken, kaliteli balgamlarda %7.0 bulmuşlar, bunun üzerine örnek alımından sorumlu personele ve hastalara eğitim seminerleri planlamışlardır. Rodriges ve arkadaşları (46) Direkt mikroskopik incelemesi negatif olan balgamların kontaminasyon oranını, pozitif olanlara göre daha yüksek bulmuş, ancak bizim çalışmamızda belirgin fark gözlenmemiştir (%9.5; %10.0).

Sıvı bazlı kültür sistemleri klinik örnekten mikobakterilerin izolasyon sürelerini kısaltabilir, ancak hastalığın etkin tedavisi için mikobakterilerin tanımlanması önemlidir. Ayrıca TDM enfeksiyonlarının insidansında da artış gözlenmektedir. Bu nedenle ARB üremesi saptanmış pozitif kültürlerde MTBC'nin TDM'lerden ayırımının yapılması gereklidir. Dünya Sağlık Örgütü bu ayırım için tüberküloz laboratuvarlarında hızlı ve uygun fiyatlı yöntemlerin kullanılması gerektiğini belirtmektedir. Geleneksel biyokimyasal identifikasyon testler zaman alan, zahmetli yöntemler, moleküler testler ise sofistike ve pahalı yöntemlerdir. NAP testi (BACTEC NAP TB Differentiation Test), uzun zamandır pozitif kültürden MTBC ile TDM ayırımını yapmak için başarıyla kullanılan, BACTEC 460 TB sistemi için standardize edilmiş, 2-7 günde sonuç veren bir testtir. Ancak bu test BACTEC MGIT 960 sisteminde kullanılamamaktadır. Aynı üretici firma, BACTEC MGIT 960 sisteminde kullanılabilen, anti-MPT64 monoklonal antikor kullanarak MTBC ile TDM ayırımını immunokromotografik olarak yapan, 15 dakikada sonuç veren bir test olan MIGT TBc ID (BD MGIT TBc Identification Test) testini piyasaya sürmüştür. MIGT TBc ID testi, MTBC üyelerince, üreme sırasında salınan MPT64 (MPB64) proteinini saptamaya dayalı bir testtir. (51, 57-63). Biz çalışmamızda NAP testi ve MIGT TBc ID testlerinin pozitif kültürden MTBC ve TDM ayırımı yapma performanslarını karşılaştırdık. Daha önceden Moleküler yöntemle (GenoType Mycobacterium CM test) tanımlanmış 30'u MTBC ve 21'si TDM 51 mikobakteri stok suşunun tamamı her iki test ile de doğru olarak tanımlandı (duyarlılık ve özgüllük %100). MIGT TBc ID testinin performansını araştıran daha önceki çalışmaların çoğu, çalışmamız ile benzer şekilde altın standart olarak moleküler yöntemleri kullanmışlar, testin duyarlılığını %95.2-%100 arasında, özgüllüğünü ise %92.4- %100 arasında bildirmişlerdir (31, 58, 60, 61, 63-65). MIGT TBc ID testi dışında, MPT64 saptamaya yönelik ticari immunokromotografik testlerin (ICA, immunochromatographic assay) başlıcaları Capilla TB test (Tauns, Numazu, Japan) ve SD TB Ag MPT64 rapid testdir (Standard Diagnostics, Seoul, South Korea). Çeşitli çalışmalarda tüm bu MPT64-ICA testlerin performansı MIGT TBc ID testine benzer bulunmuştur (57, 59, 61, 64-69). Bu

çalışmalarda MPT64-ICA testlerinin seyrek olarak yanlış negatif ve yanlış pozitif sonuçlar verebildiği gözlenmiştir. Yanlış negatif sonuçlar üç nedenle açıklanmaktadır; birinci neden mpt64 geninin mutasyon, insersiyon ve delesyonu, ikinci neden sıvı kültürde erken dönemlerdeki yetersiz üreme ( $<10^5$  CFU/ml), üçüncü neden ise bazı *M.bovis* BCG alt suşlarının MPT64 salgılamamasıdır. Nadiren görülen yanlış pozitiflik ise testin bazı TDM türleri (*M.marinum*, *M.flavescens*, *M.avium* kompleks, *M.chelonae*) ile seyrek olarak çapraz reaksiyon verebilmesidir (31, 57, 58, 60, 64, 69). Yüksek performansına ek olarak MIGT TBc ID testi, NAP testi ile karşılaştırıldığında daha hızlı, uygulaması ve yorumlaması kolay daha basit, ek cihaz gerektirmeyen ve daha ucuz bir testtir.

*Mycobacterium tuberculosis* izolatlarının primer antitüberküloz ilaç direncinin doğru ve hızlı saptanması, hastaların etkin tedavisi ve direncin yayılımının önlenmesinde önemlidir. Sıvı besiyeri bazlı kültür sistemlerinin duyarlılık testinde kullanılması CDC'nin önerdiği duyarlılık testi raporlama süresin yakalanmasını sağlamıştır. BACTEC 460TB sistemi yaklaşık 25 yıldır MTBC izolatlarının duyarlılığını test etmede yaygın olarak kullanılan ve standart kabul edilen bir yöntemdir (56, 70-73)). Biz çalışmamızda, BACTEC MGIT 960 sisteminin, MTBC suşlarının primer antitüberküloz ilaçlara (SM, INH, RIF ve EMB) karşı duyarlılık testi performansını referans yöntem olarak BACTEC 460TB sistemi ile karşılaştırdık. Karşılaştırma sadece kritik konsantrasyonlarda yapıldı (BACTEC 460TB sistem için; SM 2 µg/ml, INH 0.1 µg/ml, RIF 2 µg/ml, EMB 2.5 µg/ml, BACTEC MGIT 960 sistem için; SM 1 µg/ml, INH 0.1 µg/ml, RIF 1 µg/ml, EMB 5 µg/ml) Test edilen 50 suşun 39'u (%78) için her iki sistem arasında sonuçların tam uyumlu olduğu görüldü. Scarparo ve arkadaşları (73) da bu oranı %74 olarak bildirmişlerdir. Her ilaç için yapılan toplam 200 test göz önüne alındığında, her iki sistem arasındaki genel uyum %94.5 bulundu. Yanlış duyarlı sonuçlar (çok büyük hata, very major error, VME) anti-TB kemoterapisinin başarısızlığı ile sonuçlanabilen ciddi bir sorunu gösterir. Başarı ile kullanılabilecek bir ilacı etkisiz olarak nitelendiren yanlış dirençli sonuçlar (büyük hata, major error, ME) ise daha az ciddi bir sorunu gösterir. BACTEC 460TB sistemi ile alınan sonuçları

referans kabul ettiğimizde, BACTEC MGIT 960 sistem ile bir VME, 10 ME elde edildi. Tek çok büyük hata EMB için saptanırken, büyük hataların biri EMB için 9'u ise SM için saptandı. Daha önce ki çalışmalarda da iki sistem arasındaki en büyük uyumsuzluklar sırasıyla SM, EMB ve INH için bildirilmiştir (70, 71, 73, 74). Çalışmamızda RIF ve INH için her iki sistem ile alınan sonuçlar arasında tam uyum (%100) elde edilirken, EMB için %96.0, SM için %82.0 uyum saptandı. Daha önceki çalışmalar her iki sistem ile alınan sonuçlar arasında tam uyumu RIF için %98.0-%100.0, INH için %96.0-%98.7, EMB için %96.2-%98.8, SM için ise %91.8-%98.5 arasında bildirmişlerdir (71-76). Bu çalışmaların bazılarında uyumsuz sonuçlar farklı bir referans yöntem ile (genellikle agar proporsiyon yöntemi) doğrulanmış ve bazı hatalı sonuçların BACTEC 460TB sisteminden kaynaklandığı tesbit edilmiştir (72, 73, 76). Ancak bizim çalışmada uyumsuz sonuçlar için farklı bir referans yöntem kullanılmadı.

Piersimoni ve arkadaşları (70) hatalı sonuçlara neden olabilecek dört noktaya dikkat edilmesi gerektiğini belirtmişlerdir; i) kültürün saflığı, ii) mikobakteriyel süspansiyonun homojenitesi, iii) inokulum miktarı, ve iv) inokulasyon işlemi sırasında besiyerinin çevresel kontaminasyonu. BACTEC MGIT 960 sistemi çevresel kontaminasyona BACTEC 460TB sistemine göre daha açıktır. Dolayısı ile duyarlılık testi sırasında besiyerinin kontamine olması ise ME sonuçlara neden olabilir. Benzer şekilde inokulum kaynağının saf olmaması da hatalı sonuçlara neden olabilir. Ayrıca enjektör yerine pipet kullanılan BACTEC MGIT 960 sisteminde iyi homojenize edilmeyen süspansiyondaki mikobakteriyel kümeler pipetle alınabilir ve hatalı sonuçlara neden olabilir (70, 71). Ancak bizim çalışmamızda ME sonuçlarının sadece iki ilaç için, özellikle büyük çoğunluğunun SM için elde edilmesi, bu sayılan etkenlere bağlı olamayacağını düşündürmektedir. En olası neden iki sistem arasında kritik konsantrasyon farklılığı olabilir. BACTEC MGIT 960 sisteminde VME sonuçlardan kaçınmak amacı ile üç ilacın kritik konsantrasyonu BACTEC 460TB sistemininkine göre daha düşük önerilmiştir (25), bu durum SM ve EMB için alınan ME sonuçları açıklayabilir (71). Garrigo ve arkadaşları (71) hatalı sonuç elde edilen çoğu suşun MİC

(minimal inhibitör konsantrasyon) değerlerinin kritik konsantrasyona yakın olduğunu bildirmişlerdir. Bu veri de yukardaki görüşü desteklemektedir.

Çalışmamızın analizinde, duyarlılık testinde her iki sistem arasında RIF, INH ve EMB için iyi bir uyum olduğu (sırasıyla  $\kappa=1$ ; 1; 0.83 ), SM için ise orta düzeyde bir uyum ( $\kappa=0.60$ ) olduğu hesaplandı. BACTEC MGIT 960 sisteminin özellikle dirençli suşları saptamada yüksek duyarlılık gösterdiği (SM, RIF, INH için duyarlılık %100.0, EMB için %85.7) görüldü. Test ettiğimiz suşlar içinde EMB'ye karşı dirençli olanların sayısının az olması (n=7, %14), sadece bir tane yanlış duyarlı sonucun duyarlılığı düşürmesine neden oldu. Piersimoni (70) çoğu çalışmada yetersiz sayıda dirençli izolat kullanılmasının hatalı sonuç oranını olumsuz etkilediğini, uygun sayıda (yaklaşık %30'u dirençli) dirençli izolat test edilmez ise bilimsel olarak doğru oranlara ve değerlendirmelere ulaşılamayacağını iddia etmiştir. Biz çalışmamızda diğer üç ilaç için bu oranı yakaladık ancak EMB için bu oranın altında kaldık.

## VI. SONUÇ VE ÖNERİLER

BACTEC 460TB sisteminin klinik kullanımdan çekilmesi nedeniyle, sıvı kültür sistemleri kullanan laboratuvarlarda MGIT BACTEC 960 sisteminin, klinik örnekten MTBC izolasyonunda ve MTBC izolatlarının primer seçenek ilaçlara karşı duyarlılıklarının belirlenmesinde BACTEC 460TB sistemine alternatif olarak kullanılabileceği, MTBC identifikasyonu için NAP testi yerine BD MGIT Tbc testinin uygulanabileceği sonucuna varılmıştır. Ancak sistemin kontaminasyon sorununun iyileştirilmesi ve özellikle SM olmak üzere kritik konsantrasyonların revize edilmesi gerektiği düşünüldü.



## VII. ÖZET

Çalışmada BACTEC MGIT 960 ve BACTEC 460TB kültür sistemlerinin, klinik örneklerden *M.tuberculosis* kompleks (MTBC) izolasyonu, identifikasyonu ve antitüberküloz ilaç duyarlılık test performanslarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya alınan 694'ü solunum, 372'si solunum yolu dışı olmak üzere toplam 1066 klinik örneğin MGIT 960 ve BACTEC 460TB sisteminde ve Löwenstein-Jensen (LJ) besiyeri kullanılarak yapılan kültürlerinde MTBC izolasyon oranı MGIT 960, BACTEC 460TB ve LJ besiyerinde sırasıyla %86,5 (n=32), %83,8 (n=31) ve %54,0 (n=20) olarak bulunmuştur. Ortalama izolasyon süresi aynı sıra ile 13,7 (5-35) gün, 14,6 (4-26) gün ve 20,7 (12-43) gündür. Kontaminasyon oranları ise %6,6 ,%2,6 ve %7,7 olarak hesaplanmıştır. İdentifikasyon karşılaştırması için 30'u MTBC ve 21'si Tüberküloz Dışı Mikobakteri (TDM) olmak üzere toplam 51 mikobakteri suşunun her iki sistem ile kültür sonrası yapılan identifikasyonlarında TBc ID testi (BD MGIT TBc Identification Test) ve NAP testi (BACTEC NAP TB Differentiation Test) ile tamamı doğru olarak tanımlanmıştır. Elli *M.tuberculosis* suşunun streptomisin (SM), izoniazid (INH), rifampisin (RIF) ve etambutole (EMB) karşı duyarlılıkları her iki sistemle araştırılmış, duyarlılık test sonuçları arasında uyum SM, INH, RIF ve EMB için sırasıyla %82, %100, %100, %96 bulunmuştur.

Sonuç olarak her iki sistem arasında, klinik örnekten MTBC izolasyonu ve identifikasyon performansları yönünden istatistiksel fark olmadığı, ancak BACTEC MGIT 960 sisteminde kontaminasyon oranının anlamlı düzeyde yüksek olduğu görülmüştür. Duyarlılık açısından ise iki sistem arasında sadece SM sonuçlarının orta düzeyde uyum olduğu, RIF, INH ve EMB için yüksek düzeyde uyum olduğu görülmüştür.

Anahtar kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis* kompleks, BACTEC MGIT 960, BACTEC 460TB, kültür, identifikasyon

## VIII. SUMMARY

### **Comparison of the BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460TB culture systems for recovery, identification and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis***

In the present study, it was aimed to compare the performances of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460TB culture systems in terms of isolation of *M.tuberculosis* complex (MTBC) from clinical specimens, identification, and anti-tuberculosis drug susceptibility testing.

A total of 1066 clinical specimens, 694 respiratory and 372 non-respiratory, were cultured by using BACTEC MGIT 960, BACTEC 460TB and Lowenstein-Jensen (LJ) medium. The recovery rates, respectively, were 86.5% (n = 32), 83.8% (n = 31) and 54.0% (n = 20), for MTBC. The mean detection times for MTBC were 13.7 (5-35) days, 14.6 (4-26) days and 20.7 (12-43) days; the contamination rates were 6.6%, 2.6% and 7.7% respectively, in the same order. Fifty-one mycobacteria strains, 30 MTBC and 21 nontuberculous mycobacteria (NTM) were selected for evaluation of identification. Following culture in both of the system, strains were tested by using TBc ID test (BD MGIT TBc Identification Test) and the NAP test (BACTEC NAP TB Differentiation test), and consequently all were determined to be identified correctly. Drug susceptibilities of the 50 *M.tuberculosis* strains against streptomycin (SM), isoniazid (INH), rifampin (RIF) and ethambutol (EMB) were investigated by using both two systems. The compatibility between the susceptibility test results were determined as 82%, 100%, 100%, 96% for SM, INH, RIF and EMB, respectively.

In conclusion, no statistical difference was detected in terms of the isolation of MTBC from clinical specimens and identification performances between the two systems, however, contamination rate were noted significantly higher in the MGIT BACTEC 960 system compared to BACTEC 460TB. Regarding susceptibility performance, Moderate agreement of results for SM and very good agreement for RIF, INH and EMB between two systems were found.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis* complex, BACTEC MGIT 960, BACTEC 460TB, culture, identification.

## IX. KAYNAKLAR

1. Murray P R, Baron E J, Jorgensen J H , Landry M L,. Pfaller M A (eds), [Başustaoğlu A (çev. editörü)]. Klinik Mikrobiyoloji (Manual of Clinical Microbiology). 2009, Cilt 1,36, [543-601] [1223-47].
2. World Health Organization: Global Tuberculosis Control, Surveillance , Planning, Financing. WHO Report 2008. Geneva.
3. Montoro E, Rodriguez R. Global Burden of Tuberculosis. In: Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. Tuberculosis 2007 From basic science to patient care. 2007; 263-82.
4. Özkütük, N. Mikobakteriler. In: M. Altındış (ed), Hemşireler için Mikrobiyoloji, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri; 2010: 217-228.
5. 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.
6. Alp A. Mikobakterilerin tanı ve identifikasyonunda moleküler yöntemler. 3. Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Program ve Bildiri Özet Kitabı, Ankara, 2004: 95-99.
7. Babacan F, Hasdemir U. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (editörler). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3. baskı. İstanbul:Nobel kitapevleri; 2008: 2283-302.



18. Verem Savaşı Daire Başkanlığı. Türkiye’de Verem Savaşı, 2011 Raporu. Ankara, 2011.
19. CLSI, Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard. CLSI document M24-A, Pennsylvania, 2003.
20. Erturan Z. Antitüberküloz İlaçlar. İnfeksi Derg 1997; 11:35-42.
21. WHO. Guidelines for drug susceptibility testing for secondline anti-tuberculosis drugs for DOTS-PLUS. WHO/CDS/ TB/2001. 288; World Health Organization, 2001.
22. Woods GL. Susceptibility Testing for Mycobacteria. Clin Infect Dis. 2000; 31: 1209-15.
23. Klimik Derneği Tüberküloz Çalışma Grubu. VI. Tüberküloz Sempozyumu/ IX. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kursu Kitabı. İzmir/Manisa. 2011.
24. Klimik Derneği Tüberküloz Çalışma Grubu. 21. yy da tüberküloz Sempozyumu/ II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu Kitabı. Samsun. 2003.
25. Isenberg HD (ed). Clinical Microbiology Procedures Handbook. New York. Second edition. Washington, D.C., ASM; 2004.
26. Washington WJ. Stephen A, William J, et al. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6.ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2006; 1065-1124.
27. Baylan O. Tüberkülozun kültüre dayalı tanı yöntemleri Mikrobiyol Bul. 2005;39:107-124.
28. CLSI. Laboratory Detection and Identification of Mycobacteria; Approved Guideline. CLSI document M48-A, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
29. Siddiqi SH. BACTEC 460TB System Product and Procedure Manual. Becton Dickinson and Company Maryland, USA, 1996.

30. BACTEC MGIT 960 System, User's Manuel. Becton Dickinson. Sparks, Maryland, USA 2004.
31. Martin A, Bombeeck D, Fissette K, et al. Evaluation of the BD MGIT TBc Identification Test (TBc ID), a rapid chromatographic immunoassay for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex from liquid culture. *Journal of Microbiological Methods*. 2011; 84: 255–257.
32. BD MGIT TBc Identification Test, User's Manuel. BD and Company, Sparks, Maryland, USA 2009.
33. GenoType Mycobacterium CM, User's Manuel. Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany 2007.
34. Hillemann D, Richter E, Rusch-Gerdes S. Use of the BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 Automated System for Recovery of Mycobacteria from 9,558 Extrapulmonary Specimens, Including Urine Samples. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 11 (44), 4014-4017.
35. Scarparoa C, Piccolia P, Ri A. Evaluation of the BACTEC MGIT 960 in comparison with BACTEC 460 TB for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2002; 44: 157-161.
36. Leitritz L, Schubert S, Bücherl B, Masch A, Heesemann J, Roggenkamp A. Evaluation of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460TB Systems for Recovery of Mycobacteria from Clinical Specimens of a University Hospital with Low Incidence of Tuberculosis. *Journal Of Clinical Microbiology*. 2001; 39: 3764-3767.
37. Tortoli E, Cichero P, Piersimoni C, Simonetti M T, Gesu G, Nista D. Use of BACTEC MGIT 960 for Recovery of Mycobacteria from Clinical Specimens: Multicenter Study. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999; 37: 3578-3582.
38. Hanna B A, Ebrahimzadeh A, Elliott B, Morgan M A, Novak S M, Rusch-Gerdes S, et al. Multicenter Evaluation of the BACTEC MGIT

- 960 System for Recovery of Mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999; 37: 748-752.
39. Otu J, Antonio M, Cheung Y B, Donkor S, De Jong B C, Corrah T, et al. Comparative evaluation of BACTEC MGIT 960 with BACTEC 9000 MB and LJ for isolation of mycobacteria in The Gambia. *J Infect Developing Countries*. 2008; 2(3): 200-205.
  40. Somoskövi A, Ködmön C, Lantos A, Bartfai Z, Tamasi L, Füzy J, et al. Comparison of Recoveries of Mycobacterium tuberculosis Using the Automated BACTEC MGIT 960 System, the BACTEC 460 TB System, and Löwenstein-Jensen Medium. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000; 38: 2395-2397.
  41. Yan JJ, et al. Comparison of the MB/BacT and BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2000; 37: 25-30.
  42. Rishi S, Sinha P, Malhotra B, Pal N. A comparative study for the detection of mycobacteria by bactec MGIT 960, lowenstein jensen media and direct AFB smear examination. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2007; 25: 383-386.
  43. Alcaide F, Benitez M A, Escriba J M, Martin R. Evaluation of the BACTEC MGIT 960 and the MB/BacT Systems for Recovery of Mycobacteria from Clinical Specimens and for Species Identification by DNA AccuProbe. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000; 38: 398-401
  44. Cruciani M, Scarparo C, Malena M, Bosco O, Serpelloni G, Mengoli C. Meta-Analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without Solid Media, for Detection of Mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004; 42: 2321-2325.
  45. Huang T S, Chen C S, Lee S S, Huang W K, Liu Y C. Comparison of the BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460TB Systems for Detection of Mycobacteria in Clinical Specimens. *Annals of Clinical & Laboratory Science*. 2001; 31: 279-283.



46. Rodrigues C, Shenai S, Sadani M, Sukhadia N, Jani M, Ajbani K, et al. Evaluation of the bactec MGIT 960 TB system for recovery and identification of Mycobacterium tuberculosis complex in a high volume tertiary care centre. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2009; 27: 217-221.
47. Pardini M, Varaine F, Bonnet M, Orefici G, Oggioni M R, Fattorini L, et al. Usefulness of the BACTEC MGIT 960 System for Isolation of Mycobacterium tuberculosis from Sputa Subjected to Long-Term Storage. *Journal Of Clinical Microbiology*. 2007; 45: 575-576
48. Idigoras P, Beristain X, Iturzaeta A, Vicente D, Perez Trallero E. Comparison of the Automated Nonradiometric Bactec MGIT 960 System with Löwenstein-Jensen, Coletsos, and Middlebrook 7H11 Solid Media for Recovery of Mycobacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000; 19: 350-354.
49. Williams Bouyer N, et al. Comparison of the BACTEC MGIT 960 and ESP Culture System II for Growth and Detection of Mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000; 38: 4167-4170.
50. Chien H P, Yu M C, Wu M H, Lin T P, Luh K T. Comparison of the BACTEC MGIT 960 with Löwenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2000; 4(9): 866-870.
51. World Health Organization. Use of liquid TB culture and drug susceptibility testing (DST) in low and medium income countries: summary report of the expert group meeting on the use of liquid culture media. : World Health Organization, Geneva, Switzerland., 2007.
52. World Health Organization. A Roadmap for Ensuring Quality Tuberculosis Diagnostics Services within National Laboratory Strategic Plans. World Health Organization, Geneva, Switzerland., 2010.

53. World Health Organization. Policy framework for implementing new tuberculosis diagnostics. World Health Organization, Geneva, Switzerland., 2010
54. Sorlazano A, Soria I, Roman J, Huertas P, Soto M J, Piedrola G, et al. Comparative Evaluation of Three Culture Methods for the Isolation of. J. Microbiol. Biotechnol. 2009; 19: 1259-1264
55. Flanagan P G, Williams R, Paull A. Comparison of Two Automated Systems for the Isolation of Mycobacteria from Clinical Specimens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1999; 18: 912-914.
56. Tenover F, Crawford J, Huebner R, Geiter L, Horsburgh C, Good R. The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? J. Clin. Microbiol. 1993; 31: 767-770.
57. Marzouk M, Kahla I, Hannachi N, Ferjeni A, Salma W B, Ghezal S, et al. Evaluation of an immunochromatographic assay for rapid identification of Mycobacterium tuberculosis complex in clinical isolates. Diagnostic Microbiology and Infections Disease. 2011; 69: 396-399
58. Lu D, Heeren B, Dunne W M. Comparison of the Automated Mycobacteria Growth Indicator Tube System (BACTEC 960/MGIT). American Society for Clinical Pathology. 2002; 118: 542-545
59. Ismail N A, Baba K, Pombo D, Hoosen A A. Use of an immunochromatographic kit for the rapid detection of Mycobacterium tuberculosis from broth cultures. Int J Tuberc Lung Dis. 2009; 13: 1045-1047.
60. Yu M C, et al. Evaluation of the Rapid MGIT TBc Identification Test for Culture Confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strain Detection. J. Clin. Microbiol. 2010; 49: 802-807.
61. Said H, Ismail N, Osman A, Velsman C, Hoosen A. Evaluation of TBc Identification Immunochromatographic Assay for Rapid Identification of Mycobacterium tuberculosis Complex in Samples from Broth Cultures. J. Clin. Microbiol. 2011; 49: 1939-1942.

62. Sharma B, Pal N, Malhotra B, Vyas L. Evaluation of a Rapid Differentiation Test for *Mycobacterium tuberculosis* from other *Mycobacteria* by Selective Inhibition with p-nitrobenzoic acid using MGIT 960. *Journal of Laboratory Physicians*. 2010; 2: 89-92.
63. García-Martos P, García-Agudo L, Rodríguez-Jiménez M, Rodríguez-Iglesias M. Rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex from broth cultures by immunochromatographic assay. *Rev Esp Quimioter*. 2010; 23: 206-209
64. Gaillard T, Fabre M, Martinaud C, Vong R, Brisou P, Soler C. Assessment of the SD Bioline Ag MPT64 Rapid™ and the MGIT™ TBc identification tests for the diagnosis of tuberculosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2011; 70: 154-156.
65. Brent A, Mugo D, Musyimi R, Mutiso A, Morpeth S, Levin M, et al. Performance of the MGIT TBc Identification Test and Meta-Analysis of MPT64 Assays for Identification of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Liquid Cultu. *J. Clin. Microbiol*. 2011;49: 4343-4346.
66. Fabre M, Vong R, Gaillard T, Merens A, Gerome P, Saint-Blancard P, et al. Evaluation of the SD BIOLINE TB Ag MPT64 Rapid for the diagnosis of tuberculosis. *Pathologie Biologie*. 2011; 59: 26-28
67. Abe C, Hirano K, Tomiyama T. Simple and Rapid Identification of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex by Immunochromatographic Assay Using Anti-MPB64 Monoclonal Antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999; 37: 3693-3697.
68. Kurtoğlu M, Özdemir M, Keşli R, Özkalp B, Baysal B. Tüberküloz Şüpheli Hastalardan *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks İzolasyon Oranı ve Suşların BACTEC NAP ve İmmünokromatografik TB Ag MPT64 rapid Testleri ile Tanımlanması. *Mikrobiyol Bül*. 2011; 45: 266-273.
69. Hasegawa N, Miura T, Ishii K. New Simple and Rapid Test for Culture Confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* Complex: a Multicenter Study. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40: 908-912.

70. Piersimoni C, Olivieri A, Benacchio L, Scarparo C. Current Perspectives on Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Complex: the Automated Nonradiometric Systems. J. Clin. Microbiol. 2006; 44: 20-28.
71. Garrigo M, Aragon L M, Alcaide F, et.al. Multicenter Laboratory Evaluation of the MB/BacT Mycobacterium Detection System and the BACTEC MGIT 960 System in Comparison with the BACTEC 460TB System for Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Clinical Microbiology. 2007; 45: 1766-1770.
72. Tortoli E, Benedetti M, Fontanelli A, Simonetti M T. Evaluation of Automated BACTEC MGIT 960 System for Testing Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Four Major Antituberculous Drugs: Comparison with the Radiometric BACTEC 460TB Method and the Agar Plate Method of Proportion. 2002; 40: 607-610.
73. Scarparo C, Ricordi P, Ruggiero G, Piccoli P. Evaluation of the Fully Automated BACTEC MGIT 960 System for Testing Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. Journal Of Clinical Microbiology. 2004; 42: 1109-1114.
74. Ardito F, Posterano B, Sanguinetti M. Evaluation of BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT 960) Automated System for Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Clinical Microbiology. 2001; 39: 4440-4444.
75. Sınırtaş M, Özakin C, Gedikoğlu S. Mikobakterilerin Majör Antitüberküloz İlaçlara Duyarlılığının Otomatize Bactec MGIT 960 Sistemi İle Araştırılması Ve Radyometrik Bactec 460 Tb Sistemi İle Karşılaştırılması. Mikrobiyoloji Bül. 2009; 43: 403-409.
76. Bemer P, Palicova C, Rüsç-Gerdes S, Dugeon H B, Pfyffer G. E. Multicenter Evaluation of Fully Automated BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 System for Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Journal Of Clinical Microbiology. 2002; 40: 150-154.