

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
SUŞLARININ MGIT 960 SİSTEMİYLE PRİMER
ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA DİRENCİNİN
ARAŞTIRILMASI

MEVLİYE ZEKİ
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Fadile YILDIZ ZEYREK

Bu tez, Harran Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı tarafından 1115 proje numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA

2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
TABLolar DİZİNİ	İv
RESİMLER DİZİNİ	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR	Vİİ
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Tarihçe	5
2.2. Sınıflandırma	7
2.3. Genel Mikrobiyolojik Özellikler	9
2.4. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Kompleksinin Mikrobiyolojik Özellikleri	12
2.4.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
2.4.2. <i>Mycobacterium bovis</i>	13
2.4.3. <i>Mycobacterium africanum</i>	13
2.4.4. <i>Mycobacterium microti</i>	13
2.4.5. <i>Mycobacterium canettii</i>	13

2.4.6. Kùltür Özellikleri	14
2.5. Antijenik Yapı	14
2.5.1. Mikobakteriyel proteinler	14
2.6. Patogenez ve virulans	16
2.6.1. Mikobakteriyel lipidler	17
2.6.2. Mikobakteriyel polisakkaridler	18
2.6.3. Mikobakteriyel proteinler	18
2.7. Immunopatogenez	18
2.7.1. M. tuberculosis'in savunma ve virulans faktörleri (Perzistans faktörleri)	21
2.8. Epidemiyoloji	22
2.8.1. Dünyada Tùberküloz	24
2.8.2. Ùlkemizde Tùberküloz	26
2.9. Klinik Tabloları	27
2.9.1. Primer Tùberküloz (Çocuk Tùberküloz).....	28
2.9.1.1. Miliyer Tùberküloz	28
2.9.2. Sekonder Tùberküloz	29
2.9.2.1. Endoljen Tùberküloz	29
2.9.2.2. Ekzojen Tùberküloz	29
2.9.3. Ekstrapulmoner tùberküloz	29
2.10. Laboratuvar Tanı	30
2.10.1. Klinik Materyalin Hastadan Alınması ve Laboratuvara gönderilmesi	30

2.10.2. Mikroskopik İnceleme	32
2.10.3. Klinik Örneklerin İşlenmesi	35
2.10.4 Kültür Yöntemleri	38
2.10.4.1 Konvansiyonel Kültür Yöntemleri ve Besiyerleri	38
2.10.4.2. Hızlı Kültür Yöntemleri	41
2.10.5. İdentifikasyon	44
2.10.5.1 <i>M.tuberculosis</i> kompleks'in Fenotipik İdentifikasyonu	44
2.10.5.2. <i>M. tuberculosis</i> kompleks'in Genotipik İdentifikasyonu	45
2.10.6 <i>M.tuberculosis</i> kompleks'in Tanısında Moleküler Yöntemleri	45
2.11. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	46
2.11.1. Klasik Kültür Yöntemleri ile Yapılan Duyarlılık Testleri	47
2.11.2.Hızlı Kültür Yöntemleri ile Yapılan Duyarlılık Testleri	49
2.11.3. Kültür Dışı Yöntemler	51
2.11.4 E Test	52
2.12 Mikobakteri Antimikrobiyal Duyarlılık Belirlenmesinde Kullanılan Genotipik Yöntemler	53

2.13. Tedavi	53
2.13.1 Birinci Seçenek Antitüberküloz İlaçlar	53
2.13.2. İkinci Seçenek İlaçlar	55
2.14. <i>M. tuberculosis</i> ve İlaç Direnci	56
2.14.1. İlaç Direnciyle İlgili Tanımlar	58
2.14.2. Dünyada İlaç Direnci	59
2.14.3 Türkiye’de İlaç Direnci	60
2.15. Korunma ve Kontrol	60
2.15.1. Birincil Koruma	61
2.15.2. İkincil Koruma	61
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	62
3.1. Örneklerin İşlenmesi	62
3.1.1. Kullanılan Malzemeler	63
3.1.2. Homojenizasyon ve Dekontaminasyon	63
3.1.2.1. NALC – NaOH Yöntemi	63
3.1.2.2. Homojenizasyon ve Dekontaminasyon	
İşleminin Yapılışı	65
3.1.3. Boyama ve Mikroskopik İnceleme	65
3.1.3.1. Kullanılan Malzemeler	65
3.1.3.2. EZN Boya Solusyonlarının Hazırlanması	66
3.1.3.3. Homojenizasyon - Dekontaminasyon Sonrası	
Hazırlanan Yayma	67

3.1.3.4. Değerlendirme	68
3.1.4. Kültür.....	68
3.1.4.1. Löwenstein-Jensen (L-J) Besiyerine Ekim ve Kültürlerin İnkübasyonu	68
3.1.4.2. Kültür Pozitif Suşların Saklanması ve Pasajlanması	69
3.1.5. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	69
3.1.5.1. Kullanılan Malzemeler	69
3.1.5.2. L-J ‘den Middlebrook 7H9 ‘a pasajlayarak BACTEC MGIT 960 Cihazında retme	70
3.1.5.3 İdentifikasyon	71
3.1.5.4 NAP Testi (p-nitro-P-acetylamino-Q- hydroxypropiofenone)	71
3.1.5.5 Antibiyotik Solüsyonlarının Hazırlanması	72
3.1.5.6 Antibiyogram işlemi	72
3.1.5.7 Sonuçların Değerlendirilmesi	73
3.1.6. Kalite Kontrol	73
3.1.7. İstatistiksel Analizler	74
4. BULGULAR	75
5. TARTIşMA ve SONUÇ.....	84
6. KAYNAKLAR.....	92

ÖZET

***MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* SUŞLARINDA PRİMER ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇ DİRENCİNİN BACTEC MGIT 960 SİSTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

İnsanlık tarihi kadar eski bir hastalık olan tüberkülozun günümüzde de önemi hala devam etmektedir. Halen dünyada ölüm sebepleri arasında ikinci, infeksiyöz nedene bağlı ölümler arasında ilk sıradadır. Bu çalışmada Şanlıurfa ilinde, Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilimdalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarında Ocak 2005-Aralık 2010 yılları arasında izole edilmiş olan 60 *M. tuberculosis* susunun primer antitüberküloz ilaçlara direncinin BACTEC MGIT 960 sistemiyle belirlenmesi amaçladık.

Suşların izole edildikleri hastaların yaş ortalaması 37.5 ± 1.9 (1-74 yaş) olarak bulundu. Suşların % 76.7'si balgamdan, %10.0'ı bronkoalveoler lavaj sıvısından, %3.3'ü periton sıvısından, %6.7'si mide açlık sıvısından ve %3.3'ü abseden izole edildi.

Suşların 36'sı (% 60.0) primer antitüberküloz ilaçların tümüne duyarlı iken, 24'ü (% 40.0) en az bir ve daha fazla antitüberküloz ilaca dirençli bulundu. Değerlendirmeye alınan suşlar için genel direnç oranları streptomisin 4(%6.6), izoniyazid 10(16.7) , rifampisin 3(%5.0), etambutol 1 (%1.7) ve toplam tek ilaca direnç 18(%30) olarak bulundu. Ayrıca STR-İNH' a dirençli 1 suş ve (%1.7),İNH-RİF'e dirençli 2 suş(8%3.3),RİF-EMB'ye dirençli 2 suş (%3.3) ve STR-İNH-EMB'ye dirençli 1 suş (%1.7) tesbit ettik. Sadece streptomisine dirençli suş 6 (% 10.0), sadece izoniyazide dirençli suş 13 (% 21.7), sadece rifampisine dirençli suş 0 (% 13.3) ve sadece etambutole dirençli suş 3 (% 5.0)

olarak bulundu. En yüksek direnç izoniyazid ve rifampisine karşı bulundu. Direnç oranlarımız Türkiye ortalaması için orta üst düzeydedir.

Bu çalışmada amaçlanan; Şanlıurfa yöresinde tespit edilen *M.tuberculosis* kompleks suşlarının, tedavide ilk seçilecek ilaçlar olan dört major Türkiye anti-tüberküloz ilaca karşı direnç profillerini ortaya koymak ve Türkiye verilerine katkı sağlamaktır.

Anahtar kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis* kompleks, primer antitüberküloz ilaçları, tekli ilaç direnci, çoklu ilaç direnci, BACTEC MGIT 960 sistemi

ABSTRACT

INVESTIGATION OF PRIMARY ANTITUBERCULOSIS DRUG RESISTANCE USING BACTEC MGIT 960 SYSTEM IN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* STRAINS

Tuberculosis as a disease as old as human history, is still keeping its importance. It is still first reason in infectious deaths and second in all deaths among the whole world.

In this study it is targeted to determine primary antituberculosis drug resistance of 60 *Mycobacterium tuberculosis* strains using BACTEC MGIT 960 system in Şanlıurfa Harran University Medical Faculty Microbiology and Clinical Microbiology Department in 2005-2010

It was targeted to make the drug resistance from the patients that diagnosed tuberculosis recently. The mean patient age the strains were isolated were 35.2 ± 18 (1-74 age) the strains were isolated consequently % 76.7 from sputulum %10.0 from bronchoalveolar lavage fluid, %3.3 from the peritoneal fluid, %6.7 from the fasting gastric fluid and %3.3 from the abscess.

Although 36 (%60) of the strains were sensitive to the all primary antituberculosis drugs, 24 (%40) were found to be resistant to one or more antituberculosis drugs.

General resistance rates of the strains to streptomycin, isoniazid, rifampicin, ethambutol and multidrug resistance were found to be %6.6, %5.0, %1.7 and %10.0 respectively.

It was estimated only streptomycin resistant strain as 6 (%10.0), only isoniazid resistant strain as 13 (%21.7), only rifampicine resistant strain as 8(%13.3) and only ethambutole resistant strains as 3 (%5.0).

Maximum resistance is found to be isoniaside and rifampicine.

The goal of this study is to estimate the resistance profiles of 4 major antituberculosis drugs that is to be choser to cure M.tuberculosis kompleks strains diagnosed around Şanlıurfa and to contribute to Turkey's datas.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis* kompleks, primary antituberculosis drugs, single drugs resistant,multidrug resistant, BACTEC MGIT 960 systems.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince bilgi ve desteğini esirgemeyen, beni büyük bir ilgi ve sevgiyle destekleyen, titizliği ile bize her zaman örnek olan değerli tez danışmanı hocam Doç. Dr. Fadile YILDIZ ZEYREK'E en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda çalışmaya başladığım ilk günden beri sürekli destek ve teşviklerini gördüğüm, uzmanlık eğitimimde büyük katkısı bulunan Anabilim Dalı Başkanı hocamız Sayın Prof. Dr. Sami TAŞÇI'ya ve bakteriyolojide öğrendiklerime çok büyük katkısı olan değerli hocam Doç. Dr. Mehmet BAYRAKTAR'a sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmamda büyük desteğini gördüğüm Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Fatih KÖKSAL'a, çalışmalarımда emeği geçen Ayşe KARACALI ve Biyolog Begüm KAYAR'a ve Çukurova Üniversitesi Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamı yürüttüğüm Mikrobiyoloji Laboratuvarında birlikte çalıştığım Laborant Ayfer BAYHAN'a, Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalıştığım, bilgi ve becerilerime katkı sağlayan tüm Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı çalışanlarına, sevgili asistan arkadaşlarıma, hastanemiz Biyokimya Anabilimdalı Öğretim Görevlisi Hakim ÇELİK'e istatistik çalışmalarına katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Hayatım boyunca ve özellikle tezimle uğraştığım dönemde beni büyük bir özveriyle destekleyen anneme, sevgili kardeşlerime, hep yanımda olduğunu hissettiğim eşime, beni anlayışla bekleyen kızıma ve oğluma sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca asistanlığım boyunca yazı işlerimde her zaman desteklerini esirgemeyen Murad ALKAN ve sevgili Tevrat ZERAY'a da teşekkürlerimi sunarım.

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2.1: Mikobakterilerin Runyon'a göre Sınıflandırılması	8
Tablo 2.2: Mikobakterilerin genel üretim besiyerleri	39
Tablo 2.5: Antitüberküloz ilaçlarda dirençten sorumlu olan mekanizmalar	57
Tablo 3.1: NALC-NaOH çalışma solusyonunun hazırlanması	64
Tablo 3.2: MGIT tüplerine eklenen ilaç konsantrasyonları	72
Tablo 4.1: MTC suşlarının izole edildiği klinik hastaların yaş guruplarına göre cinsiyet dağılımı.....	75
Tablo 4.2: İzole edilen MTC suşlarının klinik örneklere göre dağılımı...	76
Tablo 4.3: İzole edilen MTC suşlarının ARB ve kültür pozitiflik oranlarının klinik örneklere göre dağılımı.....	76
Tablo 4.4: Klinik örneklere göre tekli ve birden fazla ilaç direnç dağılım oranları.....	77
Tablo 4.5: İzole edilen 60 MTC suşunun primer antitüberküloz ilaçlarına direnç oranları.....	78
Tablo 4.6: Her bir ilaca göre toplam direnç oranları	78
Tablo 5.1. Ülkemizde farklı merkezlerde, farklı yöntemlerle yapılmış çalışmalardan elde edilen kombine antitüberküloz ilaçların direnç oranları	91

RESİMLER DİZİNİ

Resim 2.1 Laboratuvarımızda direk bakıda EZN boyama yöntemiyle tespit ettiğimiz ARB + basiller (orijinal)	35
Resim 4.1 a: L-J by, üreme (-) b: L-J by, üreme (+) (orijinal).....	80
Resim 4.2. L-J besiyerinde Kültür (+) suşlar (orijinal)	80
Resim 4.3 Kültür pozitif örnekten kord faktör yapısı (orijinal).....	81
Resim 4.4 Kültür pozitif örnekten kord faktör (orijinal).....	81
Resim 4.5 EZN yöntemiyle direk bakıda tesbit edilen ARB + basil (orijinal)	82
Resim 4.6 EZN yöntemiyle direk bakıda tesbit edilen ARB + basil (orijinal)	82
Resim 4.7 Çalışmalarımızı yaptığımız BACTEC MGIT 960 cihazı (Orijinal)	83
Resim 4.8 BACTEC MGIT 960 cihazına SİRE antibiyotik tüplerinin Yerleştirilmesi	83

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Mikobakteri Hücre Duvarı 11

Şekil 4.1 Yıllara göre tek ve birden fazla ilaca dirençli suşların oranları . 79

SİMGELER

°C	Santigrat derece
Gr	Gram
KOH	Potasyum hidroksit
µl	Mikrolitre
mg	Miligram
NaOH	Sodyum hidroksit
NALC	N-asetil- L-sistein

KISALTMALAR

ARB	Asido Resistant Basil
BCG	Bacille Calmette Guerin
BAL	Bronkoalveolar Lavaj Sıvısı
CDC	Centers for Diseases Control and Prevention
CLSI	Clinical Labaratory Standarts İnstitute
ÇİD	Çoklu İlaç Direnci
DOTS	Directly Observed Treatment Short Course
DGTS	Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EMB	Etambutol
EZN	Erlich- Ziehl- Neelsen
G+C	Guanin +Citozin
HIV	Human İmmun Deficiency Virus
İNH	İsoniazid
INF	İnterferon
L- J	Löwenstein – Jensen
MDR-TB	Multi –drug resistant tuberculosis
MTC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleks
MOTT	Mycobacterium Other Than Tuberculosis Kompleks (<i>M.tuberculosis</i> kompleks dışı mikobakteriler)
MAS	Mide Aspirasyon Sıvısı

MHC-I	Major Histocompatibility Kompleks I
NAP	N-asetil beta hidroksi propiyofenon
OT	Old tüberkulin
PRZ	Pirazinamid
PAS	Paraaminosalisilik asit
PPD	Purified protein derivate
RIF	Rifampisin
RD1	Region of Difference 1
STR	Streptomisin
TB	Tüberküloz
T2H	Tiyofen -2-karboksilik asit hidrazid
TNF	Tümör nekroz faktör
VSDB	Verem Savaş Dairesi Başkanlığı
YİD	Yaygın ilaç direnci
WHO	World Health Organization

1.GİRİŞ

Tüberküloz (TB) bilinen en eski hastalıklardan birisi olmasına, sebebinin kesin olarak bilinmesine, son 50 yıldır tedavisinin mümkün olmasına ve üstelik korunabilir bir hastalık olmasına karşın halen dünyada en yaygın ve ölümcül bulaşıcı hastalıklardan biri olmaya devam etmektedir *Mycobacterium tuberculosis* tek bir enfeksiyöz ajana bağlı ölümlerin sebebi olarak ilk sıralarda yer almakta ve bu özelliği ile hala dünyadaki en başarılı patojenlerin başında gelmektedir. Düşük sosyo-ekonomik yapıya sahip kalabalık ve kapalı toplumlarda aktif enfeksiyonların sık görüldüğü ailede bir ferden tüberkülozlu olması halinde diğer fertlerde tüberküloz gelişme riskinin %30 olduğu bildirilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre iki milyardan fazla kişi (dünya nüfusunun üçte biri) tüberküloz basili ile enfektedir. 2008 yılında 9.4 milyon yeni pulmoner tüberküloz vakası olduğu ve bunların 4.1 milyonunun yayma pozitif olduğu (bu yüzden oldukça bulaşıcı) global insidansın 139/100 000 olduğu tahmin ediliyor. Muhtemelen aynı yıl içinde HIV ile ko-enfekte hastaların da (1.4 milyon) içinde bulunduğu 1.8 milyon insan tüberkülozdan ölmüştür. Epidemiyolojik trend araştırmaları global olarak yeni vaka sayılarının arttığını fakat daha fazla sayıda insanın tedavi edildiğini ve ölüm oranlarının azaldığını göstermektedir (1).

Tüberküloz tanısında kullanılan geleneksel yaklaşımlar klinik örneklerden doğrudan hazırlanan aside dirençli boyamalardan sonra mikroskopik inceleme ile basilin görülmesi ve sıvı veya katı besiyerine ekimlerden sonra üreyen basillerin tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması esasına dayanmaktadır. Tüberkülozun hızlı ve doğru tanısı global tüberküloz kontrolünde kritik öneme sahiptir (1).

Dünyada önemli bir halk sağlığı problemi olan tüberkülozda dirençli suşların yaygınlaşması hastalığın kontrolü ile ilgili çalışmalara önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Tüm dünyada 1980 yılından itibaren tüberkülozda yeniden bir artış ortaya çıkmıştır (1)

CDC (Centers for Diseases Control and Prevention) kültüründe *M.tuberculosis* kompleks izole edilen her hastaya üç aylık tedaviden sonra, yayma ve kültür pozitifliği devam eden ve tedaviye klinik yanıtı olmayan bütün hastalara duyarlılık testi yapılmasını önermektedir (2).

Ayrıca dirençli tüberküloza sahip bir hastayla temas öyküsü bulunanlar, Human İmmune Deficiency Virus (HIV) ile infekte olup kaviter lezyonu bulunanlar, sosyoekonomik düzeyi düşük insanlar , yüksek ilaç direnci bulunan (primer izoniazid direnci % 4'den fazla) bölgelerde yaşayanlar tedaviye başlamadan önce mutlaka direnç varlığı yönünden incelenmelidir (3).

Duyarlılığın zamanında ve sistematik ortaya konması; ilaca dirençli suşların hızlı yakalanması, hastaların etkin tedavisi ve çok ilaca dirençli tüberkülozun yayılımının azaltılmasını sağlaması açısından önem taşımaktadır (4). *M. tuberculosis*'e karşı çok az etkin ilaç bulunduğu için dirençli suşlar tüberküloz kontrolünde önemli bir tehdittir. Tüberküloz tedavisinde ilk seçenek olarak uygulanan ilaçlar izoniazid (İNH) rifampin (RİF), pirazinamid (PZA), etambutol (EMB), streptomisindir (STR). EMB dışında birinci seçenek ilaçlar bakterisiddir. En önemli iki ilaç olan İNH ve RİF'e karşı direnç olması durumu çok ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD-TB) veya multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB) olarak adlandırılmakta ve bu suşların yayılması tüberküloz epidemiyolojisi ve kontrol programları açısından ciddi sorun oluşturmaktadır Bu suşlarla enfekte hastaların tedavileri zorlaşmakta, . Bu durumda standart tedavinin etkinliği % 15-77 ye düşmektedir (4).İkinci seçenek ilaçlar olan paraminosalisilik asit, etionamid, sikloserin, kapreomisin, kanamisin, siprofloksasin, oflaksasin, rifabutin ile tedavi daha toksik ve pahalı olmaktadır (1).

Son yıllarda ÇİD-TB sorununa ek olarak yaygın ilaç dirençli (YİD-TB) vakalar dünyanın çeşitli bölgelerinden bildirilmeye başlanmıştır. YİD-TB izoniazid ve rifampin direncine ek olarak bir kinolon ve birde enjeksiyonla kullanılan ilaca (amikasin, kanamisin, kapreomisin) direnç saptanmasıdır (1).

DSÖ 2009 global raporuna göre 100'den fazla ülke verilerine göre bütün TB vakalarının %5' i ÇİD-TB'dir. 2007 yılında yeni ÇİD-TB vaka sayısının 500 000 civarında olduğu tahmin edilmiştir. 2008 yılı vakalarının %85 'inden 27 ülke sorumludur. En fazla görülen beş ülke Hindistan, Çin Rusya Federasyonu, Güney Afrika ve Bangladeş'tir. Özellikle eski Sovyetler Birliği ülkelerinde ÇİD-TB oranı yüksek bulunurken aynı bölgede ÇİD-TB'lerin 1/10' u YİD-TB olarak bulunmuş. Bu güne kadar 57 ülkede YİD-TB rapor edilmiştir (1).

M.tuberculosis kompleksin (MTC) antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılığını belirlemede en güvenilir ve en hızlı yöntemi bulmak amacıyla çok sayıda duyarlılık test yöntemi geliştirilmiştir. Genel olarak bu yöntemleri fenotipik ve genotipik yöntemler şeklinde ayırmak mümkündür. Fenotipik yöntemlerde antibiyotiklerin varlığında *M. tuberculosis kompleks* üremesi esas alınmaktadır. Katı besiyeri kullanılarak gerçekleştirilen fenotipik yöntemler proporsiyon (orantı) yöntemi, direnç oranı yöntemi ve absolüt (mutlak) konsantrasyon yöntemi olarak sınıflandırılabilir. Otamatize sistemler daha yeni sistemlerdir ve sıvı besiyerleri kullanılmaktadır. Genotipik yöntemlerde ise ilaç direncine yol açan mutasyonlar moleküler yöntemler kullanılarak saptanmaktadır. Fenotipik yöntemler arasında proporsiyon yöntemini temel alan kültüre dayalı klasik yöntemler en yaygın kullanılan yöntemlerdir. Proporsiyon yönteminde katı besiyeri sıklıkla yumurta bazlı besiyerlerinden Löwenstein-Jensen (L-J), agar bazlı besiyerlerinden Middlebrook 7H10 sıvı besiyeri kullanılmaktadır. Modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyerinin kullanıldığı agar proporsiyon yöntemi ile BACTEC 460 TB ve BACTEC MGIT (Mycobacterium Growth İndicatör Tube) 960 gibi hızlı ticari sistemler de yaygın olarak kullanılmaktadır. Middlebrook 7H10'un kullanıldığı agar proporsiyon yöntemi ile BACTEC 460 TB ve BACTEC MGIT 960 yöntemleri CLSI (Clinical Laboratory Standards İnstitute) tarafından önerilen yöntemlerdir. L-J' nin kullanıldığı proporsiyon yöntemi ise ekonomik olması nedeniyle DSÖ tarafından önerilmektedir (1).

Bu alışmada Ocak 2005- Aralık 2010 yılları arasında HÜTF Mikrobiyoloji AD. Mikobakteriyoloji Laboratuvarı' ndan izole edilen 60 *M.tuberculosis* suşunun BACTEC MGIT 960 Sistemiyle primer antitüberküloz ilaçlara direncinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Tüberküloz, insanlık tarihinin en eski ve en çok korkulan hastalıklarından biridir. Bakterinin paleolitik çağda, insanları infekte etmeden önce, hayvanlar arasında yaygın olarak bulunduğu tahmin edilmektedir. Başlangıçta *M.bovis* (veya bir varyantını) olan etkenin infekte hayvan etlerinin yenmesi ve ya kontamine sütlerin içilmesiyle insanlara geçtiği, toplu yaşamaya geçişle birlikte önce kabile içi sonra kabileler arası yayılım gösterdiği sanılmaktadır (5). Almanya’da bulunan ve M.Ö. 8000 yılına dek uzanan tarih öncesi insana ait iskelet kalıntılarının hastalık izi taşıdığı bulunmuştur. Milattan önce (M. Ö.) 4000- 2400’lü yıllarda Mısır’da firavunlar döneminden kalma Thebus bölgesindeki 85 mummyadan alınan organik materyalde bulunduğu ispatlanmış ve spoligotiplleme ile suş tayini yapılmıştır (6).

Hipokrat M.Ö. 460’lı yıllarda erime, tükenme anlamına gelen ‘fitizis’ terimini kullanmıştır. İlk olarak Aristo (M.Ö.354–322) bu hastalığın bulaşıcı olduğunu düşündüren bir özelliğinin farkına varmıştır. Romalı Celsus M.Ö. 30-50 yıllarında tüberkül tanımını literatüre geçirmiştir. İstirahat, öksürüğün kesilmesi, göğüs yakıları gibi ilk tedavi önerilerini ise M.S. II. yüzyılda yaşayan Galen ortaya koymuştur. Vesalius (M.S. 1478) fitizisli hastaların otopsilerinde kaviter lezyonları bildirmiştir. F. Sylvius ise tüberkülozdan ölen hastaların akciğerlerinde tüberkül olarak adlandırdığı küçük sert nodüllerin bulunduğunu göstermiştir (7).

Pierre Desault (1675–1737) ise hastalığın bulaşıcı olduğunu, temel bulaştırıcı unsurun ise balgam olduğunu belirtmiştir. Robert Koch tüberkülozdan ölen bir hastanın akciğerindeki lezyonlarda basili göstermiş, bunu kültürde üretmiş ve üretilen basil ile deney hayvanlarında hastalık oluşturmuştur. Böylece Koch 1882 yılında Berlin Fizyoloji Derneğinde tüberkülozun

M.tuberculosis tarafından oluşturulduğunu kanıtlamıştır. 1910 yılında Calmette-Guerin *M. bovis*'i 13 yıl süreyle 233 kez pasajlayarak Bacille Calmette-Guerin (BCG) denen aşı kökenini elde etmiştir. Seibert ve Glenn (1939) ise PPD'yi (Protein Purified Derivative) bulmuşlardır (6).

Onyedinci ve onsekizinci yüzyıllarda sanayi devrimi, yoksul, yetersiz beslenen ve kalabalık barınma koşullarında yaşayan insan sayısının artırarak tüberküloz salgınının genişlemesine neden olmuştur. Hastalık onsekizinci yüzyılda Avrupa'yı tamamen etkisi altına almıştır. Avrupalılar tüm dünyaya yayıldıkça tüberküloz da yaygınlık kazanmıştır. Bu dönem dünyada tüberkülozdan ölümlerin en yüksek düzeyde yaşandığı dönemdir (7).

Ondokuzuncu yüzyılın sonlarına doğru tüberküloz salgını, Osmanlı İmparatorluğu'nda büyük bir halk sağlığı sorunu olmuş, Balkan Savaşları ve 1.Dünya Savaşı'ndaki yoğun yoksulluk koşullarında Anadolu'ya yayılmaya başlayan hastalık, 1940'ların sonunda en yüksek düzeyine ulaşmış ve bu dönemde en sık görülen ölüm nedeni olmuştur. Ülkemizde tüberküloz ile etkin mücadele 1950' li yıllarda başlatılmıştır. Çıkartılan bir yasa ile 1960 yılında Verem Savaş Dispanserleri kurulmuştur. Doksanlı yıllarla birlikte Göğüs Hastalıkları ve Tüberküloz alanında bilimsel dernek örgütlenmeleri gerçekleşmiş ve düzenli, disiplinli bir şekilde bilimsel çalışmalar, mezuniyet sonrası mesleki eğitimler yapılmaya başlanmıştır (8).

Tüberküloz tedavisinde klinik etki sağlayan ilk antibiyotik olan streptomisin (STR), 1946'da keşfedilmiştir. STR'nin keşfi ile tüberküloz tedavisinde kemoterapi dönemi başlamıştır. Aynı yıl İsveçli bilim adamı Jorgen Lehman salisilik asidin para-amino tuzunu sentezleyerek para-amino salisilik asit (PAS)' in tüberküloz tedavisinde kullanımını sağlamış ve bu iki ilacın kullanıma girmesiyle tüberküloz tedavisinde iyi sonuçlar alınmaya başlanmıştır (9).INH antitüberküloz aktivitesinin 1952 yılında bulunmasıyla İNH, PAS ve STR' den oluşan üçlü tedavi dönemi başlamış ve hastaların % 90-95'i bu üç ilacın 24 ay süreyle devamlı olarak kullanılması ile tedavi edilebilir hale gelmiştir (10). Daha sonra 1954 yılında Pirazinamid (PZA), 1962 yılında EMB ve 1966 yılında RİF bulunmuştur. Ancak her keşfedilen ilaçtan 10 ila 20 yıl sonra direnç sorunu ortaya çıkmaktadır (11). İngiliz Tıbbi

Araştırma Konseyi (British Medikal Research Council) 1950 yılında PAS ve STR'yi tek tek ve kombine kullanarak ilk karşılaştırmalı, randomize klinik çalışmayı yapmışlar ve kombine tedavinin daha etkili olduğunu ve bu şekilde ilaç direnci gelişiminin engellendiğini açıklamışlardır (10). 1960'lı yıllarda PAS'ın yerini EMB'nin almasıyla iki önemli yarar elde edilmiştir; EMB hem hastalar tarafından PAS'tan daha iyi tolere edilebilmiş hem de tedavi süresini 18 aya indirebilmiştir (11). RİF'in 1970'lerde tedaviye eklenmesi ve bu ilacın kazeöz odaklarda bulunan yarı dormant basillere etkili olduğunun bulunmasıyla tedavi süresi daha da kısalmıştır (12). PZA'nın tedaviye eklenmesiyle kültür negatifliğine ulaşma süresi daha da kısalmış ve 6 ayda % 95'in üzerinde kür oranları elde edilmiştir (13).

Günümüze kadar gelen direnç paterninde 3 evre ayırılır. İlk evre STR direnci dönemidir. PAS ve İNH'nin tedaviye girmesiyle bunun üstesinden gelinebilmiş ancak bu kez "İNH ve STR" direnç dönemi gözlenmiştir. Bugün kötü tüberküloz programları özellikle RİF'in denetimsiz kullanımı sonucu sorun çözümü çok zor bir noktaya taşınmıştır. Son dönemde en az İNH ve RİF'e direnç olarak tanımlanan ÇİD – TB sorunu ortaya çıkmıştır (14).

2.2 Sınıflandırma

Mikobakteriler, Bergey'S Manual of Systematic Bacteriology kitabının 1986 baskısında ayrı bir bölüm olarak kabul edilseler de; mikolik asit üretme ve benzer Guanin + Cytosine (G+C) oranına sahip olma gibi özellikleri nedeniyle *Corynebacterium* ve *Nocardia* ile birlikte *Actinomycetales* takımında sınıflandırılmıştır (15). Bu cins içinde 80'den fazla tür tanımlanmıştır. Bakteriyolojik özellikleri ve DNA benzerlikleri nedeniyle birbirleriyle yakın ilişkili türler "kompleks" başlığı altında toplanmaktadır. *M.tuberculosis*, tüberküloz hastalığının etkeni olan mikroorganizmadır. *M.tuberculosis* kompleksi dışında kalan tüm mikobakteriler tüberküloz dışı mikobakteriler [*Mycobacteria other than M.tuberculosis* (MOTT)] olarak adlandırılmaktadır. Bu grup bakterilerin çoğu doğada yaygın olarak bulunur ve insanda hastalık oluşturmaz. Ancak bazı MOTT türleri özellikle immun sistemi

baskılanmış insanlarda tüberküloz dışı hastalıklar meydana getirir. MOTT türleri pigment oluşturma, üreme süresi ve koloni özelliklerine göre, fotokromojen: (Runyon grup I), skotokromojen (Runyon grup II) , non-kromojen (Runyon grup III) ve hızlı üreyenler (Runyon grup IV) olarak sınıflandırılmıştır (16). Mycobacterium türlerinin sınıflandırılması Tablo 2-1 de gösterilmiştir.

Alem: *Prokaryotae* (Bakteri)

Sınıf: *Firmicutes*

Alt sınıf: *Actinobacteria*

Takım: *Actinomycetales*

Aile: *Mycobacteriaceae*

Genus: *Mycobacterium*

Tür: *M.tuberculosis* (16).

Tablo 2. 1 Mikobakterilerin Runyon'a göre Sınıflandırılması (15)

Runyon sınıflandırmasına girmeyen, klinik önemi olan mikobakteriler	<p><i>M.tuberculosis</i> kompleks</p> <p><i>M.tuberculosis</i></p> <p><i>M.bovis</i>(<i>M.bovis</i> BCG)</p> <p><i>M.africanum</i></p> <p><i>M.microti</i></p> <p><i>M.cannetti</i></p> <p><i>M.caprea</i></p>
Runyon sınıflandırması Grup I: Fotokromojenler (sadece sarı pigment oluştururlar ve yavaş ürerler)	<p><i>M. marinum</i></p> <p><i>M.simiae</i></p> <p><i>M.asiaticum</i></p> <p><i>M.intermedium</i></p> <p><i>M.novocastrense</i></p>
Runyon sınıflandırması Grup II:	<i>M. szulgai</i>

Skotokromojenler (karanlıkta ve ışıktaki pigment oluştururlar ve yavaş ürerler)	<i>M. scrofulaceum</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. gordonae</i>
Runyon sınıflandırması Grup III: Non-kromojenler (Pigment oluşturmazlar ve yavaş ürerler)	<i>M. haemophilium</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. avium complex</i> <i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. paratuberculosis</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. genavense</i>
Runyon sınıflandırması Grup IV: Hızlı üreyenler	<i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. abscessus</i> <i>M. peregrinum</i> <i>M. goodii</i> <i>M. septicum</i>
Kültürü yapılamayan	<i>M. leprae</i>

2.3. Genel Mikrobiyolojik Özellikler

Mycobacterium cinsi *Mycobacteriaceae* ailesi içindeki tek cinstir Mikobakteriler aerop, hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz, katalaz üreten, hafif kıvrık ya da düzgün çomak şeklinde, dallanabilen, 0.2 ila 0.6 µm eninde, 1 ila 4 µm boyunda mikroorganizmalardır. Koloni morfolojisi türler arasında değişmekle birlikte S (smooth) ya da R (rough) pigmentli

ya da pigmentsiz olabilir. Eski kültürler karotenoid pigmentlere bağlı olarak sarı, turuncu nadiren pembe renkli olabilir (5)

Mikobakterilerin hücre duvarı yapısı alışlagelmiş bakteri hücre duvarlarından oldukça farklı, kompleks bir yapıdır (Şekil 1). Bu komplekste en iç tabaka, diğer bakterilerde de görülen plazma membranıdır. Orta tabaka ve duvarın iskeletini peptidoglikan arabinogalaktanın mikolik asit esterinden oluşan mikolilarabinogalaktan peptidoglikan oluşturur. Benzer kor yapısı mikobakteriler dışında korinobakteriler ve nokardiyalarda da görülür. Mikolik asitlerin dışında çok sayıda farklı polar veya apolar yapıda nonkovalent bağlı lipid ve glikolipidler hücre duvarında yer alır. Biyolojik aktif olan bu lipidler ve glikolipidlerin bolluğu ve asimetrik dizilişleri hücre duvarına aşırı derecede hidrofobisite kazandırır. Bu yapılar içerisinde alfa -1,4 glukun, bir arabinomannan ve mannan içeren lipomannan ve lipoarabinomannan gibi polisakkaritler, son derece önem arz eder. Mikobakterilerin hücre duvarında gram negatif bakterilerde görülen porin proteinleri de bulunur (16).

Plazma membranı: Membran tipik olarak protein ve fosfolipidlerden oluşan çift katmanlı bir yapıdadır. Kuramsal olarak bir periplazmik boşluk sayesinde peptidoglikandan ayrılır (16).

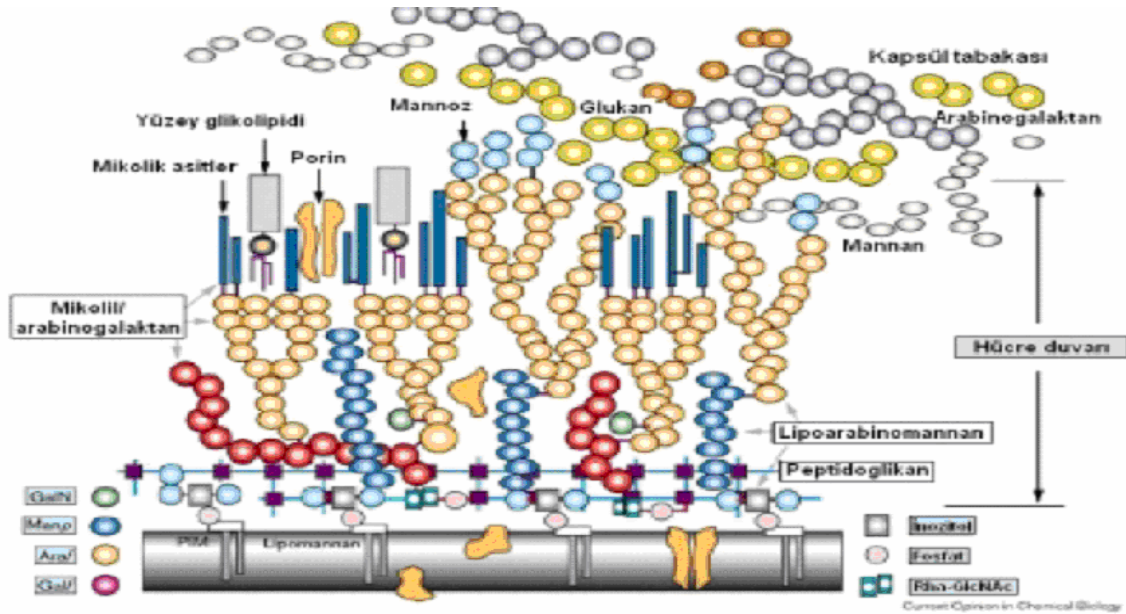
Orta tabaka: Hücre duvarının orta tabakası peptidoglikan, arabinogalaktan, mikolik asitler, açil trehalozlar, oligosakkarid içeren lipidler ve fosfotidilinozitolün glikozil derivatları yer almaktadır. Bu yapılara antijenik özelliğe sahip glikoproteinler ile porin yapılar da katılmaktadır (16).

Peptidoglikan yapı: Mikobakterilerde hücre duvarının en önemli karakteristiği kemotip-IV peptidoglikan yapısıdır. Klasik bakteriyel peptidoglikandan farklı olan bu yapı N-asetil- glukozamin ve N- glikozilmuramik asidin, betaglikozid ve fosfodiester bağlarla bağlanmasından oluşan bir heteropolimerdir. Diğer bakterilerin peptidoglikanlarından farklı olarak mikobakteri peptidoglikanında, bir başka ifade ile kemotip-IV peptidoglikanda iki

önemli farklılık görülmektedir. Bunların ilki muramik asidin asetillenmiş yapısı yerine glikolik asitle glikozillenmiş formunun yapıda yer alması, diğeri de tetrapeptit yan zincirler diaminopimelik asidin yer almasıdır (16).

Mikolik asitler mikobakterilerde tüm hücre duvarı kuru ağırlığının % 50'si ile hücre lipidlerinin % 60'ını oluşturlar. Mikobakterilerde mikolilarabinogalaktan peptidoglikan kompleksinde en fazla bulunan mikolik asit türü, D mikolik asitlerdir. Bu yapıda bir çift bağ veya siklopropan halka yer alır. Mikobakterilerdeki peptidoglikan tabaka kor bölgesinin iskeletini oluşturmak üzere gram pozitif bakterilerdeki teikoik asidin bağlanmasına benzer bir disakkarit fosforil köprü ile bir heteropolisakkarit olan arabinogalaktanı kovalent olarak bağlar. Peptidoglikan yapı bakteriye şeklini verir, hücre duvarına bütünlük ve sertlik kazandırır. Tetrapeptit yapıda yer alan diaminopimelik asit nedeni ile lizozimlere karşı

dire
nçli
dir
(15,
16)



Şekil: 2.1. Mikobakteri hücre duvarı (17).

Yüksek lipid içerikli bariyerden dolayı mikobakteriler gram pozitif kabul edilmelerine rağmen gram boyama ile boyanmazlar. Bakterilerin karbol fuksinle boyandığında asit alkol dekolorizasyonuna gösterdiği dirençten dolayı aside dirençli basil (ARB) olarak tanımlanmaları işte bu zengin lipid içeriği dolayısıyladır (18).

Mikobakteriler, yavaş üreyen mikroorganizmalar olup bölünme süreleri türden türe 2 ile 20 saat arasında değişir. Katı besiyerinde kolonilerin gözle görülmesi kültürleri yapıldığında hızlı üreyenlerde 7 günden az, yavaş üreyenlerde 7 günden fazla sürerken; klinik örneklerden primer kültürde üreme süresi 8 hafta kadar sürebilir. pH 6.5 - 6.8'de ve %5 -10 CO₂'li ortamda iyi ürerler. Üreme için uygun ısı yine türden türe 30°C- 45°C arasında değişmektedir. P-nitro-D-asetilamino-F- hidroksipropiyofenon (NAP) *M. tuberculosis* kompleksin üremesini inhibe eder. Mikobakteriler canlılığını +4°C'de haftalarca, -70°C'de aylarca koruyabilirler. Tüberküloz basilleri kuruluğa ve kimyasal dezenfektanlara dirençlidirler. Direk güneş ışığında iki saatte ölürlür.(19, 5).

2.4. *Mycobacterium tuberculosis* kompleksin Mikrobiyolojik Özellikleri

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

2.4.1. *Mycobacterium tuberculosis*

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

aktivitesi yoktur. Esas konağı insandır. Mikrokolonilerinin gözlemlendiği kültürleri boyanınca kord faktörünü oluşturduğu görülür (20).

2.4.2. *Mycobacterium bovis*

Esas olarak sığırlarda infeksiyon yapmasına rağmen keçi, kedi, köpek, geyik, porsuk ve keseli sıçan gibi geniş konak çeşitliliği gösterir. İnsan az da olsa konak olabileceği için epidemiyolojik açıdan *M. tuberculosis* ile tür düzeyinde ayırt edilmelidir. Aerobik, 6-8 haftada R yada S koloni yaparak ürer. Çoğunlukla niasin reaksiyonu vermez. Nitratları nitrite indirgeyemez. T2H'ya duyarlıdır, varlığında üreyemez. Pirazinamidaz aktivitesi yoktur. Katalaz aktivitesi vardır. Besiyerine piruvat eklenmesi üremesini artırır. *M. bovis* BCG 1924 yılında Calmette ve Guerin tarafından *M. bovis* in 10 yıl boyunca 233 kez pasaj edilmesiyle elde edilmiş virulan olmayan aşı kökenidir. Mesane kanserinin tedavisinde immünsitümölan olarak kullanılırken nadiren yayılabilir (20, 21).

2.4.3. *Mycobacterium africanum*

Genel olarak Afrika'da insan tüberkülozuna yol açan bir tür mikobakteridir. 1968 yılında Senegalli bir hastadan soyutlanmıştır. Mikroaerofilik ortamda iyi ürer. Nitratı indirgeyemez. T2H varlığında üreyemez. Pirazinamidaz aktivitesi pozitifdir (20, 21).

2.4.4 *Mycobacterium microti*

Tarla faresi gibi kemiricilerden izole edilmiştir. Hem immunkompetan hem de immunsupresif hastalarda infeksiyon oluşturabilir. Ehrlich Ziehl Nielsen (EZN) boyamasında ay çöreği görüntüsü tipiktir. Kültürde üretilmesi zordur (18).

2.4.5. *Mycobacterium canettii*

M. tuberculosis kompleksinin en son üyesi olan *M. canettii*, 1969'da Canetti tarafından, 1990'ların sonuna doğru Soolingen ve Pfyffer tarafından tanımlanmıştır. Doğal konağı bilinmemektedir ancak bildirilen vakalar insan infeksiyonlarıdır. Düz, yuvarlak kolonileriyle kompleks üyelerinden ayrılır (18).

2.4.6. *M.tuberculosis* kompleks' in Kültür Özellikleri

M.tuberculosis zorunlu aerobdur. Optimal üreme ısısı 37 °C,pH ise 7'dir. İlk izolasyonda içinde patates, yumurta veya serum bulunan kompleks besiyerlerine gereksinim duyar, sonraki pasajlarında sentetik besiyerlerinde de üreyebilirler. Amonyum tuzları ve amino asitleri nitrojen kaynağı olarak kullanabilir ancak asparajinli besiyerlerinde daha fazla üremektedirler, eser element olarak demir önemlidir. Hangi besiyerinde üretilirse üretilsin tüberküloz basilleri yavaş üreyen bakterilerdir. Rutin besiyerindeki ilk kültürlerinde onbeş günden önce üredikleri görülmez. İyi bir üreme için ortalama 4-6 hafta gereklidir (5, 22).

2.5. Antijenik yapı

Mikobakterilerin hücre duvarında glikolipit yapısında antijenler bulunmaktadır. Bu glikolipidler PGL antijen (phenol glycolipit), DAT (2,3-diacyltrehalose), TAT (2.3.6-triacyltrehalose), CF (cord factor veya trehalose- 6,'6-dimycolate) ve SL-I (2.3.6.6'-tetraacyl trehalose 2'- sulphate) antijenleridir. Hücre duvarında bulunan antijenlerden başka hücre dışına salınan (A 38 ve A30) ve sitoplazmada bulunan antijenler de tesbit edilmiştir. Mikobakteri kültür filtratlarından α -antijen, MPB51, MPB64, MPB83 ve MPB57 gibi birçok protein ekstrakte edilmiş ve klonlanmıştır. Hastaların bu protein - antijenlere verdikleri humoral yanıtlar incelenerek tüberküloz tanısı ve prognozu belirlenebilir (23).

2.5.1. Mikobakteriyel proteinler

Old tüberkülin (OT): *M.tuberculosis* ve *M.bovis*'in sıvı besiyerinde 37 °C'de 6-8 hafta üretilmesini takiben akım halindeki buharla öldürülmesi, ilk hacminin 1/10 u kalıncaya kadar ısıyla yoğunlaştırılması ve filtrasyonla sterilize edilmesi sonucu elde edilen, saf olmayan bir üründür. İlk kez Koch tarafından elde edilen OT'nin infekte bireylerde, basille karşılaşmamış olanlara nazaran daha çabuk ve daha belirgin reaksiyon oluşturduğu görülmüş ve tüberküloz enfeksiyonunun tanısında, intradermal cilt testi olarak kullanılmaya başlanmıştır. Tüberküloz basillerinin kaba bir ekstratı olan OT'nin aktif tüberküloproteinlere ek olarak, besiyerine ait maddeler ve başka komponentlerde içermesi nedeniyle, saflaştırılmasına gerek duyulmuş ve PPD geliştirilmiştir (5).

Saflaştırılmış Protein Türevi (PPD): İlk kez Seibert ve Glenn tarafından 1941'de tanımlanmıştır. Sentetik besiyerlerinde hazırlanmış OT 'nin kollodyen membranlardan süzülmesi ve amonyum sülfatla çöktürülmesi sonucu elde edilmiş daha saf bir üründür. OT 'deki tüberküloprotein 32 kD olduğu halde PPD; 2 ve 9 kD 'luk iki protein içerir. OT 'ye nazaran içerdiği proteinler daha küçük ve karbonhidratı az olduğundan daha az özgül olmayan reaksiyona neden olur. Tam olarak saflaştırılamamıştır ve diğer mikobakterilerle enfeksiyonlarda çapraz reaksiyon verebilir. Bu olumsuzluklara rağmen PPD immunodiagnostik önemini hala korumaktadır. Günümüzde PPD 'nin hazırlanmasında iki değişik yöntem kullanılmaktadır. a-Long besiyerinde üretilen tüberküloz basillerinin trikloroasetik asitle çöktürülmesi b-Sıvı besiyerinde üretilen basillerin ultrafiltrasyonla yoğunlaştırılması ve amonyum sülfat ile çöktürülmesi hangi teknikle hazırlanmış olursa olsun DSÖ 0.1 ml solüsyonda 5 TU (0.0001 mg PPD-S proteini) dozunda PPD bulunmasını önermektedir (5).

65 kDa protein: Konak hücre içinde çoğalan basillerden salgılandığı ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu sonucu lezyonda kazeifikasyon ve likefaksiyon oluşturduğu bulunmuştur. İmmünojenitesi yüksek olan bir ısı şok proteinidir (19, 5).

Antijen 85 kompleks (Alfa antijen 30/32- kDa antijen): Mikobakteri hücre duvarının karakteristik yapısı Kord Faktörün sentezi için gerekli olan *M. tuberculosis*'in salgıladığı major antijendir. Potansiyel koruyucu bir antijen olduğu düşünülmektedir. Mikolik asit sentezini inhibe eden İNH' ın in vitro Ag 85'in sentezini indüklediği ve tedaviye cevap vermeyen olgularda bu antijenin balgamda tespit edildiği gösterilmiştir. Son çalışmalar, tüberkülozlu hastalarda bronkoalveolar hücrelerin Ag 85'e sağlıklı insanlardan daha fazla yanıt verdiğini ancak bu yanıtın PPD'ye olan yanıtından daha az olduğunu ortaya koymaktadır (24).

Antijen 5, antijen 6, antijen 60: Saflaştırılmış sitoplazmik proteinlerdir. Bakteriye karşı oluşan humoral yanıtı göstermek amacıyla kullanılmaktadır. Ancak özellikle antijen 60'a dayalı ELISA (Enzim ile işaretli antikor testi) deneyi bu antijenin tüm mikobakterilerde olması ve *Nocardia* türleri ile çapraz reaksiyon vermesi nedeniyle tanıda çok yer edinmemiştir (25).

19 kDa lipoprotein: *M.tuberculosis* hücre duvarında bulunur. Özellikle immüniteyle ilgili çok önemli rolleri vardır. İnterferon gama (INF γ) sentezini kodlayan genleri ve makrofajların INF γ reseptörünü inhibe eder. Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) ve IL-12 (İnterlökin-12) sentezini azaltarak T lenfosit aktivasyonunu inhibe eder. Nitrojen ara ürünlerinin üretimini, MHC-I (Major Histocompatibility Kompleks-I)'in antijen bağlamasını inhibe eder. Monosit ve makrofajların apoptozunda görevlidir (26).

ESAT-6 (Early secretory antigenic target) ve CFP-10 (Culture filtrat protein):

M.tuberculosis kompleks'in RD1(Region of difference) gen lokusundan kodlanmaktadır ve bu proteinlere karşı oluşan interferon yanıtını T hücre sayısını göstererek invitro ölçen kitler geliştirilmiştir. Bu yöntem yardımıyla aktif ve latent tüberküloz tanısı konabilmekte, tedaviye yanıt takip edilebilmekte ve *M. tuberculosis* enfeksiyonunun BCG aşılmasıyla ayrımı yapılabilmektedir (27).

2.6. Patogenez ve virulans

M.tuberculosis' in virulansında rol oynayan kesin bir faktör gösterilememiştir. Ancak yapılan çalışmalar kord faktör ve sülfatidler gibi bazı immunoreaktif komponentlerin virulanstan sorumlu olabileceğini ortaya koymuştur. Tween-albumin besiyerinde virulan mikobakteriler yılanvari kıvrımlar yapmış şekilde (çalı demetine benzer) görülürken; virulansı zayıflatılmış veya tamamen ortadan kaldırılmış izolatlar düzensiz yığınlar halinde bulunur. Bakterinin bilinen histolitik enzimleri, endo ve ya ekzotoksinleri yoktur. Ancak duvarda bulunan bazı yapıların toksik olduğu gösterilmiştir. *M.tuberculosis*'de hiçbir yapı, antijen veya mekanizma organizmanın virulansını açıklamak için yeterli değildir (5).

2.6.1. Mikobakteriyel lipidler

Trehaloz-6,6, dimikolat (Kord faktör): Tüberküloz basilinin küme oluşturmaya neden olur. Adjuvan etkiye sahiptir ve alternatif kompleman yolunu aktive eder. Önemli bir virulans faktörüdür. Granülom oluşumunda rol oynar ve tümör geriletici etkiye sahiptir. PNL göçünü inhibe eder. Konak hücre mitokondri membranına tutunarak solunum ve oksidatif fosforilasyonda hasar yapar (5, 24).

Muramildipeptit (MDP) : İmmün sistemi uyarır ve tümör geriletici etkisi vardır (5).

Sülfolipidler (Sülfatidler): Sülfür içeren glikolipidlerdir. Kord faktöre sinerjik etki yapar ve makrofaj içinde fagozom-lizozom füzyonunu engelleyerek, basili lizozomal enzimlerin etkisinden koruduğu dolayısıyla makrofajlara karşı direnci artırdığı gösterilmiştir (5).

Wax D: Peptidoglikolipid yapısındadır. Freud adjuvanının etkisini arttırıcı özelliğe sahiptir. Tümör geriletici özelliğe sahip olup, BCG aşısının bazı tümörlerde gerilemeye neden olan immünoterapötik etkisinde rolü vardır (5).

Lipoarabinomannan:*M. tuberculosis*'in major hücre duvarı lipoglikanıdır(28).

Mikotiyol: Yüksek antioksidan kapasiteli, düşük molekül ağırlıklı bir tiyol olup, sadece mikobakteriler ve aktinomiçetler tarafından üretilmektedir. Mikotiyol, çoğu ökaryot ve bazı prokaryot hücrelerdeki antioksidan kapasiteli glutatyon analogudur. Basilin oksidatif strese verdiği yanıt ve detoksifikasyon enzimlerinin sentezi için gerekli bir kofaktördür. Mikotiyol biyosentezinde rol alan enzimler tüberküloza karşı geliştirilecek yeni ilaçların hedefi olmaya aday görünmektedir (29).

Fosfatidil inozitol mannozid (PIM): Lipid yapısındadır. Hapten özelliği gösterir. Çapraz koruyucu immünitede rolünün olabileceği düşünülmektedir (5).

2.6.2 . Mikobakteriyel polisakkaridler:

Arabinoz, galaktoz, mannoz içeren polisakkarid I molekülleri geç tip aşırı duyarlılık oluşturabilir. Polisakkarid II molekülleri ise serolojik aktivite gösterir (30).

2.6.3. Mikobakteriyel proteinler

Membranla ilişkili proteinler, peptidoglikan ile ilgili proteinler, dış hücre duvarı ile ilgili proteinler, sitoplazmik proteinler, ısı şok proteinleridir. En önemli görevleri, basile antijenik özellik kazandırmak, duvar polimerlerinin sentezinde rol almak, porları oluşturarak atık maddelerin dışarı transportuna neden olmaktır (30).

2.7. Immunopatogenez

Tüberküloz hastalığına karşı son kırk yılda birincil seçenek yeni bir ilaç ortaya konamamış, etkili ve güvenli bir aşı hala bulunamamıştır. Bu nedenle tüberküloz basilinin konakla etkileşimini açıklamaya yönelik kapsamlı çalışmalar gerekmektedir. Basil solunum, sindirim, deri, genitoüriner sistem ya da konjunktivadan girebilir. En önemli bulaş yolu

inhalasyondur. Hernekadar ilk yerleştikleri organlar farklı olsada, meydana gelen patolojik olaylar, daima aynıdır. Bulaş sonrası enfeksiyon oluşup oluşmaması ve ya hastalık meydana gelip gelmemesi konağın direnci ile bakteriyel virulans arasındaki dengeye bağılıdır (5).

Aktif tüberkülozlu kişiler çevreye, içinde değişik sayılarda basil bulunan damlacıklar (Pflugge damlacıkları) saçarlar. Normal solunum sırasında çok az olan damlacık sayısı, öksürükle 3500'e, hapşırıkla bir milyona kadar ulaşır. Sağlıklı insanlar tarafından solunan bu damlacıkların büyük olanları burun ve bronş yüzeyindeki silialar tarafından tutulurken, içinde 1-3 basil bulunan küçük partiküller kolaylıkla alveollerle ulaşır ve bakteriler alveolar makrofajlarca fagosite edilir. Fagozom ile lizozim birleşir; proteolitik enzimlerin etkisiyle basil öldürülmeye çalışılır. Eğer makrofajın sahip olduğu mikrobiyosidal aktivite bakteriyi öldürmeye yeterse, basiller ortadan kaldırılır ve enfeksiyon oluşmadan olay sonlanır. Bu durumda kişide radyolojik bulgu saptanmaz (5).

Diğer fagosite olan bakterilerin aksine *M.tuberculosis* fagozom ile lizozomun oluşumunu engeller. Bu birleşmenin olmaması mikobakterilerin yaşaması için uygun ortamı sağlar (31).

Enfeksiyon ve hastalığın oluşup oluşmaması, konağın direnci ile basilin virulansı arasındaki dengeye bağılıdır. Konağın tüberküloza karşı yanıtında hem doğal hem de kazanılan immünite rol oynamaktadır. Alveollere ulaşan basil doğal savunma yolları ile yok edilebilir veya çoğalarak hastalığın klinik görünümünü oluşturabilir. Doğal savunmada üst solunum yolu fiziksel engeli, fagositoz, inflamatuvar hücreler ve salgıladıkları sitokinler, alveolar makrofajlar, apoptoz ve genetik faktörler rol oynar (32).

Ancak bakterinin virulans faktörleri (kord faktör, sülfatidler ve diğer asidik lipidler gibi) daha ağır basar ve makrofaj aktivitesi yetersiz kalırsa basil, hücre içinde çoğalmaya başlar ve makrofajları parçalar ve alveolar boşluğa geçer. Parçalanan makrofajlardan salınan kemotaktik faktörler, monositlerin ve diğer inflamatuvar hücrelerin enfeksiyon bölgesine gelmesini sağlar ve granülom oluşumunu başlatır. Alveolar boşluğa geçen basiller, yeni

makrofajlarca fagosite edilseler bile makrofajlar henüz aktive edilmedikleri için çoğalmaya devam ederler (28).

M. tuberculosis inhalasyonundan 2-6 hafta sonra etkene özgül hücrel immün yanıt gelişir. Lezyon bölgesinde çoğalan basillerin tüberkülin benzeri proteinleri, doku hasarı yapan gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonuna yol açar. Gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu tüberkülin testi pozitifliğine ve kazeifikasyon, likeifikasyon, kaviteasyona neden olur. Böylece inaktif makrofajlar içindeki basillerin çoğalması durdurulur ve granülom merkezinde kazeöz nekroz alanları oluşturulur. Kazeöz nekroz alanları içinde basiller daha fazla çoğalamaz ve yaşam boyu dormant kalır. Primer infeksiyon ve primer odakların (Ghon odağı) olduğu bu evrede tüberkülin testi pozitifdir (28). Bu dönemin nasıl ilerleyeceği, bakterinin virulansı ve konağın immün durumu arasındaki dengeye bağlıdır (33).

Granülomlarda kazeöz odağın etrafında toplanan aktif makrofajlar, kazeöz odaklardan kaçan basilleri fagosite ederek hızla sindirirler. Aktif makrofajların yakaladığı basiller çoğalmayı sürdürürse gecikmiş tip aşırı duyarlılık yanıtı tekrarlanarak doku hasarlanması artar. İmmün yanıt baskılanmış kişilerde kazeöz odaklardan kaçan basiller, inaktif ya da düşük aktivitedeki makrofajlar tarafından fagosite edilir, fakat sindirilemezler. Bu makrofajların basil çoğalmasının durdurabilmesi için gecikmiş tip aşırı duyarlılık yanıtının tekrarlanması gerekir. Bu yanıt tekrarlandıkça kazeöz nekrozlar genişler ve primer tüberküloz oluşur. Lenfematojen yolla basiller akciğerden vücudun diğer bölümlerine yayılır ve pulmoner ven duvarında oluşan kazeöz odağın açılması ile miliyer ve dissemine tüberküloz gelişir (29).

Tüberkülozda immün yanıt, *M.tuberculosis*'e ait antijenlerin, makrofaj veya dentritik hücrelerin MHC-I / MHC-II veya CD 1 molekülleri üzerinden T lenfositlere sunulmasıyla başlar. Tüberküloprotein ve lipitler tarafından uyarılan makrofajlardan salınan IL-12 ve INF- γ , CD4T helper hücrelerinin proliferasyon ve farklılaşmasına neden olur. Akciğer tüberkülozunda yerel hücrel immünite T helper 1 hücreleri ile sağlanır. Enfeksiyonun başlamasından 2-6 hafta sonra, efektör ve bellek fenotipinde CD4 + Th ve CD8+ Tc

lenfositlerinin iki tipi de bulunur. Efektör T lenfositlerden sağlanan yeterli hücresele yanıt ilk enfeksiyonu durdurur (5,32).

Antijene özgül olarak uyarılan CD4 + Th 1 lenfositleri tarafından ölü ya da canlı aynı antijenle karşılaşma durumunda İNF- γ , lenfotoksin, GM-CSF gibi inflamasyon mediatörleri salınır. Bu mediatörlerin salınmasıyla gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu oluşmakta ve durumun ilerlemesiyle de granüloamatöz tip reaksiyon gelişmektedir. Gecikmiş tip aşırı duyarlılık konağın antijenlere karşı oluşturduğu inflamatuvar bir yanıt olup yavaş gelişip uzun süre devam eder. Hücresele immun yanıtı takip eden bu yanıt pasif olarak aktarılamayan bir reaksiyondur. PPD reaksiyonu tipik bir gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonudur. Sonuç da doku hasarı ve nekroz gelişecektir. Tüberkülozda akciğerde gözlenen kazeifikasyon, likefaksiyon ve kavitasyonlar gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu sonucu ortaya çıkmaktadır. Hücresele immun yanıt, makrofaj aktivasyonu ile fagosite olan basilleri öldürmek; gecikmiş aşırı duyarlılık reaksiyonu ise basil içeren aktive olmamış makrofajları ve komşu dokuları hasalayıp, basillerin üremesi için uygun ortamları ortadan kaldırmak için uğraşırlar (5, 34).

2.7.1. *M. tuberculosis*'in Savunma ve Virulans Faktörleri (Perzistans Faktörleri)

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

Mikolik asit: Birçok kemoterapötik için direnç sağlar, mikroorganizmayı çevresel stresten korur ve enfeksiyonun perzistansını sağlar.

16 kDa alfa- kristalin proteini (acr): Mikroaerofilik veya anaerobik ortamda ve üremenin durgun fazında yüksek oranda tesbit edildiği, Acr geninin delesyonunun makrofaj içindeki mikobakteri üremesinde baskılanmaya neden olduğu gösterilmiştir (29).

RD1 gen lokusu: Virulansı artıran özelleşmiş sekresyon sistemlerini kodlar (33).

Sigma faktörleri (rpoV, Sig F): Latent fazda salınır, basilin değişik çevre koşullarına yanıtında gen ekspresyonunun regülasyonunda, özellikle Sig F' in muhtemel spor oluşumuyla ilgisi olduğu konusunda çalışmalar yapılmaktadır (33).

Dimikoserozat ester poliketid: Dış membran lipidleri arasında major virulans faktörlerindedir (35).

İzositrat liyaz: Glioksilat döngüsünde yer alır. Fagositozdan sonra kimyasal yapısını değiştiren alveolar makrofaj içindeki basiller izositrat liyazın yardımıyla alternatif besin kaynağı olarak yağ asitlerini kullanmaya başlar böylece makrofaj içinde yıllarca kalabilir (36).

Fenolik glikolipidler: Yakın zamanda yapılan çalışmalarda yeni antitüberküloz ilaç geliştirilmesinde hedef molekül seçilmesi önerilmektedir. Küçük moleküllü virulans faktörü olarak tanımlanmıştır . Lipoarabinomannan, muramidilpeptit, mikotiyol, trehaloz - 6,6, dimikolat (Kord faktör), sülfalipid, PIM, wax D diğer virulans faktörleridir (37).

2.8. Epidemiyoloji.

Tüberküloz 1882'de Robert Koch tarafından bilim dünyasına tanıtıldığından beri gelişmiş ülkelerde görülme oranı azalmış gibi görünse de, DSÖ tarafından aktarılan bilgi aslında Koch zamanından beri bu dünya çapındaki halk sağlığı problemine çok da etkili çözümler getirilmemiş olduğudur (38). Günümüzde tüm ölümlerin % 7'si, önlenebilir ölümlerin % 26'sı tüberküloz nedeniyle olmaktadır (39).

Tüberküloz epidemiyolojisinin temelinde tarama ve yeni olguları ortaya çıkarma vardır. Taramanın amacı enfekte ve aktif hastalığı olan kişileri bulmaktır. Enfekte olguların tesbiti; risk faktörlerinin belirlenmesi, epidemiyolojik parametrelerin hesap edilmesi ve tüberküloz ile mücadelenin başarılı olup olmadığını belirlemeye yardımcı olur. Aktif tüberkülozlu hastaların belirlenmesi ise hastaların etkin tedavi ile sağlığına kavuşmasını ve hastalığın yayılımının önlenmesini sağlar (40).

Tüberküloz epidemiyolojisinde kavramlar:

Epidemiyoloji, bir enfeksiyonun, bir hastalığın veya bir durumun insan topluluklarında dağılımını ve sıklığını etkileyen faktörlerin ve koşulların birbiriyle olan ilişkilerini inceleyen bilimdir. Tüberküloz epidemiyolojisi, tüberküloz basili ile insan ve toplum arasındaki etkileşimleri (basilin bulaşması, insidens, prevalens, yıllık enfeksiyon riski, mortalite, risk faktörleri, HIV enfeksiyonu veya diğer bağışıklık yetmezlikli kişilerde enfeksiyon ve hastalığın seyri, ilaçlara direnç durumu) ve dengeyi inceleyen ve elde ettiği bilgileri dengenin insan lehine değişmesi için kullanan bilimdir. Elde edilen epidemiyolojik veriler korunmada kılavuzluk eder (41).

Tüberküloz enfeksiyonu: Basilin bulaşıp, lokal granülatöz bir inflamasyona neden olması ve basillerin sistemik olarak kontrol altına alınmasıdır (41-43).

Aktif tüberküloz olgusu: Tüberküloz basili çıkaran (balgam veya diğer klinik örneklerde basil varlığı saptanan) olgudur (41).

Şüpheli tüberküloz olgusu: Klinik ve radyolojik bulgularla tüberküloz olduğu düşünülen, ama bakteriyolojik doğrulama yapılamayan (basil çıkarmayan) olgudur (41).

Tüberküloz enfeksiyon prevalansı: Belli bir toplumda bir yıllık sürede enfekte bulunan kişilerin (BCG) ile aşılanmamış kişiler arasında tüberkülin deri testi (PPD) pozitif olanlar) orandır. Bir ülkede enfekte insan havuzunu bilmek açısından çok önemli bir epidemiyolojik ölçüdür (41-43).

Tüberküloz enfeksiyon riski (yıllık enfeksiyon riski): Bir yıl içinde tüberküloz basili ile ilk defa enfekte olacakların oranıdır. Diğer bir ifadeyle belli bir toplumda tüberküloz basili ile enfekte olmamış ve BCG aşısı yaptırmamış, PPD negatif olan kişilerin bir yıl içinde enfekte olma ihtimalidir. Ucuz, basit ve kolayca yapılabilir; kayıt-ihbar sistemine dayanmadığından günümüzde önemli ve yararlı bir göstergedir. Tüberkülozun ülkedeki bulaşıcılık durumunu değerlendirme imkanı veren bu epidemiyolojik ölçü PPD pozitifliği takip edilerek elde edilir. Yıllık enfeksiyon riskindeki azalma %10 veya üzerinde ise tüberküloz kontrol önlemleri başarılı, %5 den az ise başarısızdır (41, 43).

Tüberküloz prevalansı (nokta prevalans): Belli bir toplumda araştırmanın yapıldığı anda, 100.000 kişilik nüfusta bulunan tüberkülozlu hasta (eski+yeni olgu) sayısını gösterir (44,45).

Tüberküloz insidansı: Bir yıl içinde 100.000 kişilik nüfusta saptanan yeni hasta sayısıdır. DSÖ 25/100.00 den az olanları düşük, 25 - 100/100.000 olanları orta ve 100/100.000 den büyük olanları hastalık insidansı açısından yüksek kabul etmektedir. İlgili parametrenin doğruluğu ve güvenliği için ülke çapında standart metotlarla aktif olgu bulma ve bildirme çalışmaları etkin bir şekilde yürütülmelidir. Genç yaş grubunda insidansın azalması tüberküloz kontrol ve önleme tedbirlerinin etkin olduğunu yansıtır (45, 41, 43).

2.8.1. Dünyada Tüberküloz

DSÖ'nün verilerine göre dünya nüfusunun üçte biri tüberküloz basili ile enfektedir. Tüberküloz, özellikle Asya ve Afrika başta olmak üzere dünya çapında major hastalık ve ölüm nedenidir. DSÖ'nün verilerine göre, her yıl yaklaşık iki milyon ve günde 5000 insanın tüberkülozdan öldüğü belirtilmektedir. Ölümlerin çoğunluğu genç ve erişkinlerde

olmaktadır. Ayrıca tüberküloz basili, günümüzde ilaçlara direnç kazanarak çok daha ciddi, çözülmesi çok daha zor bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. 2015 yılına kadar hasta sayısını 50 milyona ulaşacağı, bunların üç milyonunun HIV enfeksiyonu ile birlikte olacağı tahmin edilmektedir (46). DSÖ, 1993 yılında tüberküloz konusunda dünya çapında acil durum ilan etmiş ve bütün ülkelere ‘Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi’ni’ (DGTS) önermiştir. Bu strateji esas olarak, balgamın mikroskopik incelenmesinin yaygınlaştırılması ile bulaştırıcı olguların yakalanması ve doğrudan gözetimli tedavi ile tedavi garantisinin sağlanmasını amaçlamaktadır. DGTS 184 ülkede kurulmuştur. Bu ülkeler dünya popülasyonunun %93’ünü, tahmini tüberküloz olgularının % 99’unu içeren ülkelerdir (46).

DSÖ tüberküloz kontrolünde ‘Milenyum Gelişme Hedefi’ belirlemektedir. Buna göre DSÖ, yayma pozitif olguların %70’inin tespit edilmesini, bu olguların % 85’inin başarıyla tedavi edilmesini, 2015 yılına kadar dünyada tüberküloz insidansının azalmaya başlatılması ve durdurulmasını, 1990 yılı ile kıyaslandığında 2015 yılına kadar prevalans ve ölüm oranlarının yarıya indirilmesini hedeflemektedir (46).

Dünyada tüberküloz hastalarının %80’inin bulunduğu 22 ülke, ‘Yüksek Olgu Yüğü’ olan ülkeler olarak adlandırılmaktadır. Bu ülkeler; Hindistan, Çin, Endonezya, Nijerya, Bangladeş, Pakistan, Etyopya, Güney Afrika, Filipinler, Kenya, Kongo Demokratik Cumhuriyeti, Rusya Federasyonu, Vietnam, Tanzanya, Brezilya, Uganda, Tayland, Mozambik, Zimbabve, Myanmar, Afganistan ve Kamboçya’dır. En çok hastanın olduğu beş ülke ise; Hindistan, Çin, Endonezya, Nijerya, Güney Afrika’dır (46).

Afrika bölgesi en yüksek insidansın olduğu bölgedir. Sahraaltı Afrika ile Güney Doğu Asya’da, HIV ile tüberküloz birlikteliği büyük bir sorundur. Son yıllarda eski Sovyetler Birliği Ülkeleri’nde de bu iki hastalığın birlikteliği artış göstermektedir (46).

DSÖ 2008 Küresel Tüberküloz Raporu’na göre, 2006 yılı içinde bildirilen olgu oranı (prevalans) 5.392.826 (82/100.000), yeni yayma pozitif olgu oranı 2.531.975 (38/100.000) olarak verilmektedir. Olguların %46.9’u yayma pozitif olarak bildirilmektedir. 2003 yılı için insidans 8.8 milyon olarak bildirilirken, 2005 yılı için 9.1 milyon olarak verilmektedir. 2006 yılı için tahmini prevalans oranı 14.424.343

(219/100.000), insidans oranı 9.157.021 (139/100.000), yayma pozitif olgu oranı 4.068.011 (62/100.000) olarak verilmektedir (46).

2.8.2. Ülkemizde Tüberküloz

İlk Veremle Savaş Cemiyeti' nin 1918 yılında kurulduğu Türkiye'de, Cumhuriyet' in ilk yıllarından beri tüberkülozla ilgili mücadele kampanyaları sürdürülmüştür. 1950'lerde 1000'de 25 olan hastalık prevalansı 1975' te 1000'de 1'e düşmüş, bu yıllar arasında en az % 10'luk yıllık enfeksiyon risk oranında azalma sağlanmıştır. Fakat 1970'li yılların başında 'tüberkülozun artık kontrol altına alındığı' şeklindeki resmi açıklamalar, bu yıllardan sonra kamuoyunun ve devletin konuya ilgisinin giderek azalmasına neden olmuş ve 1977'den sonra yapılan çalışmalarda enfeksiyon riskinin artmaya başladığı görülmüştür (48). .

1980 yılında aktif hasta oranı % 0.1, basil pozitif hastaların oranı yüzbinde 15, tüberkülozdan ölüm oranı yüz binde 8.8 ve insidansı yüz binde 52.23 olmuştur. 1990'da tüberkülozdan ölüm oranı % 3.2 ye gerilemiştir. 80'li yıllarda dünya genelinde yürütülmekte olan tüberküloz savaşında yaşanan gevşeme, AIDS'de tüberkülozun fırsatçı enfeksiyon olarak artış göstermesi ve yaşanan göç hareketleri, DSÖ'nü 1991 yılında yeni bir tüberküloz kontrol programı uygulamaya yöneltmiştir. Doğu Avrupa ülkelerinde tedaviye direçli olguların artması ve 3. Dünya ülkelerinde yaşanan olumsuz gelişmelerden dolayı DSÖ, 1993 yılında Acil Durum ilan etmiştir. Bu yeni anlayışla Doğrudan Gözetimli Tedavi (DGTS) ya da Directly Observed Treatment Short Course (DOTS) ile direnç gelişiminin önlenmesi amaçlanmıştır (46).

2004 yılı verilerine göre bakteriyolojik muayene oranı % 30'lardan % 70'lere çıkarılmış, hastalık insidansındaki düşme devam etmiştir. 1990'da insidans 44, 1995'de 35.48, 2000'de 26.24, 2003'de 24.31'dir. Mortalite ise 1945 yılında yüzbinde 262 iken 1950'de 204, 1960'da 55, 1970'de 20, 1980'de 8.8, 1990'da 3.2, 2000'de 1.8'dir. Tüberküloz,

ölüm nedenleri arasındaki sırasına göre 1980 yılında 8. sıra da iken 2000 yılında 19. sıraya gerilemiştir. Türkiye’de verem savaşı dispanserlerine 2007 de kayıt edilen hasta sayıları: Toplam hasta: 19,694, olgu hızı: 27.9, yeni olgular 17,781 (% 90), tedavi görmüşler 1,913, Bakteriyojik tetkikler: akciğer tüberkülozu: 13,690, mikroskopi yapılan 12,219 (% 89.3), mikroskopi pozitif: 8,797 (% 64.3), kültür yapılan: 8,379 (% 61.21), kültür pozitif: 6,868 (% 50.2), ilaç duyarlılık testi yapılan 4,917, çok ilaca dirençli tüberküloz: 240 (% 4.9)’dır. Bir ülkede tüberküloz savaşı, Ulusal ve Uluslararası otoritelerin birlikte planlı, programlı çalışmasıyla ile olur. Bu plan ve kararlılık içinde Tüberküloz laboratuvarlarının önemi tartışmasız çok büyüktür. Mikobakteri laboratuvarı tüberküloz kontrolü ve eradikasyonunda en önemli ayaklardan birini oluşturur. Laboratuvar yoksa tanı yoktur, tanı yoksa tedavi yoktur, tedavi yoksa Doğrudan Gözetimli Tedavi Strateji’ si (DGTS) yoktur, DGTS yoksa tüberküloz kontrolü yoktur (49,50).

Dünya Sağlık Örgütü Küresel Tüberküloz Kontrolü 2009 Raporu” verilerine göre ülkemizin de içinde yer aldığı DSÖ Avrupa Bölgesi’nde 2008 yılı tüberküloz insidansı yüz binde 48 iken, Türkiye’nin tüberküloz insidansı yüz binde 30 dur. DSÖ Avrupa Bölgesi’nde 2008 yılı tüberküloz nokta prevalansı yüz binde 39 iken Türkiye için bu rakam yüz binde 22 dir.DSÖ’nün tüberküloz insidansı ile ilgili hedefi 2015 yılına kadar insidans hızı artışının durdurularak geriye çevrilmesidir. Türkiye’nin tüberkülo insidans hızı, yıllara göre azalmakta olup 2002 yılında yüz binde 40 iken, 2008 yılında yüz binde 30 dur Ülkemiz tüberküloz insidansının orta düzeyde olduğu ülkeler arasında yer almaktadır. (51).

2.9. Klinik Tabloları

Yüzyıllardır insanlarda hastalık oluşturmakta olan *Mycobacterium tuberculosis* in varlığını ilk kez 1882 yılında Robert KOCH göstermiştir. Dünyada en çok akciğer tüberkülozuna rastlanmaktadır. Bakteri vücuda solunum yolu ile girerek enfeksiyon oluşturur. Bakteriler hastanın öksürmesi ve aksırması sonucu damlacıklar içinde dışarı çıkarlar. Bu damlacıklardan 5µm çapında olanlar enfeksiyon kaynağı olarak damlacık çekirdeği haline dönüşür. Damlacık çekirdekleri hava içinde birkaç saat asılı halde dolaşabilir. Başka bir kişi

tarafından solunum yolu ile alınan damlacık çekirdeği akciğerlere ulaşır ve lokalize olduğu yerde çoğalırsa enfeksiyon başlamış demektir. Enfeksiyon kapalı bir ortamı paylaşan kişiler arasında (özellikle aile fertleri, okul, hastane, kışla ve hapisane ortamında birlikte yaşamak zorunda olanlar arasında) daha hızlı yayılır. Enfekte olmuş herkes hasta olmaz. Hatta enfekte olan kişilerin büyük bir kısmında hastalık hiç gelişmez. Mikroorganizma vücut içinde uzun bir zaman dormant (aktif olmayan) halde kalabilir. Tek belirti kişinin PPD 'sinin pozitif olmasıdır. Böyle kişiler hayatlarının geri kalan kısmında hastalık riski taşıyarak yaşarlar. Ancak %5-10' unda hastalık ortaya çıkar (5).

2.9.1. Primer Tüberküloz(Çocuk Tüberkülozu)

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

Eğer konakçının immün yanıtı yeterli değilse kazeifikasyon nekrozu genişleyip klinik olarak belirginleşen primer tüberküloz (hastalık) dönemi başlar (29) .

Akciğer parankimindeki lezyon, sıklıkla iyi oksijenlenen alt ve orta loblarda görülür. Primer tüberküloz genellikle asemptomatiktir. Bir yaş altı çocukların % 45 - 50 sinde, bir yaş üstü çocukların %85-95 inde tesadüfen çekilen akciğer grafileri ile tanı konur. Bazı olgularda hafif ateş, kuru öksürük, kilo kaybı ve gece terlemesi olabilir ya da tedaviye yanıt vermeyen ateş olarak ortaya çıkabilir. Balgam pozitif aktif tüberkülozlu hasta ile temas, akciğer grafisinde hiler/paratekal lenfadenopati ve/ya Ghon odağının varlığı ve PPD pozitifliğinin olması durumunda primer tüberküloz düşünülmelidir (5).

2.9.1.1. Miliyer Tüberküloz

Kazeöz bir odağın komşu kan damarlarına açılması veya damar duvarındaki tüberkölün kazeifiye olarak dolaşıma bol miktarda basil vermesi, özellikle 0-4 yaş arası immün sistemi zayıf çocuklarda miliyer tüberkölöz gelişimine yol açar. Yetişkinlerde ise eski bir tüberkölöz lezyonunun yeniden alevlenmesi ve kan damarlarında erozyon yapmasıyla veya tüberkölöz lezyonu içeren bir organda yapılan cerrahi işlemle basiller kana karışabilir ve böylece miliyer tüberkölöz gelişebilir. Miliyer tüberkölözlu hastaların % 30'unda PPD negatiftir (3).

2.9.2. Sekonder Tüberkölöz

Primer enfeksiyon geçiren ve tüberkölün deri testi pozitifleşen kişilerde, enfeksiyondan en az beş yıl sonra yaşamlarının herhangi bir döneminde gelişen tüberkölözür. İki şekilde gelişebilir:

2.9.2.1. Endojen Reaktivasyon

Primer enfeksiyondan sonra aylar veya yıllar boyu dokularda dormant kalan basillerin, stres, steroid tedavisi, kanser kemoterapisi veya HIV enfeksiyonu gibi hücresele immün yanıtın baskılandığı herhangi bir zamanda aktif hale geçmesiyle oluşur (21).

2.9.2.2. Ekzojen Reenfeksiyon

Daha önce primer enfeksiyon geçirmiş, PPD'si pozitif bireyler, eğer tüberkölöz basiliyle yeniden karşılaşılırsa, mevcut hücresele immünite bu basillerin alvollere yerleşmesini, çoğalmasını önler fakat bu koruma tam değildir. Hücresele immünite zayıfladığında basiller yeniden çoğalmaya başlar (3).

Sekonder tüberkölöz gelişiminde bu mekanizmalardan hangisinin belirleyici olduğu bilinmemektedir. Fakat enfeksiyon riskinin düşük olduğu gelişmiş ülkelerde endojen reaktivasyon, enfeksiyon riskinin yüksek olduğu gelişmekte olan ülkelerde ise ekzojen reenfeksiyonun varlığı gösterilmiştir (3).

2.9.3. Ekstrapulmoner Tüberküloz

Tüberküloz akciğer dışında plevra, perikard, periton gibi vücut zarlarını genellikle komşuluk yoluyla; kemik ve eklemleri, böbrek, genital, gastrointestinal, merkezi sinir sistemini ise hematogen yolla infekte edebilir. Deri tüberkülozu direkt temasla oluşabilir (3).

2.10. Laboratuvar Tanı

Tüberküloz tanısında ilk adım, hastalığın akla getirilmesidir. Her ne kadar, hastanın hikayesi, şikayetleri, fizik muane bulguları ve geleneksel indirekt teşhis yöntemleri (tüberkülin deri testi, akciğer grafisi vb.) yol gösterici olsa da, tüberkülozun kesin tanısı, uygun klinik örneklerden basilin izole edilmesiyle olur. Ancak tüberküloz basillerinin, en uygun şartlarda bile, gözle görülebilen koloniler meydana getirmesi için, 2 haftadan daha uzun bir süreye ihtiyacı vardır. Bu nedenle örneklerde hazırlanan direk boyalı preparatlarda aside dirençli basillerin gösterilmesi ön tanıda önemlidir (5).

Dirençli olguların ciddi bir halk sağlığı sorunu olmasından dolayı hem etkili tedaviye hemen başlamak hem de aktif tüberkülozun çevreye bulaşını engellemek için kısa sürede sonuç veren yöntemlere ihtiyaç vardır.

2.10.1.Klinik Materyalin Hastadan Alınması ve Laboratuvara Gönderilmesi

Tüberküloz tanısı için klinik örneklerin alınma, laboratuvara gönderilme ve işlenmesi için belirli kurallar vardır:

Örnekler temiz, steril, sızdırmaz, burgulu kapaklı ve tek kullanımlık kaplar içerisine yeterli miktarda alınmalıdır.Kabın üzerine hasta ve alınan örnekle ilgili bilgiler yazılmalıdır. İlk örnek antimikrobiyal tedaviden önce alınmalıdır. Kontaminant bakterilerin üremesini engellemek için örnek en kısa zamanda laboratuvara gönderilmeli ve işlenmelidir. Örneğin

bekleme süresi 1 saati aşacaksa örnek 2-8 °C'de buzdolabında saklanmalıdır. Sürüntü örnekleri kabul edilmez; fakat başka örnek alınamıyorsa örnek transport besiyerinde gönderilmelidir. Kabul edilmeyen örneklerin neden kabul edilmediği ve yenisinin temini ile ilgili bilgi ilgili doktor bilgilendirilmelidir. İşlenmeyen örnekler 3 gün 2-8 °C'de saklanabilir (52).

Tüberküloz değişik organ ve sistemleri tutulumları ile seyrettiğinden, hastalığın tanısında balgam, mide lavaj sıvısı, bronşial lavaj sıvısı, laringeal sürüntü, beyin omurilik sıvısı (BOS), plevral sıvı, idrar, gaita, cilt ve yumuşak doku biyopsi örnekleri, lenf dokusu gibi çok çeşitli klinik örnek kullanılabilir. Hastalardan alındıktan sonra mikobakteriyoloji laboratuvarına gönderilen klinik örnekler, steril örnekler (kan, kemik iliği, BOS, suprapubik aspirasyon, diğer vücut sıvıları ve biyopsi örnekleri) ve ya farklı mikroorganizmaların bulunduğu vücudun çeşitli bölgelerinden alınmış örnekler (balgam, abse, bronko alveoler lavaj sıvısı, açlık mide suyu, laringeal sürüntü, idrar, gaita, cilt ve yumuşak doku) olmak üzere iki grup altında toplanmaktadır. Klinik örnekler; organik kalıntıları sindirip homojenize etmek için homojenizasyon ve dekontaminasyona neden olabilecek mikroorganizmaları (bakteri, mantar vs.) ortamdan uzaklaştırmak için dekontaminasyon işlemi uygulanmaktadır (53).

Balgam ; Akciğer tüberkülozlu olgularda en sık kullanılan örnektir. 5-10 ml, derin prodiktif bir öksürükle, akciğerlerden gelen koyu eksüdatif sabah balgamı tercih edilir. Tedavi takibi için gönderilecek olan balgamın ilki tedavi başlamasından üç hafta sonra olmalı, bunu izleyen örnekler, birer hafta ara ile gönderilmelidir. **İndüklenmiş balgam**: Hastanın balgam çıkaramadığı durumlarda, hastaya bir nebulizatör yardımıyla, 10 dakikada %10 NaCl içeren içeren steril ılık su inhalasyonu yaptırılarak alınan balgam örneğidir. Örnek en az 10 ml olmalıdır. **Bronkoalveoler lavaj**: Kullanılan bronkoskop steril olmalı ve alınan örnek en az 5 ml olmalıdır. **Bronşial fırçalama**: Fırçalama yöntemi ile alınan örnekler Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içinde laboratuara gönderilmelidir. **Transtrekeal aspirat**: Alınabileceği en fazla miktarda alınıp, steril kaplarda veya enjektörle laboratuara gönderilmesi uygundur. **Mide açlık sıvısı**: Kooperasyonu tam olmayan, istenen özellikte balgam çıkaramayan hastalarda,

(özellikle çocuklarda)sabah aç karna alınan mide yıkama suyuna başvurulabilir. Aç karnına sabah 5-10 ml alınmalı ve ardışık üç gün boyunca gönderilmelidir. Örnek 4 saat içinde işleme alınmalıdır. Eğer bekleyecekse 100 mg sodyum karbonatlı steril kap içinde saklanmalıdır. **İdrar:** Üriner sistem tüberkülozundan şüpheleniliyorsa; sabah idrarı, orta idrar tekniği ve 3 gün üst üste alınması uygundur. **Steril vücut sıvıları (plevral, perikardial, peritonel sıvılar ve beyin omurilik sıvısı):** Miktarı mümkün olan en fazla miktarda olmalıdır. (BOS için en az 2 ml) Miktar az ise bir sıvı besiyerine ekim yapılmalıdır. (Middlebrook 7H9, Dubos Tween albumin gibi) Bu sıvıların çoğu fibrinojen içerebileceğinden antikoagülan olarak sodyum polietanol sülfanat (SPS) veya heparin eklemek gerekebilir. **Abse ve aspirasyon sıvıları:** Alkol ile cilt temizliği yapıldıktan sonra enjektörle alınabilecek en fazla miktarda materyal alınır. Miktarın az olması durumunda Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri taşıma amacıyla kullanılabilir. **Biyopsi örnekleri:** Biyopsi örneği en az 1 gr ağırlığında olacak şekilde steril kaplarda gönderilmelidir. Formol içindeki doku kabul edilmemelidir. Alınan örnek gazlı beze sarılmamalıdır. **Kan:** Aseptik koşullarda alınan kan örneği direk hasta başında en za 5 ml olacak şekilde 10 ml'lik isolatör tüpe veya BACTEC 13A şişesine ve bu amaçla kullanılan tüplere aktarılır. Ekim hasta başında yapılamayacaksa 10 ml.kan, içinde SPS veya heparin bulunan tüplere konulur. **Dışkı:** En az 1 gr. dışkı, tek kullanımlık parafin içermeyen kaplara konulmalıdır (52, 54).

2.10.2. Mikroskopik İnceleme

Doğrudan mikroskopik boyama ve inceleme, tüberkülozun laboratuvar tanısında en hızlı, basit ve ucuz bir yöntemdir. Tüberküloz bakterilerinin bu teknik ile gösterilmesi ilk kez 1882 yılında Ehrlich ve Ziehl'in önerdiği ve 1883 yılında Ziehl tarafından modifiye edilen Ehrlich – Ziehl (EZN) ya da daha yaygın olarak kullanılan ifadesi ile Aside Dirençli Boyama (ARB: asido resistant bakteri) ile mümkün olmaktadır (55).

Basilin direk mikroskopi ile görülebilmesi için, balgamın her ml'de 5.000 ile 10.000 basil bulunması gereklidir. Tüberküloz dışı mikobakteriler, *Rhodococcuslar* *Nocardialar*,

Leigeanella micdadei, *Cryptosporidium* ve *Isosporaların* kistleride aside dirençli boyanma özelliğine sahiptirler ve bu nedenle yalancı pozitif sonuçlara neden olabilmektedirler (56, 57).

Duyarlılığı ve özgüllüğü düşük olmasına rağmen klinik örnekte aside dirençli basil gösterilmesi çoğu zaman tedaviye başlanması için yeterlidir. Boyama için iki tip boya tercih edilir:

- Karbol fuksin boyları:
 - Ehrlich- Ziehl-Neelsen (sıcak boya)
 - Kinyoun (soğuk boya)

- Florokrom boya: Auramin - rodaminle hazırlanır.

Mikobakterilerin hücre duvarı yapısı diğer bakterilerden oldukça farklıdır. Lipit yönünden zengin biyokimyasal karmaşık yapılar içermesi, kullanılan boyaların hem içeri girmesini hem de dışarı çıkmasını zorlaştırır. Bu özellik, mikobakterileri diğer bakterilerden ayırt edilmesini sağlayan ARB boya yöntemlerinin temelini oluşturur. Ülkemizde de en yaygın kullanılan boya yöntemi EZN' dir. Direk yayma ya da homojenizasyon - dekontaminasyondan sonra hazırlanan yayma preparat, ışık mikroskopunda immersiyon objektifi ile incelenmektedir. Karşı boya olarak metilen mavisi kullanıldığında aside dirençli basiller mavi zeminde pembe - kırmızı ince çubuklar halinde görülebilmektedir (58).

Auromin- rhodamine yöntemiyle boyanan aside dirençli organizmalar sarı turuncu renkte floresans verirler. Auromin - rhodamine boyama yönteminin EZN ye kıyasla daha hassas olduğu ve kısa zamanda geniş bir tarama imkanı verdiği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (59).

Auromin- rhodamine boyama yönteminde değerlendirme floresan mikroskopta yapıldığı için bu mikroskobu temin edemeyen laboratuvarlar için DSÖ tarafından EZN yöntemi önerilmektedir.

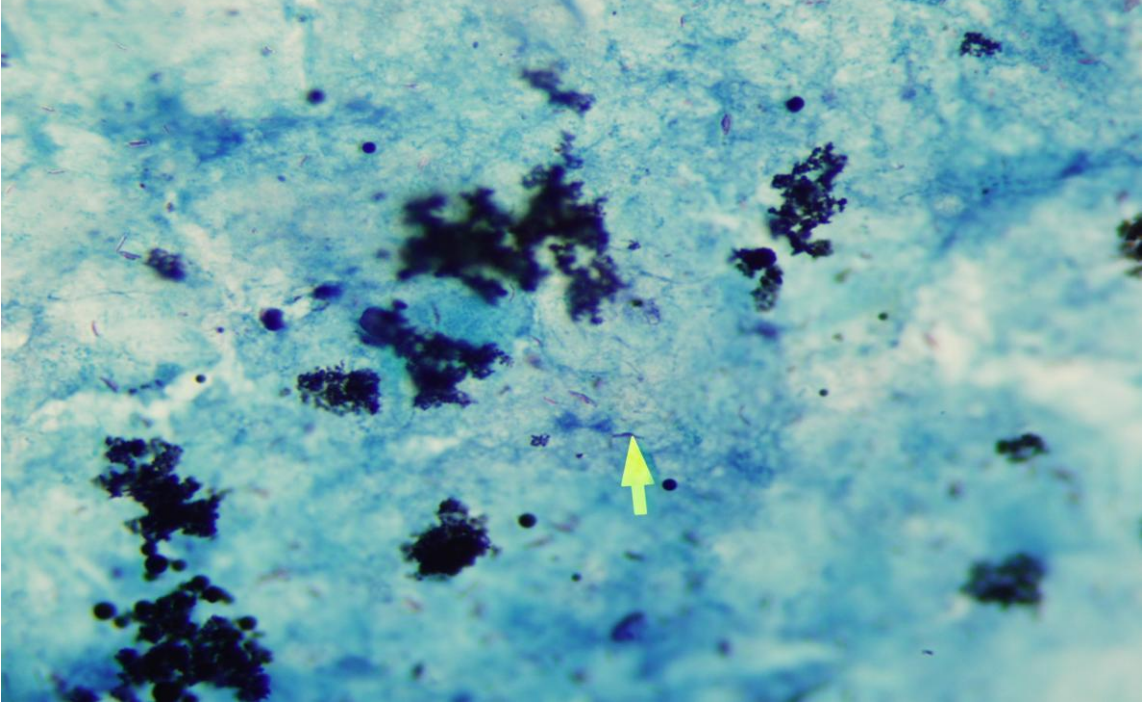
Karbolfuksin boyalarla boyandığında basiller ilk aldığı boyayı asit – alkol dekolorizasyonuna rağmen bırakmazlar. Zıt boya metilen mavisi ile boyanmayıp ışık mikroskopunda mavi zeminde pembe - kırmızı basiller şeklinde görünürler. Uygun şekilde hazırlanıp boyanmış bir preparatın en az 100-300 alan taranması gerekir

ARB boya skorum:

- 300 alanda basil yok Negatif
- 300 alanda 1- 2 basil Şüpheli (test tekrarlanmalı)
- 100 alanda 1- 9 basil (1 pozitif sonuç) +
- 10 alanda 1- 9 basil (2 pozitif sonuç) ++
- 1 alanda 1- 9 basil (3 pozitif sonuç) +++
- 1 alanda 10 ve üzeri basil (4 pozitif sonuç) ++++

Direk preparat hazırlama aerosol oluşturan bir işlem olduğu için çalışan personel ve çevreyi korumak için güvenlik kabini içinde yapılmalıdır

(60).



Resim 2.1 Laboratuvarımızda direk bakıda EZN boyama yöntemiyle tespit ettiğimiz ARB + basiller (orijinal).

2.10.3 Klinik Örneklerin İşlenmesi

Tüberkülozun mikrobiyolojik tanısı için laboratuvara gönderilen klinik örneklerin çoğunluğu, mikobakterilerle birlikte, klinik örneğin alındığı vücut bölgesine özgü flora üyeleri (bakteri, mantar vb.) ve bu mikroorganizmaların etrafını sararak onları çevre şartlarına daha dirençli hale getiren eritrosit, lökosit vücut sıvıları ve doku parçaları gibi organik kalıntıları da içerirler. Tüberküloz etkeni bakterilerin izolasyonu için klinik örneklerin kan hücrelerinden, vücut sıvıları ve doku parçaları gibi organik kalıntılardan, kontaminant bakterilerden ve mantarlardan arındırılmaları gerekir. Bu amaçla homojenizasyon / dekontaminasyon ve örnekteki bakteri konsantrasyonunu arttırmak için konsantrasyon işlemi uygulanır (61).

Kontaminant bakteri ve mantarlar tüberküloz basilinden daha çabuk üredikleri için kültür yapılan besiyerinde mikobakterilerin üremelerini baskırlar. Dekontaminasyon yöntemiyle bunların ortadan kaldırılması amaçlanır (61, 62).

Bu yöntemlere genel anlamda 'Homojenizasyon-Dekontaminasyon Yöntemleri'denir. Dünya çapında çok sayıda yöntem tanımlanmıştır. Bunların çoğunluğu, akciğer tüberkülozu tanısı amacıyla balgam örneklerini temel alan, küçük ve büyük ölçekli laboratuvarlarda rahatlıkla uygulanabilmesi amacıyla geliştirilmiş işlemlerdir. Yöntemlerde farklı kimyasal malzemeler ile farklı laboratuvar alet ve cihazları kullanılmasına rağmen hepsi aynı amaca hizmet eder. Her yöntemin kendine özgü avantajı ve dezavantajı vardır. Önemli olan mikobakteri izole etmeye çalışan laboratuvarın; laboratuvarında yer alan biyogüvenlik koşulları, laboratuvar donanımı (alet, cihaz, kimyasal malzemenin sorunsuz temini, vb.) rutin çalışma yükü, tecrübeli ve yeterli sayıda personel durumu gibi kriterleri dikkate alarak kendine en uygun yöntemi seçmesidir (62).

Homojenizasyon- dekontaminasyon yöntemleri dört farklı işlemde oluşur.

1.Konsantrasyon: İdrar ve steril vücut sıvılarında (BOS, plevra sıvısı, asit sıvısı vb.) balgam örneklerine göre daha az sayıda basil bulunur. Bu nedenle izolasyon şansını arttırmak için, büyük hacimde laboratuvara gelen bu örnekleri daha küçük hacimlere indirgemek gerekir. Bu amaçla bu örnekler 3000-4000 devirde,15-20 dakika santrifüjlenir. Sonraki işlemler elde edilen bu çökelti üzerinden yürütülür. Santrifügasyon, homojenizasyon - dekontaminasyonun değişik basamaklarında, örnek üzerine eklenen sıvılardan dolayı hacmi artan örneği yoğunlaştırmak için de uygulanır (62).

2.Homojenizasyon: Bu yöntem balgam, mide açlık suyu ve biyopsi örnekleri gibi mukus, epitelyum ve şekilli elemanları içeren örneklerde, bu yapılar arasında gizlenmiş olan basilleri ortaya çıkarmak için uygulanır. Homojenizasyon işlemi için genellikle sodyum hidroksit (NaOH) ya da N-asetil- L-sistein (NALC) gibi kimyasal maddeler kullanılır. Bu

maddeler sayesinde yoğun yapılar erir, bu yapılar arasına hapsolmuş basiller ortaya çıkar. Sonuçta basiller örnek içinde dengeli bir dağılım gösterirler (62).

3.Dekontaminasyon: Steril olmayan klinik örnekler, izole edilmeye çalışılan mikobakteriler yanında alındıkları anatomik bölgeye ait flora üyelerini (bakteri, maya hücreleri vb.) de barındırırlar. Kontaminant mikroorganizmaların üremesiyle besiyerindeki besin öğeleri tükeneceğinden ya da besiyeri yapısı bozulacağından (pH vb) mikobakteriler üremeye fırsat bulamazlar. Bu nedenle, klinik örnekler NaOH, oksalik asit vb. kimyasal maddelerle muamele edilerek kontaminant mikroorganizmalar uzaklaştırılmaya ya da oranları azaltılmaya çalışılır. (62).

4.Nötralizasyon: Mikobakteriler pH 6.8 de iyi ürerler. Bazı örnekler genel yapı itibarı ile asidik bir yapıya sahipken, bazıları ise homojenizasyon-dekontaminasyon işlemleri sırasında kullanılan kimyasal maddelerden dolayı asidik ya da alkali bir yapı kazanırlar. Bu nedenle fosfat tampon çözeltisi ya da brom-timol, fenol kırmızısı gibi indikatör eşliğinde asit (hidroklorik asit, sülfirik asit vb.) ve alkali çözeltiler (NaOH vb.) kullanılır (62).

Homojenizasyon ve dekontaminasyon işlemi için kullanılan yöntemler; NALC - NaOH yöntemi, NaOH yöntemi, Zefiran-Trisodyum fosfat yöntemi (Z-TSP), Okzalik asit yöntemi, Cetilpiridinyum klorid-sodyum klorid yöntemi, Sülfirik asit yöntemidir. Mikobakteriyoloji laboratuvarlarında en çok NALC-NaOH yöntemi tercih edilmektedir. Bu yöntemde kullanılan kimyasallardan NALC mukolitik, %4 lük NaOH dekontaminant olup; %2.9 luk sodyum sitrat klinik örnekte bulunabilecek ağır metal iyonlarını bağlayarak NALC 'ın inaktive olmasını önlemektedir. Zefiranın mikobakteriyostatik olması bir dezavantajdır. Klinik örneğin *P.aeruginosa* ile kontamine olduğu düşünüldüğünde oksalik asit yöntemi tercih edilir. İdrar örneklerinin kontaminasyonu diğer yöntemlerle önlenemiyorsa sülfirik asit yöntemi kullanılabilir. Steril vücut sıvılarında dekontaminasyonun yapılmasına gerek yoktur. Santrifüj sonrası besiyerine ekim yapılabilir (63, 54, 55).

2.10.4 Kültür Yöntemleri

Tüm mikobakteri türleri aside dirençli olduğu için, balgamda ve diğer klinik örneklerde aside dirençli basillerin saptanması, basilin tipi ve canlılığı konusunda bilgi vermez. O nedenle, yayma incelemede ARB pozitifliğinin saptanması kesin tüberküloz tanısı sağlamaz. Tüberkülozda kesin tanı saf kültürde *M.tuberculosis* izolasyonu ile sağlanır (56).

2.10.4.1 Konvansiyonel Kültür Yöntemleri ve Besiyerleri

Kültür yöntemleri geç sonuç vermesine rağmen, tür düzeyinde identifikasyon işlemleri için gerekli izolatların elde edilemesine, bakterilerin canlılıklarının doğrudan gösterilebilmesine, ilaç duyarlılık testlerinin yapılarak hastaların doğru tedavi edilebilmesine, elde edilen izolatların daha sonraki araştırmacılar için saklanabilmesine ve epidemiyolojik verilerin elde edilebilmesine olanak sağlamaları açısından tüberküloz tanısında halen altın standart olarak devam etmektedir (64).

Mikobakterilerin ikiye bölünmesi için gerekli süre 16-18 saat kadar olduğu için besiyerinden izole edilmeleri için kültürlerin uzun süre inkübe edilmeleri gerekmektedir. Kültür süreleri ise katı besiyerinde 35-37 °C de 6-8 hafta kadardır (64).

Mikobakterilerin izole edilmeleri ve çeşitli özelliklerinin incelenmesi amacıyla kullanılan konvansiyonel besiyerleri katı ve sıvı olmak üzere iki tiptir. Tüp ya da petri kabı kullanarak hazırlanan katı besiyerinde karışık kolonilerin ve kontaminatların tesbiti mümkündür. Katı özellikteki besiyerlerini ise yumurta bazlı ve agar bazlı olmak üzere iki bölümde incelemek mümkündür. Tam yumurta ya da yumurta sarısı içeren yumurta bazlı besiyerleri arasında bugün en yaygın kullanılanı Löwenstein-Jensen besiyeridir. Ancak Petraghani ve American Trudeau Society Medium gibi besiyerleri de tercih edilmektedir. Tipik koloni morfolojisi oluşturmaları ve daha bol üremeleri nedeniyle özellikle primer izolasyonda L-J besiyerinin kullanılması önerilmektedir. Yumurta bazlı besiyerlerinin opak görünümlü olmasına karşın, agar bazlı besiyerleri şeffaftır. Bu nedenle, ekim yapılan

besiyerleri 10-12 gün sonra mikroskop altında incelenirse, oluşan kolonileri görmek mümkün olmaktadır. M 7H10 ve M 7H11 en çok tercih edilen agar bazlı besiyerleridir (65).

Tablo.2.2 Mikobakterilerin genel üretim besiyerleri

Besiyeri	İçerik	İnhibitör ajan
Löwenstein-jensen	Koagüle tam yumurta,bazı tuzlar, gliserol, patates unu	Malaşit yeşili 0.0259/100 ml.
Petragnani	Koagüle tam yumurta,yumurta sarısı, süt, gliserol, patates unu	Malaşit yeşili 0.052/100ml
Middlebrook 7H10	Bazı tuzlar, vitaminler, kofaktör, oleik asit, albümin, katalaz, gliserol, dextroz	Malaşit yeşili 0.0025/100ml
Middlebrook 7H11	Bazı tuzlar, vitaminler, kofaktör, oleik asit, albümin, katalaz, gliserol, dextroz%0.1 kazein hidrozilat	Malaşit yeşili 0.0025/100ml
American Thoracic Society Medium(ATSM)	Koagüle taze yumurta sarısı,bazı tuzlar, gliserol, patates unu	Malaşit yeşili 0.01/ 100ml

Bunun yanı sıra kontaminasyona neden olan mikroorganizmaların üremesini etkin bir şekilde engellemek amacıyla selektif besiyerleri olan, LJ Gruft, Mycobactosel LJ, Mitchison selektif 7H11 de kullanılabilir. Primer izolasyonda besiyerlerinden en az birinin selektif olması önerilir (64).

Sıvı besiyerleri içinde yer alan Middlebrook 7H9 ve Dubos- tween albumin, mikobakterilerin stok suşlarının subkültürlerinin yapılması, duyarlılık deneyleri ve diğer

invitro deneylerde inokulum hazırlanması amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca bakteri sayısının az olduğu steril bölgelerden alınan klinik örneklerde, bakteriyi çoğaltmak ve dolayısıyla izolasyon şansını artırmak amacıyla da kullanılabilir. Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri, çoğu hızlı kültür sisteminde temel besiyeri olarak kullanılmaktadır (20).

Günümüzde yumurta bazlı besiyeri olan L-J besiyeri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu besiyerinin avantajları uygun saklama koşullarında uzun süre korunabilmeleri, içerdiği fosfolipidler sayesinde besiyeri ve ya inokulum içindeki toksik maddeleri bağlayarak etkisizleştirilmesi, içerdiği malaşit yeşili sayesinde kontaminant mikroorganizmaların üremesini engellemesi, ucuz olması ve birçok mikobakteri türünü üretebilmesidir (66).

L- J Besiyene Kültür Ekimi:

Homojenizasyon-dekontaminasyon işlemi sonrası elde edilen örnekten L- J besiyerine 0.1 ml ekim yapılır. Tüpler sağa sola ve aşağıya yukarıya çevrilerek örneğin besiyeri yüzeyine yayılması sağlanır. Ekim yapılan tüplerin kapakları gevşetilerek özel tablalara ya da süpore ekim yüzeyi yukarıya bakacak şekilde yatık olarak yerleştirilir. 37 °C 'lık etüvde bir haftalık inkübasyondan sonra, tüplerin kapakları sıkılaştırılıp dik olarak süpore yerleştirilir.

Besiyerleri 6-8 hafta boyunca haftada bir incelenir. Hızlı üreyen mikobakteriler birinci haftada; yavaş üreyenler 3-4. haftada gözle görülür büyüklükte koloni oluştururlar. Genellikle 3-4 haftalık inkübasyon süresi içinde kuru, kenarları düzensiz, açık sarı koloniler görülmesi pozitif kültür olarak değerlendirilir.6-8 hafta sonunda üreme yoksa sonuç kültür negatiftir (55).

2.10.4.2 Hızlı Kültür Yöntemleri

Günümüzde birçok laboratuvarında, konvansiyonel besiyerlerinin yanısıra tüberküloz etkeni bakterilerin izolasyon süresinin çok daha kısa ve izolasyon oranının çok daha yüksek olduğu hızlı kültür sistemleri rutin inceleme amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Bu sistemlerde zengin içerikli besiyerleri kullanılarak hem mikobakterilerin izolasyon şansı arttırılmakta hem de mikobakterilerin üremesi erken dönemde sağlanmaktadır. Bu sistemler, Radyometrik Kültür Sistemi (BACTEC 460 TB), Bifazik Sistem (Septi-Check AFB sistemi), Kolorimetrik Kültür Sistemleri (BacT/Alert 3D, TK Kültür Sistemi), Gaz Basınç Değişimini Saptayan Kültür Sistemi (Versa TREK), Floresans Kültür Sistemi, BACTEC MGIT 960 (Mycobacterium Growth Indicator Tube) ve manuel sistemler (MB-Redoks) olarak sıralanmaktadır. (67).

Sistemler arasında izolasyon oranı açısından önemli bir fark olmamakla birlikte, konvansiyonel katı besiyerlerine göre daha yüksek; BACTEC 460 TB sistemine göre daha düşük oranda izolasyon sağladıkları bildirilmektedir (18, 65, 68).

Primer izolasyonda sıvı besiyerlerine ilave olarak bir de katı besiyeri kullanılması Amerikan Hastalık Kontrol Merkezi (Centers for Diseases Control) CDC tarafından önerilmiştir ve bu kombinasyonla mikobakterilerin izolasyon şansının arttığı bilinmektedir (69).

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

manuel olarak kullanılmaya da uygundur. Kan dışındaki diğer tüm klinik örnekler için kullanılabilir (18, 20).

Bir BACTEC MGIT 960 tüpünde 7 ml. Modifiye Middlebrook 7H9 broth ve kazein peptonu bulunmaktadır. Tüpün pH'sı 6.7 dir ve %10 CO2 içermektedir. BACTEC MGIT 960 sisteminde kullanılan growth supplement içerisinde OADC bulunmaktadır. Oleik asit mikobakteriyel metabolizmada kullanılır, albümin mikobakteriler için toksik olabilecek yağ asitlerini bağlar, dekstroz enerji kaynağı olarak kullanılır ve katalaz toksik peroksitleri parçalar ve bu sistemde kullanılan BBL MGIT PANTA ise antimikrobial karışım içermektedir (Polimiksin B, Amfoterisin B, Nalidiksik asit, Trimothoprim ve Azlosilin) (70).

BACTEC MGIT 960 Sisteminde Ekim ve İnkübasyon:

Bir şişe liyofilize BBL MGIT PANTA antimikrobiyal madde, 15 ml BACTEC MGIT growth supplement ile sulandırılır. MGIT tüpleri üzerine hasta bilgileri yazılır ve her bir tüpe 0.8 ml. growth supplement – antimikrobiyal karışımından ilave edilir. Homojenizasyon-dekontaminasyon işlemi uygulanmış olan falkon tüpünde ki süspansiyondan 0.5 ml. MGIT tüpüne eklenir ve tüpün kapağı sıkıca kapatılarak iyice karıştırılır. Tüpler barkodu okutularak cihaza yerleştirilir. Cihaz tarafından pozitiflik alarmı veren tüp cihazdan çıkarılarak ARB araştırılmak üzere yayma preparat hazırlanır. Yayma preparat EZN yöntemiyle boyanarak ARB ya da kontaminasyon açısından incelenir. ARB varsa; izolasyon, identifikasyon ve duyarlılık testleri yapmak üzere katı besiyerlerine subkültürler yapılır. Negatif kültürler cihazda 42 gün boyunca inkübe edildikten sonra negatif olarak sonuçlandırılır (70).

BACTEC 460 TB (radyometrik kültür sistemi) Sistemi, izolasyon, identifikasyon ve duyarlılık deneylerinin uygulandığı bir sistem olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır (18).

Sistemde izolasyonun yanısıra, *M. tuberculosis* kompleksi ile tüberküloz dışı mikobakterilerin (MOTT) ayrımı yapılabilmekte ve *M. tuberculosis* kompleksi suşlarının primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılığı çalışılmaktadır. BACTEC 12B (M 7H12) ve

BACTEC 13A (M 7H13) olmak üzere iki tip besiyeri içeren bu sistem, besiyerlerinde bulunan ¹⁴C işaretli palmitik asitin kullanılması ve metabolizma sonucu oluşan ¹⁴CO₂ in 0-999 sayısal değerleri arasında üreme indeksi (GI) olarak ölçülmesi prensibi ile çalışmaktadır. Ekim işleminden önce besiyerlerine PANTA içeren antibiyotik karışımı ilave edilmelidir. Başarı ile kullanılmakla beraber, sistemde yer alan besiyerlerinin radyoaktif madde içermesi ve cihazda yapılan rutin kontroller sırasında meydana gelen çapraz kontaminasyon sorun oluşturmaktadır. Günümüzde alternatif izolasyon sistemlerinin geliştirilmesi için çalışmalar devam etmektedir (18,20).

ESP II, selüloz sünger ve M 7H9 sıvı besiyeri içeren bir sistemdir. Sistemde mikroorganizmaların üremesi sonucu oluşan gaz basıncındaki değişiklikler ölçülerek değerlendirme yapılır. Bilgisayar destekli bir sistemdir ve besiyerinde oluşan gaz basıncındaki değişiklik grafiksel olarak bilgisayarda görüntülenir. Besiyerlerine ekim yapılmadan önce, mikobakterilerin üremesini destekleyen OADC ve kontaminasyonu engellemek amacıyla antibiyotik karışımı ilave edilir. Sistem tüm klinik örnekler için uygundur (18, 20).

MB/Bac T, besiyerinin dip kısmında kolorimetrik bir sensor içeren ve oluşan CO₂ düzeyini ölçerek üremeyi değerlendiren bir sistemdir. Bilgisayar desteği bulunan sistemde besiyerleri sürekli kontrol altındadır. Steril örnekler ekilmeden önce besiyerlerine reconstitution sıvısı ilave edilirken; steril olmayan örneklerin ekiminden önce antibiyotik karışımı eklemek gereklidir. Sistem kan dışındaki tüm örnekler için uygundur (18).

BACTEC 9000 MB, besiyerlerindeki oksijen kullanımının floresans ile belirlendiği bir sistemdir. Modifiye M 7H9 sıvı besiyerlerine ekimden önce PANTA ilave edilir. Sistemde balgam ve diğer solunum yolu örnekleri için ‘‘Myco/F sputa’’ , kan ve diğer steril vücut bölgelerinden alınan örnekler için ‘‘MycoF/lytic’’ besiyeri kullanılır (18).

Septi-Check AFB, sıvı (M 7H9) ve üç tip katı (LJ, M 7H11, çukulatamsı agar) besiyerinin kullanıldığı bifazik bir kültür sistemidir. Çukulatamsı agar kontaminasyonu belirlemek amacıyla kullanılır. Kültür işleminden önce besiyerine glukoz, gliserin, oleik asit,

pridoksal HCl, katalaz, albumin, azlosilin, nalidiksik asit, trimetoprim, polimiksin B ve amfoterisin B içeren zenginleştirici ilave edilir. Klinik örneklerin ekiminden sonra besiyerleri ilk 24 saat ters olarak bekletilir ve süre sonunda dik konuma getirilir. Kültür süresince besiyerleri ara sıra hafifçe çalkalanarak sıvı besiyerinin katı besiyerlerine teması sağlanmalıdır. Sistem kan dışındaki tüm klinik örnekler için uygundur (18).

MB Redox sisteminde cihaz gerekmez. Mikobakterilerin izolasyonu amacıyla antibiyotik karışımı ve renksiz tetrazolium tuzu içeren modifiye Kirchner besiyeri kullanılır. Tetrazolium tuzu mikobakterilerin redoks sistemi sayesinde, hücre yüzeyinde granüler formda biriken pembe, kırmızı ve menekşe renginde formazona indirgenir ve üreme sonucu oluşan mikrokoloniler renkli partiküller şeklinde makroskobik olarak görülebilir (18).

TK Kültür sistemi (Salubris AŞ.İstanbul): Kolorimetrik bir sistem olup katı besiyeri içerir. Bu besiyeri içindeki çeşitli boya indikatörleri, mikobakteri üremesinin hızlı bir şekilde tespit edilmesini sağlamaktadır. İnkübasyon süresince asıl rengi kırmızı olan besiyerleri mikobakteri üremesi durumunda sarı renge dönüşmektedir. Herhangi mantar ya da bakteri kontaminasyonunda ise renk yeşil olmaktadır. Bu renk değişimi metabolitlere ve enzimlere bağlıdır (64, 71).

Drancourt ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *M. tuberculosis*'in primer izolasyonunda % 5 koyun kanlı agarın kullanılabileceği de bildirilmiştir (72).

2.10.5. İdentifikasyon

2.10.5.1 *M.tuberculosis* kompleks'in Fenotipik İdentifikasyonu

MTC' nin tür düzeyinde doğru identifikasyonu, özellikle Afrika' da insan tüberkülozunda *M. tuberculosis* dışındaki türler ve sığırlar için *M. bovis* büyük bir sorun olmaya devam etmektedir. Mikobakterilerin yaygın görülen türlerinin fenotipik özelliklerinin belirlenmesinde koloni morfolojisi, üreme zamanı, üreme ısısı, kord faktör oluşumu,

karanlıkta yada ışıkta pigment oluşumunun gözlenmesi; aril sülfataz testi, katalaz aktivitesi tayini, nitrat redüksiyonu, niasin birikimi testi, pirazinamidaz, tellürit redüksiyonu, PNB (para-nitro benzoik asit) içeren besiyerinde üreme, tiyofen-2 karboksilik asit hidrazid (T2H) ile üremenin inhibe edilmesi ve tween 80 hidrolizi gibi biyokimyasal yöntemler kullanılır. Çok büyük emek harcanmakla beraber tüm türlerin tanımlanması mümkün olmamaktadır (73).

2.10.5.2. *M. tuberculosis* kompleks'in Genotipik İdentifikasyonu

Mycobacterium tuberculosis genomunun bütün baz dizilimi çıkarılmıştır. Genom yaklaşık 4.4 mega baz çiftinden oluşmaktadır ve oldukça yüksek oranda guanin - sitozin (%62-70) içermektedir (16, 74).

Mikobakterilerin doğru şekilde tiplendirilmeleri için kullanılacak en ideal yöntem tüm genomun dizi analizini yapmaktır. Ancak genomun büyüklüğü dikkate alındığında bunun zaman alıcı ve maliyetinin yüksek olması kullanımını sınırlamıştır . Bu nedenle mikobakteri DNA'sını direkt restriksiyon enzimi ile kesimi, özgül bir bölgenin restriksiyon enzimi ile kesimi, genom üzerinde bulunan tekrarlayan bölgeleri ya da bunların arasındaki boşlukların polimorfizmini hedefleyen yöntemler geliştirilmiş ve yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Başlıca tipleme metodları; Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), IS6110 RFLP, PGRS-RFLP, Spoligotipleme, MIRU- VNTR, 16S ve 23S rRNA 'dır(74).

2.10.6 *M.tuberculosis* kompleks'in Tanısında Moleküler Yöntemleri

İnsanda infeksiyon yapan mikobakteri çeşitliliğinin artması nedeniyle tanımlamada çeşitli moleküler yöntemler kullanıma girmiştir. Ticari direkt amplifikasyon kitleri başta polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve transkripsiyon aracılı amplifikasyon (TMA) olmak üzere “strand displacement amplification” (SDA) ve ligaz zincir reaksiyonu (LZR) gibi çeşitli amplifikasyon yöntemleri kullanılmaktadır (75).

İlaç direncini saptamada Inno-LIPA RIF TB (Innogenetics NV, Zwijndrecht, Belgium) ve GenoType MTBDR (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany) gibi revers hibridizasyon testleri kullanılmaktadır (76).

2.11. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Klinikte tedavi kararlarının temelini oluşturacak olan duyarlılık testleri aynı zamanda direnç sürveyansının yapılması bakımından da gereklidir. Amerika Birleşik Devletleri Tüberküloz Eliminasyonu Danışma Konseyi, ilaca dirençli mikroorganizmaların oluşumunu önlemek için *M.tuberculosis* kompleks'in izole edildiği tüm tüberküloz hastalarında ilk izolata antimikrobiyal duyarlılık testlerinin mutlaka yapılması gerektiğini bildirmektedir. Antimikrobiyal duyarlılık testlerinin tedavinin başlamasından üç ay sonra kültürleri negatif hale dönüşmeyen ya da tedaviye yanıt yetersizliği olduğuna dair klinik delilleri olan hastalardan izole edilen sonraki izolatlar için de yapılması önerilmektedir (2). Amerika Birleşik Devletleri Hastalıkların Kontrol Merkezi (Center for Diseases Control, CDC), tüberküloz düşünülen bir hastanın örneği laboratuvara kabul edildikten sonra ortalama 28-30 gün içinde *M. tuberculosis* kompleks için duyarlılık testlerinin sonuçlanmasını önermektedir. Bu amaçla daha hızlı sonuç verebilen duyarlılık testi yöntemleri geliştirilmesine çalışılmaktadır. (77).

Mikobakterilerin antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesinde fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılmaktadır. Fenotipik yöntemlerde ilaç ilave edilmiş besiyerinde *M. tuberculosis* kompleks suşlarının inhibisyonu araştırılmaktadır. Genotipik yöntemlerde ise ilaç direncinde rol oynayan genlerde oluşan mutasyonlar moleküler yöntemlerle belirlenmektedir (78 - 80).

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

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

İndirekt yöntem: Klinik örneklerden saf kültür halinde aside dirençli bakteri izole edilir, uygun inokulum hazırlanarak ilaçlı ve ilaçsız besiyerlerine ekim yapılır. Duyarlılık yöntemleri arasında orantılama yöntemini temel alan, kültüre dayalı klasik testler en yaygın kullanılanlarıdır. Katı besiyeri olarak L-J, agar bazlı besiyeri olarak da M7H10, M7H11 kullanılmaktadır. Modifiye M7H9 sıvı besiyerinin kullanıldığı B 460 TB ve MGIT 960 gibi hızlı ticari sistemler de yaygın olarak kullanılmaktadır. E test yöntemi de kullanılabilecek alternatif bir yöntemdir.(81,82).

İlacın kritik konsantrasyonu: Daha önce ilaçla karşılaşmamış *M. tuberculosis*'in mutasyon içermeyen klinik izolatlarının (sokak suşu) % 95'ini inhibe eden, ancak aynı zamanda ilaca cevap vermemiş hastalardan alınan türleri inhibe etmeyen en düşük konsantrasyondur. Farklı besiyerinde ilacın kritik konsantrasyonlarının farklı olmasının nedenleri; besiyeri içindeki ilacın farklı şekilde absorpsiyonu, ilacın bazı besiyeri komponentlerine bağlanması, besiyerinin hazırlanması sırasında ilacın inaktivasyonu ve ilaçsız besiyerinde yeterli üreme için gerekli inkübasyon süresinde ilaçlı besiyerinde ilacın bozulması şeklinde sıralanabilir (81, 82).

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

2.11.1 Klasik Kültür Yöntemleri ile Yapılan Duyarlılık Testleri

a) Orantı (proporsiyon) yöntemi (direkt – indirekt): Canetti, Rist ve Grosset tarafından 1963 yılında tanımlanmıştır. Klasik yöntemler içinde en çok kullanılan olup, *M.tuberculosis* kompleks izolatlarının PRZ dışındaki tüm antimikobakteryel ilaçlara karşı

duyarlılığını saptamak için standart yöntem olarak kullanılmaktadır. PRZ için referans yöntem BACTEC 460 TB yöntemidir. Proporsiyon yönteminde; belli bir ilaç konsantrasyonunda (Kritik Konsantrasyon) dirençli olan organizmaların oranı saptanır. Bu yöntemde basiller ilaç içeren ve ilaç içermeyen agar temelli besiyerlerine ekilip 3 hafta inkübasyona bırakılmaktadır. İnkübasyon sonunda ilaç içeren besiyerindeki koloni sayısının, ilaç içermeyen besiyerindeki koloni sayısına oranı dirençli basillerin oranını gösterir. Test edilen suşlarda hesaplanan direnç yüzdesi 1 veya daha fazla ise o suşun test edilen antibiyotiğe dirençli olduğu kabul edilir. Uygulama koşullarından en az etkilenen, sonuçları en kabul gören yöntemdir (1, 83).

b) Mutlak konsantrasyon yöntemi: Meissner tarafından 1961’de tanımlanmıştır. Test edilen organizmaya karşı her bir ilacın Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerini tespit etme temeline dayanan bu yöntemde, 2×10^3 veya 1×10^4 koloni oluşturan birim/mililitre (cfu/ml) bakteri içeren mikobakteri solüsyonu, hem belirli konsantrasyonlarda ilaç içeren hem de ilaçsız kontrol besiyerlerine ekilir. İlaçlı besiyerinde 20 cfu’dan daha fazla koloni gözlenmesi bakterinin o ilaca karşı dirençli olduğunu gösterir. Testin yorumlanması 4 haftalık bir inkübasyon sonucunda veya yeterli üreme yoksa 5-6 hafta sonra yapılır. Farklı ilaç konsantrasyonları kullanılarak, çalışılan suşun MİK değeri saptanabilir. Metodolojik çalışmalar yapılmadığından hata oranı yüksektir. Üreme olmayan besiyerindeki ilaç konsantrasyonu o suşun MİK değeri olarak kabul edilir (1).

c) Nisbi direnç yöntemi (Direnç Oranı Yöntemi): Mitchisson tarafından 1957’de tanımlanmıştır. Mutlak konsantrasyon yöntemi ile aynı temel prensibe dayanır. Farkı bu yöntemde standart H37Rv *M. tuberculosis* suşu ile denenen suşa paralel bir seri hazırlanmasıdır. Denenen mikobakteri suşunun MİK değeri, standart suşun MİK değerine bölünerek direnç belirlenir. Bu oran ≥ 8 ise suş denenen ilaca dirençli, ≤ 2 ise duyarlıdır. Oranın 4 olması suşun dirençli olabileceği hakkında fikir vermektedir (83).

2.11.2.Hızlı Kültür Yöntemleri ile Yapılan Duyarlılık Testleri

a) BACTEC 460 TB (Radyometrik) Antibiyotik Duyarlılık Sistemi:

Mikobakteriler antibiyotik içeren ve içermeyen BACTEC 12B (M 7H12) şişelerine ekilir ve 37 °C’de inkübe edilir. Kontrol şişesine ekilen mikroorganizma konsantrasyonu ilaç içeren şişeye göre 100 kat azdır. Şişeler günlük olarak BACTEC 460 cihazında okunur. Antimikobakteriyel inhibisyon olmadığında, mikobakteriler ürer ve besiyerindeki ¹⁴C işaretli substratı kullanır. Böylelikle substrat dekarboksile olarak, ¹⁴CO₂ oluşur ve B 460 cihazında kantitatif olarak ölçülür. Üretilen ¹⁴CO₂’nin kantite edilmesi Growth Index (GI) terimiyle sayısal olarak yapılmaktadır. GI değeri besiyerindeki mikobakterilerin üreme miktarıyla direkt olarak orantılıdır. Duyarlılık sonuçları, kontrol ve ilaç içeren şişelerin günlük GI değeri artışlarının karşılaştırılmasıyla yorumlanır. Antitüberküloz ilaç içeren besiyerinde, duyarlı mikobakterilerin üremesi inhibe olur ve bu GI okumalarıyla kaydedilen günlük ¹⁴CO₂ üretiminde artmama veya azalmayla sonuçlanır. Mikobakteriler test edilen ilaca dirençliyse, üremenin inhibisyonu sözkonusu olmayacak ve GI günlük olarak artacaktır. Günlük GI değerindeki artış, test kültürünün dirençlilik derecesiyle orantılıdır (1).

b) MGIT 960 (Florometrik) Antibiyotik Duyarlılık Sistemi

MGIT 960 duyarlılık sistemi nonradyometrik bir duyarlılık sistemidir. Mikobakterilerin üremesini ve tespitini sağlayan ve OADC (Oleik asit, Albümin, Dekstroz, Katalaz) eklendiğinde mikobakterilerin çoğalmasını destekleyen modifiye Middlebrook 7H9 broth içeren MGİT tüplerinin dip kısmı, oksijen kullanımına duyarlı tris 4,7 difenil -1,10 fenatrolin rutenyum kloridpentahidrat adlı bir floresan veren bir indikatör madde oksijenle bileşik halde tüpün dip kısmına silikonla yapıştırılmıştır. İndikatörün floresansı oksijenin varlığında absorbe edilir. Mikobakteriler ürediği zaman tüpteki oksijenin tüketilmesine bağlı olarak indikatör maddenin serbest kalması sonucunda floresans açığa çıkmakta ve açığa çıkan bu floresans cihaz tarafından otomatik olarak her 60 dakikada bir sürekli ölçülmektedir. Oluşan floresans miktarı, üreme indeksi olarak değerlendirilmektedir. Sistemde üremenin

saptanması yanı sıra, İNH, RİF, EMB, STR ve PZA duyarlılık testleri de yapılabilir. İlaç içeren tüpün floresansı, ilaç içermeyen kontrol tüpü ile karşılaştırılır. İlaçlı tüp ile ilaç içermeyen tüp arasındaki relatif üreme oranı, bilgisayar yazılım algoritmaları tarafından belirlenir. İlaç tüpündeki relatif üreme, kontrol tüpüne eşitse veya daha fazla ise organizma ilaca dirençli kabul edilir. Yapılan çalışmalarda BACTEC 460 TB ve proporsiyon yöntemi ile uyumlu bulunmuştur. Üreme oranı ve saptama süresi BACTEC 460 ile aynıdır. MGIT 960 sistemi ile PZA duyarlılık testi, pH 'sı düşürülerek modifiye edilmiş 7 ml MGIT sıvı besiyeri içeren MGIT PZA tüpü kullanılarak yapılabilir (1).

c) MMB /BacT /ALERT 3D MB Kolorimetrik Kültür Sistemi (BioMe'rieux)

Kolorimetrik olarak besiyerinde oluşan CO₂ düzeyini ölçerek mikobakteri üremesini değerlendirmektedir. Radyoizotop içermeyen sistem, tam otomatik çalışmaktadır. Sistemde dip kısmında pH değişikliğine duyarlı sensör bulunan Middlebrook 7H9 içeren şişeler kullanılır. Üreme esnasında oluşan CO₂, pH'yı düşürerek şişenin dibindeki sensörün rengini değiştirir. Optik okuyucu tarafından ilk saptanan renk değişimi sistem tarafından rakamsal değere çevrilerek üreme indeksi çıkarılır (84).

Bakteri ilaçlı ve ilaçsız Middlebrook besiyerlerine ekilerek 10-14 gün inkübe edilmektedir. Kontrol tüpüne alamar mavisi eklenip, 50°C'de 2 saat bekletilir. Rengin maviden pembeye dönmesi üreme olduğunun göstergesidir. Üreme saptanmışsa aynı işlem ilaçlı tüplere uygulanır. Üremenin ne zaman olacağı tam olarak tahmin edilemediğinden birden fazla kontrol tüpü hazırlanması ve belli aralıklarla bu tüplerde üreme araştırılması gerekmektedir (1).

d) Karbondioksit Oluşumunu Saptayan Sistem; ESP Culture System II (Accumed)(Versa TREK sistemi)

Modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içeren şişelerde mikobakterilerin oluşturduğu gaz ve oluşan basıncı ölçerek üreme değerlendirmesi yapan, tam otomatik, radyoaktif

olmayan, bilgisayar destekli bir sistemdir. Primer antitüberküloz ilaçlar test edilebilmektedir (85).

e) TK Kültür Sistemi (Salubris İnc.)

TK kültür sistemi, izolasyon için kullanılan TK Medium, TK SLC(selektif), tür ayrımı için kullanılan TK PNB (p-nitro-benzoik asit) anti-TB ilaçlara duyarlılığın saptanması için kullanılan TK INH, TK RIF, TK STR, TK EMB katı besiyerleri ile MYCOLOR TK adı verilen otomatik okuyucu inkübatörden oluşmaktadır. Son zamanlarda bunlara pirazinamid duyarlılığını saptamak için TK PZA besiyeri eklenmiştir. TK Kültür Sistemi ile yapılan duyarlılık çalışmaları, bilinen diğer yöntemler ile karşılaştırıldığı zaman uyumlu bulunmuştur (1).

2.11.3. Kültür Dışı Yöntemler

a) Lüsiferaz Genli Bakteriyofaj Sistemleri

Bu sistemde canlı mikobakteri varlığını saptamak amacı ile mikobakterilerde çoğalabilen lusiferaz geni klonlanmış mikobakteriyofajlar kullanılmaktadır. Bu fajlar ile mikobakteriler infekte edildiğinde, bakteri içerisinde lusiferaz enzimi üretilmekte, ortama lusiferin bulunduğu ATP kullanılarak ışık üretilmektedir. Duyarlılık testi yapılması için mikobakteriler kısa süre ilaçlı ve ilaçsız besiyerlerinde inkübe edilmekte, daha sonra mikobakteriyofajlarla enfekte edilip ışık üretimi araştırılmaktadır. İlaçsız kontrol ile birlikte ışıldayan ilaçlı tüplerden alınan örnekler, bakterinin ilaca rağmen çoğaldığını yani o ilaca dirençli olduğunu göstermektedir (86, 87).

b) Faj Çoğalma Sistemleri

Bu sistemde hem *M. tuberculosis*, hemde hızlı üreyen *M. smegmatis* içinde çoğalabilen bir mikobakteriyofaj kullanılmaktadır. Önce duyarlılığı araştırılacak *M.*

tuberculosis suşu ilaçsız ve ilaçlı besiyerlerinde inkübe edilir. Daha sonra bunlara mikobakteriyofajlar eklenir. Mikobakteriyofajlar sadece canlı mikobakteriler içerisine girebilir ve çoğalmaya başlar. Dışarıda kalan mikobakteriyofajlar tüpe eklenen ferröz amonyum sülfat ile nötralize edilir. İlaçlı tüplerde ilaca dirençli ne kadar canlı bakteri varsa, o kadar bakteriyofaj korunmuş olur. Sonra tüplere *M. smegmatis* eklenir ve agarlı bir besiyeri ile birlikte petri kutularına dökülür. *M. tuberculosis* içinde korunmuş fajlar bu kez *M. smegmatis* içerisinde çoğalarak faj plakları oluşturulur. İlaçlı tüplerden belli bir oranın üzerinde faj plağı elde edilirse bakterinin o ilaca dirençli olduğu anlaşılır (79, 88).

c) Akım Hücre Ölçerinde (Flow Cytometry) Duyarlılık Belirleme

Canlı mikobakteriler florosein asetat ile işaretlenip hücre ölçerinde sayılabilmektedir. İlaçlı ve ilaçsız ortamda üç gün inkübe edilen mikobakteriler işaretlendikten sonra akım hücre ölçerinden geçirilirler ve ilaçlı tüplerden gelen örneklerden sayımda azalma olup olmadığı incelenir. Yarıdan fazla düşmeye neden olan ilaçların etkili olduğu kabul edilir (89).

2.11.4 E Test

Löwenstein-Jensen besiyerinde üremiş ortalama 2 haftalık taze kültürden sıvı besiyeri içine alınıp emülsifiye edilir. Bulanıklığı Mac Farland no 3'e ayarlanır. Eküvyonlu çubuk yardımıyla M 7H10 besiyerine üç yönlü sürülüp % 5-10 CO₂li ortamda inkübe edilir. 24 saat sonra E test (AB BIODISK, Solna, Sweden) şeritleri yerleştirilir. Yine aynı ortamda inkübasyona bırakılır. Ortalama 5-7 gün sonra yeterli üreme varsa okunur. Üremenin kuvvetle inhibe olduğu çizginin E test şeridini kestiği nokta MİK değeri olarak saptanır (82).

2.12 Mikobakteri Antimikrobiyal Duyarlılık Belirlenmesinde Kullanılan Genotipik Yöntemler

M. tuberculosis ilaç direncinin moleküler mekanizmalarının anlaşılmasıyla hızlı sonuç verebilen moleküler yöntemler geliştirilmiştir. DNA dizi analizi, line probe assay (solid faz hibridizasyon), RNA/RNA mismatch analiz, PCR-SSCP (PCR-single-strand conformation polymorphism), heterodubleks analiz, real-time PCR, DNA microarray bu yöntemlerdendir. Minimal bakteriyel üreme gerektirmesi ve saatler içinde sonuç verebilmesi moleküler yöntemlerin avantajlarıdır. Birden fazla gen bölgesinin sorumlu olduğu durumlarda, dirence yol açmayan mutasyonlarda yanlış sonuçlar verebilmesi dezavantajıdır. Pratik uygulamalarda moleküler yöntemler RİF direncini saptamak için kullanılmaktadır (90, 78).

2.13. Tedavi

Etkili tüberküloz tedavisi hızlı üreyen basillere karşı erken bakterisidal etkili ve dormant basilleri de ortadan kaldırmaya yönelik olmalıdır. İlaça dirençli tüberküloz, dünyanın ve ülkemizin son yıllarda üzerinde ciddi olarak durduğu bir konudur. Yeni olguların başarı ile tedavi edilmesi yeni ilaç direnci olan olguların ortaya çıkmasına engel olmaktadır fakat varolan ilaca dirençli olgular tedavi edilmezse, bulaştırma, yeni enfeksiyon ve yeni hastalık ile ilaç direncinin sürmesi söz konusudur (91).

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

2.13.1. Birinci Seçenek Antitüberküloz İlaçlar:

İzoniazid: İzonikotinic asidin hidrazididir. İzoniazid halen mevcut olan antitüberküloz ilaçların en güçlüsüdür. Klinik dozlarla oluşan konsantrasyonlarda dormant basiller üzerinde bakteriyostatik, hızlı çoğalanlar üzerinde bakterisit etki yapar. Ayrıca makrofajlar ve kazeöz lezyonlar içine girebilmesi, iyi absorbe edilmesi, kolay alınması ve ucuz olması bu ilacı en

önemli antitüberküloz ilaç yapar. Etki mekanizması kesin olarak bilinmemektedir. Bir görüşe göre bakteri içine giren izoniazid orada bir peroksidazın etkisi altında hidrazin ve izonikotinic aside dönüşür. Sonuncu madde bakteride nikotinic asidin antimetaboliti olarak etki yapar ve bir koenzim A türünün sentezini bozar. Sonuçta hücrede hidrojen peroksid yıkımı yapılamaz ve fazla miktarda biriken bu madde letal etki yapar. İNH'nın oral olarak 0- 12 yaş çocuk dozu 10-20 mg/ kg/ gün ve erişkin dozu 5 mg/ kg/ gündür. Yan etkileri KC enzimlerinde yükselme, periferik nöropati, hepatit, aşırı duyarlılık, konvülsiyon, mental semptomlar, hemolitik ve aplastik anemi, jinekomastidir (92, 93, 5).

Rifampisin: Bir rifamisin türüdür. Tüberküloz tedavisinde izoniazidten sonra ikinci önemli ilaçtır. Hem hızlı çoğalan, hem de dormant duruma geçmiş mikobakterilere etkilidir. Gerek hücre dışındaki ve gerekse hücre içindeki mikobakterilere bakterisit etki yapar. Mikobakterilerin RNA polimeraz enzimini inhibe eder. Tek doz halinde alınabilmesi, bütün tüberküloz ilaçları içinde etki gücü bakımından izoniazide en yakın ilaç olması, yan etkilerinin ondan daha az olması ve diğer ilaçlara dirençli suşlara karşı etkili bulunması bu ilacın değerini artırır. Tedavide kullanım dozu oral olarak 0-12 yaş çocuk dozu 10-20 mg/ kg /gün ve erişkin dozu 10 mg / kg/ gündür. Yan etkileri idrar ve diğer vücut sekresyonlarını turuncu renge boyaması, deri reaksiyonları, bulantı, kusma, hepatit, febril reaksiyonlar, nefes darlığı, şok, hemolitik anemi, akut böbrek yetmezliğidir. (92, 93, 5).

Pirazinamid: Nikotinamidin sentetik pirazin analogudur. İzoniazid derecesinde olmasa bile oldukça güçlü bakterisit etkisi vardır. Bu etkisini hem çoğalma halindeki, hem de dormant duruma geçmiş mikobakteriler üzerinde gösterir. Monositler ve makrofajlar içindeki yavaş çoğalan mikobakteriler üzerinde en etkili bakterisidir. Oral tedavi dozu 0-12 yaş çocuk için 15-30 mg /kg/gün ve erişkin için 10 mg/ kg/ gündür. Yan etkileri iştahsızlık, kusma, kızarma, hepatotoksisite, hiperürisemi, aşırı duyarlılık, bulantı; nadiren sideroblastik anemi, ışığa duyarlılıktır (92, 94,5).

Streptomisin: *M. tuberculosis*'e karşı etkin olduğu gösterilen ilk ilaçtır. Streptomisin parenteral olarak kullanılan bir ilaçtır. 1940'larda keşfinden bugüne sürekli olarak tüberküloz kemoterapisinde majör bir rol oynamıştır. Streptomisin bakterinin 30S ribozomuna irreversibl olarak bağlanır, böylece protein sentezini inhibe eder. Streptomisinin bakteri ve makrofajlar içine girme yeteneği düşüktür. Klinikte kullanılan dozlarda, streptomisinin etkisi esas itibariyle bakteriyostatiktir. Böylece streptomisinle tedavi süpresif bir tedavidir, yani vücuttaki odaklarda yerleşmiş bakteri ilaç ortamda bulunduğu sürece baskı altında kalır, çoğalamaz; fakat bakterilerin tamamıyla yok edilmesi mümkün olmaz. Intramuskuler tedavi dozu 0-12 yaş çocuk için 20- 40 mg/kg/gün ve erişkin için 15 mg/kg/gündür. Yan etkileri deride aşırı duyarlılık, baş dönmesi, kulakta çınlama, vertigo, ataksi, sağırılık, nefrotoksisite, aplastik anemi, agranülositozdur (92, 93, 5).

Etambutol: Baska hiçbir antimikrobiyal ilaç ailesi ile ilişkisi olmayan ayrı bir bileşiktir. Di- (1-butanol)-etilendiimin dihidroklorür'ün dekstro şeklidir. Birinci sıra ilaçlara artan bakteriyel direnç nedeniyle geliştirilmiştir. Tüberkülostatik bir ilaçtır ve etkinliği izoniazid ve rifampisine göre düşüktür, ancak kendisine karşı yavaş direnç gelişmesi teröpatik değerini artırır. Oral olarak tedavi dozu 0- 12 yaş çocuk için 15- 25 mg/kg/gün ve erişkin için 15-25 mg/kg/gündür. Yan etkileri optik nörit, deri döküntüsü, artralji, periferik nöropatidir. (92, 5).

Bu ilaçların EMB dışında bakterisidal etki gösterdikleri kabul edilmektedir. Ancak diğer antimikrobiyal ajanlarda olduğu gibi bu ilaçları bakteriyostatik ve bakterisidal olarak sınıflamak pek uygun görülmemektedir. Çünkü alınan dozlara, birlikte kullanılan diğer ajanlara ve in vivo etkinliğe bağlı olarak bakteriyostatik ve bakterisidal etkinliklerin değişikliğe uğrayabildiği farklı klinik çalışmalarla gösterilmiştir (93).

2.13.2. İkinci seçenek ilaçlar:

Kapreomisin, kanamisin, etionamid, para-aminosalisilik asit, ofloksasin, siprofloksasin ve sikloserinden oluşmaktadır. Bu grup ilaçlar, birinci seçeneklere göre daha az etkili, daha

çok toksik ve daha az tolere edilebilen ilaçlardır. Genellikle birinci seçenek ilaçlara karşı direnç geliştiği ya da toksik etki meydana geldiği durumlarda kullanılırlar. Yeni geliştirilen ve etkinlikleri henüz geniş klinik çalışmalarda incelenmemiş olan deneme aşamasındaki ilaçlar (kinolonlar, amikasin, rifabutin, klofazimin ve beta laktam-beta laktamaz inhibitör kombinasyonları) da bu grup içinde değerlendirilebilir (92, 93).

2.14. *M.tuberculosis* ve İlaç Direnci

1944'de Waksman tarafından ilk tüberküloz ilacı olan streptomisin (STR), 1952 yılında Robizek ve Selikof tarafından İNH'in, 1954 yılında PZA, 1962 yılında EMB ve 1966 yılında RIF'in bulunmasından sonra kombine tedavi uygulanarak tüberküloz tedavi edilebilir bir hastalık haline gelmiştir (95, 96).

Tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlar primer ve sekonder ilaçlar olarak başlıca iki gruba ayrılmaktadır. Primer ilaçlar; İNH, RIF, PZA, EMB ve STR' dir. EMB dışındaki primer ilaçlar bakterisidal etkinlik göstermektedir. Sekonder ilaçlar ise sikloserin, etiyonamid, kanamisin, kapreomisin ve paraaminosalisilik asit gibi daha toksik ve daha az tolere edilebilen ilaçlardır (95, 97, 98).

Son 20 yılda AIDS olgularının artması ve bu hastalığın ileri döneminde olguların yaklaşık 1/3'ünde MOTT Grubu mikobakterilere bağlı dissemine atipik tüberküloz enfeksiyonu gelişmesi yukarıdaki sınıflandırmaya "MOTT türü mikobakterilere karşı kullanılan" ilaçlar sınıfının eklenmesini gerektirmiştir. MOTT grubu mikobakteriler yukarıda belirtilen birinci sınıftaki ilaçlara ve ikinci sınıftakilerin çoğuna dirençlidir. Bu üçüncü sınıfta bulunan ilaçlar rifabutin, makrolid antibiyotikler olan klaritromisin ve azitromisin, fluorokinolon türevleri olan siprofloksasin ve ofloksasin, aminoglikozitlerden amikasin ve bir lepra ilacı olan klofazimin'dir (95, 97).

M. tuberculosis'de ilaç direnci her antibiyotik için farklı sıklıkta olmak üzere tek basamaklı, rastgele, spontan kromozomal mutasyonlar sonucu oluşmaktadır. Birçok bakteride

görülenin aksine *M. tuberculosis*'de plazmid veya transpozon aracılığı ile oluşan horizontal gen transferine bağlı direnç görülmemektedir. Spontan direnç oranları sırasıyla İNH, RİF, EMB ve STR için 10^6 , 10^8 , 10^6 ve 10^5 olarak gerçekleşmektedir. Kromozomlar üzerindeki direnç bölgeleri birbirleriyle bağlantılı olmadıklarından, bakterinin iki ilaca birden spontan direnç geliştirmesi, her bir ilaç için mevcut olan olasılıkların çarpımına eşittir. Örneğin İNH ve RİF direncinin birlikte görülme olasılığı 10^{14} dür. Primer ilaçlara direnç gelişiminde rol oynayan genler Tablo 2.3'de gösterilmiştir. Bu durumda teorik olarak bakteri popülasyonunda çok az sayıda olsa da genetik olarak ilaç direnci olan kökenler bulunabilmektedir. Hastalarda tek antibiyotik veya düzensiz antibiyotik kullanılması duyarlı mikroorganizmaları baskılamakta ve ilaca dirençli kökenler seçilerek baskın hale gelmektedir (98, 90, 99, 100).

İlaç direnci tüberküloz kontrolünü etkileyen en önemli sorunlardan biridir. İlaç dirençli tüberküloz, bir ya da daha fazla antitüberküloz ilaca karşı dirençli basil çıkaran hasta olarak tanımlanmaktadır. Birincil direnç (primer direnç); daha önce hiç tüberküloz tedavisi almamış ya da bir aydan daha kısa süre tüberküloz ilacı kullanmış hastadaki dirençtir. Hastanın daha önceden tedavi görüp görmediği konusunda şüphe varsa başlangıç direnci terimi kullanılmaktadır. Başlangıç direnci, birincil direnç (primer direnç) ve bilinmeyen edinsel direnci kapsamaktadır. Edinsel direnç (sekonder direnç), daha önce 1 aydan fazla tüberküloz ilacı kullanmış hastadaki dirençtir ve önceden kullanılmış bu ilaçlara bağlı gelişir. Eğer birincil dirençli bir hastada daha sonra başka bir ilaca edinsel direnç gelişirse mikst tip dirençten söz edilir. En az RİF ve İNH'e dirençli basil, çok ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD-TB) olarak tanımlanır. İlaç direncinin en ağır şeklidir. ÇİD-TB'un tedavisi zordur. ÇİD-TB yüksek morbidite ve mortalitesi ile önemli bir sağlık sorunudur (101-103).

Tablo.2.3 Antitüberküloz ilaçlarda dirençten sorumlu olan mekanizmalar (90, 98, 99).

İlaç	Direnç geni	Direnç mekanizması
STR	rrs	16 s rRNA inhibisyonu
	rpsl	Ribozomal S 12 inhibisyonu
İNH	kat C	Katalaz-peroksidaz enzim inhibisyonu

	inhA ahpC	Enoil redüktaz enzim inhibisyonu Alkil hidroperoksidaz enzim inhibisyonu
RİF	proB	RNA polimeraz inhibisyonu
ETB	embB	Arabinozil transferaz inhibisyonu
PZD	pncA IS6110 insertion	Pirazinamidaz enzim inhibisyonu

2.14.1.İlaç Direnciyle İlgili Tanımlar

Vahşi tip köken: Hiçbir antibakteriyel ilaçla karşılaşmamış *M. tuberculosis* kökenini tanımlar(104) .

Dirençli olgu: En az bir tüberküloz ilacına dirençli olan hastalardır (104)

Primer direnç: Henüz tüberküloz ilaçlarını kullanmamış veya bir aydan kısa süre için ilaç almış yeni tüberkülozlu hastada tedaviye başlamadan önce belirlenen ilaç direncidir. Primer direnç, basilin alındığı kaynağa ait olan dirençtir. Bir toplumdaki sekonder direnç oranıyla paralellik göstermektedir. Primer direnç oranının yüksek olması o toplumda uygulanmakta olan tüberküloz korunma ve kontrol önlemlerinin yetersizliğini yansıtmaktadır (105).

Sekonder direnç: Başlangıçta duyarlı olan basillerle enfekte olan tüberküloz hastasında, uygun olmayan tedaviye (yanlış ilaç seçimi, ilacı erken kesme, tedaviye uyumsuzluk) bağlı olarak dirençli mutantların artması sonucunda gelişen dirençtir. Artmış sekonder direnç, uygulanmakta olan tüberküloz tedavi protokolünün yetersizliğinin göstergesidir (105).

Doğal dirençli kökenler: Belli bir ilaçla daha önce karşılaşmamış olmasına rağmen o ilaca dirençli kökenlerdir. Doğal dirençli basil taşıyan konak ve onun enfeksiyon kaynağı geçmişte kemoterapi almamıştır. Doğal direnç türe özgü olup, tür tanımlamasında taksonomik belirteç olarak kullanılabilir. Bu tip direncin örneği, PZA'ya dirençli olan *M.bovis*'dir (104).

Başlangıç direnci: Yeni bir tüberküloz hastasında bir ya da daha fazla antitüberküloz ilaca karşı direncin varlığı olarak tanımlanır. Daha önceki tedavisi hakkında bilgi vermekten çekinen, geçmiş tedavi hikayesi yeterince sorgulanmayan ve bu nedenle açığa çıkmamış kazanılmış direnci olan hastaları kapsar (104)

Tek ilaca direnç: İlk grup beş ilaçtan (İNH, RİF, EMB, PZA, STR) sadece birine dirençli olma durumudur (104).

Bileşik direnç: İNH ve RİF dirençli olma koşulu olmaksızın iki ya da daha fazla ilaca dirençli olma durumudur (104).

Çok ilaca direnç (ÇİD-Multi drug resistance; MDR): En az İNH ve RİF'in ikisine birlikte direncin olmasıdır (106).

Artmış ilaç direnci (AİD- Extensively drug resistance; XDR): RIF ve İNH direnciyle birlikte herhangi bir kinolon (CIP, OFX) ve parenteral ilaçlardan birine (AK, KA, KAP) direncin olmasıdır (106).

2.14.2.Dünyada İlaç Direnci

Primer tüberküloz ilaçlarına direnç tüm dünyada hızla artmaktadır. En sık direnç saptanan ülkeler eski Sovyet Bloku, Baltık Ülkeleri, Arjantin, Hindistan ve Çin'dir. Direnç oranlarında kıtalar ve ülkeler arasında ciddi farklılıklar mevcuttur. Tek ilaca direnç Andora, İzlanda, Malta'da %0 iken, Kazakistan'da % 57.1 dir. DSÖ'nün 2004 yılında 74 ülkede yaptığı antitüberküloz ilaç direncine yönelik çalışmada, daha önce tedavi aldığı bilinmeyen yeni vakalarda sadece bir ilaca ortalama direnç oranı % 10.2, sadece İNH, RİF, EMB ve STR'ye ortalama direnç oranları sırasıyla % 5.6, % 1.4, % 0.8 ve % 6.3 olarak belirlenmiştir. Bu vakalarda ÇİD-TB ortalama oranı % 1.1 bulunmuştur. Daha önce tedavi görmüş eski vakalarda herhangi bir ilaca karşı ortalama direnç oranı % 18.4, sadece İNH, RİF, EMB ve STR'ye ortalama direnç oranları sırayla % 4.4, % 8.7, % 35 ve % 11.4 olarak belirlenmiştir. Bu vakalarda ise ÇİD-TB ortalama oranının % 7.0 olduğu gözlenmiştir. Tedavi almış ve almamış toplam hastalarda ise herhangi bir ilaca ortalama direnç oranı %10.4, İNH, RİF,

EMB ve STR'ne ortalama direnç oranları sırayla % 6.6, % 2.2, % 1.3, % 6.1 dir. Bu vakalarda ise ÇİD-TB ortalama direnç oranı % 1.7 olarak bildirilmiştir (103).

2.14.3. Türkiye'de İlaç Direnci

Ülkemizde direnç oranını ortaya koymak için ülke genelini kapsayan planlı çalışmalar bulunmamaktadır. Tek tek sağlık kuruluşlarının yaptığı bağımsız çalışmaların verilerinin karşılaştırılmasında sıkıntılar vardır. Uygulanan yöntemlerin ve kullanılan ilaç konsantrasyonlarının farklılıkları, sunum (çoğunlukla primer, sekonder, toplam direnç ayrımı yapılmamaktadır) hataları mevcuttur (105, 50). Ülkemizde dispanserler ve tek tek sağlık kuruluşlarından yapılan çalışmaların analizinde, yeni hastalardan izole edilen TB basillerinde en az bir ilaca direnç oranının % 18-26.6, ÇİD-TB oranının ise % 1.3-4.8; tedavi görmüş hastaların izolatlarında en az bir ilaca direnç oranının % 28-53.4, ÇİD-TB oranının ise % 4.4-16.6 arasında dağılım gösterdiği sonuçları çıkarılabilmektedir (105). Ülkemizde direnç durumunu yansıtan en kapsamlı çalışma Yolsal ve ark. (50) retrospektif olarak yaptıkları metaanaliz çalışmasıdır. Bu çalışmada STR, RİF, İNH ve EMB gibi antitüberküloz ilaçlara kültür pozitif olgulardaki direnç sıklıkları 1984 -1989 ve 1990 -1995 yılları için incelenmiş, ülkemizde bu konuda yayınlanmış olan 21 makale ve 27959 suş değerlendirilmiştir. 1984 -1989 yıllarında total direnç oranları STR (% 22.5), RİF (% 22.3), İNH (%27.8) ve EMB (%7.8), 1990-1995 yıllarında total direnç STR (%17.9) RİF (%22.1), İNH (%23.8) ve EMB (%7.7) olarak belirtilmiştir (50).

2.15. Korunma ve Kontrol

Gelişmiş ülkelerde 1980'lere kadar aktif tüberküloz kontrol programlarının uygulanmasıyla tüberküloz insidansında belirgin azalma kaydedilmekle birlikte HIV epidemisi, antitüberküloz ilaçlara direnç, seyahatlerin yaygınlaşması gibi nedenlerle hastalık yeniden tırmanışa geçmiştir (3).

2.15.1. Birincil Koruma

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

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

b- Aşılama: Tam hücre aşıları (canlı, ölü), BCG aşısı, Subünit aşılar, Çıplak DNA aşılarıdır.

2.15.2. İkincil Koruma

İnfekte bireylerde hastalık gelişiminin önlenmesi amacıyla genellikle İNH verilerek uygulanır (5).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Ocak 2005- Aralık 2010 yılları arasında Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilimdalı Tüberküloz Laboratuvarına tüberküloz ön tanılı hastalardan gönderilen pulmoner ve extrapulmoner örneklerden izole edilen 60 *M.tuberculosis* suşunun primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılıkları BACTEC MGIT 960 sistemi ile araştırıldı. Kültür işleminde L- J besiyerleri (OR- BAK gliserollü besiyeri) kullanıldı. Pozitif kültürler, 6 ayda bir L- J besiyerine pasajlanarak +4 °C’de buzdolabında saklandı.(2005 yılına ait olan pozitif kültür örnekleri, L- J besiyerinde ve -20 °C de saklandı.) Antibiyogram yapılacak olan suşlar, L- J besiyerine pasajları yapıldıktan sonra, oldukça dikkatli bir şekilde paketlenip koruyucu kaplara yerleştirilerek, Adana Çukurova Üniversitesi Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi Mikobakteriyoloji Labaratuvarına götürülerek BACTEC MGIT 960 (Becton-Dickinson) kültür cihazı ile antibiyogramları yapıldı.

3.1 Örneklerin İşlenmesi

Labaratuvarımıza tüberküloz ön tanısı ile rutin olarak gelen örnekleri steril ve steril olmayan örnekler olarak ayrılarak değerlendirmeye alındı. Steril olmayan örneklerle çok yaygın olarak kullanılan NALC-NaOH homjenizasyon - dekontaminasyon işlemi uygulandı. Tüm işlemler sınıf II biyo güvenlik kabini içinde yapıldı.

3.1.1. Kullanılan Malzemeler

- Falcon tüpü (50 ml'lik)
- Santrifüj cihazı
- Vorteks karıştırıcı
- Lam
- Sodyum sitrat dihidrat
- Distile su
- NaOH
- NALC
- 0.067M(M/15) Fosfat tamponu (pH6.8)
- Dezenfektan kabı (% 0.1-1 sodyum hipoklorit bulunan)
- 1000 ml lik mezür
- L- J besiyerleri(Or-Bak)
- Tek kullanımlık plastik öze

3.1.2 Homojenizasyon ve Dekontaminasyon

Çalışmamızda örneklerimize NALC- NaOH yöntemi uygulandı.

3.1.2.1. NALC- NaOH Yöntemi (5)

i. NaOH- Sodyum sitrat stok solusyonu

- Solusyon 1: Sodyum sitrat dihidrat (29 gr) + Distile su (1000 ml)
- Solusyon 2: NaOH (40 gr) + Distile su (1000ml)

Birinci ve ikinci solusyondan eşit miktarda karıştırılıp, 121 derecede 15 dakika otoklavda sterile edilerek kullanıldı.

ii. NALC- NaOH çalışma solusyonu:

Çalışmaya başlamadan hemen önce, NaOH- Sodyum sitrat solusyonuna NALC ilave edildi. Hazırladığımız çalışma solusyonu, NALC'ın mukolitik aktivitesi bekledikçe azalırıldığından dolayı 24 saat içinde kullanıldı.

Tablo.3.1 NALC-NaOH çalışma solusyonunun hazırlanması

Hacim	NaOH- Sodyum sitrat	NALC(gr)
50	50	0.25
100	100	0.50
200	200	1.25
500	500	2.50

iii- 0.067M (M/15) Fosfat tamponu (pH 6.8)

- Stok alkali tampon 1:Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) (9.47 gr) + Distile su (1000 ml)
- Stok alkali tampon 2:Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) (9.07 gr) + Distile su (1000 ml)

Birinci ve ikinci solusyondan eşit miktarda karıştırıp otoklavda 121 derecede 15 dakika sterilleyerek kullandı.

3.1.2.2. Homojenizasyon ve Dekontaminasyon İşleminin Yapılışı

1- Labaratuvara tüberküloz şüphesi ile rutin olarak gönderilen örnekleri steril ve steril olmayanlar olarak ayırdıktan sonra steril olmayan örneklerle homojenizasyon ve dekontaminasyon uygulandı.

2- Steril cam boncuk içeren 50 ml'lik steril burgulu kapaklı polipropilen (falkon) tüplere klinik örnekle eşit hacimde NALC- NaOH solusyonu ilave ederek oda ısısında 15 dakika bekletildi. Bu süre içinde balgamın NALC- NaOH çözeltisiyle homojen olarak karışması için tüp birkaç kez vorteks ile karıştırıldı (30 saniyeyi geçmeden) veya elle birkaç kez alt üst edildi.

3- Süre tamamlandığında tüpün 50 ml işaretine kadar 0,067 M fosfat tamponu (Na₂HPO₄ - KH₂PO₄) (pH:6.8) ilave edildi. Tüpün ağzını sıkıca kapatıldıktan sonra 5-10 saniye vortekslendi.

4-. Fosfat tamponu ilave edilmiş tüpler 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı içinde dezenfektan (% 0.1-1 sodyum hipoklorit) bulunan bir kaba boşaltıldı.

5- Sedimente 1-2 ml steril serum fizyolojik ilave edilerek süspanse edildi.

6-Süspansiyondan besiyerine 0.1 ml. inokulasyon yapıldı ve aside dirençli bakteri (ARB) aranması için lam yayma hazırlandı.

3.1.3. Boyama ve Mikroskobik İnceleme

3.1.3.1 Kullanılan Malzemeler

- Karbol fuksin
- %95 etil alkol
- Fenol Kristallleri
- Distile su
- Metilen mavisi
- Benmari
- Lam
- Kurutma kağıdı
- Işık mikroskobu
- HCl

3.1.3.2 EZN Boya Solusyonlarının Hazırlanması (53)

I-Karbol fuksin

- Solusyon 1: Bazik fuksin (3 gr) + %95 'lik etil alkol (100ml)
- Solusyon 2: Kristalize fenol (5 gr) + Distile su (100ml)

3 gr bazik fuksin tartılıp havana konuldu. Üzerine 100 ml etil alkol azar azar ilave edilerek ezildi (solusyon 1). 5 gr kristalize fenol, küçük bir balon içinde, 56 °C'lik su banyosunda eritildi. Erimiş sıvı fenol 45 °C iken üzerine yavaş yavaş distile su ilave edilip, homojen bir şekilde dağılması sağlandı.

Çalışma solusyonu: Solusyon 1'den 10 ml. ve solusyon 2' den 90 ml. koyu renkli bir şişeye aktarıldı. İyice karıştırılarak homojen bir şekilde karışması sağlandı. 24 saat oda ısısının da bekletildi. Filtre kağıdından süzülerek kullanıldı.

II- %3'lük Asit – Alkol Karışımı

- Konsantre hidroklorik asit (HCl) (3 ml) + % 95'lik etil alkol 97 ml

3 ml konsantre hidroklorik asit, % 95' lik etil alkol içeren şişeye azar azar eklendi. Solusyon gereksinim duyuldukça kullanıldı.

III- Metilen mavisi

- Metilen mavisi (0.1 gr) + Distile su (100 ml)

Metilen mavisi distile su içinde eritildi. Koyu renkli bir şişeye aktarıldı ve gereksinim duyuldukça kullanıldı.

3.1.3.3. Homojenizasyon- Dekontaminasyon Sonrası Hazırlanan Yayma

Preparatlarının Hazırlanması (EZN Yöntemi) (55)

1- Homojenizasyon - Dekontaminasyon işlemi sonrası falkon tüpündeki süspansiyondan temiz bir lam üzerine iki damla (100 µl) damlatıldı.

2- Yayma oda ısısında, kabin içinde bekletilerek kurutuldu. Kuruyan yayma 2 -3 kez alevden geçirilerek tespit edildi.

3- Yaymalar boya düzeneğinin üzerine yerleştirildi. Üzerine preparatın üzerini kaplayacak şekilde, filtre kağıdından süzülen karbol fuksin çözeltisi döküldü.

4- Yaymalar buhar çıkacak fakat kaynamayacak bir şekilde 5 dakika alttan ısıtıldı. Süre sonunda lam eğilerek kalan boya dökülüp su ile yıkandı.

5- Yaymaların üzerine asit – alkol çözeltisinden dökülüp, yayma rengini kaybedene kadar beklendi (en fazla 3 dakika). Su ile yıkandı.

6- Tüm lamın üzerini kaplayacak şekilde metilen mavisi çözeltisi döküldü. 20-30 saniye bekletilip yıkandı. Lamlar dik bir şekilde kurutuldu.

3.1.3.4. Değerlendirme

Boyanan lamalar ışık mikroskopunda 10xoküler, 100x objektif altında immersiyon yağı damlatılarak, lamel kullanılmadan incelendi. Asit-Alkole Dirençli Basiller (AARB), mavi zeminde pembe – kırmızı renkte, 1-10 µm uzunluğunda ve tipik olarak ince, çubuk biçiminde düz ya da eğilmiş – bükülmüş çomaklar şeklinde görüldüler. Yayma negatif raporu için en az 100 mikroskop alanı tarandı.

3.1.4 Kültür

- L- J besiyeri (Or-Bak)
- Etüv
- Tek kullanımlık plastik öze

3.1.4.1. L- J Besiyerine Ekim ve Kültürlerin İnkübasyonu (55)

1- Homojenizasyon- Dekontaminasyon işlemi sonrası falkon tüpündeki süspansiyondan L- J yüzeyine 0.1 ml ya da 2-3 damla damlatılarak ekim yapıldı.

2- Ekim yapılan L-J besiyerleri kapakları fazla sıkıştırılmadan 35 °C’de 24 saat yatık durumda inkübe edildi.

3- 24 saat sonra besiyeri kapakları biraz daha sıkıştırılarak dik pozisyonda inkübasyona devam edildi.

4- İlk haftadan sonra iki günde bir üreme olup olmadığı kontrol edildi. Üreme süreleri ve pigment oluşturma yönünden incelendi.

5- Genellikle 3 - 4 haftalık inkübasyondan sonra kuru görümlü, açık sarı kenarları düzensiz, açık sarı koloniler gözlemediğimiz tüpler kültür pozitif olarak değerlendirildi.

6- Üreme gözlenen tüplerden örnek alınarak mikroskopik inceleme yapıldı.

7- Tüm besiyerleri en fazla 45 gün inkübe edildi.

8- 45 gün sonunda üreme gözlenmeyen tüpler kültür negatif olarak değerlendirildi

3.1.4.2 -Kültür Pozitif Suşların Saklanması ve Yeniden Pasajlanması

L- J 'de pozitif olan suşlar, tüpün ağzı sıkıca kapatılıp parafilmlelendikten sonra kurutma kağıdına sarılarak dik bir şekilde spora yerleştirilerek buzdolabında + 4 - 8 °C'de saklandı. 6 - 9 aylık periyodlarla L- J 'ye pasajlama yapıldı. Antibiyogram için 15 günden eski olmayan pasajlar kullanıldı.

3.1.5 Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Antibiyotik duyarlılık testi üretici firma önerileri (Becton- Dickinson, USA) doğrultusunda gerçekleştirildi.

3.1.5.1 Kullanılan Malzemeler

- Steril 7 ml 'lik tüpler
- BACTEC MGIT Growt Supplement (oleic acid, dextrose, catalase,bovin albumin)
- 7 ml Middlebrook 7H9 besiyeri tüpü
- Mc Farland cihazı
- Kanlı agar besiyeri

3.1.5.2. L- J' den Middlebrook 7H9' a Pasajlayarak BACTEC MGIT 960 Cihazında Üretme (70)

- 1- L- J besiyerinde üretilen ve 14 günden eski olmayan suşlar, steril bir öze ile, 8-10

adet cam boncuk içeren 4 ml Middlebrook 7H9 Broth (BBL, Difco) besiyerine alındı. Bu işlem sırasında katı besi yeri alınmamasına ve bakteri bulanıklığının 1 McFarland standardını (10^7 cfu/ml) geçmemesine dikkat edildi.

- 2- Bakteri süspansiyonunu homojenize etmek amacıyla 2-3 kez vortekslendi ve 20 dakika beklemeye bırakıldı.
- 3- Üstte kalan kısım başka bir steril tüpe aktarıldı. Sedimentin alınmamasına dikkat edildi. Tekrar 15 dakika bekletilerek, üstte kalan kısım başka bir steril tüpe aktarıldı.
- 4- Bu süspansiyon gözle 0.5 McFarland standardına ayarlandı. Süspansiyondan 1ml.1 alınarak 4 ml steril serum fizyolojik ile 1/5 dilüsyon yapıldı.
- 5- Dilüe edilen süspansiyondan steril pastör pipeti ile 0.5 ml alınarak, 0.8 ml BACTEC MGIT Growt Supplement (oleic acid, dextrose, catalase, bovin albumin) eklenmiş BBL MGIT 7 ml tüpüne aktarıldı. Bu tüp cihaza konularak inkübe edildi.

Cihaz pozitif sinyal verdikten sonra steril bir pastör pipeti ile aside dirençli boyama için örnek alındı. Bakteri kontaminasyonunu kontrol etmek amacıyla bir kanlı agar besiyerine ekim yapıldı. 48 saatlik inübasyondan sonra kanlı agar basiyerinde üreme yoksa antibiyogram işlemine geçildi. Kanlı agarda üreme olması durumunda dekontaminasyon işlemi tekrarlandı.

3.1.5.3 İdentifikasyon:

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

3.1.5.4 NAP Testi (p-nitro-P-acetylamino-Q-hydroxypropiophenone) (70)

Üreme saptandıktan sonraki 1-2. gün: Steril tüp içerisinde 1 ml pozitif MGIT Tüpü, 4 mL steril distile su ile sulandırıldı. GC (üreme kontrolü) ve NAP testi için 2 yeni MGIT 7 ml tüpüne suş kaydı yapıldı. GC ve NAP kontrolü için tüpler işaretlendi GC ve NAP tüpü içerisine “Growth Suplemanı” ve MGIT PANTA karışımından 0,8'er mL eklendi. NAP işaretlenmiş şişe içerisine 0,1 mL p-NAP reaktifi eklendi. 1 /4 sulandırılmış süspansiyondan her iki tüpe 0,5 mL süspansiyondan ekildi. İkili barkot taşıyıcılarına GC tüpü sola, NAP şişesi sağa yerleştirildi. Barkot okutularak cihaza yerleştirildi. Üreme saptandıktan sonraki 3-5. gün: Pozitif MGIT tüpündeki bulanıklığın 0.5 Mac Farland'ı geçip geçmediği kontrol edildi. 0.5 Mac Farland'dan daha bulanık olduğu durumlarda, yeni bir steril tüp içerisinde, distile su ile dilüe ederek en fazla 0.5 Mac Farland bulanıklığına ayarlandı. Pozitif MGIT tüpündeki bulanıklığı 0,5 Mac Farland'ı geçmeyen ve daha yoğun olup da 0,5 Mac Farland bulanıklığına ayarlanmış tüplerle 1 ve 2. gündeki işlem basamağına devam edildi.

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

3.1.5.5 Antibiyotik Solüsyonlarının Hazırlanması (70)

Antibiyotikler STR, İNH, RİF, EMB, BACTEC MGIT SIRE kiti (Becton Dickinson, USA) içinde liyofilize halde üretici firma tarafından sağlandı. Liyofilize halde bulunan ilaçlar sulandırılarak stok solusyonlar hazırlandı. Her liyofilize antibiyotik şişesine 4 ml steril distile su eklendi ve tamamen çözünene kadar çalkalandı. Liyofilize antibiyotik şeması ve MGIT 7 ml besiyerindeki son konsantrasyon Tablo 3.2.'de belirtilmiştir.

Tablo 3.2 MGIT tüplerine eklenen ilaç konsantrasyonları

İlaç	Liyofilize antibiyotik içeren flakon	Sulandırım sonrası konsantrasyon	MGIT tüpüne eklenmesi gereken volüm	Son konsantrasyon
MGIT SM	332µg	83 µg/ml	100 µg	1.0 µg/ml
MGIT İNH	33.2 µg	8.3 µg/ml	100 µg	0.1 µg/ml
MGIT RİF	332 µg	83 µg /ml	100 µg	1.0 µg/ml.
MGIT EMB	1660 µg	415 µg/ml	100µg	5.0 µg/ml

3.1.5.6. Antibiyogram İşlemi

1- Her test için 5 adet 7 ml'lik MGIT tüpü, ilk tüp kontrol tüpü (GC- Growth Control) olacak şekilde sırasıyla STR, İNH, RİF ve EMB şeklinde işaretlendi.

2- Her birine aseptik şartlarda 0,8 ml BACTEC MGIT 960 SIRE Supplement (Becton Dickinson, USA) OADC (Oleic acid, dextros, catalase, bovine albumin, polyoxethylene stearate) eklendi.

3- Aseptik koşullar altında, firma önerileri doğrultusunda sulandırılmış liyofilize ilaç solusyonlarından (Tablo.3.2) 100'er ml alınarak daha önce işaretlenmiş olan uygun tüplere ekledi.

4- Kontrol tüpü hazırlamak için yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan inokulumdan 0.1 ml alınarak 10 ml steril serum fizyolojik içinde 1/100 dilüe edildi. Bu süspansiyondan 0.5 ml, ilaç konulmamış kontrol tüpüne ekim yapıldı.

5- İlaçlı tüplere ise inokulumdan 0.5 ml eklendi. Tüplerin kapakları sıkıca kapatılarak antibiyotik duyarlılık test (antibiotic susceptibility test: AST) seti cihaza yüklendi.

3.1.5.7 Sonuçların Değerlendirilmesi

Antibiyotik içeren tüplerin değerlendirmesi kontrol tüpünde üreme 400 Üreme İndeksi (Growth Unit:GU)'ne ulaşıldığında yapıldı. Antibiyotik içeren tüplerde üreme gözlenmesi durumunda bakteri o antibiyotiğe dirençli kabul edildi. Kontrol tüpünde 4 günden önce 400 GU üreme gözlenmesi kontaminasyon varlığı veya bakteri miktarının fazlalığı şeklinde yorumlandı. Bu durumda ilgili izolat için antibiyogram tekrarı yapıldı. Onüç günden sonra üreme gözlenmeyen (400 GU) kontrol tüpleri ise bakteri yoğunluğu yetersiz olarak değerlendirilerek ilgili izolat için antibiyogram tekrarı yapıldı.

3.1.6 Kalite Kontrol

Duyarlılık testlerinde kalite kontrol olarak, denenen ilaçlara duyarlı olduğu bilinen *M. tuberculosis* ATCC 27294 (H37Rv) suşu kullanıldı.

3.1.7 İstatistiksel Analizler

Veriler SPSS for Windows (version 11.0) paket programı kullanılarak bilgisayar ortamına aktarıldı. Ortalama değerler “aritmetik ortalama \pm standart sapma” olarak gösterildi. P değeri Pearson Chi-square yöntemiyle değerlendirildi.

4. BULGULAR

2005-2010 yılları arasında Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ne başvuran tüberküloz ön tanılı hastaların klinik örneklerinden izole edilen 60 *M.tuberculosis* kompleks suşunun primer antitüberküloz ilaçlarına direnç dağılımı retrospektif olarak çalışılmış ve kombine ilaç direnci değerlendirilmiştir.

Hastaların yaş ortalaması 35.2 ± 18 yaş, en küçük yaş 1 ve en büyük yaş 74 olarak saptanmıştır. Her hastaya ait tek bir örnek çalışmaya alınmıştır (Tablo 4. 1). 60 *M.tuberculosis* kompleks suşunun 25 'i (%41.7) kadın hastalardan, 35 'i (% 58. 3) erkek hastalardan izole edilmiştir. İzole edilen suşların yaş grupları ve cinsiyet dağılımına bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Tablo 4.1 *MTC* suşların elde edildiği hastaların yaş guruplarına göre cinsiyet dağılımı

Yaş	Kadın (n=25)		Erkek (n=35)	
	Sayı	%	Sayı	%
1-10 yaş	2	8	2	5.7
11-30 yaş	14	56	11	31.4
31-50 yaş	3	12	14	40
51≤	6	24	8	22.9

Çalışmaya alınan 60 *M.tuberculosis* kompleks suşunun 46 'sı (%76,7) balgam, 6'sı(%10,0) bronşial lavaj sıvısı, 2'si (%3,3) periton

sıvısı, 4'ü (%6,7) mide aspirasyon sıvısı (MAS) ve 2'si (%3,3) abseden izole edilmiştir .Örnek dağılımına bakıldığında; % 77 gibi büyük bir çoğunluğunun balgamdan izole edilen suşlar olduğu görülmüştür (Tablo 4.2).

Tablo 4.2 İzole edilen *MTC* suşlarının klinik örneklere göre dağılımı

Örnek	Sayı	%
Balgam	46	76,7
Bronkoalveolar lavaj sıvısı	6	10,0
Periton sıvısı	2	3,3
Mide Aspirasyon Sıvısı	4	6,7
Abse	2	3,3
Toplam	60	100,0

Literatürle uyumlu olarak ARB sonuçlarının daha az bilgi verici olması gelen örneğin kalitesi, hastanın daha önce tedavi almış olması ve örnekteki basil sayısının azlığı ile bağlantılı olabilir.

Tablo 4.3 İzole edilen *MTC* suşlarının ARB ve kültür pozitiflik oranlarının klinik örneklere göre dağılımı

Klinik örnekler		ARB (+)		Kültür (+)	
		n	(%)	n	(%)
Solunum yolu örnekleri	Balgam	8	17.4	46	100
	BAL	1	16.7	6	100
Solunum dışı örnekler	MAS*	0	0	2	100
	Abse	1	50	2	100
	Peritoneal mayi	1	50	4	100

*MAS: Mide Aspirasyon Sıvısı

46 balgam örneğinden izole edilen *MTC* suşunun 11’inde tek ilaca karşı ,5’inde iki yada üç ilaca karşı direnç tesbit edilmiştir. 4 MAS örneğinden izole edilen suşların 1’inde tekli, 1’inde çoklu ilaç direnci tesbit edilmiştir. 6 BAL örneğinden izole edilen suşların 3’ünde, 2 peritoneal mayi örneğinden izole edilen suşların 1’inde ve 2 MAS örneğinden izole edilen suşların 1’inde tekli ilaç direnci tesbit edilmiş bunun yanında çoklu ilaç direncine rastlanmamıştır (Tablo 4.4).

Tablo 4.4 Klinik örneklere göre tekli ve birden fazla ilaç direnç dağılım oranları

Klinik örnek	Tekli direnç	Birden Fazla İlaç direnci
Balgam	11 (%23.9)	5 (% 10.9)
BAL	3 (%50)	--
MAS	1 (% 25)	1 (%25)
Peritoneal mayi	1 (%50)	--
Abse	1 (%25)	--

İzole edilen *MTC* suşlarının ilaç direnç dağılımını tek ilaca karşı değerlendirdiğimizde; STR dirençli 4 suş (%6.6), İNH dirençli 10 suş (%16.7), RİF dirençli 3 suş (%5.0), EMB dirençli 1 suş (%1.7) olarak tesbit edilmiştir. İki ilaca karşı dirençli olan suşlara baktığımızda STR+İNH dirençli 1 suş (%1.7), İNH + RİF dirençli 2 suş (%3.3), RİF + EMB dirençli 2 (%3.3) suş tesbit edilirken, üç ilaca direnç, STR + RİF +EMB dirençli sadece 1 suş tesbit edilmiştir.

Tablo 4.5 İzole edilen 60 *MTC* suşunun primer antitüberküloz ilaçlarına direnç oranları

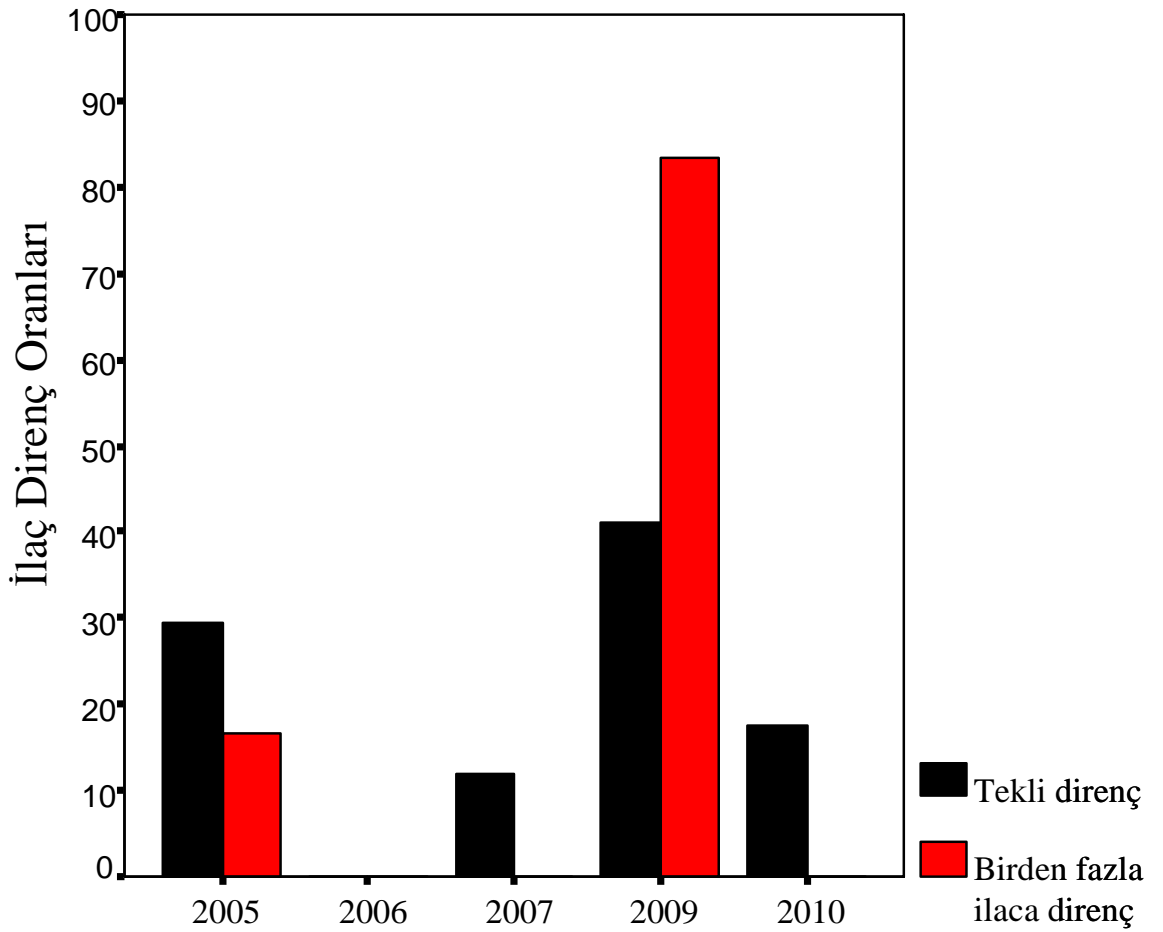
	İlaçlar	Sayı	%
Tek ilaca direnç	STR	4	6.6
	İNH	10	16.7
	RİF	3	5.0
	EMB	1	1.7
	Toplam tek ilaca direnç	18	30.0
İki ilaca direnç	STR +İNH	1	1.7
	İNH + RİF	2	3.3
	RİF+ EMB	2	3.3
	Toplam iki ilaca direnç	5	8.3
Üç ilaca direnç	STR + RİF + EMB	1	1.7
	Toplam birden fazla ilaç direnci	6	10.0

Her bir ilacın toplam direnç oranları; STR için 6 suş (%10.0), İNH için 13 suş (%21.7), RİF için (%13.3) ve EMB için 3 suş (%5.0) olarak tesbit edilmiştir (Tablo 4.6).

Tablo 4.6 Herbir ilaca göre toplam direnç oranları

İlaçlar	Direnç	
	Sayı	(%)
STR	6	10.0
İNH	13	21.7
RİF	8	13.3
EMB	3	5.0

Şekil 4.1. de görüldüğü gibi tekli ve birden fazla ilaç direnç oranları yıllara göre farklılık göstermesine rağmen, hasta sayılarının bazı yıllarda az olması ve tüm yıllara dağılımının orantılı olmaması nedeniyle, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p > 0.05$).



Şekil 4.1 Yıllara göre tek ve birden fazla ilaca dirençli suşların oranları



Resim 4.1 a: L- J by, üreme (-) **b:** L-J by, üreme (+) (orijinal)



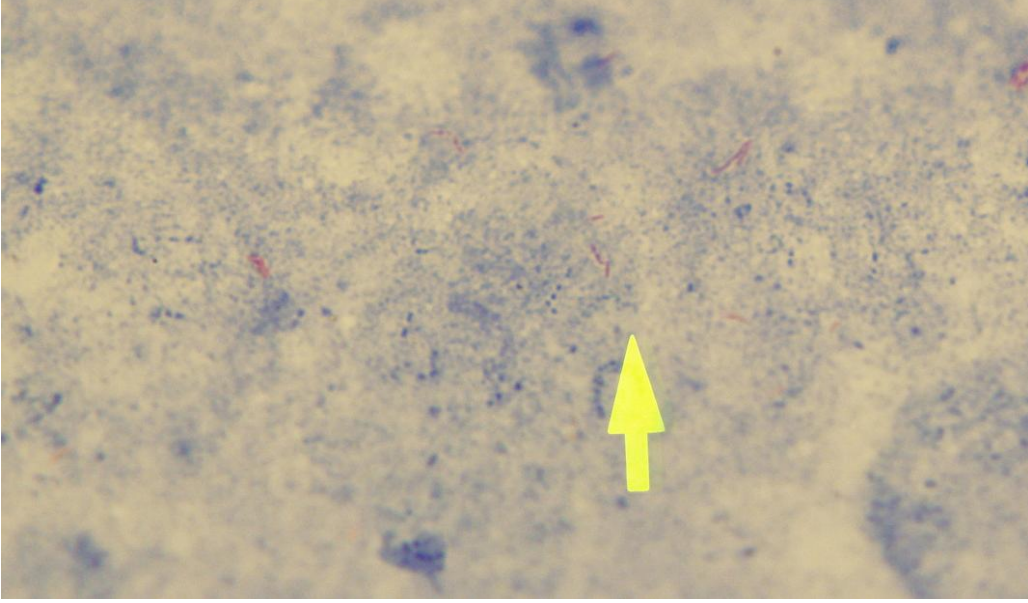
Resim 4.2. L-J besiyerinde Kültür (+) suşlar (orijinal)



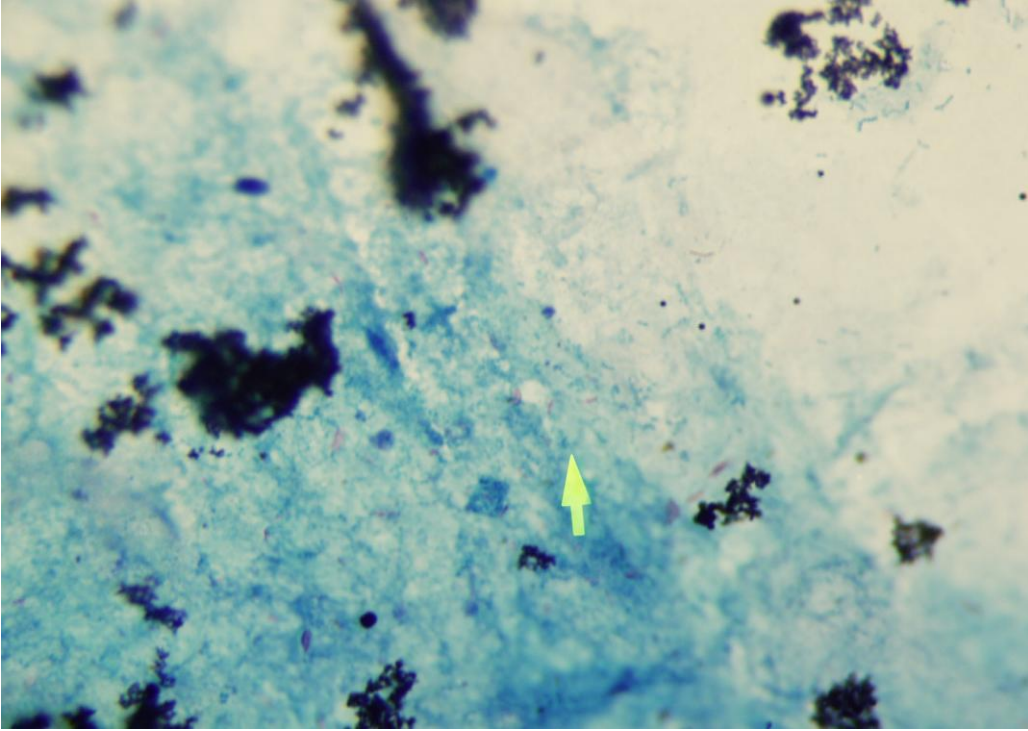
Resim 4.3 Kültür pozitif örnekten kord faktör yapısı (orijinal).



Resim 4.4 Kültür pozitif örnekten kord faktör yapısı (orijinal).



Resim 4.5 EZN yöntemiyle direk bakıda tesbit edilen ARB + basil (orijinal)



Resim 4.6 EZN yöntemiyle direk bakıda tesbit edilen ARB + basil (orijinal)



Resim 4.7 Çalışmalarımızı yaptığımız BACTEC MGIT 960 cihazı (Orijinal).



Resim 4.8 BACTEC MGIT 960 cihazına SİRE antibiyotik tüplerinin yerleştirilmesi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bir toplumda TB hastalarının erken tespiti, bu hastalara uygun tedavi programlarının uygulanması ve tedavinin takibi, tüberküloz kontrol programlarının en önemli unsurlarındandır. Bu nedenle *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTC) grubu bakterilerin üretilmesi ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması, uygun tedavi rejimlerinin belirlenmesinde büyük öneme sahiptir (107,108).

TB hastalığı insanlık tarihi kadar eski olmasına karşın bugün birinci grup tüberküloz ilacı olarak kullanılan RİF 1967 yılında bulunmuştur. TB ilaçlarına karşı direnç kemoterapi uygulamalarından sonra fark edilmiştir. RİF' in gözetimsiz kullanımı İNH ve RİF'e karşı birlikte direnç gelişimine neden olmuştur. Artık direnç sorunu tüberküloz tedavisinin başarısını tehdit eder boyuta ulaşmıştır (109).

TB basillerinde direnç, doğal olarak direnç genlerinin varlığına veya spontan mutasyonlara bağlı olarak gelişmektedir. Mutant basillerin oluşumu tamamen rastlantısal ve geri dönüşümsüzdür (98, 99). *M. tuberculosis*'de direnç aktarılabılır özellikte olmadığından, direncin yayılması ancak dirençli izolatlarla infekte kişiler aracılığı ile olmaktadır. MTC' de antitüberküloz ilaçlara karşı direnç, tedavide ve TB kontrol programında yapılan hatalara bağlıdır. HIV ile infekte kişiler de TB' nin yayılımında ve direnç gelişiminde önemli rol oynamaktadır (110 - 112).

ÇİD- TB ise, hastalarda uygun olmayan tedavi sırasında direncin adım adım birikmesiyle ortaya çıkmaktadır. Klasik direnç yolu; İNH veya STR'e tekli direnç, İNH+STR ikili direnci, İNH+STR+RİF üçlü direnci, İNH+STR+RİF+EMB dörütlü direnci şeklinde gelişmekte, tüm dirençli olguların %85'inde bu yol gözlenmektedir (105, 113).

Dünyadaki ÇİD-TB suşlarının yerel prevalansları çarpıcı şekilde farklılık göstermektedir. TB kontrol programı iyi olan ülkelerde direnç daha düşüktür. TB oranlarının yüksekliği, yetersiz kontrol programlarının uygulanması ve TB tedavilerine uyumsuzluk gibi yüksek oranda ilaç direncine neden olan koşulların bulunduğu ülkelerde, aynı zamanda yetersiz bilgi ve ekipmana sahip laboratuvarların yaygınlığı da direnç prevalansını belirlemede güçlüklereden neden olmaktadır (109).

CDC, TB düşünölen bir hastanın örneği laboratuvara kabul edildikten sonra ortalama 28-30 gün içinde *MTC* için duyarlılık testlerinin sonuçlandırılmasını önermektedir (77). Hastalığın erken tanısı ve primer antitüberküloz ilaç direncinin hızlı bir şekilde saptanması ÇİD-TB kökenlerin kontrolünde ve etkili tedavide yaşamsal bir rol oynamaktadır. Klasik antibiyotik duyarlılık testlerinde iş yükü fazlalığı, antibiyotik içeren klasik besiyerlerinin hazırlanması ve saklanması sırasında antibiyotiğin inaktive olmasıyla yanlış sonuçlar alınabilmektedir (60). Ayrıca, bu testlerde suşların duyarlılık sonuçlarının 21 günlük inkübasyon süresi sonunda değerlendirilmesi tedaviyi geciktirebilmektedir. Daha hızlı sonuç alabilmek için moleküler yöntemler kullanılarak, ilaç direncinden sorumlu olan gen bölgelerinin gösterilmesine çalışılmaktadır. Ancak bu yöntemlerle, birden fazla gen bölgesinin dirençten sorumlu olduğu durumlarda her bir direnç geni için ayrı işlem yapılmasının gerekmesi, dirence yol açmayan sessiz mutasyonların da saptanması gibi sorunlarla karşılaşmaktadır. Dirençli olduğu saptanan, fakat mutasyonların gösterilemediği olgular, dirençte başka gen bölge mutasyonları veya başka mekanizmalar olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca kullanılan ekipmanın pahalı olması bu yöntemlerin pratikte uygulanmasını kısıtlamaktadır (78).

Gerek tüberküloz basilinin izolasyonunda, gerekse primer antitüberküloz ajanlara karşı duyarlılık testlerinin standardize edildiği, hızlı, güvenilir bir sistem olan BACTEC MGIT 960 kültür ve antibiyogram sistemi; radyoizotopik madde içermemesi nedeniyle ülkemizde tüberkülozla mücadelede daha yaygın bir şekilde kullanılabilceği düşünülmüştür (111).

Günümüzde tüberküloz tedavisinde kullanılan primer antitüberküloz ilaçlar, İNH, RİF, İNH, EMB ve PRZ' dir. TB' da etkenin kısa sürede tanınması, ilaç direncinin saptanması ve ilaçların uygun dozlarda uygulanması son derece önemlidir. Bu nedenle klasik laboratuvar tanı yöntemleri yanında hızlı sonuç veren, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, kolay uygulanabilir yeni kültür yöntemleri ile moleküler biyoloji teknikleri geliştirilmektedir. Antitüberküloz ilaçlara karşı direnç gelişimini saptamak için *MTC* kökenlerinin antitüberküloz ilaçlara duyarlılıklarının belirlenmesinde, Dünya Sağlık Örgütü tarafından sıvı (7H12 besiyeri kullanan ticari sistemler) ve katı (proporsiyon yöntemi Middlebrook 7H10/ 7H11 agar veya Löwenstein-Jensen) bazlı yöntemler önerilmektedir (69).

Uzun dönemde yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda BACTEC MGIT 960 sistemi ile alınan sonuçlar referans yöntemlerle alınan sonuçlar ile uyumlu bulunmuştur. NCCLS tarafından fenotipik antitüberküloz ilaç duyarlılık testleri için önerilen testler arasında bildirilmiştir (NCCLS 2003). BACTEC MGIT 960 sistemi tam otomatize ve kolay uygulanabilir olması, 4-13 gün gibi kısa sürede sonuç verebilmesi açısından önemli avantajlar sağlamaktadır. Bu sistemin en önemli dezavantajının, kültür işlemleri sırasında karşılaşılan kontaminasyon sorunu olduğu bildirilmektedir (114 - 116).

Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak en çok balgam örnekleri tanı materyali olarak kullanılmış, bunun dışında BAL, peritoneal mayi, abse ve MAS gibi örneklerde izolasyon için değerlendirmeye alınmıştır. Gelen örneklerden izole edilen suşların primer antitüberküloz ilaçlarına direnci araştırılmıştır. Çalışmamızda tekli yada çoklu ilaç direnci gözetmeksizin hesaplanan toplam direnç oranları yalnızca STR için % 10 (4 suş), yalnızca İNH için % 21.7 (10 suş) , yalnızca RİF için %13.3 (8 suş) , yalnızca EMB için % 5.0 (3 suş) dir. Aydın F. ve arkadaşlarının (117) BACTEC MGIT 960 Sistemi ile yaptıkları çalışmada tekli ya da çoklu

ilaç direnci gözetmeksizin hesaplanan toplam direnç oranları STR, İNH, RİF, ve EMB için sırasıyla; % 13.7, %17.5, %5.7 ve %5.7 olarak bulunmuştur. Bu oranlar STR için bizim çalışmamızdan yüksek, İNH ve RİF için düşük ve EMB için benzerdir. Bizim çalışmamızda İNH direnci, Tanıdır ve arkadaşlarının (118) 2006 yılında yaptıkları BACTEC MGIT 960 sistemi ile belirledikleri İNH direnç oranı (%20.6) ve Aydın O. 'ın (119) Samsun' da yaptığı yaptığı tez çalışmasında ki İNH direnç oranı (%23.2) ile benzerdir. Ancak bu çalışmalarda ki RİF direnci sırasıyla % 2.9 ve % 8.0 dır ve bizim çalışmamızdan daha düşüktür. Bu çalışmada bulunan yüksek RİF direnci, hastaların tedaviye uyum başarısında problemler olması, uygulanan tedavi ve takiplerinin yetersiz olması, bölgede sık görülen brucelloz enfeksiyonunun tedavisinde rifampisin yaygın olarak kullanılıyor olması gibi nedenlere bağlı olabileceği düşünülmüştür (5).

2005 - 2010 yılları arasında izole edilen suşlardan kombine ilaç direncini belirlemek amacıyla yaptığımız bu çalışmada, tekli ilaç dirençleri İNH için % 16.7, RİF için %5.0, STR için % 6.6, EMB için %1.7 olarak tespit edilmiştir. Yöntem farklılığı göz ardı edildiğinde, Karadağ ve arkadaşlarının (120) 50 MTC suşu ile 2004 yılında yaptıkları kombine ilaç direnç oranları İNH için % 8, RİF için % 4, STR için % 4 , EMB için % 2 ve ayrıca PRZ için % 2 direnç tesbit etmişlerdir.Çalışmamızda bulunan RİF ve EMB direnç oranları, Samsun' da yapılan bu çalışma ile uyumlu iken, İNH ve STR direnç oranımızın daha yüksek olduğu görülmektedir.

Aydın F. ve arkadaşlarının (117) ve Gaziantep'den Ekşi ve arkadaşlarının (121) BACTEC MGIT 960 sistemiyle yaptıkları kombine ilaç direnci çalışmasındaki tekli ilaç direnci oranları STR, İNH, RIF ve EMB için sırasıyla % 5.2, % 6.1, % 0.5 , % 2.4 ve % 6.9, %8.6, % 1.7 , % 1.7 dir ve İNH direnç oranı bizim çalışmamızdan düşüktür. Bizim çalışmamızda bulunan tekli ilaç dirençleri İNH dışında benzerlik göstermektedir. İNH direncinin diğer ilaç dirençlerine göre daha fazla bulunmasının, bu ilacın sadece tedavi amaçlı değil, aynı zamanda profilaktik amaçlı olarak da yaygın kullanılıyor olmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca Türkiye'nin diğer bölgelerinde son yıllarda farklı yöntemler kullanılarak yapılan çalışmalarda da tek başına STR, İNH, RIF, ve EMB için

direnç oranları % 3.7- 39.0, % 17.0 -30.0, % 3.6 – 11.0, % 4.3 – 13.0 oranları arasında bildirilmektedir (122, 123). Bu oran farklılıkları yöntem farklılığı, yöntemi uygulayan teknik ekibin yeterliliği, tesbit edilen suşun genetik profili ilede bağlantılı olabilmektedir.

TB tedavisinde özellikle İNH ve RİF'nin ayrı bir önemi vardır. Toplum düzeyinde RİF direncindeki artış, TB eradikasyonunun önündeki en büyük engel olarak görülmektedir (124). Çalışmamızda herhangi bir ilaca direncin saptanmadığı oran % 60.0, bir ilaca direnç oranı % 30.0 ve birden fazla ilaca direnç oranı %10.0'dır. Bunlardan 2 suş (%3.3) İNH ve RİF'e, 1 suş (% 1.7) STR-İNH'ye, 1 suş (%1.7) RİF-EMB'ye, 2 suş (%3.3) STR-RİF-EMB'ye dirençli bulunmuştur. Gaziantep'ten Ekşi ve ark. (121) toplam tek ilaca direnç oranını %19 olarak bulmuşlar, birden fazla ilaca dirençli olan suşların oranını % 7.7 olarak bildirmişlerdir. Aynı bölgeden ve aynı yöntemle yapılmış bir yapılmış bir çalışma olarak bizim birden fazla ilaca direnç oranımızın daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu yükseklik suş alt tür farklılığı, iki kent arasındaki ekonomik düzey farklılığı; tanı, tedavi ve takip hizmetlerindeki farklılıklarla açıklanabilir. Türkiye'de tüberküloz ilaç dirençlerine ait çeşitli bölgelerden bildirilen direnç sonuçları arasında farklılıklar izlenmektedir. Ülkemizin sosyo-ekonomik durumu, iklim koşulları, gelişmişlik düzeyi bölgeler arasında önemli farklılıklar göstermektedir. Bu nedenle coğrafi bölgeler arasındaki direnç değerlerinde önemli farklılıklar gözlenmektedir. Yaylı ve arkadaşlarının (125) Isparta ve yöresinde *M. tuberculosis* izolatlarında MGIT sistemi ile primer antitüberküloz ilaçlara karşı ortalama direnç oranları ise STR, RİF, İNH ve EMB için sıra ile % 13.88, % 1.85, % 1.85, % 0.92'dir. Bu oranlar hem bizim çalışmamızdaki oranlardan düşük, hem de genel olarak Türkiye ortalamalarının altında bulunmuştur.

Gönlügür ve arkadaşlarının (126) Sivas'ta yaptıkları yaptıkları BACTEC MGIT 960 sistemi ile yapılan çalışmada ise İNH için % 17.7, STR için % 11.4 ve EMB için %5.1 olan direnç oranları ülkemiz verilerine benzer bulunmuş, ancak RİF direnci (%4.4) ve ona paralel olarak ÇİD-TB oranı %3.8 olarak bulunmuştur. Sağlık Bakanlığı verilerine göre ülkemizde tüm TB olguları göz önüne alındığında ÇİD – TB % 5.1 oranındadır. Bizim ÇİD – TB oranımız % 3.3 ile Gönlügür ve ark. 'nın çalışmasıyla uyumlu ve Türkiye ortalamasının

altındadır. Bu bulgu, hastaların hem klasik kısa süreli ilaç tedavisine hem de relaps riskinin azalmasına olanak sağlayacaktır.

Dünyada görülen direnç oranları tüberkülozun endemik olarak görüldüğü bölgelerle az görüldüğü ülkeler arasında belirgin farklılık göstermektedir. Hastalığın sıklığı ise uygun tedavi rejimlerinin verilmemesi, tüberküloz kontrol önlemlerinin yeterince uygulanmaması, HIV epidemisi ve ülkenin göç alıp almaması gibi nedenlerle bağlantılı olarak dalgalanmalar göstermektedir. Tüberküloz vakalarının % 95'inden fazlası gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir (127).

DSÖ ve Uluslararası Akciğer Hastalıkları ve Tüberküloz Birliğinin 1999-2002 yılları arasında, çeşitli ülkelerden 75 merkezden tedavi görmemiş 55,779 hasta üzerinde yapılan çalışmalarının analizine göre bir veya daha fazla ilaca direnç oranı % 10.2 olup en yüksek direnç oranı % 57.1 ile Kazakistan'da saptanmıştır. Ortalama direnç oranları STR için % 6.3, İNH için % 5.9, RİF için % 1.4 ve EMB için % 0.8 olarak bulunmuştur. Ortalama çok ilaca direnç oranı ise % 1.1 olarak hesaplanmıştır (127). Bu oranların tedavi almış eski vakalarda STR için % 11.4, İNH için % 14.4, RİF için % 8.7 ve EMB için % 3.5; ortalama çok ilaca direncin ise % 7.0 olduğunu görmek şaşırtıcı olmasa gerektir. Bazı ülkelerde uygulanan tüberküloz kontrol politikaları sayesinde hem enfeksiyonun görülme sıklığı hem de ÇİD'li suş oranı azalmıştır. Örneğin İzlanda, İtalya, Kanada gibi ülkelerde TB görülme sıklığı yaklaşık 1-4/100 bin iken bu ülkelerdeki ÇİD oranı % 0-1'in altındadır. Doğu Avrupa, Güneydoğu Asya, Batı Pasifik bölgeleri TB görülme sıklığının yaklaşık 200/ 100 bin ÇİD'in % 6.5'in üzerinde görüldüğü 'sıcak nokta' ülkelerinin yer aldığı bölgelerdir. DSÖ verilerine göre ülkemizin tahmin edilen TB görülme sıklığı 12/ 100 bin iken tedavi edilmemiş izolatlarda ÇİD oranı % 1-5 arasındadır (127).

İNH + STR+ RİF + EMB dördü ilaç direnci, primer antitüberküloz ilaçlarının direncinde son noktadır. Biz çalışmamızda dört ilaca dirençli suş tesbit etmedik. Ancak Aydın F. ve ark.(117) % 0.9, Gönülçür ve ark.(126) % 0.6, Ekşi ve ark.(121) % 0.8 oranında dört ilaca direnç saptamışlardır. Dündar ve ark.(128) 'nın yaptığı 157 suşluk çalışmada dört ilaca

direncin saptanmamış olması, bu suşların henüz çok yaygın olmadığını, uygun tedavi ve ciddi takiplerle dört ilaca dirençli suşların toplumda yayılımının azaltılabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak ilimizden izole edilen *M. tuberculosis* suşlarında Türkiye ortalamalarının üzerinde sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca ülkemizde diğer merkezlerde yapılan çalışmalarda primer direnç, sekonder direnç, kombine direnç ve ÇİD-TB oranları dünya ortalamalarının üstünde bulunmuştur. Bu da ülkemizde uygulanan TB ile mücadele programlarımızın başarısızlığını göstermektedir. Yeni dirençli olguların artışı için acilen önlem alınması gerekmektedir. Çalışmamızda görüldüğü gibi karşımıza çıkan her tüberküloz hastasının dirençli olma ihtimali yüksektir. Bu nedenle ülkemizde dirençli vakaların hızlı bir şekilde tespit edilmesi ve uygun tedavi verilebilmesi için hızlı ve güvenilir sonuç veren yöntemlerin uygulanmaya başlanması gerekmektedir. Ülkemizde toplumun tümünü yansıtan, güvenilir, standardize edilmiş direnç raporları bulunmamakla birlikte, değişik merkezlerden bildirilen raporlar direnç sorununun küçümsenmeyecek boyutta olduğunu göstermektedir. Bu çalışmaların ışığında, etkili TB tedavisinin sağlanabilmesi için ülke genelinde, ülke gerçekleriyle bağlantılı olarak hızlı, güvenilir, standardize edilmiş hem izolasyon - identifikasyon, hem de duyarlılık testlerinin yapılabildiği sistemlerin mikobakteriyoloji laboratuvarlarında kullanıma girmesi gerektiği anlaşılmaktadır.

Bu çalışma ilimizden yapılmış olan ilk MTC ilaç direnci oranlarını sağlamış ve halen dörtlü ilaç direncinin olmadığını göstermiş olmasıyla anlamlıdır. Elde edilen bu direnç oranlarının uygun tedavi protokolleri oluşturulmasında ve ilimizde başarılı bir TB kontrol programının uygulanmasında yol gösterici olacağını düşünmekteyiz.

Tablo 5.1 Ülkemizde farklı merkezlerde, farklı yöntemlerle yapılmış çalışmalardan elde edilen kombine antitüberküloz ilaçların direnç oranları

Araştırmacı	Kaynak	Yıl	Merkez	Besiyeri	STR	INH	RIF	EMB
Arseven ve ark	140	1994	D.Karadeniz	L-J	29.4	25.2	10.5	7.8
Yüce ve ark.	129	1997	İzmir	L-J	10.3	6.0	10.3	5.2
Otkun ve ark..	123	1997	Edirne	7H11	39.0	30.0	11.0	13.0
Balcı ve ark.	130	1999	İstanbul	12 B	4.5	10.6	0.5	2.0
Öztürkeri ve ark.	131	1999	İstanbul	12 B	6.8	35.3	21.0	30.5
Saniç ve ark.	132	2000	Samsun	L-J	10.1	7.3	22.1	16.0
Sürücüoğlu ve ark.	133	2002	Manisa	12 B	20.2	17.1	12.4	7.0
Kısa ve ark.	134	2002	Ankara	12 B	4.1	8.7	2.1	5.1
Gani ve ark	135	2002	Gaziantep	12 B	1.9	13.9	2.9	3.4
Kocazeybek ve ark.	136	2002	İstanbul	MGIT	6.5	19.6	14.7	3.2
Tansel ve ark.	137	2002	Edirne	12 B	2.2	9.0	4.5	1.5
Karadağ ve ark .	120	2004	Samsun	12B	4.0	8.0	4.0	2.0
Yanık ve ark.	138	2005	Samsun	12B	3.1	18.8	3.1	12.5
Abaslı ve ark.	122	2006	Ankara	12B	3.7	17.0	3.6	4.3
Tanıdır ve ark	118	2006	İstanbul	MGIT	4.4	20.6	2.9	11.8
Öksün ve ark.	139	2006	Adana	MGIT	7.4	13.4	8.9	2.9
O. Aydın ve ark.	119	2006	Zonguldak	MGIT	19.2	23.2	8.0	4.0
Gönlügür ve ark.	126	2007	Sivas	MGIT	11.4	17.7	4.4	5.1
Ekşi ve ark.	121	2009	G.antep	MGIT	6.9	8.6	1.7	1.7
Dündar D ve ark.	128	2009	Kocaeli	MGIT	4	13	-	3
Faruk A ve ark.	117	2011	Trabzon	MGIT	13.7	17.5	5.7	5.7
Bu çalışma		2011	Şanlıurfa	MGIT	10.0	21.7	13.3	5.0

KAYNAKLAR

- 1- Albay A. Anti-tüberküloz ilaç duyarlılık testleri ve Türkiye Verileri - Gülhane Mikrobiyoloji Günleri, 105-116, İstanbul, 2010.
- 2- MMWR: Initial therapy for tuberculosis in the era of multidrug resistance Recommendations of the advisory council for the elimination of tuberculosis of the Centers for Diseases Control and Prevention MMWR 1993; 42: 1-8.
- 3- Kocabaş A. Akciğer tüberkülozu In: Topçu Wilke A, Söyletir G, Doğanay M (ed). Enfeksiyon Hastalıkları 1.Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 1996;396-443.
- 4- Hazbon HM, Labreda LA. Evaluation of E test for susceptibility testing of multidrug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* J Clin Microbiol 2000; 38: 4599-4603.
- 5- Kıyan M. *Mycobacteriaceae*, 'Temel ve Klinik Mikrobiyoloji' Ed.Ustaçelebi Ş, 419 - 455, Güneş Kitapevi, Ankara, 1999.
- 6- Kayalı R, Çöplü N, Ceyhan ve ark. Çok İlaça Dirençli (ÇİD) *Mycobacterium tuberculosis* Suşlarının Minör İlaçlara Direncinin Saptanması. 5. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu. İzmir. 2004: 226.
- 7- Karlıkaya C. Tüberküloz Ders Notları. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilimdalı ; 1998.
- 8- Barış İ.Y. Çağlar Boyu Tüberküloz. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu, Samsun. 2003: 1-7.
- 9- Iseman MD. Tuberculosis therapy: past, present and future. Eur Respir J 2002;20 (36): 87-94.
- 10- 18. Medical Research Council. Various combinations of isoniazid with streptomycin or with PAS in the treatment of pulmonary tuberculosis. BMJ 1955; 1: 435-445
- 11- Medical Research Council. Treatment of pulmonary tuberculosis with streptomycin and paramino salicylic acid. BMJ

1950; 2: 1073-1085.

12- Doster B, Murray FJ, Newman R, et al. Ethambutol in the initial treatment of pulmonary tuberculosis. U.S. Public Health Service, Tuberculosis Therapy Trials. Am Rev Respir Dis 1973; 107: 177-190.

13- Davidson PT, LE HQ: Drug treatment of tuberculosis.1992; 43(5): 651-673. 16- Hong Kong Chest Service, BMR Council. Controlled trial of 6-months and 8-months regimens in the treatment of pulmonary tuberculosis: The results up to 24 months. Tubercle 1979; 60: 201-210.

14- Aslan G, Delioğlu N, Emekdaş G, ve ark. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının izoniazid, rifampin, streptomisin ve etambütol duyarlılıklarının BACTEC yöntemi ile belirlenmesi. Ankem dergisi. 2005; 19 (1): 43-47.

15- Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M : *Mycobacterium*, Mikrobiyoloji 2000,Ed.Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M ,174-183,Asya Tıp Yayıncılık,İzmir, 1998.

16- Köksal F., Yaman A. Farklı Bir Bakteri Topluluğu Mikobakterilerde Hücre Duvarı Yapısı 21 Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu. 11-12 Haziran, Samsun, 2003,

17- www.answers.com/main/Record2/Q=NR&url,http://commons.wikimedia.org/wiki/image:Mycobacterial_cell_wall_diagram.png.(20.07.2010).

18- Pfyffer GE, Brown-Elliot BA, Wallace RJ. Mycobacterium In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH (eds). Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington DC: 2003; 532-559, 1156-1164.

19- Inderlied CB. Mycobacteria In: Armstrong D, Cohen J (eds). Infectious Diseases, Mosby Company, London. 1999: 1 (8): 1-22.

20- Wayne LG, Kubica GP. Mycobacteria In: P.H.A.Sneath, (ed), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. 1986; 1435-1457.

21- Haas DW. Mycobacterial Diseases In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (ed).Principles and Practice of Infectious Diseases, 5th ed, Philadelphia: Churcill Livingstone; 2000; 2596-2608.

22- Bilgehan H: *Mycobacteriumlar* Klinik Mikrobiyolojik Tanı Ed. Bilgehan H 3. Basım,571 - 593, Fakülteler Kitapevi Barış Yayınları, İzmir, 2002.

- 23- Özerol Hİ: Tüberkülozun serolojik tanısı, 21. Yüzyılda tüberküloz Sempozyum Kitabı, 411-427, Samsun, 2003.
- 24- Schwander SK, Torres M, Seda E, et al. Enhanced responses to *M. tuberculosis* antigens by human alveolar lymphocytes during active pulmonary tuberculosis. J Infect Dis 1998; 178: 1434-45.
- 25- Maes R. Clinical usefulness of serological measurements obtained by antigen 60 in mycobacterial infections: Development of a new concept. Klin Wochenschr 1991; 69: 696-709
- 26- Noss EH, Pai RK, Sellati TJ, et al. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19 kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol, 2001; 167: 910-918.
- 27- Andersen P, Munk ME, Pollock JM, et al. Specific immunebased diagnosis of tuberculosis. Lancet 2000; 356: 1099-104.
- 28- Özbal Y. Tüberküloz immünolojisi. Erciyes Tıp Dergisi, 2006; 28 (1): 25-34.
- 29- Babacan F, Över U. Mikobakterilerin Genel Özellikleri ve *Mycobacterium tuberculosis* complex, In:Topçu A W, Söyletir G, Doğanay M (ed), İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2002; 538-591.
- 30- Freedman AG, Martin JM, Riska PF, et al. Monoclonal antibodies to surface antigens of *Mycobacterium tuberculosis* and their use in a modified enzymelinked immune sorbent spot assay for detection of Mycobacteria. J Clin Microbiol 1996; 34 (11): 2795- 2802
- 31- Mycobacterium, İn: ‘Medical Mikrobiology’ Eds.Patric R Murray, Ken S Rosenthal, Micheal A Pfaller,5 th Ed., 297-309, Elsevier Mosby, Pennsylvania, 2005.
- 32- Kılıçaslan Z: Tüberkülozda Patogenez, Bulaşma ve Tanı ,Türk Toraks Derneği , Kış Okulu Eğitim Kitabı; 83-94, Adana, 2002.
- 33- Esen N. Tüberkülozda Mikobakteriyel Persistans Mekanizmaları. 4. Tüberküloz Sempozyumu Kitabı, Malatya, 2005; 58-64.
- 34- Dannenberg AM: Immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis, Hospital Practise;15:51-58,1993.
- 35- Nigou J, Gilleron M, Puzo Germain. Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis. Biochimie 2003; 85 (1,2): 153-166.

- 36- Smith CV, Huang CC, Miczak A, et al. Biochemical and structural studies of malate synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem 2003; 278: 1735-1743.
- 37- Ferreras JA, Stirret KA, Lu X, et al. Mycobacterial phenolic glycolipid virulence factor biosynthesis: mechanism and small-molecule inhibition of polyketide chain initiation. J Chembiol 2007; 11: 10.
- 38- Bloom BR, Murray CJL. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. Science 1992; 257: 1055-1064.
- 39- Ducati RG, Ruffino-Netto A, Basso LA, et al. The resumption of consumption-areview on tuberculosis. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101 (7): 1-9.
- 40- Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2005. Geneva . World Health Organization (WHO / HTM / TB /2005. 349).
- 41- Öztürk, R. Tüberküloz Epidemiyolojisi. IV Tüberküloz Sempozyumu 9-11 Aralık, Malatya, 2005, Sayfa: 23-32.
- 42- Kılıçaslan, Z. Dünyada ve Türkiye’de Tüberküloz Epidemiyolojisi Kontrolü. Uzun M., Ünal S. (eds). Güncel Bilgiler Işığında enfeksiyon Hastalıkları, Cilt 2, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 821-833, 2002.
- 43- Çelenk M. Tüberküloz Epidemiyolojisi. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi Cilt 14, 1994, Sayfa: 391-403.
- 44- Anğ Ö., Uzun M. Türkiye’de Tüberkülozun Son Durumu. Klimik Dergisi Cilt 11 Sayı(1) 1998 Sayfa: 3-5.
- 45- Özkara S., Aktas Z., Özkan S., Ecevit H. Türkiye’de Tüberkülozun Kontrolü için Başvuru Kitabı, Sağlık Bakanlığı, Verem Savaş Daire Başkanlığı 2003.
- 46- Global Tuberculosis Control Surveillance, Planing, Financing WHO Report 2008. WHO/HTM/200 8; 93.
- 47- Aksu M: Tıp Tarihi Açısından Türkiye’de Verem Savaşı, s.161-70, Türkiye Ulusal Verem Savaşı Dernekleri Federasyonu, Ankara (2007)-
- 48- Barış Yİ: Osmanlı Padişahlarının Yaşamlarından Kesitler, Hastalıkları ve Ölüm Sebepleri, s.206-68, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara (2002).
- 49- Ceyhan İ, Saygan MB, Saniç A, Tarhan G: Tüberkülozda Bakteriyolojik Tanı, s.1-4, RSHMB, Ankara (2007).

- 50- Yolsal N, Malat G, Disçi R, ve ark. Türkiye’de tüberküloz ilaçlarına direnç sorununun 1984-1989 ve 1990-1995 yılları için karşılaştırılması: Meta-analiz, *Klinik Dergisi* 1998; 11(1): 6-9.
- 51- T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaşı Dairesi Başkanlığı Türkiye’de Verem Savaşı Raporu, Ankara (2009).
- 52- Uzun M. Klinik materyallerin hastadan alınması ve laboratuvara gönderilmesi, V. Tüberküloz Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kurs Kitabı,15-21, Diyarbakır, 2006.
- 53- Aslan G. Hasta örneklerinin işlenmesi ve kültürü III. Tüberküloz sempozyumu ve III. Tüberküloz tanı yöntemleri uygulama kursu, adana 2004. kurs kitabı; 10-18.
- 54- Master RN: Mycobacteriology,In ‘Clinical Microbiology procedures Handbook’Ed. Isenberg HD,Washington DC, ASM, 1992.
- 55- Ceyhan İ, Saygan BM, Saniç A, Tahran G: Tüberkülozda Bakteriyolojik Tanı, Ed. Ceyhan İ, 56-63, Laboratuvar Teknikleri serisi, Mikobakteriyolojik Teknik Seri RSHM. LAB. TB. 01, 2005.
- 56- Köksal İ: Tüberkülozda tanı, Sürekli Tıp Eğitim Dergisi; 5-9, 2000.
- 57- Sarıgüzel Sar N: Direk Mikroskopik Teknikleri ve Değerlendirilmesi, V.Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kurs Kitabı; 27-33, Diyarbakır, 2006.
- 58- Özkara Ş, Akteş Z, Özkan S, Ecevit H. Türkiye ‘de tüberkülozun kontrolü için başvuru kitabı. 1. baskı, Ankara.
- 59- Ulukanlıgil M, Aslan G., Taşçı SA. Comparative study on the Different staining Methods and Number of Specimens for the detection of acid Fast Bacilli. *Mem Inst.Oswaldo Cruz* 2000; 95(6); 855- 858.
- 60- Özakin C, Gediklioğlu S: Tüberküloz Tanısında Tüberküloz Laboratuvarının Rolü: Tanı ve ilaç duyarlılık testlerinde rutin laboratuvar yöntemlerinin rolü, 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyum Kitabı; 397-401, Samsun, 2003.
- 61- Ersöz G:Örneklerin İşlenmesi ve Kültür Yöntemleri, V.Tüberküloz Laboratuvar tanı Yöntemleri Uygulamalı Kurs Kitabı, 22-26, Diyarbakır, 2006.
- 62- Teksif: Homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemleri, [www. rshm. gov.tr](http://www.rshm.gov.tr)

- 63- İşitez M: Afyon bölgesindeki tüberküloz olgularının L- J, BACTEC 460 TB ve TK Medium ile saptanıp dört major ilaca karşı dirençlerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Afyon,2003.
- 64- Uzun M: Örneklerin İşlenmesi ve Kültür Yöntemleri, 21.yüzyılda Tüberküloz sempozyum Kitabı; 285-290, samsun, 2003.
- 65- Della-Latta P, Weitzman I. Mycobacteriology. In: Isenberg HD (ed). Essential Procedures for Clinical Microbiology. Washington DC: ASM Press.1998: 169- 75,175-83.
- 66- Liu Pİ et al.comparison of three culture media for isolation of *M tuberculosis* :a 6 year study.applied Microbiology.1973;880-883.
- 67- Köksalan OK, Aydın MD, Eraslan S,Bekiroğlu N.Reliability of cort formation in BACTEC 12/B13A Media for presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* kompleks in laboratories with a high prevalance of *Mycobacterium tuberculosis*. Eur J Clin Microbiol Infect dis. 2002; 21: 314 - 317.
- 68- Alp A. Non-moleküler tekniklerin tanı amaçlı kullanımları. IV. Tüberküloz sempozyumu kitabı, Malatya, 2005: 98-103.
- 69- Dibek AM: *M.tuberculosis* kompleks kökenlerinin MB/BacT sistemi ile ilaç duyarlılıklarının saptanması ve sistemin standardize edilmesi, Uzmanlık Tezi, İzmir,1999.
- 70- Saragias M.BACTEC MGIT 960 Automated System. Section7: Mycobacteriology and Antimycobacteriel Suspectibility Testing.In:İsenberg HD.Clinical Microbiology Procedures Handbook.2nd ed.Vol 2 washington:ASM Pres,2004:7.4.2.1-7.4.2.4.
- 71- Baylan O,Kısa O,Albay A,Doğancı A:Evaluation of a new automated, rapid, colorimetric culture system using solid medium for laboratuary diagnosis of tuberculosis and determination of anti-tuberculosis drug susceptibility, İnt J Tuberc Lung Dis; 8(6)772-777;2004.
- 72- Drancourt M, Carrieri P, Gevaudan MJ, et al. Blood agar and *Mycobacterium tuberculosis*: the end of a dogma. J Clin Microbiol 2003; 41: 1710-11.
- 73- Sürücüoğlu S. Tüberküloz basilinin klasik yöntemlerle identifikasyonu. IV. Tüberküloz sempozyumu kitabı, Malatya, 2005: 173-185.
- 74- Durmaz R. Tüberkülozun Epidemiyolojik Araştırmalarında Laboratuvarın Yeri. 21 Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu. 11-12 Haziran, Samsun, 2003, Sayfa: 443-456.

75- Piersimoni C, Scarparo C, Piccol P, et al. Performance assessment of two commercial amplification assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples. J Clin Microbiol 2003; 41: 5355- 5365.

76- Alp A. Moleküler tanı yöntemlerinde yenilikler. 6. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu kitabı, Kızılcahamam, 2006; 165-169.

77- Centers for Disease Control and Prevention. Initial therapy for tuberculosis in the era of multidrug resistance: recommendations of the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis. MMWR Mortal Morbid Weekly Rep 1993; 42 (RR-7).

78- Çavusoğlu C., *Mycobacterium tuberculosis*'de Moleküler Antibiyotik Duyarlılık Test yöntemleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun, 2003.

79- Dorbniewski F., Antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. EUCAST Discussion Document, CMI . 8: 1, 2001.

80- ICMR Bulletin: Vol.32, No.8, August.2002.

81- CLSI. Susceptibility Testing of *Mycobacteria*, *Nocardia* and Other Aerobic *Actinomycetes*: Approved Standard. CLSI document M24-A [ISBN 1-56238-500-3]. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

82- Wanger A, Mills K. Testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibility to ethambutol, isoniazid, rifampin, streptomycin by using Etest. J Clin Microbiol 1996; 34: 1672-1676.

83- Kocagöz T. *M. tuberculosis* için uygulanan fenotipik ve genotipik direnç testleri. 4. Ulusal mikobakteri sempozyumu kitabı, Abant, 2002; 115-117.

84- Bemer P., Bodmer T., Munzinger J., Perrin M., Vincent V., Drugeon H.,

85- Yajko D.M., Madej J.J., Lancaster M.V., Sanders C.A., Cawthon V.L., Gee B., Babst A., Hadley W.K., Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol . 33(9):2324-2327, 1995.

86- Banaiee N., Bobadilla-del-Valle M, Riska, P. F, Bardarov S Jr Small P.M, Poncede-Leon A, Jacobs W. R. Jr., Hatfull G. F., Sifuentes-Osornio, J. Rapid identification and susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from MGIT cultures with luciferase reporter mycobacteriophages. J Med. Microbiol. 52 (Pt 7):557-561, 2003.

- 87- Hazbon M. H., Guarin N., Ferro B. E., Rodriguez A. L., Labrada L. A., Tovar R., Riska P. F., Jacobs W. R. Jr., Photographic and luminometric detection of luciferase reporter phages for drug susceptibility testing of clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates J Clin. Microbiol. 41 (10): 4865-4869, 2003.
- 88- Eltringham, I. J., Wilson S.M., Drobniewski F. A., Evaluation of a bacteriophage-based assay (phage amplified biological assay) as a rapid screen for resistance to isoniazid, ethambutol, streptomycin, pyrazinamide, and ciprofloxacin among clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin. Microbiol. 37 (11): 3528-3532, 1999.
- 89- Moore A.V., Kirk S.M., Callister S.M., Mazurek G.H., Schell R.F., Safe determination of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to antimycobacterial agents by flow cytometry. J Clin. Microbiol. 37(3): 479-483, 1999.
- 90- Cockerill F.R., Genetic methods for assessing antimicrobial resistance. Antimicrob. Agent Chemother. 43:199-212, 1999.
- 91- Özkara S. Dünyada ve Türkiye’de çok ilaca dirençli tüberküloz. 6. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu kitabı, Kızılcahamam, 2006; 197-204.
- 92- Oğuz Kayaalp. Tüberküloz ve diğer mikobakteri infeksiyonlarında kullanılan ilaçlar In: Tıbbi Farmakoloji. 2002: 306-312.
- 93- Douglas JG, McLeod MJ. Pharmacokinetic factors in the modern drug treatment of tuberculosis. Clin Pharmacokinet 1999; 37(2): 127-146.
- 94- Artvinli M. Tüberküloz ilaçları ve yan etkileri. In: Kocabaş A (ed). Tüberküloz kliniği ve kontrolü. 1. Basım 1991; 265-271.
- 95- Oktun M., Tüberküloz Tedavisinde Temel İlkeler ve Direnç Sorunu, Klimik Dergisi., 14 (2): 71-82, 2001.
- 96- Murray J.F., A century of tuberculosis. Am J Respir. Crit Care Med., 169(11): 1181-1186, 2004.
- 97- Çilli A., Antitüberküloz İlaçlar ve Etki Mekanizmaları. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun, 2003.
- 98- Kiraz N., Antitüberküloz İlaçlara Direnç Mekanizmaları ve Yeni İlaçlar. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun, 2003.

99- Musser J.M., Antimicrobial agent resistance in *Mycobacteria*. Molecular genetic insights. Clin Microbiol Rev.8:496-514,1995.

100- Giellespie SH. Evolution of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Clinical and Molecular Perspective. Antimicrob Agent Chemother 2002; 46:267-74

101- Peter D.O.Davies, Multi-Drug Resistant Tuberculosis. Director of the Tuberculosis Research Unit, Cardiothoracic Centre, Thomas Drive, Liverpool L14 3PE. Received March .1999.

102- Bastian I, Rigouts L., Van D. A.,Portaels F., Directly observed treatment, shortcourse strategy and multidrug-resistant tuberculosis: are any modifications required? Bull. World Health Organ, 78 (2): 238-251, 2000.

103- Anti-Tuberculosis Drug Resistance in The World Report No.3 WHO/HTM/TB/2004.343.

104- Özışık NÇ. Çok İlaça Dirençli Tüberküloz Hastalarında BACTEC ve Agar Proporsiyon Yöntemi İle Saptanan Etionamid Direncinin Klinik Önemi. Süreyyapaşa Göğüs ve Kalp Damar Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi. Uzmanlık Tezi. İstanbul. 2006

105- Durmaz R. *Mycobacterium tuberculosis*'de Direnç Sorunu. ANKEM Dergisi. 2005;19 (2): 107-110.

106- Fattorini L, Migliori BG, Cassone A. Extensively drug-resistant (XDR) tuberculosis: an old and new threat. Annali dell'Istituto Superiore di Sanita. 2007; 43(4): 317-319.

107- Öger O, Karagöz T. Tüberküloz Epidemiyolojisi ve Ülkemizdeki Durum, s: 67-80. 1992. Türkiye Ulusal Verem Savaş Dernekleri Federasyonu Başkanlığı Yayınları, Erol Ofset, İstanbul.

108- Biçmen C, Gündüz AT, Coşkun M, et al. Molecular identification and characterization of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by line probe assay: an approach for rapid diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis. Lett Appl Microbiol 2008; 47(3): 214-20.

109- Çalışır HC. Tüberkülozda direnç sorunu ve dirençli tüberküloz tedavisi. In: Uzun O, Ünal S; eds. Güncel Bilgiler Işığında İnfeksiyon Hastalıkları, Ankara: Bilimsel Tıp; 2002:887-901.

- 110- Otkun M. Tüberküloz tedavisinde temel ilkeler ve direnç sorunu. Klimik Derg. 2001; 14(2): 71-82.
- 111- Baykal ES. Van yöresinde izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının dört farklı yöntemle antimikobakteriyel ajanlara duyarlılık testleri, YYÜ, Uzmanlık Tezi, 2008, Van.
- 112- Anti-tuberculosis Drug Resistance in the World. Fourth Global Report [Internet]. Geneva: World Health Organization [erişim 20 Mayıs 2009]. www.who.int/tb/publications/2008/drsreport4_26feb08.pdf
- 113- Balcı İ, Bayram A, Filiz A. *Mycobacterium tuberculosis*'de birinci seçenek ilaçlara direnç. İnfeksiyon Derg 1999; 13: 521-5.
- 114- Sarıbaş S., Bağdatlı Y., Yıldız N., BACTEC MGIT 960 Sistemi ile Tüberküloz tanısı. İnfeksiyon dergisi. 18 (2): 149-153, 2004. Sayfa: 34-47.
- 115- Saitoh H., Yamane N., Comparative Evaluation of BACTEC MGIT 960 System With MB/Bact And Egg-Based Media For Recovery of Mycobacteria]. Rinsho Biseibutshu. Jinsoku. Shindan. Kenkyukai. Shi. 11 (1): 19-26, 2000.
- 116- Lee J.J., Suo J., Lin C.B., Wang J.D., Lin T.Y., Tsai Y.C., Comparative evaluation of the BACTEC MGIT 960 system with solid medium for isolation of mycobacteria. Int. J Tuberc. Lung Dis. 7 (6): 569-574, 2003.
- 117- Faruk Aydın, Neşe Kaklıkaya, Gülçin Bayramoğlu: ' Klinik örneklerden izole edilen *Mycobacterium Tuberculosis* Kompleks Suşlarının Primer Antitüberküloz İlaçlara Direnç Oranları' , Mikrobiyol.Bul. 2011, 45(1): 36-42.
- 118- Tamdır B, Arabacı Ç, Aksu B, ve ark. M.Ü. Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı Mikobakteriyoloji biriminin iki yıllık performansının değerlendirilmesi, 6. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu kitabı, Kızılcahamam, 2006, 247.
- 119- Aydın O, 'Zonguldak İlinden elde edilen *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının primer antitüberküloz ilaçlarına duyarlılığın BACTEC MGIT 960 sistemiyle belirlenmesi', Uzmanlık Tezi, 2006, Zonguldak .
- 120- Karadağ A., Tokaç M., Güvenli A., Sünbül M., Günaydın M., Saniç A. Klinik Örneklerden İzole Edilen Tüberküloz Basili Kompleksinin Major Antitüberküloz İlaçlara Direnç Oranları, ANKEM Derg 2004; 18(4): 189-192.

- 121- Ekşi F, Zer F, Karşılıgil T, Bayram A, Balcı İ, 'Çeşitli Klinik Örneklerden Elde Edilen *Mycobacterium Tuberculosis* Kompleksi Suşlarının Majör Antitüberküloz İlaçlara Direnç Oranları' Türk Mikrobiyol. Cem. Der. (2009 -939(3-4):89-93.
- 122- Abaslı HE, Kısa Ö, Senses Z, ve ark. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks izolatlarının antitüberküloz ilaçlara duyarlılık oranları, 6. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu kitabı, Kızılcasamam, 2006; 250.
- 123- Otkun M., Akata F., Karabay O. ve ark. Trakya Üniversitesi Hastanesine 1996 yılı içinde başvuran tüberkülozlu olgularda antitüberküloz ilaçlara direnç sorunu, İnfeksiyon Derg 1997; 11(3): 191-6.7.
- 124- Toman K: Tuberculosis case finding and chemotherapy questions and answers; Genava WHO, (1979) treatment of tuberculosis. Clin Pharmacokinet 1999; 37(2): 127-146.
- 125- Güler Yaylı, Hamdi Sözen; Canan Ağalar: 'Isparta Yöresinden İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* Suşlarının Antitüberküloz İlaçlara Duyarlılıkları' Türk Mikrobiyol. Cem. Der. (2003) 33:24-30.
- 126- Gönlügür U, Bakıcı MZ, Gönlügür Tanseli E, Hasbek M,' Sivas ilinde Antitüberküloz ilaçlara Direnç Oranları', Mikrobiyoloji Bülteni 2007, 41: 459 – 463.
- 127- Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2007. Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2007.376).
- 128- Devrim Dünder, Gülden Sönmez Tamer '*Mycobacterium Tuberculosis* Kompleksi Suşlarının Primer Antitüberküloz İlaçlara Direnç Oranları' XIV.Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi 25-29 Mart 2009 Kongresi, Antalya.
- 129- Yüce A, Yücesoy M, Ercan H, ve ark. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının antitüberküloz ilaçlara direnç paternleri ve izoniazid direnci ile katalaz aktivitesi arasındaki ilişki, Klimik Derg 1997; 10(1): 33-5.
- 130- Balcı, Bayram A, Filiz A. *Mycobacterium tuberculosis*'te birinci seçeneği ilaçlara direnç, İnfeksiyon Derg 1999; 13(4): 521-5.
- 131- Öztürkeri H, Emektaş G, Kocabay Ö, ve ark. İzoniazid, rifampin, streptomisin ve etambutolün tüberküloz basillerine in-vitro etkinlikleri. BACTEC test yöntemi ile alınan sonuçlar, Türk Mikrobiyol Cem Derg 1999; 29 (1-2): 58-60.

132- Saniç A, Günaydın M, Çoban AY, ve ark. A comparison of the E-test and proportion methods for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*, J Chemother 2000; 12(6): 491-4.

133- Sürücüoğlu S, Özkütük N, Kurutepe S, ve ark. Manisa bölgesinde izole edilen tüberküloz basillerinin primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılıklarının incelenmesi, 4. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu, Abant (2002).

134- Kısa Ö, Albay A, Baylan O, ve ark. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarında antitüberküloz ilaç direnç oranlarının BACTEC 460 TB kültür sistemi ile değerlendirilmesi, Flora 2002; 7(3): 171-6.

135- Gani O, Zer Y, Balcı İ, ve ark. Mikobakteriyoloji laboratuvarında incelenen örneklerin retrospektif olarak değerlendirilmesi, Türk Mikrobiyol Cem Derg 2002; 32 (34): 225-9.

136- Kocazeybek B. Tüberküloz tanısında BBL-“Mycobacteria-Growth Indicator Tube (MGIT)” Yönteminin “Löwenstein-Jensen” besiyeri ile karşılaştırılması ve izole edilen suşların dört majör ilaca karşı dirençlerinin değerlendirilmesi, Flora 2002; 7 (2): 112-9.

137- Tansel Ö, Yüksel P, Kuloğlu F, ve ark. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının antitüberküloz ilaçlara direnci: Trakya Üniversitesi Hastanesi'nin iki yıllık sonuçları, İnfeksiyon Derg 2003; 17 (1):236.

138- Yanık K, Cirit OS, Çoban AY, ve ark. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının majör ilaçlara duyarlılığının araştırılması, 6. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu kitabı, Kızılcahamam, 2006; 246.

139- Öksün E, Biçer AT, Kibar F, ve ark. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının antibiyotik direnç oranları, 6. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu kitabı, Kızılcahamam, 2006, 244 .

140- Arseven O, Eraksoy H, Uzun Y, Sepkin C, Kalaycıoğlu A, Özmenoğlu M, Bölükbaşı O: Doğu Karadeniz bölgesinde tüberküloz ilaçlarına direnç durumu, Klimik Dergisi 8(2) 63-67,1995.