

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİMDALI

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ TROPİKAL HASTALIKLAR
ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ VE BÖLGE
TÜBERKÜLOZ LABORATUVARINA GÖNDERİLEN BALGAM
ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN *MYCOBACTERIUM*
TUBERCULOSIS SUŞLARININ MAJOR VE MİNÖR
ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA DUYARLILIKLARININ
BELİRLENMESİ**

Sitti ÇALIK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fatih KÖKSAL**

ADANA 2012

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİMDALI

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ TROPİKAL HASTALIKLAR
ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ VE BÖLGE
TÜBERKÜLOZ LABORATUVARINA GÖNDERİLEN BALGAM
ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN *MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS* SUŞLARININ MAJOR VE MİNÖR
ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA DUYARLILIKLARININ
BELİRLENMESİ**

Sitti ÇALIK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fatih KÖKSAL**

**Bu çalışma TF2010YL9 nolu proje olarak Çukurova Üniversitesi Araştırma
Projeleri tarafından desteklenmiştir.**

ADANA 2012

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yaralandığım, tez çalışmamı yönlendiren, emeğini, bilgisini ve desteğini sonuna kadar benden esirgemeyen danışman hocam Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Fatih Köksal'a değerli hocalarım Prof. Dr. Fügen Yarkın, Prof. Dr. Akgün Yaman ve Prof. Dr. Macit İlkit'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim süresince her zaman yardımlarını gördüğüm bölüm sekreterimiz Suna Gökmen'e, tezimin her aşamasında bana destek olan Biyolog Ayşe Karacalı'ya ve değerli asistan, biyolog ve teknisyen arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Sitti ÇALIK

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vi
KISALTMA LİSTESİ	vii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tarihçe	4
2.2. Epidemiyoloji	8
2.2.1. Dünyada Tüberküloz	10
2.2.2. Türkiye’ de Tüberküloz	11
2.3. Mikobakterilerin Bakteriyolojik Özellikler	13
2.4. Mikobakterilerin Sınıflandırılması ve Evrimi	16
2.5. Tüberkülozda Bulaş	20
2.6. Laboratuvar Tanı	20
2.6.1. Aside dirençli boyama	20
2.6.2. Örnek alınması ve işlenmesi	21
2.6.3. Kültür	22
2.6.4. İdentifikasyon	26
2.6.4.1. Fenotipik Yöntemler	26
2.6.4.1.1. Nitrat Redüksiyon Testi	27
2.6.4.2. Genotipik Yöntemler	27
2.6.5. Antibiyotik Direnç Gelişimi ve Duyarlılık Testleri	29
2.6.5.1. Direncin Mekanizması	29
2.6.5.2. Duyarlılık Testleri	31
2.6.5.2.1. Fenotipik Yöntemler	33
2.6.5.2.1.1. Klasik Kültür Yöntemleri	33

2.6.5.2.1.1.1. Orantı (Proporsiyon) Yöntemi	33
2.6.5.2.1.1.2. Mutlak Konsantrasyon Yöntemi	34
2.6.5.2.1.1.3. Direnç Oranı Yöntemi	34
2.6.5.2.1.2. Hızlı Kültür Yöntemleri	35
2.6.5.2.1.2.1. Radyometrik Kültür Sistemi (BACTEC 460-Becton Dickinson)	35
2.6.5.2.1.2.2. Floresan Kültür Sistemi (BACTEC- MGIT 960–Becton Dickinson)	36
2.6.5.2.1.2.3. Kolorimetrik Kültür Sistemi	36
2.6.5.2.1.2.4. Karbondioksit Oluşumunu Tespit Eden Sistem: ESP Kültür Sistemi II	37
2.6.5.2.1.2.5. E-test	37
2.6.5.2.1.3. Bakteri Varlığına Dayanan Yöntemler	37
2.6.5.2.1.3.1. Lusiferaz Taşıyıcı Faj Yöntemi	37
2.6.5.2.1.3.2. Biyoluminesans Yöntemi	38
2.6.5.2.1.3.3. Flow Sitometri Yöntemi	38
2.6.5.2.2. Genotipik Yöntemler	39
2.7. Korunma ve Kontrol	39
2.7.1. Birincil Koruma	39
2.7.2. İkincil koruma	39
2.8. Tedavi	40
2.8.1. Dünyada İlaç Direnci	40
2.8.2. Türkiye’de İlaç Direnci	41
2.8.3. Tüberküloz Tedavisinde Kullanılan İlaçlar	43
2.8.3.1. Birinci seçenek ilaçlar	44
2.8.3.1.1. Rifampisin	44
2.8.3.1.2. Pirazinamid	45
2.8.3.1.3. İzoniazid	46
2.8.3.1.4. Etambutol	46
2.8.3.1.5. Streptomisin	47
2.8.3.2. İkinci seçenek ilaçlar	48
2.8.3.2.1. Para-aminosalisilik asit	48

2.8.3.2.2. Etionamid	48
2.8.3.2.3. Protionamid	48
2.8.3.2.4. Sikloserin	48
2.8.3.2.5. Tiasetazon	49
2.8.3.2.6. Kanamisin, amikasin, kapreomisin, viomisin	49
2.8.3.2.7. Florokinolonlar	50
3. GEREÇ ve YÖNTEM	51
3.1. Antibiyotik Stok Solüsyonunun Hazırlanması	51
3.1.1. Löwenstein-Jensen İlaçlı ve İlaçsız Besiyerinin Hazırlanması	52
3.1.2. Nitrat Redüktaz Testi Reagen Hazırlanması ve Ekim	53
3.1.3. MGIT Antibiyogram	53
3.2. Sonuçların Değerlendirilmesi	54
3.2.1. LJ'nin değerlendirilmesi	54
3.2.2. Nitrat redüktaz-LJ'nin Değerlendirilmesi	54
3.2.3. MGIT'in Değerlendirilmesi	55
3.3. Sonuçların Yorumlanması	55
4. BULGULAR	56
5. TARTIŞMA	60
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	65
KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ	71

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Türkiye de 1991-2007 yılları arasında tüberküloz insidansı	12
Şekil 2. Mikobakteri hücre duvarı yapısı	14
Şekil 3. Mikobakteri hücre duvarı porin kanal yapısı	15
Şekil 4. <i>M. tuberculosis</i> kompleks türleri arasındaki filogenetik ilişki	19

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Runyon Sınıflandırması	17
Tablo 2. Woods ve Washington sınıflandırması	18
Tablo 3. Mikobakterilerin genel üretim besiyerleri	22
Tablo 4. Mikobakterilerin seçici besiyerleri	23
Tablo 5. <i>M. tuberculosis</i> kompleksi türlerin koloni morfolojileri ve biyokimyasal özellikleri	27
Tablo 6. DSÖ verilerine göre Türkiye’de MDR-TB oranları	42
Tablo 7. VSD kayıtlarına göre Türkiye’de ilaç duyarlılık testi Sonuçlarında ilaç direnci dağılımları	42
Tablo 8. VSD kayıtlarına göre Türkiye’de her bir tüberküloz ilacı için toplam direnç sonuçları	43
Tablo 9. Minör ilaçlara karşı duyarlılık dağılımı	56
Tablo 10. En az bir yöntemle en az iki ilaca karşı direnç belirlenen Suşların dağılımı	57
Tablo 11. Çalışılan örneklerin antibiyotik duyarlılık sonuçları	58
Tablo 12. Türkiye’de MDR <i>M. tuberculosis</i> kökenleriyle yapılan çalışmalarda ikinci seçenek ilaçlarla direnç	63

KISALTMA LİSTESİ

AIDS	:Acquired Immune Deficiency Syndrome- :Kazanılmış Bağışıklık Yetmezlik Sendromu
AK	:Amikasin
ARB	:Aside Dirençli Bakteri
ATP	:Adenozin Trifosfat
BCG	:Bacillus Calmette-Guerin
bp	:Baz Çifti
C	:Katreomisin
CDC	:Centers for Diseases Control and Prevention
CIP	:Siprofloksasin
CLSI	:Clinical and Laboratory Standarts Institue
DR	:Direct Repeat
DSÖ	:Dünya Sağlık Örgütü
ERDR	:EMB-Resistance Determining Region
EMB	:Etambutol
EZN	:Ehrlich-Ziehl-Neelsen
FDA	:Floresein Diasetat
GI	:Üreme İndeksi
HCL	:Hidroklorik Asit
HIV	:Human Immunodeficiency Virus-İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
INH	:İzoniazid
IS	:Insertion Sequence
İDT	:İlaç Duyarlılık Testi
KA	:Kanamisin
MDR-TB	:Multi Drug-Resistant Tuberculosis-Çok İlaça Dirençli Tüberküloz
MGIT 960	:Mycobacterium Growth Indicator Tube
MIRU	:Mycobacterial İnterspersed Repetitive Units
MİK	:Minimal İnhibitör Konsantrasyon

MOTT	: <i>M. tuberculosis</i> Kompleks Dışı Mikobakteriler
MOX	:Moksifloksasin
MTK	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Kompleksi
NAD	:Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NALC	:N-asetil L-sistein
OADC	:Oleik Asit-Albumin Dekstroz Katalaz
OFX	:Ofloksasin
P	:Protionamid
PANTA	:Polimiksin B, Azlosilin, Nalidiksik Asit, Trimetoprim ve Amfoterisin B
PAS	:Para amino salisilik asit
PPD	:Saflaştırılmış Protein Türevi
PZA	:Pirazinamid
Pzaze	:Pirazinamidaz
RIF	:Rifampisin
RRDR	:Rifampin Resistance Determining Region
SNP	:Tek Nükleotid Polimorfizmi
STR	:Streptomisin
TB	:Tüberküloz
TCH	:Tiyofen-2-Karboksilik Asit Hidrazid
VSD	:Verem Savaş Dispanseri
XDR-TB	:Extensively Drug-Resistant Tuberculosis-Artmış İlaç Dirençli Tüberküloz

ÖZET

Çukurova Üniversitesi Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi ve Bölge Tüberküloz Laboratuvarına Gönderilen Balgam Örneklerinden İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* Suşlarının Major ve Minör Antitüberküloz İlaçlara Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Tüm dünyada ilaç dirençli tüberküloz olgularının sayısındaki artış, 20.yy ilk yarısına kadar başarı ile sürdürülen tüberküloz kontrol programlarının tartışılır hale getirilmiştir. Ayrıca bu durum dirençli suşların daha duyarlı epidemiyolojik yöntemlerle izlenerek yeni kontrol programlarının geliştirilmesine sebep olmuştur. Bu bağlamda çok ilaca dirençli ve artmış ilaç dirençli izolatlarının izlenmesi, tanımlanması ve minor ilaç duyarlılıklarının belirlenerek vakaların en kısa sürede uygun tedavi protokolleri kullanılarak tedavisi hayati önem taşımaktadır.

Bu çalışmada Bölge Tüberküloz Laboratuvarına 2 yıllık periyod içerisinde 20 merkezden gönderilen 27.457 akciğer tüberkülozlu hastaya ait balgam örneklerinden izole edilen 14'ü RIF+INH 19'u da RIF+INH dışı major ilaçlara karşı dirençli bulunan suşlardaki minor antibiyotik direnci belirlenmiştir. Bu amaçla kullanılan yöntem proporsiyon (PPD) duyarlılık yöntemi ve MGIT-960 duyarlılık testlerinin nitroredüktaz aktivitesinin ölçümü ve hızlı sonuç üreten nitroredüktaz proporsiyon (NRPPD) yöntemlerinin duyarlılıkları karşılaştırılmıştır.

Sonuç olarak; RIF+INH dirençli suşların 1(%7)'inin çalışılan tüm yöntemlerle minor antibiyotiklerin en az 3'üne karşı direnç geliştirdiği tespit edildi. Ayrıca çok ilaca dirençli tüberkülozun bölgemiz için ülke ortalamalarının üzerinde prevalans gösterdiği ve artan genişletilmiş ilaç dirençli tüberküloz olgularının arttığı bir duruma doğru ciddi tehdit yarattığı tartışılmıştır.

Anahtar kelimeler: INH, MGIT, *Mycobacterium tuberculosis*, RIF

ABSTRACT

**Determination of Sensitivity to Major and Minor Antituberculosis
Drugs of *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated From Sputum Samples
Which Sent to Çukurova University Tropical
Disease Research and Application Center**

Tuberculosis control programmes maintained successfully until the first half of 20. Century had become argumentative due to increase of cases of drug resistant tuberculosis throughout the world. Furthermore this situation inspired the development of new control programmes with more sensitive epidemiologic monitoring of strains. In this context, treatment of cases with suitable treatment protocols in addition to monitoring and identification of isolates with multi or increased drug resistant strains is of vital importance.

In this study, minor resistant of 14 RIF+INH and 19 non(RIF+INH) major drug resistant strains isolated from sputum samples of 24,457 patients sent to regional tuberculosis laboratory within 2 years has been determined. To this end, sensitivities of Proportional Sensitivity method (PPD), MGIT-960 sensitivity test, measurement of nitroreductase activity test and fast result producing nitroreductase proportion method (NRPPD) has been compared.

As a result, 1(7%) of RIF+INF resistant strains has found to develop resistant to at least 3 of minor antibiotics with all of methods studied. Furthermore, it is concluded that prevalence of multi-drug resistant tuberculosis in our region is above the average of country and it is threatening towards a situation of increasing extended drug resistant cases of tuberculosis.

Key words: INH, MGIT, *Mycobacterium tuberculosis*, RIF

1.GİRİŞ

Tüberküloz (TB), *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi (MTK) olarak tanımlanan bir grup mikroorganizma tarafından oluşturulan, tanı ve tedavi yöntemlerindeki ilerlemelere ve yaşam kalitesinin artmasına rağmen, dünyada ve ülkemizde insan sağlığını tehdit eden, insanlık tarihi kadar eski kronik bir hastalıktır¹.

Dünya nüfusunun üçte biri *M. tuberculosis* ile enfektedir. Her yıl, % 85'i gelişmekte olan 22 ülkeden olmak üzere, yaklaşık olarak 9 milyon yeni akciğer tüberkülozu vakası bildirilmekte ve yine çoğu bu ülkelere mensup, üretkenlik dönemindeki genç yetişkinler arasından olmak üzere yaklaşık olarak 2-3 milyon hasta bu global pandemide kaybedilmektedir. Tüberküloz HIV (Human Immunodeficiency Virus-İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü) /AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome-Kazanılmış Bağışık Yetmezlik Sendromu)'ten sonra erişkinlerde en çok ölüme neden olan enfeksiyon hastalığı olarak önemini korumaktadır. Dünyadaki HIV/AIDS salgını, kötü ekonomik şartlar, sınır ötesi göçler ve tüberküloz kontrol programlarının ihmal edilmesi, az gelişmiş ülkelerin yanında birçok gelişmiş ülkede de Tüberkülozun önemli bir sağlık problemi olarak varlığını sürdürmesine sebep olmuştur².

Tüberkülozun az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki yüksek insidansının yanı sıra rifampisin ve izoniazid gibi en az iki major ilaca dirençli (MDR-TB) ve bunların yanı sıra bir florokinolon ile en az 2 minor enjekte edilebilir ilaca dirençli (XDR-TB) suşların ortaya çıkışı ve bu suşlar ile oluşan enfeksiyonların klasik tüberküloza göre çok daha malign ve mortal seyretmesi, bu hastalığı "yeniden önem kazanan" global bir tehdit haline getirmiştir³. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) tüberküloz için önerdiği standart tedavi protokolü; rifampisin (RIF), izoniazid (INH), pirazinamid (PZA), streptomisin (STR) ya da etambutolden (EMB) oluşan ve 6 ay süren kombine ilaç kullanımını gerektirmektedir. Bu tedavi protokolleri MTK suşlarının sebep olduğu tüberküloz vakalarının tedavisi için yeterlidir. Ancak hastaların ilaç uyumsuzlukları, ilacın tedariki ile tanı ve tedavi merkezlerine ulaşımındaki güçlükler, yanlış reçeteleme, HIV'li hastalarda tüberküloz dışı immun yetmezlik sendromuna bağlı diğer sebeplerle hastanelere sık başvuru ve immun yetmezlik sebebi ile savunma mekanizmalarının kullanılan ilaçlara, bakteri eradikasyonunda yardımcı olmaması ve laboratuvar tanıdaki

gecikme ve hatalar MTK suşları arasında major ilaçlara karşı direnç gelişimine sebep olmuş ve klasik tedavi protokollerinin başarısını olumsuz yönde etkilemiştir. DSÖ bu gerekçeleri de dikkate alarak tüberküloz kontrol programlarının gözden geçirilmesi, DOTS uygulamaları ile doğru hastaya doğru ilaç uygulamasının ve hızlı tanı yöntemlerinin yaygınlaştırılarak her hastaya ve şüpheli temaslıya ulaşılması ve izole edilen suşlarda direnç tayininde yapılarak tedavi protokollerinin modifiye edilmesi şartı ile 2025 yılında tüm dünyada tüberkülozun kontrol altına alınabilmesini ön görmüştür⁴.

Bu bağlamda CDC (Centers for Diseases Control and Prevention), MDR-TB ve XDR-TB suşlarının yayılmasının önlenmesi için, dirençli suşlara karşı daha etkili yeni antitüberküloz ajanların geliştirilmesinin yanısıra yüksek insidansa sahip yoksul ülkelerde ucuz, hızlı ve yüksek duyarlılıkta yeni tanı yöntemlerinin geliştirilmesine ve minör veya ikinci seçenek ilaçların duyarlılık testleri yapılarak kullanılmasının önemine dikkat çekmiştir. CDC;

- Kültüründe MTK izole edilen hastaların tamamından,
- Üç aylık tedaviden sonra yayma ve kültür pozitifliği devam eden,
- Tedaviye klinik cevap vermeyen bütün hastalardan izole edilen suşlara duyarlılık testi yapılmasını önermektedir⁵.

Böylece duyarlılığın zamanında ve sistematik ortaya konması ile;

- İlaça dirençli suşların hızlı yakalanması,
- Hastaların etkin tedavisi ve
- MDR-TB yayılımının azaltılması, uygun halk sağlığı ölçülerini belirlemesi gerçekleştirilecektir.

Bu çalışmada; bölgemizdeki 7 ilde hizmet veren, 17 Verem Savaş Dispanseri (VSD) ile birisi Göğüs Hastalıkları Hastanesi, ikisi de Devlet Hastanesi olmak üzere 3 yataklı tedavi kurumunda 3 yıllık periyoda akciğer tüberkülozu ön tanılı veya şüpheli temas öyküsü olan kişilerden alınarak, *M. tuberculosis* tanısı ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi amacı ile laboratuvarımıza gönderilen kişilere ait balgam örneklerinden izole edilen ve RIF+INH direnci tespit edilen 33 *M. tuberculosis* izolatının minör antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılıkları; dirençli suşların tedavilerinde, klasik tedavi protokollerine eklenebilecek minor antitüberküloz ilaçlara karşı direncin bölge izolatları arasındaki insidansı ve dolayısı ile artmış ilaç dirençli suşlarının varlığı; proporsiyon

yöntemi, modifiye Nitrat Redüktaz Testi ve MGIT 960 (Mycobacterium Growth Indicator Tube) yöntemleriyle araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Tüberküloz (TB), insanlık tarihi kadar eski bir hastalıktır. Genom mutasyon analiz çalışmaları sonucu TB etkeni olan *M. tuberculosis*'in geçmişinin 150 milyon yıldan daha fazla olduğu ileri sürülmüştür. Bu çalışmalarda mikobakterilerin 35.000-15.000 yıl önce ortak bir atadan köken aldığı, atasal suşların 3 milyon yıl önce Doğu Afrika'da Afrika boynuzundan ilk insanla birlikte evrimleşerek çıktığı ve buradan tüm Dünya'ya yayıldığına inanılmaktadır¹. M.Ö 8000 yıllarına kadar uzanan insan iskelet kalıntılarında Pott's hastalığı izlerine rastlanması, tüberkülozun o yıllarda da epidemiler yaptığını düşündürmüştür. Nitekim M.Ö. 4000-2400'lü yıllarda eski Mısır'da Firavunlar döneminden kalma Thebus bölgesinde bulunan 85 mumyadan alınan organik materyallerde tüberküloz varlığı ARB, PCR ve IS6110- RFLP ile ispatlanmış, spoligotipleme ile de suş tayini yapılabilmıştır³. Yine bu döneme ait kemik kalıntılarında da Pott's hastalığına bağlı kemik lezyonlarının gösterilmesi, vazo ve testi gibi sanat eserleri üzerinde bulunan figürlerde bu hastalığa ait kemik lezyonlu hastaların resmedilmesi bu dönemde tüberkülozun ne kadar yaygın olduğu hakkında fikir vermektedir³. Mısır'da, M.Ö. 5000 yıllarına ait, Hindistan'da M.Ö. 3300 ve Çin'de M.Ö. 2300 yıllarına ait kaynaklarda tüberkülozu düşündüren ifadeler bulunmaktadır^{1,6,7}. M.Ö. 1500-500 ve M.Ö. 500-0 yıllarında Nil nehri vadisinde iki büyük tüberküloz epidemisi kaydedilmiştir. Bu salgınlardan sonra hastalığın görülme oranı ani olarak düşmüştür. M.S. 500-1500 yıllarında Kuzey Amerika'da ve son 1000 yılda Avrupa'da çeşitli epidemiler tanımlanmıştır. 17. ve 18. yüzyıllarda Avrupa nüfusunun % 70'i tüberküloza yakalanmış ve bunların yedide biri ölmüştür^{8,9,10}.

Dünyada verem epidemileri dalgalanmalar göstermiş olup M.Ö. 1500-750 yılları arasında Nil vadisinde, 1500-50 arasında Eski Yunan'da; 250-1500 süresinde Amerika'da, 1000-2000 arasında da Avrupa'da epidemiler yapmıştır⁹. 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. Roma'lı Celsus M.Ö. 30-50 yıllarında tüberkül tanımını literatüre geçirmiştir^{11,12}. M.S. II.yy'da F. Sylvius ise tüberkülozdan ölen hastaların akciğerlerinde tüberkül olarak adlandırdığı küçük sert nodüllerin bulunduğunu

göstermiştir¹². 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 kanıtlamıştır².

Yirminci yüzyılın başlarında hastalığın akciğerleri tutması ve hastaların oksijen açlığı çekmeleri dikkate alınarak, bol oksijenli alanlarda ilk sanatoryumlar açılmış ve tüberküloz tedavisinde farklı bir yaklaşım başlamıştır. Ancak TB basillerinin hücre duvarı yapılarında bol miktarda yer alan mero ve ketomikolik asitlerin varlığının anlaşılması ve bu sebep ile en az hasta kadar bol oksijenden faydalananı olması, sanatoryumların tedavide etkisiz hatta zararlı bile olabilecekleri gerçeğinin anlaşılmasına sebep olmuş ve bu uygulamalardan zaman içerisinde vazgeçilmiştir. TB hakkındaki bilgiler ilk anti-TB ajanların kullanıma girmesi ile dramatik olarak değişti ve sanatoryumlarda tedavi edilen bir hastalık iken kabul edilen ne kadar inanç varsa antibiyotiklerden sonra değişmeye başladı. STR 1940'larda ABD'de keşfi ile TB tarihinde yeni bir dönem, kemoterapi dönemi, başlamıştır. İlaçla tedavi konsepti, yanında direnç problemini de getirdi. STR tüberküloz tedavisinde kullanıma girdiği ilk yıllarda, Pyle, 1947'de, daha önce tekrarlayan akciğer TB sebebi ile STR tedavisi almış hastalar arasında daha önce hiç STR tedavisi almayan hastalar gibi ölümlerin görüldüğünün duyurarak, tüberkülozlu olgularda klinik direncinin gelişebildiğini ve ölümlere streptomisin direncinin yol açtığını ileri sürdü. *M. tuberculosis*'de direnç gelişiminin sistematik olarak izlenmesi gereken bir olgu olduğunu gösteren bu uyarı kombine ilaç tedavisinin başlamasına sebep oldu. Tedavi başarısızlığına karşı ilk olarak STR ile birlikte Lehman J (1949)'nin antitüberküloz özelliğini gösterdiği para amino salisilik asit (PAS), kullanıldı. Bu kombinasyon ile klinik olarak direnç görülen vakaların % 10'unda tedavi sağlanabildi. Ancak 1953 yılında kombinasyonun yetersizliği fark edildi. Yeni arayışlar mevcut ilaçların anti-TB özelliklerinin yeniden gözden geçirilmesine sebep oldu. Bu bağlamda, aslında 1912 yılında keşfedilen ancak antitüberküloz etkinliği bilinmeyen INH'in çoğalan dönemdeki TB basilleri için bakterisidal, dinlenme dönemindeki bakteriler içinde bakteriyostatik etkinliği fark edildi ve bu ilaç umut olarak kabul edilip TB tedavisine "monoterapi" ajanı olarak girdi.

Ancak aynı yıl boyalı balgam yayma preparasyonlar kullanılarak tedavi başlangıcını takip eden 4-6. haftalar içerisinde bu ilaca da direnç geliştiği gösterildi. Böylece INH ile monoterapide hayal oldu ve INH, zayıf tüberkülosidal etkinliğine karşılık yavaş üreyen TB basillerine karşı oldukça etkili olduğu yine 1952 yılında fark edilen ve bir nikotinamide analogu olan PZR ile kombine edilerek kullanılmaya başlandı. Oldukça başarılı olan bu kombinasyon tekrarları büyük ölçüde engelledi. Anti-TB ajanların bilinmediği yıllarda sanatoryumlarda bol oksijen ve immun sistemi güçlendirecek beslenme ve istirahat gibi palyatif yöntemlerle tedavi edilmeye çalışılan tüberküloz artık özgül ve özgül olmayan antibiyotiklerle tedavi edilebiliyordu. Bu endüstrileşmiş ülkelerde tüberküloz insidansında gerilemelere sebep olurken gelişmekte olan ülkelerde bile önemini kaybeden hastalıklar arasında görülmesine sebep oldu. TB'li hastaları mümkün olduğu kadar erken ve doğru tanıyıp erken tedaviye başlamayı hedef alan başarılı tüberküloz kontrol programları, endemik de olsa klinik başarısızlık görülen hastalarda sikloserin(1955), ethambutol(1962) ve rifampisin (1972) gibi ajanların, *M. tuberculosis* etkinliklerinin anlaşılacak anti-TB tedavisine eklenmeleri ile çözülmeye çalışıldı. Bakterisidal, sterilizan özelliğe sahip bu ajanların, özellikle RIF ve INH kombinasyonunun, hastalarda 18-19 ay süren daha sonra 9 aya kadar inen tedavi sürelerinin 6 aya kadar inmesine ve günümüzde kullanılan standart kısa süreli tedavi protokollerinin omurgasının oluşturulmasına sebep oldu. Gelişmiş ülkelerde duyarlı suşlar süratle azaldı, direnç gelişimi durdu ve bunlara bağlı olarak TB kontrol programlarında bir gevşeme oldu. TB kontrol programlarını iyi uygulayamayan ülkelerde TB insidansında önemli düşüşler kaydedilmedi. Bu ülkelerde ilaçların hatalı reçete edilmesi, kullanım sürelerinin iyi planlanamaması, hasta ilaç uyumsuzluğuna bağlı düşük doz ve sürede ilaç kullanımı, ilaca ve tanı merkezlerine ulaşmadaki zorluklar, direnç gelişimine sebep olan kromozomal mutasyonların ardışık olarak birikimine, *M. tuberculosis* basillerinde hücre duvarı permeabilitesinde azalmaya, eflük sisteminin daha etkin çalışmasına ve ilaç hedef bölgelerinin aşırı üretilmesine bağlı olarak çoklu ilaç direncinin ve çoklu ilaç dirençli *M. tuberculosis* suşlarının klonal yayılımına yol açtı. Kısacası 1990'lı yıllarda dünya insan eli ile yaratılmış, birinci seçenek ilaçlarla cevap vermeyen çoklu ilaç dirençli MDR-TB ile yeniden yüz yüze geldi. Aynı yıllarda, sekonder sebeplerle sık sık hastanelere başvurmak zorunda kalan, farklı enfeksiyonlar sebebi ile geniş spektrumlu antibiyotiklerin yoğun olarak

kullanıldığı, diğer mikroorganizmalar gibi *M. tuberculosis* basillerine karşıda bağışık sistemdeki yetmezlik sebebi ile korunamayan HIV pozitif hastaların Batı dünyasında sayısının hızla artışı ve yüksek insidansa sahip epidemik bölgelerden kontrolsüz insan göçü endüstrileşmiş dünyayıda yeniden önem kazanan MDR-TB ile karşılaştırdı. Tüm dünyada; akut olguların tedavisi, bulaşın ve tekrarların önlenmesi gibi kontrol programlarının hedefleri realize edilemez hale geldi. Nitekim problemin boyutlarını tespit için DSÖ ve IUATLD 1994 yılından başlayarak iki yıllık periyotta 35 farklı coğrafi bölgeden topladıkları örneklerle “global project on drug-resistance surveyansı projesi”nin ilkinin başlattılar. Proje sonuçları yeni tedaviye başlanan hasta örneklerinden izole edilen suşlar arasında % 1.4 (0-14) olan direnç oranının daha önce tedavi almış tekrarlayan olgu örneklerinden izole edilen suşlarda % 13 (0-54) olduğunu ve problemin global bir problem olduğunu gösterdiler. Bunu 1996-99 yıllarında daha geniş katılımı yapılan ikinci proje ve 1999-2002 yıllarındaki üçüncü proje, 2002-2006 ve 2006-2010 projeleri izledi. Bu projelerde ortak sonuç olarak yeni yayma pozitif vakalarda insidans artarken tekrarlayan tedavi alan vakalarda insidansın sabit kaldığı dikkat çekti, çünkü MDR-TB, sokak tipi *M. tuberculosis*'e göre daha kısa sürede ve daha yüksek oranda ölümcüldü. Kwazulu Natal'de 28 hastanede (2006) RIF+INH yanı sıra kinolon grubu antibiyotikler ve enjektele minor antibiyotiklere dirençli “geniş spektrumlu ilaçlara dirençli” (XDR-TB) yeni suşların tespit edilmesi ile tüberküloz tedavisinde yeni bir dönem başladı. Tüm dünyada izole edilen *M. tuberculosis* suşlarının yaklaşık olarak %0.5'inin oluşturan ki tahminen 27.000 olguda tespit edilen, bu suşların yüksek mortalite ile seyrettiği, tahminen 16.000 ölüm ve tüm dünyaya yayılma eğiliminde olduğu bildirildi⁴.

Diğer taraftan TB tanısı ve aşı çalışmalarında da gelişmeler sürdü. F. Seibert 1930'lu yılların sonunda “old tüberkülini saflaştırmıştır ve elde edilen saflaştırılmış protein türevi (PPD) aktif tüberküloz tanısında kullanılmaya başlanmıştır. Calmette ve Guerin isimli araştırmacıların 1921 yılında Fransa'da ilk tüberküloz aşısı Bacillus Calmette-Guerin (BCG)'i geliştirmişlerdir. Bu aşı II. Dünya Savaşı'ndan sonra tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır^{7,8,9,13}. Osmanlı İmparatorluğu'nda 19. yüzyılın sonlarına doğru büyük bir tüberküloz salgını görülmüştür. Balkan Savaşları ve 1. Dünya Savaşı'ndaki yoğun yoksulluk şartlarında Anadolu'ya hızla yayılmaya

başlayan hastalık, 1940'ların sonunda en yüksek düzeyine ulaşmış ve bu dönemde en sık görülen ölüm nedeni olmuştur^{8,9}.

STR'in 1940'larda ABD'de keşfi ile tüberküloz tarihinde yeni bir dönem, kemoterapi dönemi, başlamıştır. Aynı yıl İsveçli bilim adamı J. Lehman salisilik asidin para-amino tuzunu sentezleyerek PAS'in TB tedavisinde kullanımını sağlamış ve bu iki ilacın kullanıma girmesiyle TB tedavisinde iyi sonuçlar alınmaya başlanmıştır. Tek başına kullanılan bu ilaçlara kısa zaman içinde direnç gelişimi yeni ilaç bulma çabalarını da zorunlu kılmıştır. 1952 yılında Robizek ve Selikof tarafından INH'in bulunmasından sonra üç ilaçla 18-24 ay süren kombine tedavi uygulanması sonucu TB tedavi edilebilir bir hastalık haline gelmiştir. 1954 yılında PZA, 1962 yılında EMB ve 1966 yılında RIF bulunmuştur¹.

Yetmişli yıllarda batı ülkelerinde tüberküloz hastalığının kontrol altına alındığı düşünülmüş ancak HIV ile birlikte 1985 yılından itibaren TB insidansında yeniden artışlar kaydedilmeye başlanmıştır. Bu ülkelerde 1960'lardan sonra uygulanmaya başlayan DSÖ tarafından önerilen ve erken tanı, tedavi ve aşılamayı öneren TB kontrol programlarının, 1990'lı yıllarda yetersiz olduğu görülmüştür^{1,12}.

Ülkemizde TB ile etkin mücadele 1950'li yıllarda başlatılmıştır. Çıkarılan bir yasa ile 1960 yılında VSD'ler kurulmuştur¹⁰. TB günümüzde AIDS insidansının arttığı bölgelerde salgın yapma özelliğini devam ettirmektedir¹⁴.

2.2. Epidemiyoloji

Yirminci yüzyılın ilk yarısında kontrol altına alınmaya başlanan TB hastalığı, tedavi alanında sağlanan önemli başarılarla rağmen, son 10 yılda ölümün en önemli sebeplerinden birisi olarak tekrar ortaya çıkmıştır. DSÖ tahminlerine göre 8.8. milyon yıllık yeni TB vakası görülmekte, yani haftada 52.000, günde 7.000 den fazla her saat başı 1000 yeni vaka tüberkülozlu arasında katılmaktadır. Vakaların % 80'inden fazlasını 15-49 arasında, üretkenlik yaşındaki hastalar oluşturmaktadır. Küresel bir salgın olmasına rağmen, TB'den yoksul ülkeler daha fazla etkilenmektedir ve bu ülkelerde TB % 98 oranında ölümle sonuçlanmaktadır¹⁵. Dünya nüfusunun büyük çoğunluğunu (% 86) düşük ekonomi kaynaklı ülkeler oluşturmakta ve tüm tüberküloz olgularının % 95'ini oluşturmaktadır. TB dünyada özellikle Batı Afrika ülkelerinde

yaygın görülmektedir. Bu yüksek insidansın bölgede görülen HIV epidemisine bağlı olduğuna inanılmaktadır. Endüstrileşmiş ülkelerde de HIV'li genç yetişkinler problemin kaynağını oluşturmaktadır^{8,15}.

Diğer taraftan, hiç anti-TB ajanla karşılaşmamış sokak tipi bir basile göre bu ilaçlardan bir veya bir kaçına karşı standart ilaç konsantrasyonlarında nispi olarak duyarlılık kaybı gösteren dirençli suşların oransal artışı, morbiditenin yanı sıra mortalite yönünden de TB epidemisinin bir diğer ürkütücü yönüdür. MDR-TB de mortalite %50-80 e kadar çıkmaktadır⁴. Diğer taraftan bu tür suşların sebep olduğu enfeksiyonlarda ayrıca tanı ile ölüm arasındaki sürede kısalmış, 4 ila 16 hafta arasına kadar düşmüştür. Bu hızlı ölüm süreci tanı için ne kadar çabuk davranılması gerektiğini ortaya koymaktadır. Gecikmiş tanı ve tedavi, özellikle yatan hastalar arasında veya cezaevleri gibi kapalı toplumlarda MDR-TB insidansını ve TB'ye bağlı mortalite riskini artırıcı faktördür. Sonuç olarak MDR-TB suşlardaki oransal artış, özellikle gelişmekte olan ülkelerde genel olarak TB insidansını da artırmış ve kontrol programlarını zaafa uğratmıştır. Bu ülkelerde MDR-TB oranları % 48'lere kadar çıkmıştır^{4,16}.

TB'den korunma ve etkin kontrol tedbirlerinin geliştirilmesinde hastalar arasındaki yayılmanın derecesi, kaynağın ve bulaş yollarının bilinmesi çok önemlidir. Bunun için kökenler arasındaki benzerliğin araştırılması gereklidir. Mikobakterilerin biyokimyasal ve morfolojik özelliklerinden yararlanılarak cins ve tür düzeyinde tanımlamaları yapılabilmekte, tür düzeyinde tanımlamalar da TB'nin etiyolojisini aydınlatma bakımından yeterli olabilmektedir. Ancak, salgınlar esnasında izole edilen aynı tür içindeki birçok suşun birbiriyle klonal ilişkisini belirlemek için tür içinde farklılık gösterebilen varyantların belirlenmesinin yapılması gereklidir^{15,17,18}. TB'nin tekrar dünyanın gündemine girmesinde etkili olan en önemli faktör çoğul ilaca dirençli suşların oranındaki artıştır. Çin'in Beijing bölgesinden orjin aldığı ve daha sonra tüm dünyaya yayıldığı tahmin edilen W genotipinin çoklu ilaç direncine sahip olduğunun belirlenmesi epidemiyolojik çalışmaların bu yöne kaymasına neden olmuştur¹⁹.

HIV enfeksiyonu ABD gibi gelişmiş ülkelerde tüberkülozun daha genç hastalarda rastlanması, reaktivasyona göre primer tüberküloz olgularının artması ve çoklu ilaca dirençli tüberküloz sayısında artış gibi tüberküloz epidemiyolojisinde önemli değişimlere neden olmuştur. Amerika ve Afrika'dan sonra Güney Doğu Asya ve Eski Sovyetler Birliği ülkelerinde de bu iki hastalığın birlikteliği artış göstermiştir^{20,21,22}.

2.2.1. Dünyada Tüberküloz

Tüberkülin testi pozitifliği esas alınarak yapılan değerlendirmede dünya nüfusunun 1/3'ünü oluşturan yaklaşık 1.7 milyar kişinin tüberküloz basili ile enfekte olduğu ve bunların büyük çoğunluğunun gelişmekte olan ülkelerde bulunduğu tahmin edilmektedir. Günümüzde her yıl 10-12 milyon yeni tüberküloz vakası ortaya çıkmaktadır ve yaklaşık olarak 100.000'i çocuk olmak üzere toplam 2 milyon insan bu hastalıktan ölmektedir²³. 2015 yılına kadar hasta sayısının 50 milyona ulaşacağı, bunların üç milyonunun HIV enfeksiyonu ile birlikte olacağı ve 30 milyon insanın da bu nedenle ölmesi beklenmektedir²⁴.

Dünya nüfusunun % 25'inin yaşadığı gelişmiş ülkelerde (Avrupa, Kuzey Amerika, Japonya, Avustralya) yıllık TB riski % 0.1-% 0.01 düzeylerindedir ve bu oran her yıl % 10'dan fazla düşmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde ise yıllık TB riski % 0.5-2.5 arasında değişmekte ve enfeksiyonun hızı daha yavaş azalmaktadır. Tüm dünyada 16 milyondan fazla tüberkülozlu hasta bulunmaktadır ve bunların yaklaşık % 80'i 22 ülkede yaşamaktadır. Prevalansın 16,2 milyon/yıl olduğu TB' de, ölümcül vaka oranı % 23'tür ve bu oran HIV prevalansının yüksek olduğu bölgelerde % 50'ye ulaşabilmektedir. Günümüzde küresel tüberküloz sorunu büyük oranda, yetersiz kontrol programlarının uygulandığı Güneydoğu Asya, Sahra Altı Afrika ve Doğu Avrupa ülkeleri ile yüksek TB / HIV birlikteliğinin bulunduğu Afrika ülkelerinden kaynaklanmaktadır. 1980'den sonra giderek artan HIV enfeksiyonu insidansı bugün birçok ülkede TB'li hasta sayısının belirgin şekilde artışından sorumlu görünmektedir²³.

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^{13,24}.

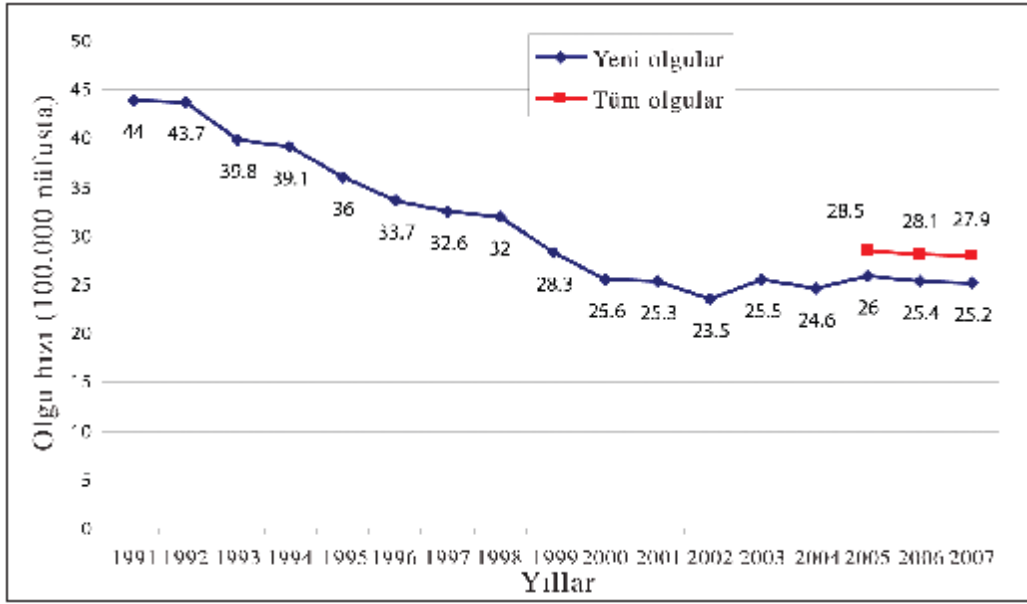
DSÖ 2008 Küresel Tüberküloz Raporu'na göre, 2006 yılı içinde bildirilen olgu oranı (prevalans) 5.392.826 (82/100.000), yeni yayma pozitif olgu oranı 2.531.975 (38/100.000) olarak verilmektedir. Olguların %46.9'u yayma pozitif olarak bildirilmektedir. 2003 yılı için insidans 8.8 milyon olarak bildirilirken, 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^{13,24}.

2.2.2. Türkiye’ de Tüberküloz

İlk Veremle Savaş Cemiyeti’nin 1918 yılında kurulduğu Türkiye’de, Cumhuriyet’ in ilk yıllarından beri tüberkülozla mücadele sürdürülmüştür. 1950’lerde % 0,25 olan hastalık prevalansı 1975’te % 0,1’e düşmüş, bu yıllar arasında yıllık enfeksiyon risk oranında % 10’luk azalma görülmüştür. 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 görülmüştür¹¹.

Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı’nca, Avrupa Tüberküloz Sürveyansı’nın veri standartları esas alınarak hazırlanan, Türkiye’de Verem Savaşı 2009 Raporu’na göre Kayıtlı tüberküloz hastalarının toplam sayısı 2006 yılında 20.526 iken 2007 yılında 19.694 olmuştur ve bir yılda % 4 düşüş görülmüştür. Kayıtlı 19.694 hastanın 17.781’i (% 90,3) yeni olgu, 1.913’ü (% 9,7) tedavi görmüş olgudur. Hastaların 12.381’i (% 62,9) erkek, 7.313’ü (% 27,1) kadın hastadır. Akciğer tüberkülozu olan 13.690 hastadan 12.219 (% 89,3)’üne mikroskopi yapılmış ve akciğer tüberkülozluların % 64,3’ünde (8.797) yayma pozitif bulunmuştur. Hem mikroskopi hem de kültür yapılma oranları ile pozitiflik oranlarında bu yıl geçen yıllardan daha başarılı sonuç alınmıştır. İlaç duyarlılık testi (İDT) yapılan 4.917 hastanın % 20,8’inde en az bir ilaç direnci tespit edilirken, 240 (% 4,9) çok ilaca dirençli tüberküloz hastası bulunmuştur²¹. Bu oranlar diğer ülkeler ile karşılaştırıldığında azımsanmayacak bir değerdir ancak ülkemizde hasta bildirimleri ve kayıtlama sistemlerinde önemli sorunlar olması nedeniyle gerçek tüberküloz görülme sıklığının daha fazla olması gerektiği de göz ardı edilmemelidir²³.



Şekil 1. Türkiye de 1991-2007 yılları arasında tüberküloz insidansı¹³

Ülkemizin tüberküloz insidansı açısından başarılı kontrol programı uygulamış ülkeler ile başarısız programlar uygulamış ülkeler arasında bir konumda olduğu görülmektedir²⁵. Bölgelere göre bakıldığında, olgu hızı 100.000/48.6 ile Marmara Bölgesi'nde en fazla görülmektedir. Bunu, Karadeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi izlemektedir. Bunun nedeni, Marmara Bölgesi'nin, düşük gelirli bölgelerden çok fazla göç alması ile açıklanmaktadır²¹.

Sağlık Bakanlığı'nın yayınlarına göre, 2007'de bölgelere göre insidans ise,(100.000);

- Karadeniz Bölgesinde 32
- Marmara Bölgesinde 44.8
- Ege Bölgesinde 23
- İç Anadolu Bölgesinde 15
- Doğu Anadolu Bölgesinde 19.4
- Güneydoğu Anadolu Bölgesinde 22,1
- Akdeniz Bölgesinde 17.8

Türkiye genelinde yüz binde 27.9 olarak hesaplanmıştır²⁵.

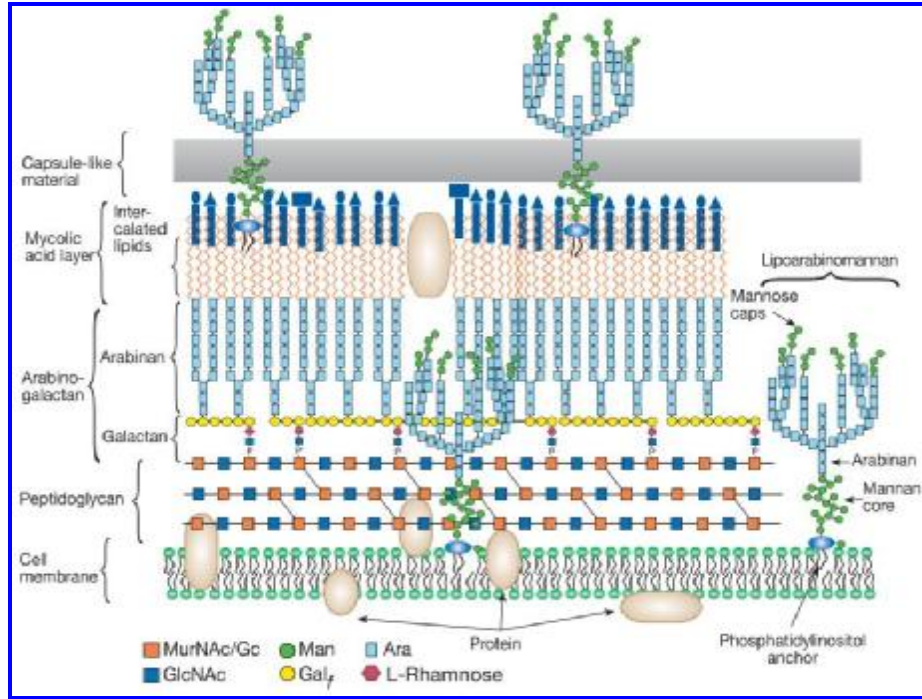
İllere göre bakıldığında, nüfusa göre tüberküloz olgu hızı sırasıyla en fazla 100.000/55.9 ile İstanbul'da, ardından 100.000/47.9 ile Edirne ve 100.000/51.2 ile

Bartın'da görülmektedir. İzmir'de ise bu oran 100.000/29 ile Türkiye ortalamasının üzerinde bulunmaktadır¹³.

2.3. Mikobakterilerin Bakteriyolojik Özellikleri

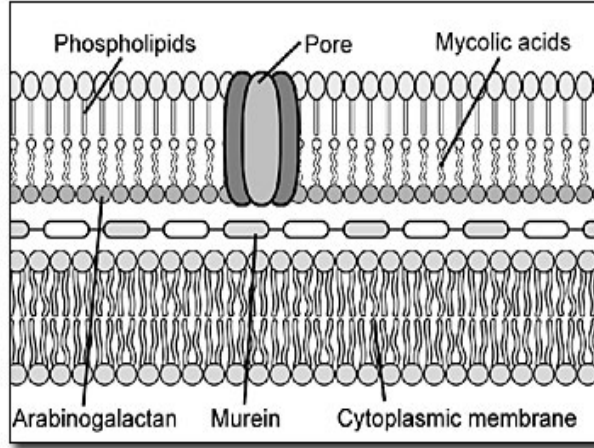
Mycobacteriaceae ailesinin tek cinsi olan mikobakteriler; aerop, sporsuz, katalaz üreten, hafif kıvrık veya düzgün çomak şeklinde, dallanabilen, 0.2- 0.6 µm eninde, 1.0- 10 µm boyunda mikroorganizmalardır. Yavaş üreme hızına sahip olan mikobakteriler 18-24 saatte ikiye bölünmektedir¹³. Katı besi yerinde kolonilerin gözle görülmesi, hızlı üreyenlerde 7 günden az, yavaş üreyenlerde 7 günden fazla sürmekte; klinik örneklerden primer kültürde üreme süresi 8 hafta kadar sürebilir. Optimum üremesi için gerekli ortam pH' sı 6.5- 6.8 ve CO₂ oranı % 5-10'dur. Üreme için uygun ısı ortalama 37 °C, türden türe 30°C-45°C arasında değişmektedir. Mikobakteriler canlılığını +4°C' de haftalarca, -70°C' de aylarca koruyabilir. Standart kültür ortamında ortalama 10-15 günde gözle görünür koloni oluşturmaktadırlar. Son zamanlarda otomatize sistemlerde (BACTEC TB 460, MGIT 960, MB/BacT Alert, Myco-ESPII ve MYCOLOR TK) katı-sıvı besi yerleri kullanılarak bu süre on güne kadar inmiştir²⁶. Koloni morfolojisi türler arasında değişmekle birlikte S (smooth) ya da R (rough) pigmentli veya pigmentsiz olabilir. Bazı türler pigment oluşturmak için ışığa gereksinim duyarken (fotokromojen) diğerleri ışıpta da karanlıkta da pigment oluşturabilir (skotokromojen)^{3,27}.

Hücre duvarları lipit içeriği bakımından zengindir. Bu nedenle alkol, asit, alkali ve kuru ortama karşı direnç gösterirler. Mikobakteriler fenol içinde çözündürülen bazik fuksinin yoğun eriyikleri ile [Kinyoun veya Ehrlich- Ziehl- Neelsen (EZN) yöntemleri ile] boyandıklarında aldıkları boyayı % 3'lük asit alkolle renksizleştirme işleminden sonra bırakmazlar. Bu özelliklerinden dolayı aside dirençli bakteriler (ARB) olarak da adlandırılırlar. Aside dirençlilik özellikleri laboratuvar tanısında kullanılan önemli bir kriterdir. Kinyoun veya EZN boyama yönteminde renk giderme işleminden sonra zeminin boyanabilmesi için zıt boya olarak metilen mavisi kullanılır ve mikroskopik incelemede tüberküloz basilleri mavi zeminde kırmızı çomakçıklar şeklinde görülürler²⁸. Tek tek küçük zincirler veya demetler halinde bulunabildiği gibi klinik örneklerde X, V, L harfleri oluşturacak biçimde de bulunurlar (% 62-70)²⁶.



Şekil 2. Mikobakteri hücre duvarı yapısı²⁹

Hücre duvar yapıları diğer bakterilerden farklı olup ana iskeletini peptidoglikan ve arabinogalakattan molekülleri oluşturur. Ayrıca arabinogalakattan ve glikolipidler arasında yer alan uzun zincirli doymuş yağ asitlerinden olan mikolik asit hücre duvarının önemli yapılarından¹⁷. Hücre duvarının bu kompleks yapısında en iç tabaka, diğer bakterilerde de görülen plazma membranıdır. Orta tabakası peptidoglikan, arabinogalakattan, mikolik asitler, açıl trehalozlar, oligosakkarid içeren lipidler ve fosfotidilinozitolün glikozil derivatlarından oluşmaktadır. Hücre duvarının en dışında bakteriye şeklini veren hücre duvarına bütünlük ve sertlik kazandıran peptidoglikan yapı bulunmaktadır. 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 asimetric dizilişleri hücre duvarına aşırı derecede hidrofobisite kazandırır. Bu yapılar içerisinde alfa-1,4 glukan, bir arabinomannan, lipomannan ve lipoarabinomannan gibi polisakkaritler, son derece önem arz eder. Mikobakterilerin hücre duvarında gram negatif bakterilerde görülen porin proteinleri de bulunur^{8,11,27}.



Şekil 3. Mikobakteri hücre duvarı porin kanal yapısı³⁰

Mikobakterilerde mikolik asitler tüm hücre duvarı kuru ağırlığının % 50'sini, hücre lipidlerinin % 60'ını oluştururlar. Mikolilarabinogalaktan peptidoglikan kompleksinde en fazla bulunan mikolik asit türü, oksitlenmiş grupları içermeyen 60 karbon büyüklüğündeki D-mikolik asitlerdir. Yapısında bir çift bağ veya siklopropan içerir. D-mikolik asitler *M. tuberculosis* de dahil olmak üzere bir çok mikobakteri türünde görülen major mikolik asitler olup tüm mikolik asitlerin % 25'den fazlasını oluştururlar. Mikobakterilerdeki peptidoglikan tabaka kor bölgesinin iskeletini oluşturmak üzere gram pozitif bakterilerdeki teikoik asitin bağlanmasına benzer bir disakkarit fosforil köprü ile bir heteropolisakkarit olan arabinogalaktanı kovalent olarak bağlar. Tetrapeptit yapıda yer alan diaminopimelik asitler ile lizozimlere karşı direnç kazanırlar²⁷.

2.4. Mikobakterilerin Sınıflandırılması ve Evrimi

Alem : Prokaryot

Bölüm : Firmicutes

Sınıf : Actinobacteria

Takım : Actinomycetales

Aile : Mycobacteriaceae

Cins : Mycobacterium

Tür : *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium cinsi Actinomycetales takımında sınıflandırılmış olup Mycobacteriaceae ailesinde yer alan tek cinstir^{26,31}. Doğada, toprakta, sularda ve çevrede yaygın olarak bulunan mikobakterilerin ilk insan topluluklarının sığırları evcilleştirmeye başlamasıyla insanlara bulaştığı düşünülmektedir¹⁰. Mikobakterilerin saprofit ve patojen olan 100'e yakın türü tanımlanmıştır. *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium ulcerans* ve *Mycobacterium bovis* BCG'nin bakteriyolojik özellikleri ve DNA benzerlikleri temel alınarak bu türler "*M. tuberculosis* complex" adı altında toplanmışlardır³².

Son yıllarda özellikle AIDS 'in ortaya çıkışıyla birlikte, diğer bazı mikobakteri türlerinin, *M. tuberculosis* kompleks dışı mikobakterilerin (MOTT) (*M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. smegmatis* ve *M. avium* complex) klinik öneminin anlaşılması, ilginin bu türler üzerinde yoğunlaşmasına neden olmuştur^{8,11}. *M. tuberculosis* kompleks dışı mikobakterilerin sınıflandırılması Runyon tarafından üreme hızı, koloni morfolojisi ve pigmentasyon esas alınarak dört grupta incelenmiştir³².

Tablo 1. Runyon Sınıflandırması³⁰

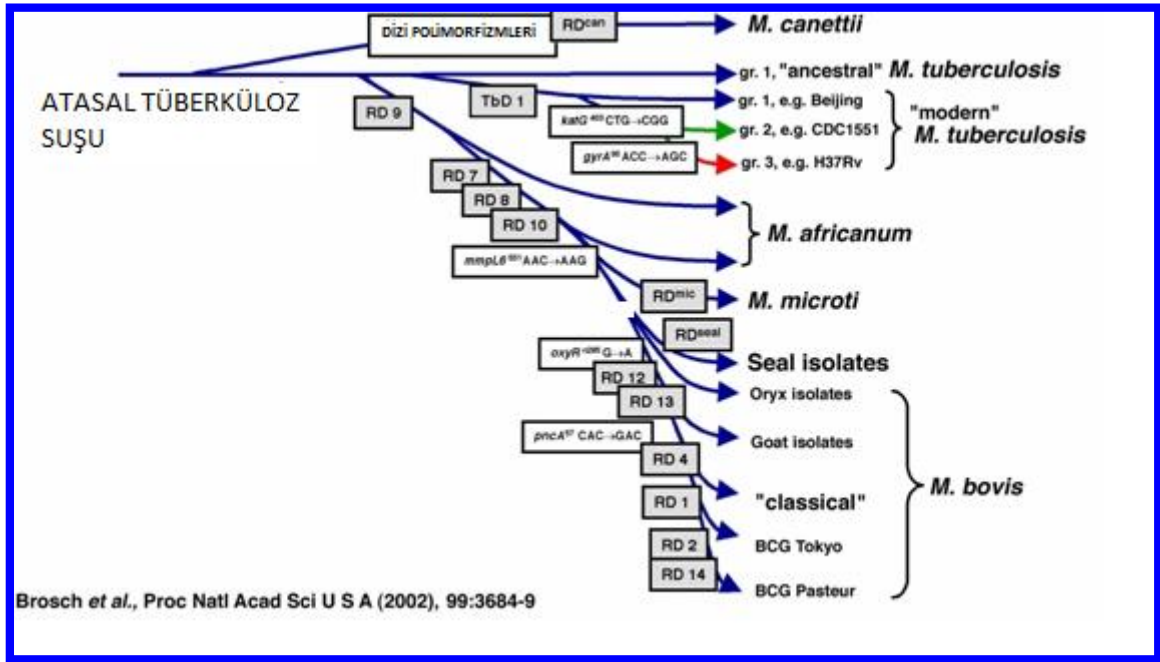
Mycobacterium	Klinik belirti	Pigmentasyon	Üreme
Sınıflandırılmayan			
<i>M. tuberculosis</i>			
<i>M. ulcerans</i>			
<i>M. bovis</i>			
<i>M. leprae</i>			
Runyon Grup 1			
<i>M. marinum</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. simiae</i>	Genelde patojen	Fotokromojen	Yavaş
Runyon Grup 2			
<i>M. scrofulaceum</i>	Nadir patojen	Skotokromojen	Yavaş
<i>M. gordonae</i> <i>M. xenopi</i>			
Runyon Grup 3			
<i>M. avium</i> <i>intracellulare</i>	Fırsatçı patojen	Nonkromojen	Yavaş
<i>M. avium</i> <i>M. haemophilum</i>			
Runyon Grup 4			
<i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. abscessus</i>	Nadir patojen	Nonkromojen	Hızlı

Runyon sınıflaması halen MOTT'ların ilk aşama identifikasyonunda kullanılsa da tüm mikobakterilerin gruplandırılmasında yetkili değildir. 1987'de Woods ve Washington 1979'da Wolinski'nin ilk bahsettiği klinikle uyumlu sınıflamayı önermişlerdir³³.

Tablo 2. Woods ve Washington sınıflandırması¹¹

Klinik önemi olan mikobakteriler	<i>M. tuberculosis</i> kompleks <i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i> (<i>M. bovis</i> BCG) <i>M. africanum</i> <i>M. microti</i> <i>M. canetti</i>		
İnsanda potansiyel patojen olan mikobakteriler	<i>M. avium-intracellulare</i> kompleks <i>M. kansasii</i> <i>M. fortuitum-chelonae</i> kompleks <i>M. scrofloceum</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. szulgari</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. simiae</i> <i>M. genavense</i> <i>M. marinum</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. celatum</i>		
İnsanda nadiren hastalık yapan saprofitik türler	Yavaş üreyenler <i>M. gordonae</i> <i>M. asiaticum</i> <i>M. terrae-triviale</i> komp. <i>M. shimoidei</i> <i>M. gastri</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. paratuberculosis</i>	Orta hızda Üreyenler <i>M. flavescens</i>	Hızlı üreyenler <i>M. thermoresistibile</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. vaccae</i> <i>M. phlei</i> <i>M. parafortuitum</i> kompleks

Mycobacteriaceae ailesinin tek cinsi olan *Mycobacterium*'lar yüksek G + C : (% 61-71 mol) içeren DNA'sından dolayı diğer mikolik asit içeren Tsukamurella, Gordonia, Nocardia, Rhodococcus ile birlikte Actinomycetales takımında sınıflandırılmıştır¹. Mikobakterilerin türler arasındaki dağılımları genomlarında yer alan 20 farklı değişken bölgedeki insersiyon ve delesyonlar ile oluşmaktadır. İnsersiyon ve delesyonları dikkate alarak yapılan çalışmalarda filogenetik ilişkileri belirlenen yaklaşık 100 farklı mikobakteri türü olduğu tespit edilmiştir. Genetik benzerlikleri temel alınarak bu türler kompleks başlığı altında toplanmaktadır^{1,7,8}.



Şekil 4. *M. tuberculosis* kompleks türleri arasındaki filogenetik ilişki³⁴

M. tuberculosis kompleks türleri arasında meydana gelen bazı değişken gen bölgelerindeki mutasyonlar, bu türleri birbirinden ayırmaktadır³. *M. tuberculosis* kompleksi içerisinde yer alan *M. canetti*, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti* ve *M. bovis* türlerine ait gen kırılmaları incelendiğinde; *M. tuberculosis* kompleksinde meydana gelen ilk ayrışmanın 26 farklı gen bölgesindeki delesyon nedeni ile *M. canettii*'de olduğu gözlenmiştir. *M. tuberculosis* RD gen bölgelerini ve RD9 bölgesini koruyarak *M. africanum*, *M. microti* ve *M. bovis* türlerinden; *M. africanum* RD9 bölgesini kaybederek *M. microti* ve *M. bovis* türlerinden; *M. microti* RD9, RD7, RD8 ve RD10 bölgelerini kaybedip, RD12, RD13, RD14, RD4, RD2 ve RD1 gen bölgelerini korumasıyla *M. bovis*'den ayrılmıştır. *M. bovis* RD12, RD13 ve RD4 bölgelerini kaybederek bazı türleri enfekte etme yeteneğini kaybetmiştir. *M. bovis*'in RD1, RD2 ve RD14 gen bölgelerini kaybetmesiyle atenué BCG suşları ortaya çıkmıştır^{3,35}. *M. tuberculosis*'in RvD1 bölgesinin kaybıyla H37Rv, TbD1'deki ve IS6110 gibi bazı polimorfik gen bölgelerinde meydana gelen nokta mutasyonları sonucunda "Beijing", "Haarlem", ve "African" diye adlandırılan modern *M. tuberculosis* kökenleri ortaya çıkmıştır^{1,3,8,9}.

2.5. Tüberkülozda Bulaş

Tüberküloz, nadiren deri yolu ile bulaşabilmesine rağmen, toplumda asıl bulaşma yolu inhalasyon yoludur. Hasta bireylerin öksürük, hapşırık gibi yollarla çıkardıkları akciğer sekresyonları damlacık şeklinde dışarı atılır. Hava yolu ile bulaşta, içinde az sayıda canlı basil içeren ve havada birkaç saat asılı kalabilen 1-5 µm büyüklüğündeki damlacık çekirdekleri önemli rol oynar. Bunlar, alveollere ulaşır ve enfeksiyon başlar. Tüberküloz basiline akciğerde enfeksiyon oluşturması basilin virülansına ve bakteriyi fagosite eden alveoler makrofajın mikrobisidal yeteneğine bağlıdır. Eğer basil bu ilk savunmaya karşı canlı kalmayı başarabilirse alveoler makrofajlar içinde çoğalmaya başlar. Tüberküloz basili yavaş çoğalan bir mikroorganizmadır. Alveoler makrofaj içinde ortalama 25-32 saatte bir bölünür. Bilinen bir endotoksini veya ekzotoksini bulunmamaktadır. Bu nedenle tüberküloz enfeksiyonuna karşı konak yanıtı hemen gelişmez. Basil, yeterli hücrel immünite gelişene kadar çoğalmaya devam eder^{36,37}.

Bunlar göz önüne alındığında, toplumu tüberkülozdan korumanın en etkili yolu tüberkülozlu hastaların tanısının mümkün olduğunca erken konulması ve hastalara etkili tedavinin uygulanmasıdır³⁶.

2.6. Laboratuvar Tanı

Aktif tüberküloz solunum yolu örneklerinde veya diğer vücut sıvılarında *M. tuberculosis* tespit edilerek tanı konur. Her ne kadar yeni moleküler tanı yöntemleri geliştirilmiş olsa da mycobacterium tanısında, mikroskopi (ARB) ve Löwenstein-Jensen (LJ) besiyerinde kültür "altın standart" olarak kullanılmaktadır. Ayrıca tedavinin etkinliğini izlemek ve aktif tüberkülozun çevreye bulaşını engellemek için kısa sürede sonuç veren yöntemlere ihtiyaç vardır^{1,38}.

2.6.1. Aside dirençli boyama

Tanıda öncelik laboratuara gelen klinik materyalin uygun şekil ve miktarda olmasıdır. Sonrasında aside dirençli boyama yöntemiyle preparat hazırlanıp incelenir. 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:

1. Karbolfuksin boyaları

a. Ehrlich Ziehl-Neelsen (sıcak boya)

b. Kinyoun (soğuk boya)

2. Florokrom boya: Auramin - rodaminle hazırlanır.

Karbolfuksin boyalarla boyandığında basiller ilk aldığı boyayı asit-alkol dekolorizasyonuna rağmen bırakmazlar. Zıt boya metilen mavisi ile boyanmayıp ışık mikroskobunda mavi zeminde pembe-kırmızı basiller şeklinde görünürler. Uygun şekilde hazırlanıp boyanmış bir preparatın en az 100-300 alan taranması gerekir³⁹. Florokrom boyamada da boyalı preparatlar floresan izotiyosiyanat filtreli mavi ışıktaki, koyu zemin üzerinde parlak sarı veya turuncu-kırmızı basiller şeklinde görülür. Karbolfuksinle boyanmış preparatlara göre daha hızlı tarama imkanı verir.

2.6.2. Örnek alınması ve işlenmesi

Akciğer tüberkülozunda inceleme için en uygun örnek balgamdır ve 3 gün arka arkaya alınan ekspektore balgam örneklerinde basil aranır. Hastanın balgam çıkaramadığı durumlarda endotrakeal aspirasyon, bronkoalveolar lavaj, özellikle çocuklarda gastrik aspirasyon sıvıları gibi örnekler de kullanılabilir. Böbrek tüberkülozunda sabah ilk idrarı olmak koşuluyla 3 gün arka arkaya alınan orta akım idrarları kullanılır. Bunların dışında infeksiyon odağına yönelik beyin omurilik sıvısı, periton, plevra, dışkı, eklem ve kemik iliği aspirasyonları ve kan gibi steril veya steril olmayan klinik örneklerle işlenmek için alınır. Normal vücut flora üyelerinin bulunabileceği klinik örneklerle, alınırken ve laboratuara taşınırken sterilizasyon kurallarına uyulmadığı düşünülen örneklerle, besiyerlerine kültür için ekilmeden önce organik kalıntıları sindirmek için homojenizasyon, kontaminasyona yol açan mikroorganizmaları ortadan kaldırmak için de dekontaminasyon işlemleri yapılır³⁸. Bu amaçla kullanılan yöntemler:

-N-asetil L-sistein (NALC) -NaOH yöntemi

-NaOH yöntemi

-Zefiran-trisodyum fosfat yöntemi

-Okzalik asit yöntemi

-Cetilpiridinyum klorid-sodyum klorid yöntemi

-Sülfirik asit yöntemidir.

Ancak bu işlemlerin mikobakterilere zarar vermemesi için bu süre 15 dakikayı geçmemelidir. Süre tamamlandığında fosfat tamponu (PH 6.8) ilave edilerek nötralizasyon sağlanır ve dekontaminasyon işlemi durdurulur. Kullanılan fosfat tamponunun sterilitésinin korunması önemlidir. Steril örneklerin dekontaminasyona ihtiyacı olmayabilir. Ayrıca mikobakterilerin üreme şansını artırmak için santrifüjle konsantre edilmesi de gerekir. En uygun santrifüj işlemi 3000 g'de 15 dk süreyle yapmaktır.

2.6.3. Kültür

Mikobakterilerin izole edilmeleri ve çeşitli özelliklerinin incelenmesi amacıyla kullanılan konvansiyonel besiyerleri katı ve sıvı olmak üzere iki tiptir. 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 LJ besiyeridir (Tablo 3). Ancak Petragnani ve American Trudeau Society Medium gibi besiyerleri de tercih edilmektedir. Tipik koloni morfolojisi oluşturmaları ve daha bol üremeleri nedeniyle özellikle primer izolasyonda LJ 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. Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11 en çok tercih edilen agar bazlı besiyerleridir³⁸.

Tablo 3. Mikobakterilerin genel üretim besiyerleri³³

Besiyeri	İçerik	İnhibitör ajan
Löwenstein jensen	Koagüle tam yumurta, bazı tuzlar, gliserol, patates unu	Malaşit yeşili, 0.025g/100ml
Petragnani	Koagüle tam yumurta, yumurta sarısı, süt, gliserol, patates, patates unu	Malasit yeşili, 0.052 g /100 ml
Middlebrook 7H10	Bazı tuzlar, vitaminler, kofaktörler, oleik asit, albümin, katalaz, gliserol, dextroz	Malaşit yeşili, 0.0025g/ 100ml
Middlebrook 7H11	Bazı tuzlar, vitaminler, kofaktörler, oleik asit, albümin, katalaz, gliserol, dextroz, %0.1 kazein hidrolizat	Malaşit yeşili, 0.0025g/100ml
American Thoracic Society Medium (ATSM)	Koagüle taze yumurta sarısı, gliserol, patates unu	Malasit yeşili, 0.02 g /100 ml

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 (Tablo 4).

Tablo 4. Mikobakterilerin seçici besiyerleri³³

Besiyeri	İçerik	İnhibitör ajan
Löwenstein Jensen (Gruft modifikasyonu)	Koagüle tam yumurta, bazı tuzlar, gliserol, patetes unu, RNA-5 mg / 100 ml	Malasit yesili, 0.025 g / 100 ml Penisilin, 50 U / ml Nalidiksik asit, 35 mg / ml
Löwenstein Jensen	Koagüle tam yumurta, bazı tuzlar, gliserol, patetes unu,	Malasit yesili, 0.025 g / 100 ml Sikloheksimid, 400 mg / ml Linkomisin, 2 mg / ml Nalidiksik asit, 35 mg / ml
Middlebrook 7H10	Bazı tuzlar, vitaminler, kofaktörler, oleik asit, albümin, katalaz, gliserol, glukoz	Malasit yesili, 0.0025 g / 100 ml Sikloheksimid 360 mg / ml Linkomisin, 2 mg / ml Nalidiksik asit 20 mg / ml
Middlebrook 7H11 (Mitchison besiyeri)	Bazı tuzlar, vitaminler, kofaktörler, oleik asit, albümin, katalaz, gliserol, dextroz, kazein hidrolizat	Karbenisilin 50 mg / ml Amfoterisin B 10 mg / ml Polimiksin B 200 / ml Trimetoprim laktat 20 mg / ml

Sıvı besiyerleri içinde yer alan Middlebrook 7H9 ve Dubos tween albumin, mikobakterilerin stok suşlarının subkültürlerinin yapılması, duyarlılık deneyleri ve diğer in vitro 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 kullanılmaktadır³³.

Günümüzde birçok laboratuarda, konvansiyonel besiyerlerinin yanı sıra 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 gaz basıncındaki değişiklikler, CO₂ oluşumu ve oksijen kullanımı florometrik veya kolorimetrik olarak ölçülür. Primer izolasyonda sıvı besiyerlerine ilave olarak bir de katı besiyeri kullanılması CDC tarafından önerilmiştir ve bu kombinasyonla mikobakterilerin izolasyon şansının arttığı bilinmektedir. Hızlı kültür sistemleri içinde yer alan yarı otomatize BACTEC 460 TB (Becton Dickinson

Diagnostic Instruments, Sparks, MD) sistemi, izolasyon, identifikasyon ve duyarlılık deneylerinin uygulandığı bir sistem olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır^{39,40,41}. Sistemde izolasyonun yanı sıra, *M. tuberculosis* kompleksi ile tüberküloz dışı mikobakterilerin ayrımı yapılabilmekte ve *M. tuberculosis* kompleksi suşlarının primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılığı çalışılmaktadır. BACTEC 12B (Middlebrook 7H12) ve BACTEC 13A (Middlebrook 7H13) olmak üzere iki tip besiyeri içeren bu sistem, besiyerlerinde bulunan 14C işaretli palmitik asitin kullanılması ve metabolizma sonucu oluşan $^{14}\text{CO}_2$ 'in 0-999 sayısal değerleri arasında üreme indeksi (GI) olarak ölçülmesi prensibi ile çalışmaktadır. Ekim işleminden önce besiyerlerine polimiksin B, azlosilin, nalidiksik asit, trimetoprim ve amfoterisin B (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. Tam otomatize sistemler:

- ESP II (Extra Sensing Power) (Trek Diagnostics, Inc. , Westlake, Ohio)
- MB/Bact T (Organon Teknika, Durham, NC)
- BACTEC 9000 MB (BD Biosciences, Sparks, MD)
- BACTEC MGIT 960 (Mycobacterium Growth Indicator Tube) (BD Biosciences, Sparks, MD)^{33,39,41}.

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^{38,41,42}. Mikobakterileri üretme süreleri açısından sistemler karşılaştırıldığında, BACTEC 460 TB sisteminin, ESP II ve MB/BacT sistemlerine oranla daha avantajlı olduğu belirlenmiştir. Birçok çalışmada tam otomatize sistemlerde üretme süresi ortalama ≤ 14 gün olarak saptanmış ve en yüksek izolasyon oranının BACTEC 460 TB ve katı besiyeri kombinasyonu ile sağlandığı bildirilmiştir. Kontaminasyon oranları açısından tam otomatize sistemler birbiri ile karşılaştırıldığında önemli bir fark bulunamamıştır ancak bu sistemlerde oran, BACTEC 460 TB ve katı besiyerlerine göre daha yüksektir^{33,41}.

ESP II, selüloz sünger ve Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içeren bir sistemdir. Sistemde mikroorganizmaların üremesi sonucu oluşan gaz basıncındaki değişiklikler ölçülerek değerlendirme yapılır. Bilgisayar destekli bir sistemdir ve besiyerinde oluşan

gaz basıncındaki değişiklik grafiksel olarak bilgisayarda görüntülenir. Besiyerlerine ekim yapılmadan önce, mikobakterilerin üremesini destekleyen oleik asit-albumin dekstrozu katalaz (OADC) ve kontaminasyonu engellemek amacıyla antibiyotik karışımı ilave edilir. Sistem tüm klinik örnekler için uygundur^{33,41}.

MB/Bac T, besiyerinin dip kısmında kolorimetrik bir sensör 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 uygundur⁴¹.

BACTEC 9000 MB, besiyerlerindeki oksijen kullanımının floresans ile belirlendiği bir sistemdir. Modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyerlerine ekimden önce PANTA ilave edilir. Sistemde balgam ve diğer solunum yolu örnekleri için “Myco/F sputa” , kan ve diğer steril vücut bölgelerinden alınan örnekler için “MycoF/lytic” besiyeri kullanılır⁴¹.

BACTEC MGIT 960 sisteminde kullanılan tüplerde, Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri ve dip kısımlarında oksijene duyarlı rutenyum metal kompleksi içeren silikon bulunur. Klinik örnekler ekilmeden önce besiyerlerine OADC ve PANTA ilave edilir. Kullanılan besiyerlerinde herhangi bir üreme olmadığında oksijen varlığına bağlı olarak silikon tabakaya gönderilen UV ışınına karşı 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 makroskopik olarak da değerlendirme yapılabildiğinden manuel olarak kullanılmaya da uygundur. Kan dışındaki diğer tüm klinik örnekler için kullanılabilir^{33,41}.

Fazla sayıda örneği aynı anda kontrol edebilen BACTEC MGIT 960 (960 örnek), BACTEC 9000 MB (240 örnek) , MB/BacT (240 örnek) ve ESP II (128/256/384 örnek inceleyen üç farklı cihaz) genellikle yüksek kapasite ile çalışan laboratuvarlarda tercih edilmekle birlikte; daha düşük kapasite ile çalışan laboratuvarlar için Septi-Check AFB (BD Biosciences, Sparks, MD), MGIT (BD Biosciences, Sparks, MD) ve MB Redox (Biotest Diagnostics Corp., Danville, NJ) gibi manuel sistemler önerilmektedir³³.

Septi-Check AFB, sıvı (Middlebrook 7H9) ve üç tip katı (LJ, Middlebrook 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. Cihaz gerektirmeyen MB Redox sisteminde 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 makroskopik olarak görülebilir⁴¹.

Drancourt ve arkadaşları⁴³ tarafından yapılan bir çalışmada, *M. tuberculosis*'in primer izolasyonunda % 5 koyun kanlı agarın kullanılabileceği de bildirilmiştir.

2.6.4. İdentifikasyon

2.6.4.1. Fenotipik Yöntemler

Mikobakterilerde türlerin fenotipik özelliklerinin belirlenmesinde biyokimyasal testler kullanılmaktadır. Üreme hızları, koloni morfolojileri ve biyokimyasal testlere bakıldığında *M. tuberculosis* türleri ayırt edilebilir. Ancak *M. tuberculosis* kompleksi içinde yer alan türleri ayırt etmek için yavaş üreyen ARB basilleri üzerinde koloni morfolojileri, oksijen kullanımı, niasin birikimi, nitrat redüktaz aktivitesi, katalaz aktivitesi, üreme hızı, tiyofen-2-karboksilik asit hidrazid (TCH) direnci ve pirazinamidaz üretimine bakılır¹. Her zaman her vakada kesin tür tanımlanması yapılamamaktadır. 1980'lerde hücre duvarındaki mikolik asitlerin incelenmesi prensibi ile çalışan yüksek performanslı likid kromatografi ile mikobakterilerin identifikasyon metodu kullanılmaya başlanmıştır^{8,15}.

Tablo 5. *M.tuberculosis* kompleksi türlerin koloni morfolojileri ve biyokimyasal özellikleri⁴⁴

Test	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. Bovis</i>	<i>M. bovis BCG</i>	<i>M. Africanum</i>	<i>M. microti</i>	<i>M. canettii</i>
Morfoloji	R	R	R	R	R	S
Pirazimidaz	+	-	-	+	+	+
Niasin	+	-	-	+/-	+	-
Nitrataz	+	-	-	+/-	-	+
Üreaz	+/-	-	+	+/-	+/-	+
TCH duyarlılığı	Dirençli	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Dirençli
Oksijen	Aerobik	Mikro aerofilik	Aerobik	Mikro Aerofilik	Mikro Aerofilik	Bilinmiyor
Piruvat kullanması	-	+	+	-	-	-

2.6.4.1.1. Nitrat Redüksiyon Testi

Mikobakteriler nitroredüktaz enzimi üreterek nitratları nitritlere indirgeyebilirler. Nitrat redüksiyon testi; koloni morfolojisi, üreme hızı ve pigment üretme özellikleri ile birbirlerine benzer olan mikobakterileri ayırt etmede değerlidir. *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. smegmatis* ve *M. fortuitum* grubu nitrat redüktaz pozitifdir. Test niasin kağıt strip yöntemi ile de kombine edilebilir.

Test için LJ veya diğer yumurtalı besiyerlerinde üremiş olan 3-4 haftalık koloniler kullanılmalıdır. 0,2 ml distile suya iki öze dolusu bakterinin ezilerek karıştırılması ile hazırlanan yoğun bakteri süspansiyonuna 2 ml NaNO₃ (sodyum nitrat) eklenerek çalkalanır. 37 °C lik su banyosunda dikey durumda 2 saat inkübe edilir. Tüp su banyosundan çıkarıldıktan sonra 1 damla reaktif 1 (50 ml su içinde 50 ml HCl karışımı), 2 damla reaktif 2 (100 ml suda eritilmiş 0,2 g sülfanilamid) ve 2 damla reaktif 3 (100 ml suda eritilmiş 0,1 g N-naphthyl ethylenediamine dihidrochloride) standart kültür süspansiyonuna eklenir. Pembe rengin oluşumu pozitifliği gösterir. Pozitif kontrol olarak *M. tuberculosis* H37Ra ve negatif kontrol olarak *M. avium* kullanılabilir. Reaktif çözeltileri buzdolabında koyu renkli şişede 1 ay saklanabilir.

2.6.4.2. Genotipik Yöntemler

M. tuberculosis suşlarının birbirinden ayırt edilmesinde moleküler tiplendirme yöntemleri epidemiyolojik yönden son derece değerli bilgilere ulaşılmasını mümkün hale getirmiştir. Bilinen mikobakteri türü sayısı 1983 yılına kadar 53 iken bugün bu

yöntemler sayesinde sayı 150'nin üzerine çıkmıştır. Mikobakterilerin doğru şekilde tiplendirilmeleri için kullanılacak en ideal yöntem tüm genomun dizi analizini yapmaktır. Moleküler yöntemler parmak izi "fingerprint" olarak adlandırılan spesifik genetik profilleri ortaya koyabilmelidir. İki veya daha fazla suş aynı parmak izine yani aynı genetik profile sahipse izolatların epidemiyolojik olarak ilişkili oldukları görülmektedir. Moleküler epidemiyolojik tiplendirme metodları salgın tespitinde kullanılan güçlü araçlardır^{8,15}.

Mycobacterium tuberculosis genomunun bütün baz dizilimi çıkarılmış olup homojen ve stabil yapıdadır. Genom yaklaşık 4.4 mega baz çiftinden oluşmaktadır ve oldukça yüksek oranda guanin-sitozin (% 62-70) içermektedir³. Genomda çok az sayıda sessiz mutasyon meydana gelmekte, genetik rekombinasyonlar, genellikle transpozonlar yoluyla veya tekrarlayan dizilerin polimorfizmi ile gerçekleşmektedir⁸. En basit transpozon 'Insertion sequence'dir (IS). Genom üzerinde 14'den fazla farklı IS elementi belirlenmiştir. IS ve tekrarlayan diziler farklı tür, dal ve alt dallarda farklı sayıda ve genomun farklı yerlerinde yerleşirler, genetik polimorfizmin oluşumunu sağladıkları kabul edilmektedir. Bu nedenle farklı suşlar arasındaki ayırmada sıklıkla kullanılmaktadırlar Bugüne kadar çok sayıda tekrarlayan dizi ve mobil element tespit edilmiş olmasına rağmen, bugün için en çok kabul gören ve en sık kullanılan tekrarlayıcı elemanlar IS6110, DR (Direct repeat) ve MIRU'dur (Mycobacterial interspersed repetitive units)⁴⁴.

Mikobakterilerin tanımlanmasında 16S rRNA gen bölgesi diziliminin belirlenmesi gibi çeşitli moleküler biyolojik yöntemlerin geliştirilmesi ile konvansiyonel biyokimyasal testlerin yerini moleküler metodlar almıştır. *M. tuberculosis* kompleksinin tanımlanması 16S rRNA bölgesini hedef alan gen problemleri kullanılarak mümkün olmaktadır. Fakat bu problemler tür düzeyinde tanımlama yapamıyordu. *Mycobacterium* türlerini ve *M. tuberculosis* kompleksi tanımlayan 16S-23S rRNA bölge amplifikasyonu ve reverse hibridizasyon metodu INNO-Lipa kullanılmıştır. 23S rRNA gen bölgesini hedef alan DNA strip test Geno Type MTBC de *M. tuberculosis* kompleks üyelerinin ayırımında kullanılmıştır. Bu test gyrB DNA dizi polimorfizmleri ve bovis BCG RD1 delesyonuna dayanmaktaydı. Exact Tandem Repeat D (ETR-D; Mikobakteriyel Serpiştirilmiş Tekrarlayan Ünite 4) dizilimi gösterilmiş ve bu gen bölgesinin *M. tuberculosis* kompleksinin tür düzeyinde belirlenmesini hızlı,

doğru, tek adımda sağladığı görülmüştür. Behr ve arkadaşları *M. tuberculosis* H37Rv suşları ile genomik karşılaştırılma sonucu *M. bovis* BCG de bazı farklılık bölgesinin (RD1-16) olmadığını belirlemişlerdir. Huard ve arkadaşları *M. tuberculosis* kompleks içindeki türleri ayırt etmek için RD delesyon bölgesini hedef alan yedi primer çiftini ayrı, ancak eş zamanlı reaksiyonlarda kullanarak PCR bazlı tiplendirme metodu geliştirmiştir. *M. caprae* ve *M. pinnipedii* geliştirilen LSP ve tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) teknikleri sonucu *M. tuberculosis* kompleks üyesi olarak kabul edilmiştir¹⁵.

M. tuberculosis kompleks içerisindeki DNA polimorfizmlerini tanımlamada IS6110-PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism), Spoligotyping, Variable Number of Tandem Repeat (VNTR), Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) yöntemleri ve kombinasyonları kullanılmaktadır¹⁷.

2.6.5. Antibiyotik Direnç Gelişimi ve Duyarlılık Testleri

Tüberküloz kontrol programlarının başarısı önündeki en önemli engel klinik izolatlarda dirençli suşların artışıdır. Antitüberküloz ajanlar ve non-spesifik *M. tuberculosis* etkili antibiyotiklerin tedavi protokollerinde yer alması ile hastalığın tedavisi, bulaşın kontrolü daha kolay ve ümit verici olmuştur. Ancak önce monoterapide kullanılan ajanlara karşı görülen duyarlılık kaybının zaman içerisinde kombine tedavilerin iskeletini oluşturan RIF ve IZN'e karşıda bildirilmesi (1996), daha sonra bu iki ajanla birlikte minör veya ikinci seçenek ajanlardan her hangi bir florokinolon ve kanamisin ve kapreomisin gibi en az 2 enjekte edilebilir antibiyotiğe karşıda duyarlılık kaybı gösteren genişletilmiş spektrumlu suşların rapor hastalığın kontrolünü neredeyse imkansız hale geldi. Moleküler biyolojik yöntemlerin kullanılması ve *M. tuberculosis* tam genom dizisi analizi sonucu elde edilen bilgiler tüberküloz tedavisinde kullanılan ajanlara karşı direncin mekanizması hakkındaki bilgilerimizin yenilenmesine önemli katkılar sağlamıştır⁴.

2.6.5.1. Direncin Mekanizması

İlaç direncinin genellikle plazmidler, transpozonlar veya integronlar gibi mobil genetik elementlerle horizontal gen aktarımı yolu ile kazanıldığı diğer bakterilerden farklı olarak mikobakterilerde direnç kazanımı sıklıkla kromozomal genlerdeki spontan

mutasyon veya mutasyonların sonucu, sub-optimal tedavi sürecinde dirençli suşların seleksiyonu ile gelişir. Her ne kadar *M. tuberculosis*'in MDR fenotiplerin de sadece tek bir gen mutasyonu dirence sebep olarak gösterilemese de, diğer ilaçlara karşı direnç gelişiminin başlangıcında bir ilaca karşı direnci sağlayan klasik mutasyonlar ve takip eden diğer mutasyonel değişimlerin birikimi arasındaki kompleks ilişki MDR fenotiplerine sebep olur. Prokaryotlarda spontan mutasyonlar düşük oranlarda görülüp yaklaşık olarak her replikasyon için ihtimal 0.0033'dır. Mutasyon oranı genom büyüklüğü ile baz çifti bağlamında ters orantılıdır. İlk çalışmalarda mutasyon oranının seçilen ilaca bağlı olduğu iddia edilmişti, ancak ilk seçenek antitüberküloz ilaçların çoğu için, dirence sebep olan bilinen mutasyonları da karşılayacak şekilde, bir basilde spontan mutasyon görülme ihtimalleri hesaplandığında, her hücre bölünmesinde mutasyon görülme ihtimalinin 10 olduğu gösterilmiştir. Bu hesaplama ile yani dirence sebep olan ve bilinen gen/genlerdeki beklenen mutasyon ile genom büyüklüğü dikkate alındığında, RIF için mutasyon riski 3.32×10^{-9} , INH için 2.56×10^{-8} , STR için 2.29×10^{-8} ve EMB için 1.00×10^{-7} 'dir. Eş zamanlı olarak RIF + INH' da dirence sebep olabilecek mutasyonların bir basilde görülme ihtimali ise 1.00×10^{-14} , INH+RIF+EMB için; 1.00×10^{-20} ve nihayet RIF+INH+STR için; 1.00×10^{-25} 'dir. Diğer taraftan aktif bir kavern de en çok görülebilecek bakteri sayısı 10^8 basildir. Kısacası tedavi esnasında aktif bir kavernde RIF dirençli basil gelişme ihtimali en fazla 0-1 arasında iken bu oran 100 resistant INH, STR ve EMB direnci için 100 basildir. Yani en uzak ihtimal RIF direncidir ve muhtemelen diğer ilaçlara karşı direnç gelişiminden çok sonra seleksiyona uğramış, direnç mutasyonları birikimine sahip suşlar arasından seçilecek çoğalacak, duyarlı suşların tedavi ile eliminasyonu sonrası ayakta kalıp, çoğalarak yayılacaktır. *M. tuberculosis* suşları arasında kromozomal mutasyonlarla kazanılmış direncin yanı sıra intrinsik dirençde görülür. Mesela *M. tuberculosis*'de hücre duvarında yer alan mikolik asitlerin alışılmışın dışındaki yapısal özellikleri, duvar permeabilitesini düşürerek bazı antibiyotiklerin hücre içerisine girişini engeller. Diğer taraftan aktif eflüks pompası sayesinde basilin tetrasiklinler, aminoglikozitler ve florokinolonlara karşı doğal direnci sağladığı gösterilmiştir. β -laktam antibiyotikler PBP'lere bağlanarak hücre duvarı sentezini baskırlar. Ancak mikobakteriler de bu ilaçları degrade eden β -laktamazlara sahiptir. *M. tuberculosis* de β -laktamazlar *blaC* ve *blaS* genlerinde kodlanır. β -laktamazlara dirençli β -laktam antibiyotiklerin veya β -laktamaz inhibitörleri ile

kombine β -laktam antibiyotiklerin kullanılması *M. tuberculosis*'i öldürmede etkilidir. Yeni çalışmalardan birisinde MtbRv1698 de hidrofilik bileşenlere karşı doğal direnç için MspA benzeri fonksiyon olduğu gösterildi. Daha ötesi biyoinformatik analizler hem Rv1698 hemde Rv1973 suşlarında mikobakteriyel dış membran proteinlerinin bazı antibiyotiklere karşı intrinsik dirençte muhtemelen rol oynadıklarını gösterdi. Fakat sadece permeabilite bariyeri veya B-laktamazlar değil mikobakterilerde antibiyotiklere intrinsik dirençte bunların dışında da mekanizmalar varlığı gösterildi. Mesela konak içerisinde gösterilen fizyolojik uyum, antibiyotik toleransı için sebep olabilir. Sonuç olarak *M. tuberculosis* whiB7 geni bir MDR determinantıdır bunun delesyonu bakteriyi tüm ilaçlara duyarlı hale getirir, böylece bunun atasal MDR determinantı olduğu söylenebilir. *M. tuberculosis* tedavisinde sınırlı sayıda ilacın kullanılabildiği düşünülürse Intrinsik direnç tedavi başarısı için önemlidir, kaldı ki suşlar arasında kullanılabilir ilaçlara karşı direnç artmaktadır. Bu da intrinsik direnci daha anlamlı hale getirmektedir. Bu mekanizmaları inhibe edecek yeni ilaçların keşfi halinde *M. tuberculosis*'e etkili olma potansiyeline sahip ancak hali hazırda kullanılamayan birçok yeni antibiyotik antitüberküloz ajan olarak kullanılabilecek⁴.

2.6.5.2. Duyarlılık testleri

Duyarlılık sonuçları olmaksızın yapılan tüberküloz tedavileri, tedavi başarısızlığı riskini ve antitüberküloz ilaçlarına karşı direnç gelişimini arttırmaktadır. CDC kültüründe *M. tuberculosis* izole edilen her hastaya, üç aylık bir tedaviden sonra yayma ve kültür pozitifliği devam eden veya tedaviye klinik yanıtızsızlık olan bütün hastalara direnç testi yapılmasını önermektedir. Ayrıca dirençli tüberküloza sahip bir hasta ile temas öyküsü bulunanlar, HIV ile infekte olup kaviter lezyonları olanlar, düşük sosyoekonomik şartlarda yaşayanlar, yüksek ilaç direnci bulunan (primer izoniazid direnci % 4'den fazla) bölgelerde olanlar tedaviye başlamadan önce mutlaka direnç varlığı yönünden incelenmelidir⁴⁵.

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

1) İlaç içeren ve içermeyen kültür ortamında üremenin makroskopik olarak izlenmesi

- 2) Metabolik aktivitenin ya da ürünlerinin ölçümü ya da ürünlerinin tespiti
- 3) Mikobakterifaj ile lizis
- 4) Moleküler tekniklerle genetik mutasyonların tespiti esaslarına dayanır.

Mikobakterilerin antitüberküloz ilaçlara duyarlılığını belirlemek amacıyla uygulanan deneylerde, direkt ve indirekt olmak üzere 2 yöntem kullanılmaktadır.

Direkt yöntemde; preparatında aside dirençli bakteri görülen klinik örneklerin, mililitresindeki ortalama bakteri sayısı hesaplanarak, homojenizasyon-dekontaminasyon işlemleri sonrasında ilaçlı ve ilaçsız besiyerlerine ekimi yapılır.

İndirekt yöntemde ise, klinik örneklerden saf kültür halinde aside dirençli bakteri izole edilir, uygun inokulum hazırlanarak ilaçlı ve ilaçsız besiyerlerine ekim yapılır.

Fenotipik Yöntemler

Klasik Kültür Yöntemleri

- Orantı (proporsiyon) Yöntemi
- Mutlak Konsantrasyon Yöntemi
- Direnç Oranı Yöntemi

Hızlı Kültür Yöntemleri

- Radyometrik Kültür Sistemi
- Floresan Kültür Sistemi
- Kolorimetrik Kültür Sistemi
- Karbondioksit Oluşumunu Saptayan Sistem
- E-test

Bakteri Varlığına Dayanan Yöntemler

- Lusiferaz Taşıyıcı Faj Yöntemi (LRP)
- Biyoluminesans Yöntemi
- Flow Sitometri Yöntemi

Genotipik Yöntemler

- DNA Dizi Analizi
- Ters Hibridizasyon

- RNA/RNA Mismatch Analizi
- PCR-SSCP (Single-Strand Conformational Polymorphism)
- Heterodubleks Analiz
- Real Time-PCR
- DNA Microarray

2.6.5.2.1. Fenotipik Yöntemler

Fenotipik testlerin değerlendirilmesinde iki kavram önem taşımaktadır. Bunlardan birisi olan kritik konsantrasyon; ilaçlı besiyerinde, belli bir oranda veya miktarda bakteri üremesine izin veren antibiyotik konsantrasyonunu ifade etmektedir. Diğer kavram olan kritik proporsiyon ise, kritik konsantrasyonun üremesine izin verildiği dirençli basil topluluğunun oranıdır. Yapılan klinik ve bakteriyolojik çalışmalar sonucunda anti-tüberküloz ilaçlara dirençli basil oranı, genel olarak % 1 düzeyi kriter alınarak ayarlanır. İlaçlı besiyerinde üreyen bakteri sayısı % 1'in altında ise bakteri o ilaca duyarlı, % 1'in üzerinde ise dirençli olarak kabul edilmektedir⁴⁶.

2.6.5.2.1.1. Klasik Kültür Yöntemleri

2.6.5.2.1.1.1. Orantı (Proporsiyon) Yöntemi

Antitüberküloz ilaçlara dirençli basil oranı, yapılan çalışmalar sonucunda genel olarak %1 düzeyi kriter alınarak ayarlanır. Direncin %1 oranını tayin etmek için kontrol besiyerinde kullanılan bakteri miktarı ilaçlı besiyerindekinden 100 defa daha azdır. İlaçlı besiyerinde üreyen kolonilerin sayısı, kontrol besiyerindeki kolonilerin sayısı ile karşılaştırılır. Belli bir ilaca dirençli basillerin oranı hesaplanıp, test edilen popülasyona yüzdesi olarak belirtilir. Bu test için koagulasyondan önce ilaç eklenmiş LJ besiyeri, Middlebrook 7H10 kullanılabilir. İlaçsız kontrol besiyerinde 200-300 koloni oluşturan ekim örneği, bu yöntem için en uygun olanıdır. Bu yoğunlukta basil içeren örneğin elde edilebilmesi için önce kültürde üretilmiş bakteriden 1.0 Mc Farland bulanıklığında süspansiyon hazırlanır. Hazırlanmış homojen süspansiyondan 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} veya 10^{-2} , 10^{-4} 'lük dilüsyonlar hazırlanmaktadır. Bu dilüsyonlardan ilaçsız kontrol besiyerine ve ilaçlı besiyerine ekim yapılır. Ekim yapılmış tüpler 3–4 hafta inkübe edildikten sonra oluşan koloniler sayılır. Test edilen suş belli bir antibiyotığa karşı %1 veya daha yüksek

oranda dirençli ise sonuç dirençli; %1'in altındaki oranlarda dirençliyse sonuç duyarlı olarak yorumlanır. Oran hesaplanırken şu formül kullanılır;

$$\frac{\text{İlaçlı besiyerindeki koloni sayısı}}{\text{Kontrol besiyerindeki koloni sayısı}} \times 100 = \text{Direnç Yüzdesi}$$

Bu yöntem indirekt olarak primer kültürde üremiş bakteriden veya direkt olarak mikroskobide aside dirençli bakteri görülen hasta materyalinden yapılabilir. Uzun yıllar test edilmiş, metodolojik çalışmalar yapılmış, uluslararası komitelerce onaylanmış bir yöntemdir⁴⁵.

2.6.5.2.1.1.2. Mutlak Konsantrasyon Yöntemi

Antibiyotikli ve antibiyotiksiz besiyerlerine, 2×10^{-3} - 1×10^4 cfu/ml mikobakteri içeren inokulum ekilir. İnokulum miktarı 100.000 basili geçmemelidir. İlk değerlendirme ikinci haftanın sonunda yapılır. Son değerlendirme dördüncü haftanın sonunda yapılır. İlaçlı besiyerinde 20'den fazla koloni olması o ilaca bakterinin dirençli olduğunu gösterir. Yeterli metodolojik çalışmalar yapılmadığından hata oranı yüksektir. Ekim örneğinin hassas bir şekilde hazırlanması yöntemin en önemli zorluğudur⁴⁵.

2.6.5.2.1.1.3. Direnç Oranı Yöntemi

Bu testle farklı dilüsyonlarda ilaç içeren besiyerlerine ekilen bakteriler için ilaçların Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değeri belirlenebilmektedir. İlaçlı besiyeri içeren tüplerin bir sırasına antitüberküloz ilaçların hepsine duyarlı olduğu bilinen *M.tuberculosis* H₃₇Rv inoküle edilir. Bu yöntemde 10^5 cfu/ml'lik inokulum kullanılır. Test edilen kökenin MİK değeri, *M. tuberculosis* H₃₇Rv'nin MİK değerinden 8 kat veya daha fazla yüksekse o ilaca dirençli olduğu kabul edilir⁴⁵.

2.6.5.2.1.2. Hızlı Kültür Yöntemleri

2.6.5.2.1.2.1. Radyometrik Kültür Sistemi (BACTEC 460-Becton Dickinson)

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) tarafından standart bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. Besiyeri olarak kullanılan BACTEC 12B şişeleri ^{14}C işaretli palmitik asit içerir. Üreyen mikobakteriler bu substratı primer karbon ve enerji kaynağı olarak kullanarak $^{14}\text{CO}_2$ açığa çıkarır. Metabolik son ürün olarak oluşan $^{14}\text{CO}_2$ sıvı besiyeri üzerindeki boşlukta toplanır. BACTEC 460 cihazı şişelerde oluşan radyoaktiviteyi ölçer, her şişede ortaya çıkan radyoaktivite 0-999 sınırları içinde bir sayı olarak belirlenir. Bu sayılar üreme indeksi olarak değerlendirilir. Oluşan $^{14}\text{CO}_2$ 'in oran ve miktarı, üremenin oranı ve miktarı ile doğrudan orantılıdır. Örnekler, bilinen yöntemlerle dekontaminasyon ve konsantrasyon işleminden sonra 0.5 ml miktarında 12B şişelerine ekilir; 35°C'de enkübe edilir. Ortalama üreme süresi 7-12 gündür. Şişeler 24 saatlik aralarda en az 4 gün GI yönünden kontrol edilir ve kontrol şişesinin GI'si 30 olana kadar sürdürülür. GI>10 ise örnek pozitif olarak kabul edilir. Kontrol GI 30 olduğunda, her şişe için bir önceki güne göre GI farkı hesaplanır ve bu fark ΔGI olarak değerlendirilir⁴⁷.

Buna göre;

İndirekt testte;

Kontrol ΔGI > ilaçlı ΔGI = duyarlı

Kontrol ΔGI < ilaçlı ΔGI = dirençli

Kontrol ΔGI = ilaçlı ΔGI = sınırdadır (test tekrarlanmalıdır)

Direkt testte;

Kontrol ΔGI > ilaçlı ΔGI = duyarlı

Kontrol ΔGI < ilaçlı ΔGI = dirençli

Kontrol ΔGI = ilaçlı ΔGI = dirençli olarak yorumlanır.

Bu yöntemde öncelikle birinci seçenek tüberküloz ilaçlarına karşı duyarlılık test edilebilir ve sonuçlar üç-beş günde alınır. Bu yöntemin en önemli dezavantajları, dirençli basillerin oranını belirleyememesi ve radyoaktif madde kullanılmasıdır. Ancak sonuçların agar orantı yöntemi ile % 90 uyumlu olmasıyla birlikte, hızlı ve güvenilir bir

yöntem olması nedeni ile CLSI tarafından standart bir yöntem olarak önerilmekte ve birçok merkezde kullanılmaktadır⁴⁷.

2.6.5.2.1.2.2. Floresan Kültür Sistemi (BACTEC-MGIT 960–Becton Dickinson)

Middlebrook 7H9 içeren dip kısmı ruthenium kompleksi bulunan silikon bir tabaka ile kaplı tüpler kullanılmaktadır. Tüp içinde bulunan oksijen yoğunluğunun fazla olması nedeniyle tüp dibine gönderilen UV ışınına karşı floresan ışımaya oluşmazken, oksijenin mikobakteri veya kontaminan mikroorganizmalar tarafından kullanılarak tüketilmesi ve CO₂ birikmesi sonrası tüp dibine gönderilen UV ışını ruthenium kompleksindeki değişiklik nedeniyle floresan vermektedir. Tespit edilen floresan miktarı üreme indeksi olarak ele alınmakta ve kültür pozitifliği açısından değerlendirilmektedir. Duyarlılık testi için ilaçsız ve ilaçlı tüplere eşit miktarda bakteri ekimi yapıp bu tüplerdeki üreme karşılaştırılır. İlaçsız tüpte üreme saptandıktan sonra 48 saat içerisinde ilaçlı bir tüpte üreme olursa, bakterinin o ilaca dirençli olduğu kabul edilir. Üreme oranı ve saptama zamanı BACTEC 460 ile aynıdır. Radyoizotop kullanılmaması avantajıdır. Sürekli monitörizasyon ile tüplerin aynı anda takibini sağlama ve bilgisayar verileri vermesi nedeniyle iş yükü daha azdır. Kontaminasyon oranları yüksektir⁴⁵.

2.6.5.2.1.2.3. Kolorimetrik Kültür Sistemi

- **BacT /ALERT MB**

Kolorimetrik olarak besiyerinde oluşan CO₂ düzeyini ölçerek mikobakteri üremesini değerlendirir. Radyoizotop içermez. Tam otomatiktir, bilgisayar desteklidir. Duyarlılık testi yapılabilmektedir. Testlerin sonuçlanma süresi BACTEC 460'dan daha uzundur⁴⁵.

- **Alamar Blue Oxidation-Reduction Indicator**

Alamar mavisi, bakteri üremesi sonucunda rengi pembeye dönüşen üreme indikatörü olarak kullanılan bir oksidasyon-redüksiyon boyasıdır. Diğer bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarında başarı ile kullanılan bu testin *M. tuberculosis* ve *M. avium* için de kullanılabileceği gösterilmiştir. Middlebrook 7H9 sıvı besiyerinde üretilen *M.*

tuberculosis kültüründen, Mc Farland No 1'e göre bir süspansiyon hazırlanır ve buyyonda 1:5 oranında sulandırılır. Test edilecek antitüberküloz ilaçların da sıvı besiyerinde çift kat sulandırılmaları yapılır. Dilüe ilaç içeren tüplere, dilüe edilmiş kültür süspansiyonlarından eklenir. Tüplerdeki son bakteri konsantrasyonu 6×10^5 cfu/ml'dir. Aynı şekilde üç ilaçsız kontrol tüpüne de ekim yapılır ve tüm tüpler 35°C'de enkübe edilir. İlaçlı tüplerin okunmaya hazır olup olmadığını anlamak için kontrol tüpleri yedi, 10 ve 14. günlerde test edilir. Bunun için kontrol tüpüne 0.02 ml Alamar mavisi solüsyonu ile 0.05 ml % 5 Tween 20 veya Tween 80 eklenir ve iki saat 50°C'de enkübe edilir. İnkübasyon sonunda tüpün rengi maviden pembeye dönerse, ilaçlı besiyerine de aynı maddeler eklenerek yine iki saat 50°C'de enkübe edilir. Renk değişimini önleyen ilaç konsantrasyonu MİK olarak değerlendirilir. Bu yöntem hızlı, kantitatif ve non-radyometrik bir yöntem olup sonuçlar 7-10 günde alınır. Yorumlar agar orantı yöntemiyle % 97 oranında uyumlu bulunmaktadır⁴⁷.

2.6.5.2.1.2.4. Karbondioksit Oluşumunu Tespit Eden Sistem: ESP Kültür Sistemi II

Modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içeren şişelerde mikobakterilerin oluşturduğu gaz ve oluşan basıncı ölçerek üreme değerlendirmesi yapan, tam otomatik, radyoaktif olmayan, bilgisayar destekli bir sistemdir⁴⁵.

2.6.5.2.1.2.5. E-test

Primer antitüberküloz ilaçlara karşı MİK değerlerini belirlemek için kolay bir yöntemdir. Açık sistem olduğundan uygulama ve okunması sırasında dikkatli olunması gerekmektedir⁴⁵.

2.6.5.2.1.3. Bakteri Varlığına Dayanan Yöntemler

2.6.5.2.1.3.1. Lusiferaz Taşıyıcı Faj Yöntemi

Bu yöntemde, ateş böceğinin lusiferaz genini taşıyan bir mikobakteri faji kullanılmaktadır. Bilindiği gibi, fajlar kendilerine özgü canlı bakterileri enfekte ederler. Lusiferaz geni taşıyan bir faj ile enfekte olan mikobakterilerde lusiferaz geninin transkripsiyonu ve faj çoğalması ile bol miktarda lusiferaz eksprese edilir. Ortama

lusiferaz enziminin substratı olan lusiferin eklendiğinde, mikobakteri hücre duvar ve membranını hızla geçen lusiferin, adenosin trifosfat (ATP) varlığında lusiferazın katalize ettiği bir kimyasal reaksiyon sonucunda oksilusiferine dönüşür ve ışık oluşur. Oluşan ışık bir luminometre veya fotometre ile ölçülebilir. Oluşan ışığın miktarı faj enfeksiyonu ve hücre ATP miktarına yani ortamdaki canlı mikobakteri sayısına bağlıdır. Antitüberküloz ilaçlara duyarlı bakteriler ışık oluşturmaz iken, dirençli olanlar ışık oluşturmaya devam eder⁴⁷.

2.6.5.2.1.3.2. Biyoluminesans Yöntemi

Yaşayan tüm canlılarda ATP varlığına dayanan bir yöntem olup bakteriyel kültürlerden ATP ekstraksiyonu ve ölçülmesi ile yapılır. Uygun konsantrasyonlarda Mc Farland No 0.5'e göre bulanıklığı ayarlanmış süspansiyondan ilaçlı tüplere eklenir. İlaç içermeyen kontrol tüpleri ile birlikte 35°C'de 10 gün enkübe edilir. Daha sonra bu kültürlerden alınan bir miktar sıvı, 0.1 µl TRİS tamponu ve EDTA içeren cam tüplerde beş dakika kaynatılarak hücreler parçalanır, oda ısısında soğutulur ve üzerine ATP monitorize edici madde eklenerek ışık üretimi yönünden luminometre ile incelenir. Oluşan ışık miktarı, hücre ATP ile doğru orantılıdır. Ortamda ne kadar çok canlı hücre varsa ışık üretimi o kadar fazladır. Anti-mikobakteriyellere duyarlı olanlar ışık üretimi yapamaz. ATP aktivitesinin kontrol kökenine göre %40 veya daha altına inmesi, o ilaca karşı duyarlılığı gösterir. Sonuçlar ortalama bir haftada alınır⁴⁷.

2.6.5.2.1.3.3. Flow Sitometri Yöntemi

Flow sitometri, bir sıvı akımı içinde tek tek geçmekte olan hücreler veya biyolojik partiküllerin, fizik ve kimyasal özelliklerini sensörler aracılığı ile ölçebilen bir yöntemdir. Bu yöntemde, *M. tuberculosis*'in floresein diasetat (FDA)'ı hidrolize etmesi ve oluşan floresans veren mikobakterilerin flow sitometrik analiz ile tespiti esastır. Çeşitli konsantrasyonlarda antitüberküloz ilaç içeren ve kontrol olarak ilaç içermeyen Middlebrook 7H9 sıvı besiyerinde 24-48 saat enkübe edilen bakteri kültürüne FDA eklenir ve canlı mikobakterilerin FDA'yı hidrolize etmesi sonucu oluşan floresan mikobakteriler flow sitometri ile saptanır. Antimikobakteriyel ajanlara duyarlı mikobakteriler FDA'yı daha az hidrolize eder. Bakteri üremesi gerekmediği için 24 saat gibi kısa sürede sonuç alınır⁴⁷.

2.6.5.2.2. Genotipik Yöntemler

M. tuberculosis'de ilaçlara karşı duyarlılığı saptamada 1960'lardan beri kullanılan geleneksel yöntemlere ek olarak *M. tuberculosis*'de ilaç direncinin moleküler mekanizmalarının anlaşılmasıyla hızlı sonuç verebilen moleküler yöntemler de geliştirilmiştir. DNA dizi analizi, ters hibridizasyon, RNA/RNA mismatch analizi, PCR SSCP, Heterodupleks analiz, Real-time PCR bu yöntemlerdendir. Minimal bakteriyel üreme gerektirmesi ve saatler içerisinde sonuç verebilmesi moleküler yöntemlerin avantajıdır. Dirence yol açmayan sessiz mutasyonların da saptanması dezavantajıdır. Çoğu kez RIF ve INH direncini saptamak için kullanılmaktadır³².

2.7. 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 geçmiştir⁴⁸.

2.7.1. 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 enfekte olmamış kişilerin tüberküloz basilleri ile karşılaşma riskini azaltmak,

b- Aşılama: Tam hücre aşıları (canlı, ölü)... BCG aşısı

Subünit aşıları

Çıplak DNA aşıları

2.7.2. İkincil koruma

Enfekte bireylerde hastalık gelişiminin önlenmesi amacıyla genellikle izoniazid verilerek uygulanır⁴¹.

2.8. Tedavi

Etkili tüberküloz tedavisi hızlı üreyen basillere karşı erken bakterisidal etkili ve dormant basilleri de ortadan kaldırmaya yönelik olmalıdır⁴⁹.

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 var olan ilaca dirençli olgular tedavi edilmezse, bulaştırma, yeni enfeksiyon ve yeni hastalık ile ilaç direncinin sürmesi söz konusudur⁵⁰. Bu nedenle tedavide bazı tanımları bilmek yararlı olacaktır:

Çok ilaca dirençli tüberküloz: En az izoniazid ve rifampisine birlikte olmak üzere daha fazla antitüberküloz ilaca dirençli suş olarak tanımlanır.

Yaygın ilaç dirençli tüberküloz: MDR ve ikinci seçenek ilaçlardan en az üçüne dirençli suş olarak tanımlanır⁵⁰.

2.8.1. Dünyada İlaç Direnci

M. tuberculosis suşları arasında ilaç direnci, özellikle çoklu ilaç direnci TB (MDR-TB) hakkında yakın bir zamana kadar yeterli bilgi yoktu. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) ve WHO Global Project on Antituberculosis Drug Resistance Surveillance üzerine 1994 yılında bir prevalans projesi başlattılar. İlk sonuçları 5 kıtadaki 35 ülkeden, yaklaşık olarak 50.000 hastadan topladıkları örnek analizleri olarak yayınladılar. Bu ülkelerde ortalama % 9.9 oranında RIF veya INH direnci vardı ve ortalama MDR-TB oranında %1 di. Fakat Sovyetler birliği, Dominik cumhuriyeti ve Arjantin'de durum endişe verici idi. Bu grup II. raporunu Nisan 2000'de yayınladı. Bu raporda ülke sayısı 72'ye çıkmıştı. Birden fazla anti-TB ilaca direnç ortalaması % 10.7 idi. Ancak prevalans yönünden uç ülkeler vardı. Mesela Uruguay'da % 1.7 olan prevalans Estonya'da % 36.9'du. Çalışmaya dahil edilen ülkelerde ortalama yeni MDR-TB görülme oranında % 1 olarak tespit edilirken, Rusya Federasyonu'ndaki Ivanovo Oblast'da %32.4, Litvanya'da %19.9, ve Çin'de Henan Province'de %35 olarak tespit edildi. Buna karşılık Kuba, Finlandiya, ve Fransa'da yeni MDR-TB bildirmedi. Bu sonuçlardan sonra yılda 500'den fazla yeni MDR-TB görülen ülkelerin "Sıcak Nokta" olarak tanımlanmasına başlandı. Bu çalışmada bu tanıma giren ülkeler; Sierra Leone, Zimbabwe, İsviçre, Peru, Bolivya,

Brazilya, Nepal, Kore ve Romanya idi. Yine Estonya ve Litvanya %14'lük yeni vaka artışı oranı ile sıcak nokta'ya yakın ülkeler olarak tanımlandılar.

Bu grubun 2002-2007 yılları arasında 81 ülke ve Çin'in iki ayrı eyaletinden toplanan verilere göre hazırlayarak yayınladığı, III. 'Küresel Antitüberküloz İlaç Direnci 2008 Raporunda, MDR-TB insidansının o güne kadar rapor edilen en yüksek seviyeye ulaştığı bildirildi. Bu rapora göre veri alınan ülkelerde MDR-TB oranı tüm olgularda % 4.8 (%4-20), yeni tanı almış olgularda % 3.1, önceden tedavi almış olgularda % 19.3 olarak bildirildi. Hindistan ve Çin, bu olguların yaklaşık % 50'sini, Rusya Federasyonu ise yaklaşık olarak % 7'sini barındırmaktaydı⁵¹. Bu çalışmadaki bir başka yenilikde XDR-TB bildirimlerinde görüldü. İlk defa raporda yer alan XDR-TB suşlarının prevalansı: Rusya Federasyonu'nda %6.6, Estonya'da % 23.7, Azerbaycan'da % 12.8, Ukrayna'da % 15, Güney Afrika'da % 5.7, ABD'de % 1.9 olarak bildirildi. Belçika, Hırvatistan, Danimarka, Norveç, Polonya, İngiltere'den XDR-TB olgusu bildirilmezken, Avusturalya, Fransa, İrlanda, Hollanda, Slovenya, İsveç'den 1 olgu, İsrail ve Romanya'dan 2'şer olgu bildirilmiştir. Afrika Bölgesi'nde tüberküloz insidansı çok yüksek olmasına rağmen, bu bölgeden XDR-TB insidansı ile ilgili veri elde edilememiştir⁵¹.

2.8.2. Türkiye'de İlaç Direnci

Türkiye genelinde direnç profilini ortaya koyacak bir çalışma olmamakla birlikte, çeşitli bölgelerden ve dispanserlerden yapılan çalışmaların analizinde, yeni hastalardan izole edilen tüberküloz basillerinde en az bir ilaca direnç oranının % 18-26, MDR *M. tuberculosis* oranının % 1.3-4.8; tedavi görmüş hastaların izolatlarında en az bir ilaca direnç oranının % 28-53, MDR *M. tuberculosis* oranının ise % 4-17 arasında dağılım gösterdiği görülmektedir⁵².

Ülkemizde direnç durumunu yansıtan en kapsamlı çalışmalardan biri, 1984-1989 ve 1990-1995 yılları arasında yapılmış 21 çalışma ve 27.959 kökenin sonuçlarını kapsayan bir metaanaliz çalışmasıdır. Bu çalışmaya göre 1984-1989 yıllarında toplam direnç oranları sırasıyla, STR (% 22.5), RIF (% 22.3), INH (% 27.8) ve EMB (% 7.8) olarak verilirken, 1990-1995 yıllarında toplam direnç oranları sırasıyla, STR (% 17.9), RIF (% 22.1), INH (% 23.8) ve EMB (% 7.7) olarak belirtilmektedir⁵³.

DSÖ ‘Küresel Antitüberküloz İlaç Direnci 2008 Raporu’na’ göre (Tablo 6), Türkiye için tüm olgularda (eski-yeni olgu) MDR-TB oranı % 3.3, yeni tanı alan tüberküloz olgularında % 1.4, önceden tedavi almış olgularda % 10.6 olarak verilmektedir⁵¹.

Tablo 6. DSÖ verilerine göre Türkiye’de MDR-TB oranları⁵¹.

	Tüberküloz olgu sayısı	MDR-TB sayısı	% MDR-TB
Tüm olgular	27.272	889	3.3
Yeni olgular	21.752	303	1.4
Tedavi almış olgular	5.520	588	10.6

Verem Savaş Daire Başkanlığı’nın ‘Türkiye’de Verem Savaşı 2007 Raporu’na’ göre (Tablo 7) ise yeni olgularda % 14,4, tedavi görmüş olgularda % 34,8 oranında en az bir ilaca direnç tespit edilememiştir. Toplamda tek ilaca direnç oranı yeni olgularda % 8.7, tedavi görmüş olgularda % 12.8, iki ilaca direnç oranı yeni olgularda % 3.2, tedavi görmüş olgularda % 8.7, üç ilaca direnç oranı yeni olgularda % 1.5, tedavi görmüş olgularda % 10, dört ilaca direnç oranı ise yeni olgularda % 1, tedavi görmüş olgularda % 3.3 olarak verilmiştir. Yeni olgularda INH ve STR’ye direnç yüksek iken, tedavi görmüş olgularda INH ve RIF’e direnç yüksektir. MDR-TB oranı, yeni olgularda % 3,1, tedavi görmüş olgularda % 17,7 olarak verilmektedir (Tablo 8).

Tablo 7. VSD kayıtlarına göre Türkiye’de ilaç duyarlılık testi sonuçlarında ilaç direnci dağılımları²¹.

	Yeni olgu		Tedavi görmüş		Tüm olgular	
	Sayı	Yüzde %	Sayı	Yüzde %	Sayı	Yüzde %
Duyarlı	2.773	85.6	331	65.2	3.104	82.9
Dirençli	464	14.4	177	34.8	641	17.1
Tek ilaç direnci	281	8.7	65	12.8	346	9.2
İki ilaç direnci	103	3.2	44	8.7	147	3.9
Üç ilaç direnci	48	1.5	51	10.0	99	2.7
Dört ilaç direnci	32	1.0	17	3.3	49	1.3

Tablo 8. VSD kayıtlarına göre Türkiye’de her bir tüberküloz ilacı için toplam direnç sonuçları²¹.

İlaçlar	Yeni olgu		Tedavi görmüş		Tüm olgular	
	Dirençli	Yüzde %	Dirençli	Yüzde %	Dirençli	Yüzde %
INH	291	9.0	139	27.4	430	11.5
RIF	144	4.4	107	21.1	251	6.7
EMB	97	3.0	51	10.0	148	4.0
STR	227	7.0	77	15.2	304	8.1
MDR	101	3.1	90	17.7	191	5.1

2.8.3. Tüberküloz Tedavisinde Kullanılan İlaçlar

Günümüzde tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlar, birinci seçenek (primer, majör) ve ikinci seçenek (sekonder, minör) ilaçlar olarak iki grup altında incelenebilir⁵⁴.

Birinci Seçenek İlaçlar (Majör, Primer İlaçlar): İzoniazid, Rifampisin, Pirazinamid, Etambutol, Streptomisin.

İkinci Seçenek İlaçlar (Minör, Sekonder İlaçlar): Sikloserin, Para-amino salisilik asit, Etionamid, Protionamid, Amikasin veya Kanamisin, Kapreomisin, Levofloksasin, Moksifloksasin, Gatifloksasin, Tiasetazon.

Tüberküloz ilaçlarının etki mekanizmalarını 4 grupta incelemek mümkündür⁵⁵:

- 1) Hücre duvarı inhibitörleri (izoniazid, etambutol, etionamid, sikloserin),
- 2) Nükleik asit sentez inhibitörleri (rifampisin, kinolonlar),
- 3) Protein sentez inhibitörleri (streptomisin, kanamisin),
- 4) Membran enerji metabolizma inhibitörleri (pirazinamid).

Etki mekanizmalarından da anlaşıldığı gibi günümüzde kullanmakta olduğumuz ilaçlar esas olarak aktif olarak çoğalmakta olan basiller üzerine etkilidir. Oysa bir tüberküloz basil topluluğunda bulunan basiller farklı metabolik özellikler gösterebilir. Mitchison tüberküloz basillerini metabolik aktivitelerine göre 4 gruba ayırmıştır⁵⁶.

A Grubu Basiller (Sürekli Çoğalan Basiller): Kavite içinde bulunan, hızla çoğalan en büyük basil grubudur. Bulaştırıcılıktan, direnç gelişiminden sorumludurlar. Bu grup üzerine en etkili ilaç izoniaziddir. Ayrıca rifampisin ve streptomisinin de zayıf etkisi vardır.

B Grubu Basiller (Asit Ortam Basilleri): Makrofaj içinde ve inflamasyon alanları gibi asit ortamlarda bulunan metabolik aktivitesi zayıflamış basillerdir. Bu grup üzerine en etkili ilaç pirazinamiddir.

C Grubu Basiller (Aralıklı Çoğalan Basiller): Kaseoz odaklarda bulunan ikinci büyük basil grubudur. Metabolik aktiviteleri zayıftır, zaman zaman çoğalırlar. Nükslerden sorumludurlar. Bu grup üzerine en etkili ilaç rifampisindir.

D Grubu Basiller (Dormant Basiller, Persistan Basiller): Metabolik aktivitesi olmayan ancak bir gün metabolik aktivite kazanabilme potansiyeli olan basillerdir. Bu grup üzerine etkili ilaç yoktur.

2.8.3.1. Birinci seçenek ilaçlar

2.8.3.1.1. Rifampisin

Streptomyces mediterranei'den izole edilen ve 1972 yılında antitüberküloz etkinliği fark edilen RIF, lipofilik ansamisin olup, INH ile birlikte kısa süreli tedavi rejimlerinin iskeletini oluşturur. Uzun süreli kullanılması halinde RIF, bakterinin DNA'ya bağımlı RNA polimeraz enziminin β -alt ünitesine bağlanarak transkripsiyonun başlamasını ve daha çok zincir uzamasını engellemekte, sonuç olarak bakterinin ölümüne sebep olmaktadır. Bu sebeple de özellikle yavaş üreyen *M.tuberculosis* üzerine etkili olan RIF'e karşı direnç geliştiren mutasyonlarının diğer antitüberküloz ajanlara karşı direnç geliştiren mutasyonlardan 100 kat daha seyrek olması bu ilaca karşı gelişen direnci çoklu ilaç direnci için prediktif bir bulgu haline getirmekte ve tedavi başarısızlıklarının sebebi olarak kabul edilmesine yol açmaktadır. RNA polimerase, kompleks bir oligomer olup α , β , β' ve γ olarak tanımlanan ve *rpoA*, *rpoB*, *rpoC*, ve *rpoD*, genlerinde kodlanan 4 farklı üniteden oluşur. Bu bölgeler bakteri türlerinde iyi korunmuşlardır. RIF'e dirençli *M. tuberculosis* suşlarının %95'inden fazlasında RNA polimeraz enziminin β -alt ünitesini kodlayan *rpoB* genin 507-533. kodonları arasındaki 81 baz çifti (bp) uzunluğundaki *rifampin resistance determining region* (RRDR) veya *hot spot* adı verilen bölgede tek amino asit değişimine sebep olan SNP'lerin yanı sıra, *missense* mutasyonlar, küçük delesyon veya insersiyonların olduğu gösterilmiştir. Dirençli kökenlerde mutasyonlar tek bir kodonda bir nükleotidin değişmesi şeklinde olabileceği gibi bir kodonda birden fazla nükleotidin değişmesiyle ya da birden fazla

kodonu kapsayan ikili, üçlü hatta dördlü kodon mutasyonları şeklinde de olabilmektedir. Yapılan çok sayıda çalışmada RIF'e dirençli kökenlerin yaklaşık %70'inde *rpoB* geninin 531Ser ve 526His mutasyonları tespit edilmiştir. Bazı istisnalar olmasına karşın genellikle belli kodonlardaki aminoasit değişiklikleri ile RIF için MİK değerleri arasında kuvvetli bir ilişki olduğu bilinmektedir. RIF dirençli izolatlar da çok az sayıdaki mutasyon 81 bp'lik bu kor bölgesinin dışında idi. Bu RIF permeabilite mutasyonları ve RNA polimerazın diğer sub-ünitlerinde oluşabilecek farklı mutasyonlar gibi başka mekanizmalarında dirençte etkili olabileceği ihtimalini doğurdu.

Duyarlılık testi çalışmalarında kodon 531, 526 ve 513'deki mutasyonların yüksek düzeyli RIF direncine (MİK $\geq$ 64 μ g/ml) neden oldukları 514 veya 533. kodonlarda görülen mutasyonların ise genellikle düşük düzey RIF direncine yol açtığı gösterildi⁵².

2.8.3.1.2. Pirazinamid

PZA nikotinamidin yapısal analogudur. Antitüberküloz ajan olarak önemi 1952 yılında fark edilen ve 1980'li yıllarda kısa süreli tedavi protokollerinin yaratılmasında etkili olan PZA, asidik şartlarda makrofaj içindeki düşük metabolik aktivite gösteren semi-dorman durumdaki tüberküloz basillerine etkilidir. PZA ve INH nikotinamid türevidir olmakla birlikte, etki mekanizmaları farklıdır. Ancak INH ve RIF ile güçlü sinerji yaratır. PZA bir ön ilaç olup, mikobakterilerin PZA'ya duyarlılığı spesifik pirazinamidaz (Pzaze)'ın varlığına bağlıdır. PZA fagolizozomların asidik ortamında tüberküloz basillerinin ürettiği Pzaze ile aktif şekli olan pirazinoik aside dönüşerek etkili olduğu düşünülmektedir. Nitekim bu enzim aktivitesine sahip olmayan diğer mikobakteriler mesela *M. bovis*, PZA'ya karşı intrinsik direnç gösterir. Makrofaj fagolizozomlarında pH 5.5'de aktif hale geçer. pH 5.5'de MİK 1650 μ g/ml iken, pH 6.0'da 100 μ g/ml olup, nötr pH'da etkili değildir. Pirazinamidin etkinliğini pH dışında bakteri sayısı, demir, efluks, enerji inhibitörleri ve oksijen miktarındaki azalma belirler⁴⁷.

PZA'ya karşı direnç kolay gelişir, ancak diğer ilaçlarla çapraz direnç gelişimi söz konusu değildir. Direnç gelişiminde nikotinamidaz aktivitesindeki azalma sorumlu tutulmaktadır. PZA'ya dirençli kökenlerin % 72-94'ünde pirazinamidaz enzimini

kodlayan *pncA* geninde çeşitli tipte mutasyonların olduğu bilinmektedir. Mutasyonların çok fazla değişkenlik göstermesi ve gen boyunca dağılmış olması *pncA* dışındaki direnç genlerinde görülmeyen bir durumdur. Buna karşın mutasyonlar (3-17, 61-85 ve 132-142 kodonlar arasında *pncA* geninin üç bölgesinde) belli bir kümeleşme göstermektedir⁴⁷.

2.8.3.1.3. İzoniazid

Tüberküloz tedavisinde kullanılan önemli birinci seçenek ilaçlardan biridir. 1952 yılında üretilmiştir. INH, *M. tuberculosis* için MİK aralığı 0.002-0.2 µg/ml arasında olan yüksek oranda aktif bir ajandır. INH'nin potent bir ilaç olarak keşfedilmesi nikotinamid ve thiosemikarbazonesin kobaylar ve fareler üzerinde çalışılması sırasında birbirinden bağımsız iki araştırma ile ortaya çıkmıştır⁵⁵.

INH sadece *M. tuberculosis* ve bazı mikobakteriler üzerine etki etmesi yönü ile dar spektrumlu antitüberküloz ilaçtır. Tüberküloz tedavisinde ve profilaksisinde uzun yıllardır kullanılıyor olmasına rağmen ilacın bakteriyel hedefleri ve aktivasyon şekli tam olarak anlaşılamamıştır. Piridin halkası ve hidrazid grubu içeren basit bir yapıya sahiptir⁴⁷. INH'nin *M. tuberculosis*'e göstermiş olduğu etki karmaşıktır. INH oksijen varlığında çoğalmakta olan bakteriler üzerine etkilidir. 37 °C'de optimum etki gösterir, ısı düştükçe INH aktivasyonu azalır. Önce, katalaz peroksidazı, pigment prekürsörleri nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) ve peroksidazları içeren mekanizmalarla ilaç tüberküloz basilinin içine alınır. Peroksidazların etkisi ile izoniazid hidrazin ve izonikotinik aside dönüşür. Bu işlem *katG* geninin kontrolündedir. İzonikotinik asit nikotinik asidin antimetaboliti olarak etki yapar ve bu reaksiyondaki koenzim A sentezini bozar. Hidrojen peroksit yıkılmaz ve hücrede toksik özellikteki bu maddenin yüksek düzeyde birikimine bağlı olarak DNA, karbonhidrat ve lipid olmak üzere pek çok hedefte hasar oluşturarak hücre ölümüne neden olur. Ayrıca izonikotinik asit mikolik asit sentezinin inhibisyonuna neden olur^{55,57}.

2.8.3.1.4. Etambutol

Kimyasal yapısı dietilendiamin hidroklorürün deoksi şeklidir. Etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte EMB'nin bir arabinoz analoğu olduğu düşünülmektedir. EMB arabinozil transferazın özgül hedefidir. İlaç arabinozun arabinogalakattan ve lipoarabinomannana polimerize olmasına aracılık eden arabinozil

transferaz enzimini inhibe ederek arabinogalakattan ve lipoarabinomannanın hücre duvarına taşınmasını engellemektedir. Arabinogalakattan mikobakteriyel hücre duvarının en önemli polisakkaritidir³².

Arabinozil transferaz enzimini kodlayan üç gen *embC*, *embA* ve *embB* genleri 10 kilo baz çiftlik bir operon (*embCAB*) oluşturacak şekilde organize olmuştur. *EmbCAB*'ın sekonder yapısal analizi ile bu proteinin 12 adet transmembran bölgesi içeren bir integral transmembran proteini olduğu gösterilmiştir. *EmbB* proteininin stoplazmik lupunda *EMB-resistance determining region* (ERDR)'nin yer aldığı ve bu bölgenin farklı mikobakteri türlerinde bulunan ve iyi korunan bir bölge olduğu öne sürülmektedir. Muhtemelen EMB bir arabinoz analogu *EmbB* ise bir arabinozil transferazdır. EMB'ye dirençli *M.tuberculosis* kökenlerinin önemli bir bölümünün *EmbB* proteininde duyarlı kökenlerde olmayan aminoasit değişiklikleri bulunmaktadır. EMB'ye dirençli kökenlerde *embB* geninde en sık rastlanan mutasyonlar 306. kodondaki *missense* mutasyonlardır. Ayrıca Phe285Leu, Phe330Val ve Thr630Ile mutasyonlarında EMB için MİK değerleri (MİK >40 µg/ml) genellikle daha yüksektir^{47,57}.

2.8.3.1.5. Streptomisin

Aminoglikozit grubundan bir antitüberküloz ilaç olup, ribozomların ribozomal S12 proteini ve 16SrRNA alt grubuna etkileyerek ribozom fonksiyonlarını ve dolayısıyla protein sentezini bozar. STR etkisini, ribozomal proteinlere bağlanıp translasyonu engelleyerek gösterdiği düşünülmektedir. *M. tuberculosis*'de STR'ye direncin % 80'inde iki tür mutasyon saptanmıştır. Ribozomal S12 proteinini kodlayan *rpsL* geninde nokta mutasyonu olmakta bu da tek aminoasit değişimine neden olmaktadır. Aminoasit değişimi 88. kodonda lizinin arjinine, 43. kodonda ise Lys43Arg veya Lys43Treo değişimi olarak gerçekleşmektedir. Diğer mutasyon ise 16S RNA' yı kodlayan *rrs* geninde olmaktadır. Burada 530. ve 904. nükleotidlerinin çevresindeki bölgede mutasyonlar olmaktadır^{32,47}.

2.8.3.2. İkinci seçenek ilaçlar

2.8.3.2.1. Para-amino salisilik asit

Sadece *M. tuberculosis*'e etkili, çok dar spektrumlu bir ilaçtır. PAS, paraaminobenzoik asidin yapısal analogudur ve para-aminobenzoik asidin folik aside konversiyonunu kompetitif olarak bloke ederek *M. tuberculosis* üzerinde bakteriyostatik etki yapabilir. STR ve INH'e göre çok daha zayıf etkilidir. Bu ilaca karşı mikobakteride direnç gelişmesi, STR ve RIF'e karşı olana göre daha geç ve güç olur. Birlikte kullanıldığında bu ilaçlara ve izoniazide direnç gelişmesini geciktirir. Günümüzde, 2 yaşın altındaki çocuklarda tüberkülozun kombine tedavisinde kullanılır. Bunlarda EMB'nin görme ile ilgili toksik etkisinin başladığını saptamak zor veya olanaksız olduğundan onun yerine PAS kullanmak gerekir⁵⁴.

2.8.3.2.2. Etionamid

Etionamid ikinci sıra bir ajandır, primer ilaçlar etkili olmadığında veya kontrendike olduğunda diğer ilaçlarla birlikte kullanılır. Etionamid izoniazid gibi izonikotinik asitten üretilmiştir ve bakterisidal etkilidir. Gerçek etki mekanizması bilinmemekle birlikte, INH'deki gibi mikobakteriyel hücre duvarında mikolik asid sentezini inhibe ederek etki ettiği düşünülmektedir. Etionamid sadece oral olarak kullanılır⁵⁴.

2.8.3.2.3. Protionamid

Etionamid gibi bir INH türevi olup farmakolojik özellikleri etionamide benzer. Etki ve yan etki etionamidle aynıdır ve her iki ilaç da INH'ye dirençli mikobakteriler üzerine etkili olabilir. Etionamid ve protionamid arasında çapraz direnç görülür⁵⁴.

2.8.3.2.4. Sikloserin

Sikloserin *Streptococcus orchidaceus* tarafından üretilen geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. D-alanin'in analogudur, ve alanin rakemaz ve D-alanil-D-alanin sentaz'ın hareketini kompetitif olarak inhibe eder. Bu enzimler hücre duvarının prekürsörlerini inhibe ederler ve bunların inhibisyonu hücre büyümesinde gerilemeye ve büyük olasılıkla lizis yolu ile hücre ölümüne neden olmaktadır. Günümüzde sikloserin

pulmoner veya ekstrapulmoner tüberkülozun tedavisinde primer ilaçlar başarısız olduğunda, diğer tüberkülostatik ilaçlarla birlikte kullanılır. Siklosporin ve diğer tüberkülostatik ilaçlar arasında çapraz-direnç yoktur. Renal yetmezlik durumunda ilaç toksik konsantrasyonlarda birikebilir. Sikloserin yeniden tedavi gerekli olduğunda veya diğer ilaçlara direnç durumunda kullanılmalıdır. Tüberküloz tedavisi için kullanıldığında diğer efektif ilaçlarla birlikte verilmelidir⁵⁴.

2.8.3.2.5. Tiasetazon

Çok ucuz olduğundan gelişmekte olan ülkelerde izoniazidle birlikte çok yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. İn vitro etkinliği ve farmakokinetiği konusundaki bilgiler sınırlıdır. İlaç adrenal glandlarda konsantre olur ve akciğer içinde bakteriyostatik konsantrasyonlara ulaşır. Tiasetazonun belirgin yan etkileri ve önemli toksisitesi vardır. Bu ilaç etionamid ile benzer yapıdadır ve bulantı, kusma, abdominal rahatsızlık ve iştahsızlık dahil benzer bir yan etki profili vardır. En önemli yan etkileri öldürücü eritema multiforme ve toksik epidermal nekrozisdir⁵⁴.

2.8.3.2.6. Kanamisin, amikasin, kapreomisin, viomisin

Bu bölümde gruplanan ilaçlar pek çok açıdan benzer özellikler göstermektedir. Sadece dirençli mikroorganizmaların ya da nontüberküloz mikobakterilerin neden olduğu hastalığın tedavisinde kullanılırlar. Hepsinin parenteral olarak verilmesi gereklidir ve benzer farmakokinetiklere ve toksisiteye sahiptirler. Bu ilaçlar potansiyel olarak ototoksik ve nefrotoksik olduklarından, bu gruptan iki ilaç bir arada kullanılmamalıdır ve streptomisinle kombine edilmemesi gereklidir⁵⁴.

Kanamisin, bir aminoglikozittir. Tüberkülozlu hastaların küçük grupları günlük 1 g kanamisin ile tedavi edilmişlerdir. Toksik etkileri sıktır: nöromusküler paralizi, solunum depresyonu, agranülositozis, anafeksi ve nefrotoksisite⁵⁴.

Amikasin'de bir aminoglikozittir. Birçok mikobakteri türüne karşı oldukça aktiftir ve nontüberküloz mikobakterinin neden olduğu hastalığın tedavisinde önemli bir ilaç olabilir⁵⁴.

Kapreomisin, *Streptococcus capreolus* tarafından oluşturulan antimikobakteriyel bir siklik peptiddir. İlaç hem in vitro hem de deneysel tüberkülozda etkilidir. Tek başına verildiğinde kapreomisine karşı bakteriyel direnç gelişir; bu mikroorganizmalar

kanamisin ve neomisin ile çapraz direnç gösterirler. Kapreomisin bakterisidal ajanlar tolere edilemediğinde veya dirençli mikroorganizma varlığında diğer antitüberküloz ilaçlarla kombine edilerek kullanılır⁵⁴.

Viomisin, birçok dirençli tüberküloz suşlarına karşı etkilidir. Kapreomisin ve viomisine karşı çapraz direnç sıklıkla oluşmaktadır⁵⁴.

2.8.3.2.7. Florokinolonlar

DNA giraz inhibisyonu yapan florokinolonlar bakterisidal etki gösterirler. DNA giraz inhibisyonu DNA replikasyonunda ve protein sentezinde yetersizliğe yol açar. Diğer antitüberküloz ilaçlarla etkileşimi önemlidir. RIF gibi RNA ve protein sentez inhibitörleri kinolonların bakterisidal etkisini azaltabilirler. Geniş spektrumlu bir florokinolon olan moksifloksasinin rifampisine benzer in vitro aktivite gösterdiği bulunmuştur. Ofloksasin ve siprofloksasin arasında tam çapraz direnç vardır, in vitro siprofloksasin ile moksifloksasin ve gatifloksasin arasında da çapraz direnç olduğu gösterilmiştir. Levofloksasinin izomeri olan ofloksasine göre 2 kat daha etkili olduğu düşünülür. Genellikle iyi tolere edilen ilaçlardır. Gastrointestinal ve santral sinir sistemine ait yan etkilere rastlanabilir. Yan etkileri: gastrointestinal intolerans, baş ağrısı, halsizlik, uykusuzluk, baş dönmesidir. Uykudan önce verilen kinolonlar kabuslara yol açabileceğinden genellikle sabah saatlerinde verilmesi tercih edilir. Nadiren alerjik reaksiyonlar, diare, fotosensitivite, yükselmiş karaciğer fonksiyon testleri ve periferik nöropati görülebilir. Böbrek yetmezliğinde siprofloksasin, ofloksasin ve levofloksasinin doz ayarlaması gerekir, bu gereklilik moksifloksasin için mevcut değildir⁵⁴.

3.GEREÇ ve YÖNTEM

Şubat 2009-Şubat 2011 yılları arasındaki 3 yıllık periyotta Adana, Mersin, Antakya, Osmaniye, Gaziantep, Kahramanmaraş, Şanlıurfa illerinde bulunan 17'si Verem Savaşı Dispanseri, 1'i Göğüs Hastalıkları Hastanesi ve 2'si de Devlet Hastanesi olmak üzere toplam 20 merkezden Çukurova Üniversitesi Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi-Adana Bölge Tüberküloz Laboratuvarına gönderilen, akciğer TB'li hastalara ait 27,457 örnekten *M. tuberculosis* kompleksi olarak tanımlanan 254 (%9.25) klinik izolattan, daha önce birinci seçenek antibiyotiklere karşı duyarlılık testleri yapılan ve 14 (% 5.51)'ünde RIF+INH direnci tespit edilen (doğrulanmamış MDR-TB), 19(% 7.48)'un da RIF+IHN dışı direnç tespit edilen toplam 33 izolat PAS, moksifloksasin(MOX), kapreomisin (C) ve protionamid (P) gibi dört minör ilaca karşı direnç oranları, MGIT-960, konvansiyonel proporsiyon ve nitrat redüktaz indikatörlü proporsiyon test yöntemleriyle araştırılmıştır.

Çalışma, MGIT-960 ile izole edilerek tanı almış ve SIRE testi ile duyarlılık kalıpları belirlenmiş suşlarla yapılmış olup;

- i-Antibiyotik stok solüsyonlarının hazırlanması ve besiyerlerinin yapılışı
- ii-Duyarlılık testlerinin uygulanması
- iii-Test sonuçlarının yorumu ile tamamlanmıştır.

3.1. Antibiyotik Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Çalışmada kullanılan antibiyotikler aşağıda belirtilen formüle göre 10.000 µg/ml olacak şekilde stok solüsyon olarak hazırlandı.

$$\text{Ağırlık (mg)} = \frac{\text{Hacim (ml)} \times \text{Konsantrasyon (µg/ml)}}{\text{Potens (µg/mg)}}$$

Çözücü olarak; PAS için tuzlu su, kapreomisin için distile su, moksifloksasin için 1/10N NaOH ve protionamid için ise alkol kullanıldı.

Kullanılan bu antibiyotikler için çalışılan konsantrasyon ise şu şekildedir:

- PAS: 2 µg/ml
- P: 2,5 µg/ml
- MOX: 0,25 µg/ml
- C: 2,5 µg/ml

Uygun olarak hazırlanan stok solüsyonlardan standartlara uygun olarak hazırlanan test besiyerlerine inokülasyonlar yapıldı.

3.1.1. Löwenstein-Jensen İlaçlı ve İlaçsız Besiyerinin Hazırlanması

1. 2.4 gr Monopotasyum fosfat (KH_2PO_4)
0.24 gr Magnezyum sülfat
0.6 gr Magnezyum sitrat
3.6 gr Asparajin tuzları tartıldı.
2. Tuzlar steril bir erlenmayer içerisine konuldu ve üzerine 600 ml distile su ilave edildi.
3. Tuzların çözülmesi için 121 °C'deki otoklavda 15 dk bekletildi daha sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı.
4. Taze, iri boy 25 adet yumurtanın dış kabuğu iyice fırçalanarak temizlendi.
5. Yumurtalar alkol veya UV lambası yardımıyla steril edildi.
6. Yumurtalar steril bir balona tek tek kırıldı ve homojen hale gelinceye kadar çalkalandı.
7. Daha önceden hazırlanmış tuz karışımına 12 ml gliserol ilave edildi.
8. Hazırlanmış olan solüsyona % 2'lik malaşit yeşilinden 20 ml ilave edildi.
9. Önceden hazırlanmış olan yumurta sıvısı steril biz bezden geçirilerek filtre edildi ve hazırlanmış olan solüsyona 1000 ml ilave edildi ve çalkalanarak karıştırıldı.
10. Hazırlanan karışımın yani besiyerinin pH değeri 6.8-7 civarında olmasına dikkat edildi.
11. Hazırlanan karışımın bir kısmı kontrol besiyeri olarak ilaçsız olarak steril tüplere 6'şar ml döküldü.

12. Kalan besiyerine ilaçlar belirlenen miktarlarda ilave edildi ve üzeri etiketlenmiş tüplere 6'şar ml olarak döküldü.
13. Bu tüplerin hepsi yatık bir şekilde koagülatöre konuldu. 80 °C'de 1 saat koagüle edildi.
14. 18-24 saat 37 °C'de sterilit kontrolü yapıldıktan sonra ekim yayıncaya kadar 2-8 °C'de buzdolabında saklandı.

3.1.2. Nitrat Redüktaz Testi Reagen Hazırlanması ve Ekim

Nitrat redüktaz testi için Griess reageni hazırlandı. Steril bir tüpe sırasıyla 2.5 ml distile su, 5 ml hidroklorik asit (HCL) ve 2.5 ml distile su konularak 10 ml miktarında % 50 w/v hidroklorik asit hazırlandı. Diğer tüpe ise % 0.2 w/v sülfanilamidden 0.04 gr tartılarak üzerine 20 ml distile su ilave edildi. Bir başka tüpe ise % 0.01 w/v N-(1-Naphthyl) etylene di amin di hydrochloride maddesinden 0.02 gr tartıldı. Üzeri yine 20 ml distile su ile tamamlandı. Daha sonra bu üç solüsyondan sırasıyla 1 cc N-(1-Naphthyl) etylene diamin dihydrochloride, 1 cc sülfanilamid ve 0.5 cc HCL miktarlarında bir karışım hazırlandı.

Ekim amacı ile hazırladığımız test suşlarından 0.5 Mc Farland bulanıklığında süspansiyonlar yapıldı. İki metod için de 1'i kontrol tüpü 4'ü ilaçlı tüp olmak üzere 5 tüpe 0.2'şer ml ekim yapıldı. Ekimi yapılan tüpler inkübasyon için 37 °C'deki etüve yerleştirildi.

3.1.3. MGIT Antibiyogram

Üreme belirlendikten sonraki 1-2. gün:

1. Kullanılan antibiyotikler çözücülerinde çözüldü.
2. Kontrol ve antibiyotik testi için 5 yeni MGIT tüpüne hasta kaydı yapıldı.
3. Pozitif MGIT tüpünden 0,1 ml örnek alınarak steril bir tüp içerisinde, 10 ml steril distile su ile sulandırıldı.
4. Kontrol ve antibiyotikli tüpler içerisine Growth Supplemant'tan 0,8'er ml eklendi.
5. Antibiyotikle işaretlenmiş tüpler içerisine her tüpe yazılan antibiyotiğe göre 0,1 ml antibiyotik eklendi.
6. 1/100 sulandırılmış süspansiyondan 0,5 ml kontrol tüpüne ekildi.

7. Pozitif olan MGIT tüpünden 0,5 ml (süspansiyon yapılmadan) antibiyotiklerin eklendiği ilaçlı şişelere eklendi.
8. Beşli barkod taşıyıcılarına kontrol tüpü en sola, antibiyotikli tüpler sağa yerleştirildi.
9. Barkod okutularak cihaza yerleştirildi.

Üreme belirlendikten sonraki 3-5. gün:

Steril boş bir tüp içerisinde 1 ml Pozitif MGIT tüpünden alınan örnek, 4 ml steril distile su ilave edilerek dilue edildi. Bu tüp pozitif MGIT tüpü olarak kabul edildi ve üremenin 1 ve 2. günündeki prosedür aynen takip edildi.

3.2. Sonuçların Değerlendirilmesi

Test sonuçları değerlendirilmeden önce her test besiyeri önerilen sürelerde inkübasyona bırakıldı.

3.2.1. LJ'nin değerlendirilmesi

Proporsiyon yöntemi için, tüpler 3 hafta inkübe edildikten sonra oluşan koloniler sayılır. Direncin değerlendirilmesinde, ilaçsız kontrol besiyerindeki koloni sayıları ile ilaçlı besiyerindeki koloni sayıları karşılaştırdık. İlaçlı besiyerindeki üreme kontrol besiyerindeki üremenin % 1 ve daha fazlası ise köken o antibiyotiğe karşı dirençli olarak kabul edildi. Oran hesaplanırken şu formülü kullandık.

$$\frac{\text{İlaçlı besiyerindeki koloni sayısı}}{\text{Kontrol besiyerindeki koloni sayısı}} \times 100 = \text{Direnç Yüzdesi}$$

3.2.2. Nitrat redüktaz-LJ'nin Değerlendirilmesi

Nitrat redüktaz testi için ayrılan tüplere hazırlanan karışımdan 2-3 damla damlatarak renk değişimi gözlemlendi. Pembeden mora bir değişimi gözlemlendi. Renk değişimi olmasına bağlı olarak bu ilaca karşı direnç olduğu belirlendi.

3.2.3. MGIT'in Değerlendirilmesi

MGIT 960 için ise, cihaz 10-14 gün arası otomatik olarak duyarlı ya da dirençli sonuç vermektedir.

3.3. Sonuçların Yorumlanması

Elde edilen sonuçlar bulgular ve tartışma bölümlerinde yorumlanmıştır.

4. BULGULAR

RIF ve INH dirençli *M.tuberculosis* klinik izolatlarındaki minor ilaç direncini 3 farklı yöntemle tespiti ve yöntemler arasındaki avantaj ve dezavantajları tespit amacı ile yapılan bu çalışmada değerlendirilen 33 izolattan 20'si minör ilaçlardan en az bir minör ilaca en az bir yöntemle duyarlı bulunmuştur (Tablo 9).

Tablo 9. Minör ilaçlara karşı duyarlılık dağılımı.

	Proporsiyon Duyarlılık Testi		Nirtat Redüktaz Proporsiyon Duyarlılık Testi		MGIT-960 Yöntemi	
	Duyarlı Suş Sayısı	%	Duyarlı Suş Sayısı	%	Duyarlı Suş Sayısı	%
C	12	36	20	60	11	33
MOX	17	51	13	39	13	39
PAS	6	18	10	30	4	12
P	15	45	6	18	14	42

Kaba bir değerlendirme ile test örneklerinden 13'ünde MOX direnç sonuçları hem Nirtat Redüktaz Proporsiyon Duyarlılık Testi (NRPPD) hem de MGIT-960 yöntemi ile % 100 uyum gösterirken, P ve C direnç sonuçları Proporsiyon Duyarlılık Testi (PPD) ve MGIT-960 yöntemleri ile % 93 oranında benzer bulunmuştur.

Bunun yanı sıra test edilen yöntemlerle tüm ilaçlar için duyarlı sonucu veren örnek sayısı ise NRA testi, MGIT 960 ve proporsiyon yöntemi için sırasıyla 7 (%21), 8 (%24) ve 6 (%18) olarak belirlenmiştir.

Diğer taraftan örneklerdeki 2'li, 3'lü ve 4'lü ilaç dirençleri dağılımı irdelendiğinde; en fazla sayıda aynı 2 ilaca karşı dirençli suş sayısı 15 izolat NRPPD yöntemi ile belirlenmiş olup, en sık karşılaşılan birlikteliğinde 6 izolat ile C/MOX birlikteliği olmuştur. Diğer 2 test yöntemi ile bu iki ilaca aynı anda dirençli olan suş sayıları az olmakla birlikte sayılar arasındaki benzerlik ve NRPPD ile farklılıkları dikkat çekici bulunmuştur(Tablo 10).

Tablo 10. En az bir yöntemle en az 2 ilaca karşı direnç belirlenen suşların dağılımı.

Yöntem İlaç	PPD	NRPPD	MGIT-960
C/MOX	1	6	2
C/PAS	-	4	1
C/P	2	-	-
MOX/PAS	1	-	-
MOX/P	2	5	-
PAS/P	1	-	1
Toplam	7	15	4

Test suşlarının 4 (%12.1)'ünün her 3 yöntemle de 4 ilaca karşı dirençli oldukları tespit edilmiştir (Tablo 11).

Tablo 11. Çalışılan örneklerin antibiyotik duyarlılık sonuçları

ÖRNEK protokol no	1.SEÇENEK İLAÇ DİRENCİ	NRA TESTİ	MGIT 960	PROPORSİYON YÖNTEMİ
3831	STR, INH, RIF	C, MOX	MOX, P	MOX
1790	STR, INH, RIF	C, MOX	MOX, P	C, P, MOX
1124	STR, INH, RIF	MOX, PAS	MOX, P, PAS	MOX, P
766	STR, INH, RIF	C, PAS	C, PAS	C
584	STR, INH, RIF	C, MOX	C, P	C, P
2288	STR, INH, RIF	T.DUYARLI	C	T.DUYARLI
2601	STR, INH, RIF	C, P, PAS	MOX	MOX, P, PAS
2175	STR, INH, RIF	C, PAS	C, MOX, P	MOX
1855	STR, INH, RIF	C	T.DUYARLI	C, PAS
3036	STR, INH, RIF	C, MOX, P	C, MOX, PAS	C, MOX, P
2963	INH, RIF, EMB	C, MOX, PAS	T.DUYARLI	MOX, P
1908	INH, RIF, EMB	C	T.DUYARLI	T.DUYARLI
1473	INH, RIF, EMB	T.DUYARLI	T.DUYARLI	P
1321	INH, RIF, EMB	T.DUYARLI	T.DUYARLI	MOX
1147	INH, RIF, EMB	C, MOX, PAS	T.DİRENÇLİ	C, MOX, PAS
1078	INH, RIF, EMB	P	P	P
903	INH, RIF, EMB	C, P, PAS	C, MOX, P	P
2135	INH, RIF	T.DUYARLI	T.DUYARLI	T.DUYARLI
2496	INH, RIF	T.DUYARLI	T.DUYARLI	T.DUYARLI
2091	STR, INH, RIF	C, MOX	MOX, P	C, MOX, P
1988	STR, INH, RIF	C	C, MOX	MOX
1846	RIF, EMB, INH	P	P, PAS	P, PAS
938	INH, RIF, EMB	MOX	C	C, MOX
1560	INH, RIF, EMB	C, MOX	C, MOX	MOX
1051	RIF, INH	C, PAS	P	C, P
973	RIF, INH	C, MOX	MOX, P	C, MOX, P
943	RIF, INH	C, MOX, PAS	MOX, P	C, MOX, PAS
265	T.DİRENÇLİ	T.DUYARLI	T.DUYARLI	T.DUYARLI
202	T.DİRENÇLİ	T.DUYARLI	T.DUYARLI	T.DUYARLI
1876	T.DİRENÇLİ	C, P	P	P
1693	T.DİRENÇLİ	C, MOX, PAS	C	MOX, PAS
1556	T.DİRENÇLİ	T.DİRENÇLİ	C, MOX, P	C, MOX, P

Ayrıca NRA testi ve MGIT 960 yöntemiyle yapılan çalışmada 1'er örnek tüm ilaçlara direnç göstermiştir.

Üç yöntemde çıkan sonuçları değerlendirdiğimizde ise genel anlamda birbiriyle uyumlu sonuçlar elde ettiğimizi gördük.

Bu çalışmada proporsiyon yöntemini temel yöntemimiz olarak kabul ettik, çünkü MGIT 960 yöntemi otomatize bir sistem olduğu için daha önce yapılan çalışmalar da daha hızlı olduğunu fakat hata oranının daha yüksek olduğunu göstermiştir.

5. TARTIŞMA

Tanı ve tedavi yöntemlerindeki gelişmelere rağmen tüberküloz, tüm dünyada HIV/AIDS'den sonra erişkinlerde en çok ölüme yol açan ikinci enfeksiyon hastalığı olarak önemini korumaktadır²¹.

Tüberkülozda direnç sorununun ilk ipuçları tüberküloz kemoterapisinin başlamasıyla ortaya çıkmıştır. 1952 yılında STR'nin bulunması ve ilacın yaygın kullanıma girmesiyle, STR'ye karşı direnç gelişmiştir. Kısa bir süre sonra PAS'ın bulunmasıyla dirençli tüberkülozun önüne geçmek için kombine tedavi stratejisi kullanıma girmiştir. Tüberküloz kemoterapisi zaman içinde gelişirken yetersiz ilaç alımı ve hastaların uygunsuz ilaç kullanımına bağlı olarak ilaca dirençli olguların sayısında artış gözlenmiştir. 1990'larda çok ilaca dirençli tüberküloz olgularının sayısındaki artış tüberküloz tedavisinde önemli sorunlar yaratmaya başlamıştır⁵⁹.

CDC tarafından 2007 yılının mart ayında yayınlanan haftalık morbidite ve mortalite raporunda Amerika'da 1993-2006 yılları arasında bildirilen ve duyarlılık testleri yapılmış 190.213 kültür pozitif tüberküloz olgusunun %2'sinin (2927) MDR-TB, MDR-TB olguların %57'sinin (1665) ikinci seçenek ilaçlardan, florokinolon grubu ya da enjektabl ilaçlardan birine karşı dirençli olduğu bildirilmiştir⁶⁷.

Resmi verilere göre Türkiye, tüberküloz insidansının orta düzeyde olduğu ülkeler arasında yer almaktadır. Türkiye genelinde yapılmış direnç profilini ortaya koyacak çok merkezli bir çalışma olmamakla birlikte, Durmaz R.⁵² tarafından çeşitli bölgelerden yapılan çalışmaların analizinde, MDR-TB oranının yeni hastaların izolatlarında % 1.3-4.8, tedavi görmüş tüberküloz hastalarında ise % 4.4-16.6 arasında bir dağılım gösterdiği belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda Akciğer TB tanısı almış veya şüpheli temas öyküsü olan hastalardan alınan balgam örneklerinden izole edilen M.tuberculosis suşlarından 14 (%43)'ü konfirme edilmiş olmak üzere toplam 33 (%12.9) izolatın MDR-TB tanımına uyan duyarlılık kalıbına sahip olduğu görüldü.

Bu bulgular ışığında konfirme edilmiş RIF+INH dirençli suşlar MDR-TB olarak kabul edilecek olursa bölgemiz için MDR-TB oranının %5.5 olduğu görülür. Bu oran DSÖ tarafından yıllık yeni MDR-TB için verilen %5.3'lük Dünya ortalamasına yakındır. Ancak ülkemizde yapılan direnç tespit çalışmalarında farklı sonuçlara ulaşılmıştır. MDR-TB de minor ilaç direnci ile ilgili ülkemizde yapılan çalışmalarda

sınırlıdır. Yapılan sınırlı sayıda çalışmada MDR-TB kökenlerinde içinde florokinolon ve aminoglikozitlerin de bulunduğu ikinci seçenek ilaç direnci araştırılmıştır. Çalışmaların çoğunda CLSI'nin⁶⁰ önerileri doğrultusunda aminoglikozitlerin temsilcisi olarak kanamisin (KA) florokinolonların temsilcisi olarak ofloksasin (OFX) kullanılmıştır. Biz de çalışmamızda RIF+INH dirençli suşlardaki minor anti-TB ilaç direncini tespit amacı ile MOX, PAS, C ve P kullandık. Çalışma sonunda 8 izolatta her üç yöntemle olmak üzere 19(%57.5) izolatta en az bir yöntemle MOX direnci, 1'i her üç yöntemle olmak üzere 19(%57.5) örnekte C direnci, 4'ü her üç yöntemle olmak üzere 18 (%54.5) örnekte P direnci ve 12 (%16.3) izolatta da en az bir yöntemle PAS direnci tespit ettik. Buna karşılık 4 izolat her 3 yöntemle de negatif bulunurken (%12), toplam 7 (%22.1) örnek de en az 2 yöntemle tüm minor ilaçlara karşı duyarlı bulundu.

Ülkemizde minor ilaçlara karşı duyarlılık tespitini amaçlayan çalışma sayısı son derece azdır. Bu çalışmalardan birisinde, Edirne'de, Tansel Ö. ve arkadaşları⁶¹, Middlebrook 7H9 mikrodilüsyon yöntemi kullanarak yaptıkları çalışmada, 64 MDR-TB kökeninde CIP, C ve AK direncini araştırmışlar ve direnç oranlarını sırasıyla %17.2, %51.6 ve %43.7, tüm ilaçlara karşı direnç % 9.4 bulunmuşlardır. Bizim çalışmamızda bu çalışma da kullanılan ilaçlardan sadece C kullanılmış olup, C direnci kullanılan en az bir yöntemler %57.5, MGIT-960 yöntemi ile ise % 33.4 olarak bulunmuştur. Dolayısı ile sadece MGIT-960 sonuçları baz alınarak bir kıyaslama yapıldığında C direncinin bölgemiz izolatlarda daha düşük oranda görüldüğü ancak her 3 tesp sonuçları dikkate alınır ise oranımızın bu çalışmada elde edilen orandan az da olsa yüksek olduğu görülmektedir. Bizim MGIT-960 yöntemi ile tüm minor ilaçlara karşı dirençli bulunan izolat sayımızda 1 (%3.3) olup bu grubun tüm ilaçlara dirençli suş sayısından oldukça düşüktür. Yine tüm ilaçlara karşı en az bir yöntemle dirençli bulunan izolat sayımız ise 2(%6.06) olup, bu oran bile bu grubun tüm ilaçlara dirençli suş oranından oldukça düşüktür. Diğer taraftan Ankara'da Kayalı R. ve ark². tarafından, Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden izole edilen, 50 MDR-TB izolatında LJ proporsiyon yöntemiyle yapılan bir başka çalışmada, KA, PAS, C ve OFX'e karşı direnç oranları sırasıyla %6, %6, %0 ve %4 bulunmuştur. Bizim çalışmamızda bu çalışmada kullanılan PAS ve C kullanılmış olup aynı yöntemle bu iki ilaç için elde ettiğimiz direnç oranları sırası ile %18.1 ve %36.3 dür. Bizim oranlarımızın oldukça yüksek oluşu, bölgesel bir özellik olabileceği gibi standardizasyonla ilişkili bir hataya da bağlanabilir. Çünkü bu iki ilaç için bizim

kullandığımız diğer iki yöntemle (MGIT ve NRA) elde ettiğimiz direnç oranları PAS için sırası ile % 12.5 ve %30,3, C için ise %33 ve %60.4 dür. Bu oranlar araştırmacının bu iki ilaç için verdikleri % 6 ve %0'lık değerlerinden oldukça yüksektir. Nitekim Kayalı ve arkadaşlarıda C için direnç oranını %51.6 olarak vermişlerdir. Diğer taraftan 75 MDR-TB izolatındaki OFX, KA direncini Bactec 460 ve agar proporsiyon yöntemiyle irdeleyen Şatana D⁶³. ve arkadaşları bu iki ilaca karşı her iki yöntemle de direnç tespit edemediklerini bildirmişlerdir. MDR-TB suşlarındaki bu duyarlılık oranları şaşırtıcı olup ancak ilacın bölgede kullanılmamış olması ile izah edilebilirdi. Ancak çalışmada bu açıklanmamıştır.

Oysa Aslan G. ve arkadaşları⁶⁴ tarafından Mersin'de yapılan bir çalışmada 91 non-MDR-*M. tuberculosis* izolatında, BACTEC 460 yöntemiyle CIP ve AK direnci sırasıyla; % 1.1, % 2.2 olarak tespit edilmiştir. MDR *M. tuberculosis* kökenleri arasında CIP ve AK direnci belirlenmemiştir. Çavuşoğlu C. ve arkadaşları⁶⁵ tarafından İzmir'de agar proporsiyon ve E-test yöntemiyle yapılan benzer bir çalışmada, 100 *M. tuberculosis* kökeninden birinci seçenek ilaçlara duyarlı iki kökende (% 2) OFX ve CIP direnci bildirilirken, Seyfikli Z. ve arkadaşları⁶⁶ tarafından Sivas'ta LJ proporsiyon yöntemiyle yapılan çalışmada, primer antitüberküloz ilaçlara duyarlı ve dirençli toplam 200 *M. tuberculosis* kökeninde CIP direncini % 13, MDR *M. tuberculosis* kökenlerinde CIP direnci % 11.3 olarak bildirilmiş, bu kökenlerde OFX direnci belirlenmemiştir.

Türkiye'de MDR *M. tuberculosis* kökenlerinde ikinci seçenek ilaçlara karşı direncin araştırıldığı çalışmalardan elde edilen sonuçlar Tablo 12'de özetlenmiştir.

Tablo 12. Türkiye’de MDR *M. tuberculosis* kökenleriyle yapılan çalışmalarda ikinci seçenek ilaçlarla direnç

Araştırmacı	Çalışılan köken sayısı	Kullanılan yöntem	Kinolon/Aminogli-kozit direnci (MİK değerleri)	Diğer minör ilaçlara direnç
Tansel ve ark ⁶¹ .	64 MDR-TB	Mikro-dilüsyon	CIP %17.2, MİK; 4µg/ml AK %43.7 MİK; 8µg/ml	C (%51.6) Klaritromisin (%45.3) ETH (%67.2) Doksisisiklin (%81.2)
Oğuz ve ark ⁶² .	32 MDR-TB	LJ-proporsiyon	KA (%9.3) MİK;20-30 µg/ml	Sikloserin (%18.7) C (%12.5)
Şatana D ⁶³ .	75 MDR-TB	Bactec ve Agar Proporsiyon	KA (%0) OFX (%0)	Rifabutin (%83) PAS (%4) C (%1.3) Klofazimin (%1.3)
Kayalı ve ark ² .	50 MDR-TB	LJ-proporsiyon	KA (%6) MİK; 30µg/ml OFX (%4) MİK;2µg/ml	ETH (%22) Sikloserin (%8) Tiasetazon (%2) PAS (%6) C (%0)
Seyfikli ve ark ⁶⁶ .	44 MDR-TB	LJ-proporsiyon	CIP(%11.3) MİK;2µg/ml OFX (%0) MİK;2µg/ml	

Balabanova Y. ve arkadaşları⁶⁸ 2005 yılında 69 MDR-TB kökeninde AK direncini % 7.2, CIP direncini % 4.3 olarak bildirmişlerdir.

Dünyada minor ilaç direnci ile ilgili verilerde ülkemizdeki gibi değişkenlik göstermektedir. Wang JY. ve arkadaşları⁶⁹ ve Huang ST. ve arkadaşları⁷⁰ tarafından Tayvan’da yapılan çalışmalarda ise MDR-TB kökenlerinde OFX ve CIP direnci sırasıyla % 19 ve % 15.2 olarak bildirilirken Prammananan T. ve arkadaşları⁷¹ tarafından Tayland’da yapılan çalışmada, 99 MDR-TB kökeninde CIP ve OFX direnci % 10, KA ve AK direnci % 5 olarak bildirilmiştir.

Tüm dünyada MDR-TB kökenlerinde florokinolon direncinin daha yüksek olduğu bildirilmiş ve daha önce florokinolon kullanımı ile florokinolon direnci arasında ilişki olduğu belirtilmiştir. Florokinolonlara karşı direnç oranları Tayvan’da tüm

kökenlerde % 6.2, MDR-TB'de % 22.2, Filipinler'de tüm kökenlerde % 35.3, MDR *M. tuberculosis*'de % 51.4, Kanada ve ABD'de tüm kökenlerde % 1.8, MDR *M. tuberculosis*'de % 4.1 olarak bildirilmiştir.

Genel bir değerlendirme yaptığımız zaman bizim çalışma sonuçlarımızın daha yüksek oranlar gösterdiği belirlenmiştir. Bunun nedeninin bölgesel özelliklerden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Diğer taraftan MOX direncinin yapılan tüm çalışmalardaki florokinolon direncinden çok daha yüksek bulunmasını bu ilaca karşı yapılacak duyarlılık testlerindeki standartların oturtulamamışlığına bağladık. Nitekim bir anlamda rezerv gibi tutulması önerilen bu ilaçla ilgili olarak geniş vaka serilerine rastlanmamaktadır. Kullandığımız minör antitüberküloz ilaçların çalışmalarda seçilen ilaçlar olmaması da sonuçların farklı çıkmasına yol açmıştır. Önerilen ilaçlar genelde kanamisin ve ofloksasin olmuştur ve yapılan çalışmalar da bu yöndedir. Ayrıca kullanılan yöntemlerinde farklı farklı olması değerlendirmede soruna yol açmıştır. Biz de bu çalışmamızda nitrat redüktaz testinin proporsiyon ve MGIT-960 yöntemine göre daha az duyarlı olduğunu gördük ve bu neden yapılan çalışmalarda temel olarak proporsiyon yöntemi kullanılmıştır.

Ülkemizde ve dünya çapında yapılan çalışmalar da gösteriyor ki çok değişken sonuçlar alınmıştır. Bunun nedeni ise yeterli miktarda minör antibiyotiklerle ilgili çalışma yapılmamış olmasıdır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada; bölgemizde bulunan aktif tüberkülozlu hastalardan tanı ve temas öykülü kişilerden tarama amaçlı olarak toplanarak Çukurova Üniversitesi Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi-Bölge Tüberküloz Laboratuvarına gönderilen MDR-TB tanımına uyan 33 *M. tuberculosis* klinik izolatı bazı minor antibiyotiklere karşı duyarlılıkları yönünden 3 farklı yöntemle irdelendiği bu çalışma sonunda:

1-Bölgemizde 2 yıllık periyoda değerlendirilen 27.457 balgam örneğinden izole edilen 254 izolat içerisinde 14(% 5.51)'inin RIF+INH dirençli MDR suşlar oldukları ve bu sebeple MDR-TB yayılımı konusunda ilgili birimlerin daha duyarlı olmaları gerektiği,

2-Sağlıklı verilerin elde edilebilmesi, gerçek direnç oranlarının belirlenebilmesi için Türkiye'nin tüm bölgelerinde toplanan kökenlerin standart bir yöntemle ikinci seçenek ilaçlara karşı direnç profillerinin belirlenmesi gerekli olduğu

3-Dirençli olgularda uygun tedavi protokollerinin seçilebilmesi için Türkiye'deki düzey III Mikobakteriyoloji Laboratuvarları standardize edilmiş duyarlılık yöntemleriyle gerektiğinde ikinci seçenek ilaç duyarlılığını belirleyebilecek altyapının mutlaka oluşturulması gerektiği

4-Daha hızlı sonuç vermekle beraber sensitivite ve spesifitesi düşük olan nitrat redüktaz proporsiyon duyarlılık testi yerine proporsiyon duyarlılık testi veya MGIT-960 yönteminin minor antibiyotik duyarlılığının belirlenmesinde faydalı olacağı sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- 1- **Palomino JC, Leão SC, Ritacco V.** Tuberculosis. **2007**.
- 2- **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.
- 3- **Köksal F.** Tüberküloz basilinin kaynak ve evrimi. *Tüberküloz Sempozyum kitapçığı*, Malatya: **2003**; 34-47.
- 4- **Köksal F.** Mycobacterium tuberculosis'te direnç problemi. I.Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya. 12-16 Kasım **2011**; 92-94.
- 5- **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.
- 6- **Daniel TM.** The History of Tuberculosis. *Respiratory Medicine*. **2006**; 1862-1870.
- 7- **Çoban H.** *Mycobacterium tuberculosis*' e ait ESAT-6 VE CFP-10 proteinlerinin ekspresyonu, farklı hasta gruplarında IFN- γ VE IL-10 yanıtlarının saptanması. Uzmanlık tezi, İzmir, **2007**.
- 8- **Zeytinli Ü.** Çukurova Bölgesinde Akciğer Tüberkülozlu Hastalardan İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* Suşlarının Spolygotyping ve MIRU-VNTR Yöntemiyle Tiplendirilmesi. Uzmanlık tezi, Adana, **2010**.
- 9- **Barış İY.** Dünyada Tüberkülozun Tarihçesi. *Toraks Dergisi*, **2002**; 338-340.
- 10- **Barış İY.** Çağlar Boyu Tüberküloz. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Ofset Basım. Samsun. **2003**; 1-7.
- 11- **Altıntop Y.** *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks İzolatlarında Çeşitli Duyarlılık Yöntemlerinin Karşılaştırılması. Uzmanlık tezi, Kayseri, **2008**.
- 12- **Karlıkaya C.** Tüberküloz Ders Notları.
<http://celalkarlikaya.trakya.edu.tr/TBdernot.htm>. **1998**
- 13- **Bozkurt H.** Çok İlaça Dirençli *Mycobacterium tuberculosis* Kökenlerinde Artmış İlaç Direncinin Tespiti. Uzmanlık tezi, İzmir, **2009**.
- 14- **Santo AH.** Deaths attributed to multiple causes and involving tuberculosis in the state of Rio de Janeiro Brazil between 1999 and 2001. *J Bras Pneumol*. **2006**; 544-552.
- 15- **Peterson R.** Molecular Epidemiology of Tuberculosis. *Karolinska Institutet*, Sweden, **2009**.
- 16- **Johnson R, Strecicher EM, Louw GE, Warren RM, et al.** Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* curr. *Issues Mol. Biol*. **2009**; 8: 97-112.
- 17- **Günal S.** Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden toplanan *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarının IS6110RFLP (restriction fragment length polymorphism) ve spoligotyping profillerinin belirlenmesi. Doktora tezi. Malatya, **2006**.

- 18- **Kyung W, Eun J, Go Eun C, Kyung H, Chulhun L. Chang** Strain Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Korea by Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number of Tandem Repeats. *J Korean Med Sci*. **2010**.
- 19- **Jyoti A, Urvashi S, Tanu R, Jitendra NP.** Charcterization of predominant *Mycobacterium tuberculosis* strains from different subpopulations of İndia. *Joun. Micr*. **2009**.
- 20- **Özkara S, Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H.** Türkiye’de Tüberkülozun Kontrolü için Başvuru Kitabı, Sağlık Bakanlığı, Verem Savaş Daire Başkanlığı, **2003**.
- 21- T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Dairesi Başkanlığı: Türkiye’de Verem Savaşı 2009 Raporu. Ankara, **2009**.
- 22- **Oelemann M, Roland D, Sabine R, Camille L, Stefan N, and Philip S.** Assessment of an Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit-Variable-Number Tandem-Repeat Typing System Combined with Spoligotyping for Population-Based Molecular Epidemiology Studies of Tuberculosis. *Rio de Janeiro, RJ, Brasil*. **2007**.
- 23- <http://www.who.int/tb/publications/globalreport/2006/pdf/fullreportcorrectedversion.pdf>
- 24- Global Tuberculosis Control Surveillance, Planing, Financing WHO Report 2008. WHO/HTM/2008; 93.
- 25- **Zorluer E.** Yöremizde İzole Edilen *Mycobacterium Tuberculosis* Suşlarında Direnç Profili. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniv Tıp Fak. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana, **2010**.
- 26- **Murray PR,** (editor in chief) *Manual of Clinical Microbiology* Nolte., FS, Metchock, B. sixth edition Asm Press Washington D.C. **1995**; 400- 437.
- 27- **Köksal F, Yaman A.** Farklı bir bakteri topluluğu mikobakterilerde hücre duvarı yapısı. *21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu*, Samsun. **2003**; 34-47.
- 28- **Özışık N.** Çok ilaca 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**.
- 29- www.ncbi.nlm.nih.gov
- 30- **Köksal F.** Tüberküloz Kurs Kitapçığı. Adana, **2008**; 15-20
- 31- **Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC.** Mycobacteria. In Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th Ed. Philadelphia, Lippincott; *JCM*. **1997**; 893-946.
- 32- **Çavuşoğlu C.** *Mycobacterium tuberculosis*’de Moleküler Antibiyotik Duyarlılık Test Yöntemleri. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Ofset Basım. Samsun. **2003**; 367.
- 33- **Wayne LG, Kubica GP.** Mycobacteria In: P.H.A.Sneath, (ed), Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. *JCM* **1986**; 1435-1457.
- 34- [www. PLoSPathog.org](http://www.PLoSPathog.org)
- 35- **Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van SoolingenD, Cole ST.** A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2002**; 3684-3689.

- 36- **Çetin M.** Tüberküloz Basilleri Kompleksi'nin İzoniazid ve Rifampisin Duyarlılıklarının Real-Time PCR (Floresans Rezonans Enerji Transferi) Yöntemi ile Araştırılması. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi. Samsun. **2002**.
- 37- **Oğuz A.** Tüberküloz Basilinin Bulaş Yolları ve Konaktaki Seyri. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Ofset Basım. Samsun. **2003**; 48.
- 38- **Della-Latta P, Weitzman I.** Mycobacteriology. In: Isenberg HD (ed). Essential Procedures for Clinical Microbiology. Washington DC: *ASM Press*. **1998**; 169-183.
- 39- **Pfyffer GE, Brown-Elliott BA, Wallace RJ.** Mycobacterium In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington DC: **2003**; 532-559, 1156-1164.
- 40- **Glickman J.** Microbial Pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis: Dawn of a Discipline. *Cell* **1999**; 104 (4): 477-485.
- 41- **Kıyan M.** Mycobacteriaceae. Ustaçelebi S, Cengiz AT (Ed). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara: Günes Kitabevi; **1999**; 419-455.
- 42- **Alp A.** Non-moleküler tekniklerin tanı amaçlı kullanımları. IV. Tüberküloz sempozyumu kitabı, Malatya, **2005**;98-103.
- 43- **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.
- 44- **Pablo B, Natalia K, Barun M, Xiao-Ming W, Barry K.** Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates Using IS 6110-Based Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *BMC*. **2009**.
- 45- **Tansel Ö.** Klasik Antibiyotik Duyarlılık Test Yöntemleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Ofset Basım. Samsun. **2003**; 347-351.
- 46- **Aydın O.** Zonguldak İlinde İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* Suşlarının Primer Antitüberküloz İlaçlarına Duyarlılığın BACTEC MGIT 960 Sistemiyle Belirlenmesi. Uzmanlık Tezi. Zonguldak. **2006**.
- 47- **Saniç A, Çoban A.** Mikobakteriler ve Laboratuvar Tanı Kitabı. Samsun. **1999**; 23-26
- 48- **Kocabas A.** Akciger tüberkülozu In: Topçu Wilke A, Söyletir G, Doganay M, (ed). Enfeksiyon Hastalıkları 1. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri **1996**; 396-443.
- 49- **Ducati RG, Ruffino-Netto A, Basso LA, et al.** The resumption of consumption- a review on tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2006**; 101 (7): 1-9.
- 50- **Özkara S.** Dünyada ve Türkiye'de çok ilaca dirençli tüberküloz. 6. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu kitabı, Kızılcahamam, **2006**; 197-204.
- 51- Anti-Tuberculosis Drug Resistance in The World Report No: 4, WHO/HTM/TB **2008**; 394.
- 52- **Durmaz R.** *Mycobacterium tuberculosis*'de Direnç Sorunu. *ANKEM Dergisi*. **2005**; 19 (2): 107-110.

- 53- **Yolsal N, Malat G, Dişci R, Örkün M, Kılıçaslan Z.** Türkiye’de Tüberküloz İlaçlarına Direnç Sorununun 1984-1989 ve 1990-1995 Yılları İçin Karşılaştırılması; Meta-Analiz. *Klinik Dergisi*. **1998**; 11(1): 6-9.
- 54- **Çilli A.** Antitüberküloz İlaçlar ve Etki Mekanizmaları. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Ofset Basım. Samsun. **2003**; 163-170.
- 55- **Zhang Y.** The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. **2005**; 45: 529-564.
- 56- **Mitchison D.** Mechanisms of the action of drugs in the short-course chemotherapy. *Bull Int Union Tuberc* **1985**; 60: 36-40.
- 57- **Musser MJ.** Antimicrobial Agent Resistance in Mycobacteria: Molecular Genetic Insights. *Clinical Microbiology Reviews*. **1995**; 8 (4): 496-514.
- 58- **Kılıçaslan Z.** Dünyada ve Türkiye’de Tüberküloz. *ANKEM Dergisi*. **2007**; 21: 76-80.
- 59- **Jassal M, Bishai RW.** Extensively drug-resistant tuberculosis. *The Lancet infectious disease*. **2009**; 9(1): 19-30.
- 60- **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia, and other aerobic Actinomycetes; Tentative Standard – Second Edition NCCLS document M24T2. Pennsylvania USA. **2002**.
- 61- **Tansel Ö, Yüksel P, Kuloğlu F, Akata F.** *Mycobacterium tuberculosis* Kökenlerinin Antitüberküloz İlaçlara Direnci: Trakya Üniversitesi Hastanesi’nin İki Yıllık Sonuçları. *İnfeksiyon Dergisi*. **2003**; 17 (1): 23-26.
- 62- **Oğuz VA, Akbal H, Sarıbaş S, Karagöz T, Öztürk R.** Edinsel Çok İlaça Dirençli *Mycobacterium tuberculosis* Kökenlerinin Majör ve Minör Antitüberküloz İlaçlara Duyarlılığı. *İnfeksiyon Dergisi*. **2000**; 14(3): 383-386.
- 63- **Şatana D.** Çoğul İlaça Dirençli *M. tuberculosis* Kompleksi Kökenlerinin Sekonder İlaçlara Duyarlılığının BACTEC ve Agar Proporsiyon Yöntemleri İle Araştırılması. 4. Ulusal Mikobakteri Sempozyum Kitabı. Catigrafik. Bolu. **2002**;198.
- 64- **Aslan G, Direkel Ş, Otağ F, Akdenizli E, Emekdaş G.** Mersin Bölgesinde İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* Suşlarında Amikasin ve Siprofloksasin Duyarlılığı. *ANKEM Dergisi*. **2006**; 20 (3): 164-168.
- 65- **Çavuşoğlu C, Saydam ÇÇ, Burhanoglu D, Özkalay N, Özkaya D, Özçam H, Bilgiç A.** *Mycobacterium tuberculosis* Kökenlerinde Ofloksasin ve Siprofloksasin Duyarlılığının Saptanmasında Standart Proporsiyon Dilüsyon İle Etest Yönteminin Karşılaştırılması. *Mikrobiyoloji Bülten*. **2002**; 36: 118-123.
- 66- **Seyfikli Z, Ünsal M, Yener O, Yalçın AN, Dursun G.** *Mycobacterium Tuberculosis*’in Ofloksasin ve Siprofloksasin’e İn Vitro Primer Direnci. *İnfeksiyon Dergisi*. **1994**; 8(3-4): 99-102.
- 67- **Centers for Disease Control and Prevention.** Extensively Drug Resistant Tuberculosis, United States, 1993-2006, Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR). **2007**; 56 (11): 250-253.

- 68- **Balabanova Y, Ruddy M, Hubb J, Yates M, Malomanova N, Fedorin I, Droniewski F.** Multidrug-resistant tuberculosis in Russia: clinical characteristics, analysis of second-line drug resistance and development of standardized therapy. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. **2005**; 24: 136-139.
- 69- **Wang YJ, Lee NL, Lai CH, Wang KS, Jan SI, Yu JC, et al.** Fluroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates: associated genetic mutations and relationship to antimicrobial exposure. *Journal of Antimicrobial Chemoterapy*. **2007**; 59: 860-865.
- 70- **Huang ST, Kunin MC, Lee JS, Chen SY, Tu ZH, Liu CY.** Trend in fluoroquinolone resistance of *Mycobacterium tuberculosis* complex in a Taiwanse medical centre: 1995-2003. *Journal of Antimicrobial Chemoterapy*. **2005**; 56: 1058-62.
- 71- **Prammananan T, Arjratanakool W, Chaiprasert A, Tingtoy N, Leechawengwong M, Asawapokee N, et al.** Second-line drug susceptibilities of Thai multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. (Özet). *The International journal of tuberculosis and lung disease*. **2005**; 9(2): 216-219.

ÖZGEÇMİŞ

25.05.1985 tarihinde Adana’da doğdu. İlköğrenimini Gülek Koleji’nde, ortaöğrenimini Cebesoy İlköğretim Okulu’nda, lise öğrenimini ise Danişment Gazi Anadolu Lisesi’nde tamamladı. 2009 yılında Lisans eğitimini Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü tamamladı. 2009 yılında ise Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitimine başladı. İyi derecede İngilizce bilmektedir.