



T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AKCİĞER TÜBERKÜLOZLU HASTALARDA PCR
YÖNTEMİYLE DIŞKIDA *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
KOMPLEKS DNA'SININ VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Feyza Nur AŞKIN

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Deniz GAZEL

GAZİANTEP

NİSAN-2024



T.C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**AKCİĞER TÜBERKÜLOZLU HASTALARDA PCR
YÖNTEMİYLE DIŞKIDA *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
KOMPLEKS DNA'SININ VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Feyza Nur AŞKIN

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Deniz GAZEL

GAZİANTEP

NİSAN-2024

TEZ ONAY SAYFASI

**T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**AKCİĞER TÜBERKÜLOZLU HASTALARDA PCR YÖNTEMİYLE
DIŞKIDA *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* KOMPLEKS DNA'SININ
VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

DR. FEYZA NUR AŞKIN

03.04.2024

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

Prof. Dr. Şevki Hakan EREN

Tıp Fakültesi Dekanı

Bu tez çalışmasının “Tıpta Uzmanlık” derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Tekin KARSLIGİL

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile “Tıpta Uzmanlık” tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

Doç. Dr. Deniz GAZEL

Tez Danışmanı

TEZ JÜRİSİ:

1. Prof. Dr. Tekin KARSLIGİL
2. Prof. Dr. Yasemin ZER
3. Doç. Dr. Deniz GAZEL

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca üzerimde emeği geçen başta tez danışmanım Doç. Dr. Deniz GAZEL olmak üzere çok kıymetli hocalarım Prof. Dr. Tekin KARSLIGİL ve Prof. Dr. Yasemin ZER'e, hasta toplama sürecimde desteklerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Füsün FAKILI'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmamda yardımları için Gaziantep Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji tüberküloz birimi çalışanları Şükran BUĞUR ve Betül YILMAZ'a, tez verilerinin istatistiğinde ve tezin yazım düzeninde yardımlarından dolayı Mustafa IŞIK'a dört yıl boyunca beraber çalıştığım tüm laboratuvar çalışma arkadaşlarıma ve beraber çalışmaktan büyük keyif aldığım asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez yazım sürecimde kıymetli yardımlarıyla yanımda olan Muhammet Mustafa ARIMAN'a hayatım boyunca destek ve sevgisini esirgemeyen anneme, ona benzemekten gurur duyduğum babama ve kardeşlerim Sena ve Muhammet'e sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Feyza Nur AŞKIN

GAZİANTEP 2024

ÖZET

AKCİĞER TÜBERKÜLOZLU HASTALARDA PCR YÖNTEMİYLE DIŞKIDA *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* KOMPLEKS DNA'SININ VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI, UZMANLIK TEZİ, GAZİANTEP, 2024

Amaç: Tüberküloz tüm dünyada en çok ölüme neden olan enfeksiyöz kaynaklı hastalıkların başında gelmektedir. Bu sebeple kişilerin tedaviye erken başlamasını sağlamak ve hastalığın yayılmasını önlemek için erken tanı çok önemlidir. Tanıda balgam en sık kullanılan örnektir. Fakat her hasta rahatlıkla balgam çıkaramamaktadır. Özellikle ileri yaştaki hastalar, nörolojik defisiti olan hastalar ve çocuklar balgam üretebilse bile bunu rahatlıkla çıkaramamaktadır. Balgam çıkaramayan hasta gruplarında invaziv yöntemlerle farklı örnekler alınabilse de bu durum hem hasta için travmatik hem de maliyetlidir. Dünya Sağlık Örgütü tarafından 2022 yılından beri çocuk ve adölesanlarda dışkı örneğinin akciğer tüberkülozunda tanısal bir örnek olarak kullanılması önerilmektedir. Çalışmamızda erişkin akciğer tüberkülozlu hastaların dışkısı PCR yöntemiyle değerlendirilerek *M. tuberculosis* kompleks DNA'sı araştırılmış ve dışkının akciğer tüberkülozu tanısında örnek olarak kullanılabilmesi değerlendirilmiştir.

Gereç ve Yöntem: Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi Göğüs Hastalıkları polikliniğine başvuran tüberküloz ön tanılı 20 hasta ve sağlıklı 20 gönüllü çalışmaya dahil edilmiştir. Hasta ve sağlıklıların balgam ve dışkı örnekleri toplanmıştır. Balgam örnekleri ARB, kültür ve Xpert MTB/RIF Ultra ile değerlendirilmiş, dışkı örnekleri ise sadece Xpert MTB/RIF Ultra ile değerlendirilmiştir.

Bulgular: Sağlıklı gönüllülerin ARB, balgam kültür, balgam PCR ve dışkı PCR sonuçları değerlendirildiğinde tamamı negatif olarak saptandı. Hasta gönüllülerin tamamının balgam PCR sonucu pozitif bulundu. Hastalardan % 40'ının (n:8) balgam ARB sonucu pozitif, kalan % 60'ının balgam ARB sonucu negatif saptandı. Hastaların % 85'inin balgam kültür sonucu pozitif, kalan %15'inin ise negatif değerlendirildi. Hastalardan % 10'u dışında tamamının (n:18) dışkı PCR sonucu pozitif saptandı. Hastalardan % 15'inin balgam kültür sonucu negatif olmasına rağmen balgam PCR sonucu pozitif. Aynı hastalardan ikisinin dışkı PCR sonucu da pozitif. Bir hastanın ise balgam PCR ve kültür sonuçları pozitif olmasına rağmen dışkı PCR sonucu negatif saptandı. Balgam kültür sonucu referans olarak kabul edildiğinde dışkı PCR testinin duyarlılığı % 94,1, özgüllüğü % 91,3, pozitif prediktif değeri % 88,8 ve negatif prediktif değeri % 95,4 şeklinde hesaplandı.

Sonuç: Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre dışkı balgam örneği veremeyen akciğer tüberkülozlu hastalarda basilin tespit edilebileceği bir örnek olarak akla gelmelidir.

Anahtar Kelimeler: Tüberküloz, Xpert MTB/RIF Ultra, dışkı

Çalışma TF.UT.23.12'nolu Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri'nin desteği ile yapılmıştır.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE PRESENCE OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX DNA IN STOOL BY PCR METHOD IN PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS

**MEDICAL MICROBIOLOGY DEPARTMENT,
SPECIALIZATION THESIS, GAZİANTEP, 2024**

Aim: Tuberculosis is one of the leading infectious diseases that cause the most deaths all over the world. For this reason, early diagnosis is very important to ensure that people start treatment early and prevent the spread of the disease. Sputum is the most commonly used example in diagnosis. But not every patient can easily remove sputum. Especially elderly patients, patients with neurological deficits and children, even if they can produce sputum, they cannot easily remove it. Although different samples can be taken by invasive methods in groups of patients who cannot expectorate, this situation is both traumatic and costly for the patient. It is recommended by the World Health Organization to use stool sample as a diagnostic sample for pulmonary tuberculosis in children and adolescents since 2022. In our study, the stool of adult patients with pulmonary tuberculosis was evaluated by PCR method. *M. tuberculosis* complex DNA has been investigated and it has been evaluated that feces can be used as an example in the diagnosis of pulmonary tuberculosis

Material and Method: 20 patients with a preliminary diagnosis of tuberculosis and 20 healthy volunteers admitted to the Pulmonology outpatient clinic of Gaziantep University Şahinbey Research and Application Hospital were included in the study. Sputum and stool samples of sick and healthy people were collected. Sputum samples were evaluated with ARB, culture and Xpert MTB/RIF Ultra, while stool samples were evaluated only with Xpert MTB/RIF Ultra.

Results: When the ARB, sputum culture, sputum PCR and stool PCR results of healthy volunteers were evaluated, all of them were found to be negative. The sputum PCR result of all patient volunteers was found to be positive. The sputum ARB result of 40% of the patients was positive, and the sputum ARB result of the remaining 60% was negative. Sputum culture results of 85% of the patients were evaluated positively and the remaining 15% were evaluated negatively. All but 10% of the patients (n:18) had positive stool PCR results. Although the sputum culture result of 15% of the patients was negative, the sputum PCR result was positive. The stool PCR result of two of the same patients was also positive. Although the sputum PCR and culture results of one patient were positive, the stool PCR result was negative. When the sputum culture result was accepted as a reference, the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of the stool PCR test were calculated as 94.1%, 91.3%, 88.8% and 95.4% respectively.

Conclusion: According to the data obtained in our study, stool should be considered as a sample in which bacilli can be detected in patients with pulmonary tuberculosis who cannot provide a sputum sample.

Key words: Tuberculosis, Xpert MTB/RIF Ultra, stool

The study was conducted with the support of Gaziantep University Scientific Research Projects numbered TF.UT.23.12

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
RESİMLER VE ŞEKİLLER.....	xi
TABLolar	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mikobakterilerin Genel Özellikleri	3
2.1.1. Hücre Duvarı	4
2.2. Tüberküloz Enfeksiyonu	5
2.2.1. Epidemiyoloji	5
2.2.2. Tüberküloz Patogenezi ve İmmünite	7
2.2.3. Tüberküloz Klinik Semptom ve Bulguları	8
2.3. Tüberküloz Laboratuvar Tanısı	8
2.3.1. Örneklerin Alınması	8
2.3.2. Örneklerin İşlenmesi.....	12
2.3.3. Mikroskopik İnceleme	12
2.3.4. Kültür yöntemleri.....	14
2.3.5. İdentifikasyon	16
2.3.6. İlaç Duyarlılık Yöntemleri.....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Hasta Gönüllü Grubun Seçilmesi ve Örneklerin Toplanması	25
3.2. Kontrol Grubunun Seçilmesi ve Örneklerin Toplanması	26
3.3. Toplanan Balgam Örneklerinin İşlenmesi.....	26
3.4. Toplanan Balgam Örneklerinin Mikroskopik Olarak Değerlendirilmesi.....	27
3.5. Toplanan Balgam Örneklerinin Kültür Değerlendirmesi	27
3.6. MGIT 960 Sistemi ile Duyarlılık Araştırılması	28
3.7. Toplanan Balgam Örneklerinin PCR Değerlendirmesi	29
3.8. Toplanan Dışkı Örneklerinin PCR Değerlendirmesi.....	30
3.8. İstatistiksel Yöntem	31

4. BULGULAR.....	32
5. TARTIŞMA	36
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	42
7. KAYNAKLAR	43
EKLER.....	55



SİMGELER VE KISALTMALAR

AMS	: Açlık Mide Suyu
ARB	: Aside Resistant Bacil - Aside Dirençli Basil
AUC	: Area Under the Curve
BAL	: Bronkoalveoler Lavaj
Bkz.	: Bakınız
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
CFU	: Colony Forming Unit
CLSI	: Clinical and Laboratory Standarts Institute
cm	: Santimetre
COVID 19	: Koronavirüs Hastalığı 2019
Ct	: Cycle treshold
ÇİD-TB	: Çoklu İlaç Dirençli Tüberküloz
DGT	: Doğrudan Gözetimli Tedavi
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EEA1	: Erken Endozomal Otoantijen 1
EZN	: Erlich Ziehl-Neelsen
g	: Gram
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
IL-1	: İnterlökin-1
INH	: İzoniazid
IS	: İnsertion element
İDT	: İlaç Duyarlılık Testi
LAM	: Lipoarabinomannan
LAMP	: Loop-mediated isothermal amplification
LJ	: Löwenstein Jensen
LOD	: Limit of Detection
LPA	: Line prob assay
MGIT	: Mycobacterium Growth Indicator Tube
MIRU	: Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
ml	: Mililitre
MTBK	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleksi
NALC	: N-Asetil-L-Sistein
NaOH	: Sodyum hidroksit
NPD	: Negatif Prediktif Değer
OADC	: Oleik asit-Albümin-Dekstroz-Katalaz
OSF	: Optimized Sucrose Flotation-Optimize Edilmiş Sükroz Yüzdürme
PANTA	: Polimiksin B -Azlosilin-Trimetoprim-Amfoterisin B
PCR	: Polymerase Chain Reaction-Polimerize Zincir Reaksiyonu
PNB	: Paranitrobenzoik asit
PPD	: Purified Protein Derivative-Safrastırılmış Protein Türevi
PPD	: Pozitif Prediktif Değer
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RIF	: Rifampisin

RR (RD)	: Rifampicin Resistant-Rifampisin Dirençli
RRDR	: Rifampicin resistance determining region
SIRE	: Streptomisin-İzoniazid-Rifampisin-Etambutol
SOS	: Simple One Step
SPS	: Sodyum Polianetol Sülfonat
TB	: Tüberküloz
TDM	: Tüberküloz Dışı Mikobakteriler
TNF- α	: Tümör Nekrozis Faktör- α
UV	: Ultraviyole
VNRT	: Variable Number of Tandem Repeat
YİD-TB	: Yaygın İlaç Dirençli Tüberküloz
μ l	: Mikrolitre
μ m	: Mikrometre



RESİMLER VE ŞEKİLLER

Şekil 2. 1. Mikobakterilerin duvar yapısı	4
Şekil 2. 2. Örneklerin işlenmesi akış diyagramı	12
Şekil 2. 3. Tüberküloz kültürü için kullanılacak besiyerleri	14
Şekil 2. 4. Yaygın kullanılan ilaç duyarlılık yöntemleri	19
Şekil 5. 1. Referans yöntem ile optimize edilmiş yöntemin karşılaştırılması	39



TABLÖLAR

Tablo 2. 1. Akciğer tüberkülozu tanısında kullanılacak örneklerin özellikleri	9
Tablo 2. 2. Xpert MTB/RIF veya Ultra ile çalışılan pediatrik numune türlerinin değerlendirilmesi.....	11
Tablo 2. 3. Boyama yöntemlerinin karşılaştırılması	13
Tablo 2. 4. Yaymaların değerlendirilmesi.....	14
Tablo 4. 1. Hasta ve sağlıklı gönüllülerin sosyodemografik verileri	32
Tablo 4. 2. Hasta gönüllülerin ARB, kültür balgam PCR ve dışkı PCR sonuçları ...	33
Tablo 4. 3. Balgam kültür ve dışkı PCR sonuçlarının karşılaştırılması	34
Tablo 4. 4. Balgam kültür ve balgam PCR sonuçlarının karşılaştırılması	34
Tablo 4. 5. Balgam PCR ve dışkı PCR sonuçlarının karşılaştırılması	35
Tablo 4. 6. Balgam kültür-balgam PCR-dışkı PCR sonuçlarının toplu analizi.....	35



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tüberküloz hastalığına akciğer tüberkülozlu hastaların hava yoluyla ortama yaydığı *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi neden olmaktadır (1). Dünya nüfusunun yaklaşık olarak dörtte birinin tüberküloz (TB) ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir (2). Ancak mikroorganizma ile karşılaşan herkes hastalık geçirmemekte, kişilerin çoğunda basil vücuttan temizlenmektedir (3, 4). Her yıl TB hastalığı gelişen kişilerin % 90'ını yetişkinler oluşturmakta olup erkekler kadınlara oranla TB hastalığına daha fazla yakalanmaktadır (1).

TB önlenabilir ve genellikle de tedavi edilebilir bir hastalık olmasına rağmen 2022 yılında, tüm dünyada tek bir enfeksiyöz ajandan ölüm nedeni olarak koronavirüs hastalığı (COVID-19) sonrası ikinci sırada yer almaktadır. Bununla birlikte 2022 yılında Human Immunodeficiency Virus (HIV) sebebiyle ölen kişi sayısının neredeyse iki katı sayıda ölüme neden olmuştur (1). Yılda tahmini olarak 10 milyon kişi TB hastalığına yakalanırken tedavi edilmediğinde bu hastalık nedeniyle gerçekleşen ölümler yaklaşık % 50 gibi yüksek bir orana karşılık gelmektedir (5). Ancak günümüzde uygulanan tedavilerle hastaların yaklaşık % 85'inde kür sağlanmaktadır (1).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre 2022 yılında dünya genelinde yeni tanı alan kişi sayısı 7,5 milyona ulaşırken bu sayı küresel tüberküloz verilerinin izlemeye başlandığı 1995 yılından beri ulaştığı en yüksek sayı olmuştur. Bu duruma muhtemelen COVID-19 sebebiyle sağlık sisteminde yaşanan aksaklıklar sebebiyle oluşan hasta sayısındaki birikim neden olmuştur. Bunun yanında yine DSÖ verilerine göre 2022 yılında yaklaşık 1,3 milyon kişi TB hastalığı sebebiyle hayatını kaybetmiştir. Bu sayı ise 2020 ve 2021 yıllarına göre gerileyerek 2019 seviyesine geri dönmüştür (1).

TB enfeksiyonunun en sık görülen formu olan akciğer tüberkülozunun tanısında balgam kültüründe TB basilinin üretilmesi altın standart yöntemdir (1). Ancak kültürün sonuçlanma süresi altı haftaya kadar uzayabilmektedir (6). Bunun aksine Polimerize Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi birkaç saat gibi kısa bir sürede,

% 60 ile % 100 arasında değişen bir duyarlılıkta, balgamda tüberküloz basilinin varlığını saptayabilmektedir (7-11). Fakat özellikle immün yetmezlikli hastalarda yeterince balgam üretimi olmamaktadır. Çocuklar, ileri yaştaki hastalar, nörolojik defisiti olan hastalar gibi bir grup hasta balgam üretebilse bile bunu rahatlıkla çıkaramamaktadır. Bu durumlarda tanı konamadığı için tedavide gecikmelere ve hastalığın daha fazla kişiye yayılmasına sebep olmaktadır (12).

Solunum salgılarının bir kısmı fizyolojik olarak yutulmaktadır (13). Yutulan salgılardaki tüberküloz basili aside dirençli olduğu için mide sıvısında ve gastrointestinal sistemde saptanabilmektedir (14). Bu sebeple balgam veremeyen hastalardan solunum yolu örnekleri bazı invaziv yöntemlerle, nazofaringeal aspirat, bronkoalveolar lavaj veya açlık mide suyu şeklinde alınabilmektedir (15). Fakat bu örneklerin elde edilmesi hem hasta için travmatik hem de maliyetli olabilmektedir. Bununla birlikte gastrointestinal sisteme geçen ve ağızdan aldığımız maddelerle karışan bu salgılar dışkı ile vücuttan atılmaktadır. Dışkı örneği hem maliyetsizdir hem de noninvaziv bir şekilde elde edilebilmektedir. Bu nedenle dışkı örneği de balgam örneği veremeyen akciğer tüberkülozlu hastalarda basilin genetik materyalinin tespit edilebileceği bir örnek olarak kullanılabilir (13). DSÖ akciğer tüberkülozlu çocuklarda ve adölesanlarda dışkı örneğinde PCR yönteminin tüberküloz basilinin saptanmasında kullanılmasını 2022 yılında yayınlanan Konsolide Tüberküloz Rehberi (modül 5)'nde önermektedir (16).

Çalışmamızın amacı yetişkin popülasyonda, akciğer tüberkülozlu ve sağlıklı gruplardan alınan dışkı örneklerinin PCR yöntemiyle çalışılarak dışkının akciğer tüberkülozu tanısında geçerli bir örnek olup olamayacağını değerlendirmektir. Literatür tarandığında bu alanda Türkiye'de yapılan herhangi bir çalışma mevcut değildir. Bu sebeple çalışmamız ülkemizde akciğer tüberkülozlu hastalarda PCR yöntemiyle dışkıda *M. tuberculosis* kompleks DNA'sının varlığını araştıran ilk çalışma olmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikobakterilerin Genel Özellikleri

Mikobakteriler fakültatif aerob, sporsuz, hareketsiz ve katalaz aktivitesi pozitif bakterilerdir. Hafif kıvrık veya düzgün çomak yapısında, dallanabilen, 1,0-10 µm boyunda, 0,2-0,6 µm eninde olan hücre içi yaşayabilen basillerdir (17). Mikobakteriler *Actinomycetales* takımı içerisinde yer alan *Mycobacteriaceae* ailesinin tek üyesidir (18).

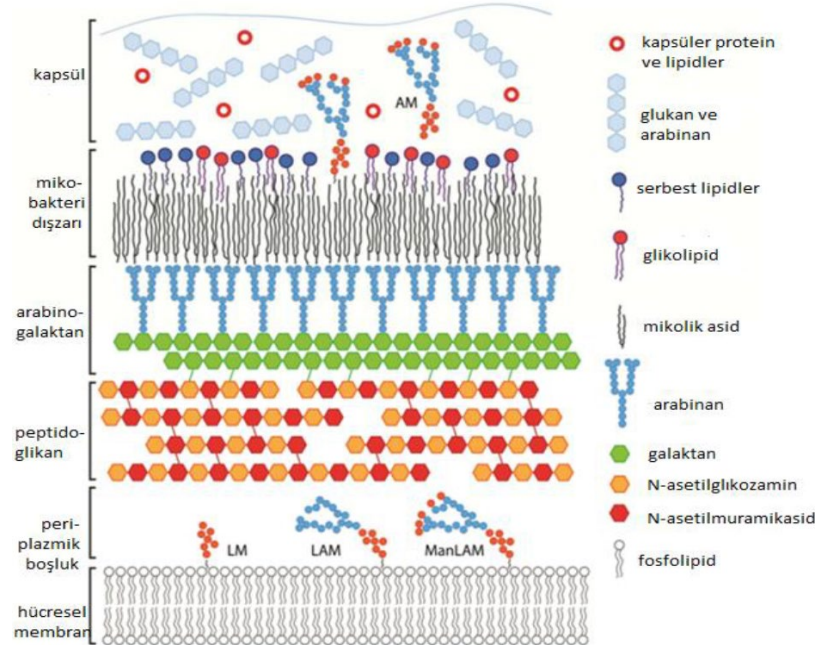
Mycobacterium cinsi içinde 2019 yılı itibariyle 200'den fazla tür tanımlanmıştır (19). Bu türler arasında patojen, fırsatçı patojen ve patojen olmayan (saprofit) mikobakteriler bulunmaktadır. Patojen mikobakteriler, TB ve lepra gibi hastalıklara neden olan mikroorganizmalar olarak ikiye ayrılmaktadır. TB'ye neden olan mikobakteriler, *M. tuberculosis* kompleksi (MTBK) adı verilen bir grup içinde sınıflandırılır. Bu grup içinde yer alan türler şunlardır: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. caprae*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. pinnipedi*, *M. mungi* ve *M. orygis* (20-22).

Mikobakterilerin hücre duvar yapısı diğer bakterilerin hücre duvar yapısından farklıdır. Mikobakterilerin lipidden zengin kompleks hücre duvar yapısı bakterinin karakteristik özelliklerinin büyük bölümünden sorumludur. Hücre duvarı Gram boyamada kullanılmakta olan basit anilin boya ile boyanmaz. Basiller bir kere boyandıklarında asit solüsyonları ile boyalarını bırakmazlar bundan dolayı “aside dirençli basil (ARB)” olarak adlandırılmışlardır (23). Aside dirençli boyanma özelliği mikobakteriler dışında *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Legionella micdadei*, *Cryptosporidium* ve *Isospora* gibi mikroorganizmalarda da bulunmaktadır. Ancak bu bakteriler mikobakterilerle kıyaslandığında daha kısa mikolik asit zincirine sahiptirler ve daha açık renkli boyanmaktadırlar. Bu sebeple bu türler kısmi aside dirençli olarak da nitelendirilmektedirler (24). Mikobakterilerin ikiye bölünme süreleri 18 saattir, bu nedenle uygun sıcaklıkta kolonilerin görülmeye başlaması ortalama olarak 2-60 gün sürmektedir. Bu da MTBK kültür incelemesinin diğer bakterilerle kıyaslandığında çok uzun sürede sonuçlanmasına sebep olmaktadır (23).

M. tuberculosis kompleks dışındakiler TB dışı mikobakteriler (TDM) veya atipik mikobakteriler olarak adlandırılmaktadırlar. Fırsatçı patojen veya saprofit olabilen mikobakterilerdir (23, 25). Runyon tarafından TDM'ler 1950 yılında dört gruba ayrılmıştır. Bunlar gruplar: hızlı üreyenler, fotokromojenler, skotokromojenler ve nonkromojenlerdir (26).

2.1.1. Hücre Duvarı

Hücre duvarı üç ana komponent içermektedir. İçte plazma membranı, peptidoglikan ve arabinogalaktanı içeren orta tabaka, en dışta yer alan kapsülden oluşmaktadır (27). Plazma zarının çift katlı fosfolipid yapısının iç tabakasında peptidoglikan tabakası bulunmaktadır. Bu tabaka, glikan yapıdaki bir omurga ve kısa peptid yan zincirlerinden oluşup hücreye şekil verirken rijitlik ve stabilite sağlamaktadır. Peptidoglikan tabakaya fosfodiester bağı ile bağlı olan arabinogalaktan tabakası ortada yer almaktadır. Bu arabinogalaktanlar, mikolik asitlerle kovalent bağlarla bağlıdır ve bu yapı mikolikarabinogalaktan peptidoglikan iskeletini oluşturmaktadır. Lipoarabinomannan (LAM), serbest lipid, mannofosfoinositid ve polipeptidlerin de bulunmasıyla bu yapının sağlamlığı artmaktadır. (28-30). Hücre duvarının yapısı Şekil 2.1'de gösterilmektedir (31).



Şekil 2. 1. Mikobakterilerin duvar yapısı (31)

Mikobakterilerin hücre duvarının ağırlığının yaklaşık % 50'sini mikolik asitler oluşturmaktadır. Bunlar aynı zamanda hücre yüzey geçirgenliğini belirleyen kuvvetli hidrofobik moleküllerdir. Bu yüzden, hücre duvarının lipidden zengin olması, boyanın hücre içine penetrasyonunu engelleyerek basilin "aside dirençlilik" özelliğini kazanmasına neden olmaktadır (30, 32). Mikolik asit, trehaloz ile esterleşerek kord faktörünü oluşturmaktadır. Bu kord faktörü (Trehaloz 6,6' dimikolat), genellikle MTBK üyeleri tarafından üretilir ve önemli bir virülans faktörüdür. Kord faktörü, özellikle kültür ortamında üretilen kolonilerden hazırlanmış olan preparatlarda bakterilerin yılankavi kordonlar oluşturmaya neden olmakta ve aynı zamanda polimorfonükleer lökosit migrasyonunu inhibe etmektedir. Granülom oluşumunu uyarmak gibi çeşitli fonksiyonlara da sahiptir (32, 33). Duvar yapısında bulunan gliko-konjuge lipidlerden biri olan LAM fagozomal olgunlaşmayı inhibe ederek konak hücre içinde mikobakterilerin canlılığını sürdürmesine olanak tanımaktadır (33, 34).

2.2. Tüberküloz Enfeksiyonu

2.2.1. Epidemiyoloji

Tüberküloz hastalığı dünya genelinde en çok mortalite ve morbiditeye yol açan hastalıklardan biri olduğu için hastalıkla mücadelede epidemiyolojik verilerin büyük önemi bulunmaktadır. Bu veriler, hastalığın yayılma şekli, risk faktörleri, etkilenen gruplar ve enfeksiyon kontrolü stratejilerinin belirlenmesinde büyük bir rol oynamaktadır. Bu nedenle tüberkülozla mücadelede etkin bir epidemiyolojik izleme ve veri analizi süreci önemlidir (1). Tüberkülozun ilk büyük epidemilerinin, dünyanın en eski yerleşik medeniyetlerinin bulunduğu Mezopotamya bölgesindeki yerleşik hayatla birlikte ortaya çıktığı ve ardından Doğu Asya, Akdeniz bölgesi, Rusya ve Kuzey Avrupa dâhil olmak üzere diğer bölgelere yayıldığı varsayılmaktadır (35). Günümüzde dahi uygulanan tüm teşhis, tedavi ve koruma yöntemlerine rağmen tüberküloz hala insan hayatını ciddi şekilde tehdit eden önemli bir enfeksiyon hastalığı olarak kabul edilmektedir (1).

Büyük kısmı Afrika ve Asya ülkeleri olmak üzere toplamda 30 ülke tüm dünyada TB vakaların % 87'sini oluşturmaktadır. 2022 yılında TB vakalarının üçte ikisini şu sekiz ülke oluşturmaktaydı: Hindistan (% 27,0), Endonezya (% 10,0), Çin

(% 7,1), Filipinler (% 7,0), Pakistan (% 5,7), Nijerya (% 4,5), Bangladeş (% 3,6) ve Demokratik Kongo Cumhuriyeti (% 3,0) (1). Tüberkülozun Asya ve Afrika'da yüksek insidans göstermesinin başlıca nedenleri olarak yoksulluk, evsiz bireylerin artışı, HIV pozitifliği ve tüberküloz ilaç direnci gösterilmektedir (23, 36).

DSÖ verilerine göre COVID 19 salgını tüberküloz tanı ve tedavisi üzerinde son yıllarda olumsuz etkiler oluşturmıştır. 2019 yılına kadar DSÖ'nün küresel tüberküloz hedefleri yönünden yıllar içinde katettiği başarı tersine dönmüş ve hedeflenen durumun gerisinde kalınmıştır. Yeni bildirilen tüberküloz tanılı hasta sayısındaki bariz düşüş görülen en büyük etki olmuştur. Bu sayı 2019 yılında 7,1 milyon ile zirvedeyken 2020 yılında 5,8 milyona düşerek % 18'lik bir azalma göstermiştir. Bu değerler daha önce en son 2012 yılında görülen değerler olmuştur. 2020 yılında bu sayı 6,4 milyon kişiye yükselmiştir (2016-2017 seviyesi). 2020 ve 2021 yılında tanı alan hasta sayısındaki azalmayla birlikte tanı almamış ve tedavi edilmemiş hasta sayısı artmıştır. Bu durum sonrasında ilk olarak tüberküloz kaynaklı ölümlerin artışıyla sonuçlanmış daha sonra da toplumda enfeksiyonun yayılmasına ve tüberkülozlu hasta sayısının artışına neden olmuştur (37). 2022 yılında ise rakamlarda büyük bir toparlanma yaşanmıştır. Yeni bildirilen tüberküloz tanılı hasta sayısı 2022 yılında 7,5 milyon olarak bildirilmiş ve DSÖ tarafından küresel tüberküloz verilerinin izlendiği 1995 yılından beri en yüksek değere ulaşmıştır (1). Bu durumun oluşmasında asıl etken 2019-2021 yılları arasında COVID 19 nedenli sağlık sistemine erişmekte sorun yaşayan hasta popülasyonu olmuştur (37). DSÖ'nün 2023 raporuna göre 2022 yılında TB gelişen kişilerin % 55'i erkek, % 33'ü kadın ve % 12'si çocuklardan (0-14 yaş) oluşmuştur (1).

DSÖ verilerine göre 2022 yılında yaklaşık 1,3 milyon kişi TB hastalığı sebebiyle hayatını kaybetmiştir. Bu sayı ise 2020 ve 2021 yıllarına göre gerileyerek 2019 seviyesine geri dönmüştür. TB sebepli ölümler hastaların HIV durumu göz önüne alınarak değerlendirildiğinde, 1,13 milyon kişi HIV negatif, tahmini 167.000 kişi ise HIV pozitif bireylerden oluşmaktadır. 2022 yılında dünya genelinde tahminen 410.000 kişide çoklu ilaca dirençli veya rifampisine dirençli TB (ÇİD-RD TB) gelişmiştir (1).

DSÖ 2023 küresel tüberküloz raporuna göre 2022 yılında Türkiye'den yaklaşık 12.000 TB olgusu bildirilmiştir. Bu olguların yaklaşık 6.600'ünü erkekler, yaklaşık

5.200'ünü kadınlar, 740'ını ise çocuklar oluşturmaktadır. Olguların 47'sinin HIV pozitif olduğu tespit edilmiştir. 2022 yılında ülkemizde 310 kişi TB sebebiyle hayatını kaybetmiştir (1).

Ulusal Tüberküloz Kontrol Programı ülkemizde verem savaş dispanserleriyle başarıyla yürütülmektedir. TB vaka sayısı 2014 yılında 20.535 iken kontrol programları sayesinde 2020 yılında 8.358'e gerilemiştir ve TB insidansı yüz binde 10,6'dır. Olgu bildirimi yine 2020 yılında % 22,1 gibi beklenmedik şekilde yüksek bir oranda azalmıştır. Bu durum COVID 19 pandemisinin sağlık sistemi üzerine etkisine bağlanmıştır (38).

Türkiye'de ilaç duyarlılık testi (İDT) çalışılan yeni TB olgularında en sık görülen ilaç direnci olarak izoniazid direnci yıllar içinde %10-11 civarlarında seyretmiştir. Önceden tedavi görmüş olgularda ise tüm ilaçlara karşı direnç daha yüksektir. Ancak 2010 yılından bu yana görülen dirençlerde azalma mevcuttur. 2020 yılı için tek ilaç olarak en sık izoniazid (% 5,0) direnci saptanmıştır. 2020 yılında toplamda 113 ÇİD-TB hasta saptanmıştır. 113 olgunun 74'ü Türkiye doğumludur. Kalan 39'u ise Asya ve Afrika ülkeleri başta olmak üzere farklı ülke vatandaşlarıdır. ÇİD-TB oranı yeni olgularda % 77,9 iken (n= 88), nüks olgularda % 13,3 (n= 15) olarak saptanmıştır. TB olguları giderek daha yüksek oranda HIV için taranmaktadır. Tarama oranı 2010 yılında olguların % 3,5'i iken 2018'de % 71,1'e (n= 8.382) yükselmiştir. 2020 yılında olguların % 3,5'i (n= 4) HIV pozitif saptanmıştır (38).

Türkiye'de TB tanı ve takibinde en önemli rol verem savaş dispanserleridir. 2006 yılından beri TB tanı ve takibi sürecinde Dünya Sağlık Örgütü'nün önerdiği doğrudan gözetimli tedavi (DGT) yöntemi kullanılmaktadır. 2019 yılı sonunda 174 verem savaş dispanserinin faaliyet gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca mobil ekipler ile toplu yaşam alanlarında (cezaevi, huzurevi, askeri kurum, çocuk yuvası gibi) taramalar gerçekleştirilmektedir (38).

2.2.2. Tüberküloz Patogenezi

Tüberküloz hastalığı hasta kişilerin solunum hareketleri ile havaya saçtığı *Mycobacterium tuberculosis* kompleks basillerinin sonucu gelişmektedir (39). Basil vücutta akciğerlerde makrofajlar tarafından fagosite edilmekte ve hücre içinde

fagozom-lizozom birleşmesini engelleyerek canlı kalabilmektedir (23). Geliştirdiği reaksiyonlar ile 3-8 hafta sonucunda hücrel immünite ve geç aşırı duyarlılık reaksiyonu gelişir. Bu aşama sonrasında hastalara uygulanan PPD testi pozitif sonuçlanır (23, 40).

2.2.3. Tüberküloz Klinik Semptom ve Bulguları

Pulmoner tüberküloz hastalarında ateş, öksürük, kilo kaybı, gece terlemesi, hırıltı ile beraber hafif düzeyde nefes darlığı görülebilmektedir (41). Semptomlar en sık 2 hafta veya daha uzun süren produktif ya da nonproduktif olabilen öksürük olmak üzere, hemoptizi, göğüs ağrısı, sırt ve yan ağrısı, eğer larinks tutulumu varsa da ses kısıklığı şeklindedir (42). Çocuklarda sık görülen semptomlar ise ateş (% 94,3), öksürük (% 77) ve kilo kaybı (% 55,2)'dır (43). Bu semptomların biri ya da daha fazlası olan hastalarda tüberkülozdan şüphelenmek gerekir, bazı hastalarda hiçbir semptom olmayabilir (44).

Muayene bulguları akciğer tüberkülozunda genellikle azdır. Lokalize ral, ronküs duyulabilmektedir. Konsolide alan varsa bronşial ses duyulabilmektedir. Subfebril ateş, kaşeksi gibi nonspesifik bulgular olabilir. Fizik muayene ayırıcı tanıda daha çok yardımcı olmaktadır (38).

2.3. Tüberküloz Laboratuvar Tanısı

Tüberküloz ile mücadelenin en etkin yolu, hastalığın erken tanısı ve doğru bir şekilde tedavi edilmesiyle bulaş zincirinin kırılmasıdır (45). Tüberküloz hastalığının tanısı klinik, histopatolojik, immünolojik ve mikrobiyolojik yöntemlerle konulabilmektedir. Tüberkülozun kesin tanısı ise basilin klinik örneklerde saptanması ile konur. Tüberküloz laboratuvarlarında mikroskopik inceleme, kültür, kültürde üreyen mikobakteri türünün tanımlanması ve ilaca duyarlılığının saptanmasıyla olmaktadır. Moleküler yöntemler de tanıya yardımcıdır (46).

2.3.1. Örneklerin Alınması

Tüberkülozun doğru teşhisi için hasta örneğinin doğru bir şekilde alınması ve uygun şekilde laboratuvara taşınması son derece önemlidir. Hastalığın etkilediği organa bağlı olarak akciğer veya diğer organlardan farklı tipte örnekler alınır. Örnek

alırken aseptik şartlara dikkat edilmeli, örnekler steril kaplara konulmalı ve hiçbir koruyucu kimyasal madde eklenmemelidir. Örneklerin doğru şekilde etiketlenmesi de büyük önem taşır. Örneğin alındığı kabın üzerinde hasta adı-soyadı, alınma tarihi ve örnek türü gibi bilgiler bulunmalıdır. Ayrıca, testi isteyen merkez veya hekimin iletişim bilgileri de istem formunda veya otomasyon sisteminde yer almalıdır. Bu önlemler örneklerin doğru işlenmesini ve tanının doğru konulmasını sağlar (47).

Akciğer tüberkülozu tanısında kullanılan en sık örnek balgamdır. Kullanılabilecek diğer örnekler indüklenmiş balgam, bronkoalveoler lavaj (BAL), endotrakeal aspirat, açlık mide suyu (AMS), akciğer doku biyopsi örneği ve bu örneklerin hiçbiri alınmadığı durumlarda larinks sürüntüsüdür (45). Bu örneklerin alınmasında dikkat edilmesi gereken durumlar Tablo 2.1’de özetlenmiştir.

Tablo 2. 1. Akciğer tüberkülozu tanısında kullanılacak örneklerin özellikleri (48)

Örnek Türü	Alınacak Örneğin Özellikleri
Balgam	Sabah erken saatlerde minimum 3 ml olacak şekilde alınmalıdır. Balgam veremeyen hastalarda indüklenmiş balgam düşünülmelidir. Bütün yaş gruplarından toplanabilir.
İndüklenmiş Balgam	Hastaya salin solutularak mümkünse sabah erken saatte alınmalıdır. Miktarı minimum 3 ml olmalıdır. İndüklenmiş balgam alınamadığı durumlarda diğer örnekler düşünülmelidir. Bütün yaş gruplarından toplanabilir.
Açlık Mide Suyu	Nazogastrik aspirasyon yolu ile mide içeriğindeki yutulmuş olan balgam-mide sıvısı karışımı toplanmaya çalışılır. Sabah erken saatte alınması önerilir. 7 yaş altı için uygundur.
Nazofaringeal Aspirat	Bu yöntemle nazofarenkste solunum salgıları toplanır. Hastanın öğürme refleksi uyarılabilir. Buna dikkat edilmelidir. 7 yaş altı için uygundur.
Bronkoalveolar Lavaj	Basilin saptanması açısından balgam veya mide aspirat sıvısına üstünlüğü yoktur. Bütün yaş grupları için uygundur.
Dışkı	Örnek gün içinde herhangi bir saatte toplanabilir. İdrar ile kontamine olamamasına dikkat edilmelidir. Xpert MTB/RIF veya Ultra ile değerlendirilmeden önce birkaç basit işlemden geçirilmelidir. Noninvaziv olması avantajıdır.

Dünya Sağlık Örgütü, akciğer tüberkülozu tanısında sabah alınmış en az iki balgam örneğinin ARB incelemesinin yeterli olduğunu belirtmiştir. Yapılan çalışmalarda, ikinci örnekle duyarlılığın ortalama % 11,1 arttığı, üçüncü örnekle ise %3,1 arttığı tespit edilmiştir. Bu nedenle, tüberküloz tanısında en az iki örneğin alınması önerilmektedir. Üçüncü örneğin ARB saptanmasına katkısı minimaldir (49).

Akciğer tüberkülozu tanısında en sık kullanılan örnek balgam olmasına rağmen her hasta tarafından rahatlıkla çıkarılamamaktadır. Özellikle çocuklar, nörolojik defisiti olan hastalar, HIV pozitif hastalar, yaşlı ve yoğun bakım hastaları gibi genel durumu kötü olan hastalar hem yeterli balgam üretememekte hem de üretilen balgamı kolayca çıkaramamaktadır (50-57). Göreceli olarak immunsuprese hasta gruplarında azalmış bir inflamatuvar yanıt mevcuttur. Bu durum balgam üretimini engelleyebilmektedir (58). Bu durumda alternatif olarak balgam indüksiyonu, gastrik aspirasyon, bronkoskopi ve nazofaringeal aspirasyon gibi invaziv ve hasta açısından zahmetli yöntemlere başvurulabilmektedir (56, 59-63). Fakat bu yöntemler ağırlı, hasta için konforsuz, maliyetli ve biyogüvenlik açısından risklidir (13, 64). Aynı zamanda nitelikli teknik ekip, ekipman ve hatta bazen hastanın hastanede yatışını gerektirmektedir (64-67). Yine birinci basamak sağlık kuruluşlarında alınamamaktadır (57). Bu invaziv işlemlerin ayrıca hasta için potansiyel komplikasyonları da mevcuttur (15).

Normal mukosiliyer aktivitenin bir parçası olarak solunum salgıları yutulmaktadır (68, 69). Tüberküloz basili yutulan salgılarla birlikte mide sıvısına karışmaktadır. MTBK suşları aside dirençli oldukları için mide sıvısında tespit edilebilmektedir (14). Daha sonra mikroorganizma enterik kanalda potansiyel olarak hayatta kalıp dışkıyla atılabilmektedir (15, 70). Böylelikle dışkı örneği akciğer tüberkülozunda tanısız bir örnek olarak kullanılabilir (70).

DSÖ'nün 2022'de yayınladığı Konsolide Tüberküloz Rehberi (modül 5) de akciğer tüberkülozu bulguları olan çocuk ve adölesanlarda, başlangıç tanısında ve rifampisin direnci saptanmasında ilk aşamada ARB, kültür ve fenotipik ilaç duyarlılık testlerinin yerine Xpert MTB/RIF veya Ultra (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) ile balgam, nazofaringeal aspirat ve dışkı örneğinde MTBK saptanmasını önermektedir (16). Dışkı DSÖ tarafından MTBK tanısında kullanılması yeni önerilen bir örnektir

(16, 71). Özellikle yeterli solunum örneği elde edilemeyen akciğer tüberkülozlu hastalarda noninvaziv ve kolay bir şekilde elde edilebilen bir solunum örneği olarak kullanılabilmektedir. Elde edilen kanıtlar çocuklarda Xpert MTB/RIF veya Ultra ile çalışılan balgam ve gastrik aspiratın en yüksek basil saptama oranına sahip olduğunu, dışkının ise diğer solunum örnekleri ile benzer orana sahip olduğunu göstermektedir. Dışkının noninvazive elde edilmesi diğer örneklerle göre büyük bir avantajdır (16). Xpert MTB/RIF veya Ultra ile çalışılan pediatrik hastalarda numune türlerinin referans yöntem olan solunum örneklerinin kültürüyle duyarlılık ve özgüllük yönünden değerlendirilmesi Tablo 2.2. 'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir. ARB ve kültür için ise dışkının bakteriyolojik verimi balgam ve gastrik aspirata göre daha düşüktür (48). Dışkı örneklerini kullanırken, numuneyi Xpert kartuşuna yerleştirmeden önce bir ön işleme adımı gereklidir. Optimize edilmiş sükröz yüzdürme (OSF) ve Basit tek adımlı (SOS) dışkı işleme yöntemi gibi farklı dışkı işleme yöntemleri, Xpert MTB/RIF ve Ultra testleri için geliştirilmiştir (48).

Tablo 2. 2. Xpert MTB/RIF veya Ultra ile çalışılan pediatrik numune türlerinin değerlendirilmesi* (48)

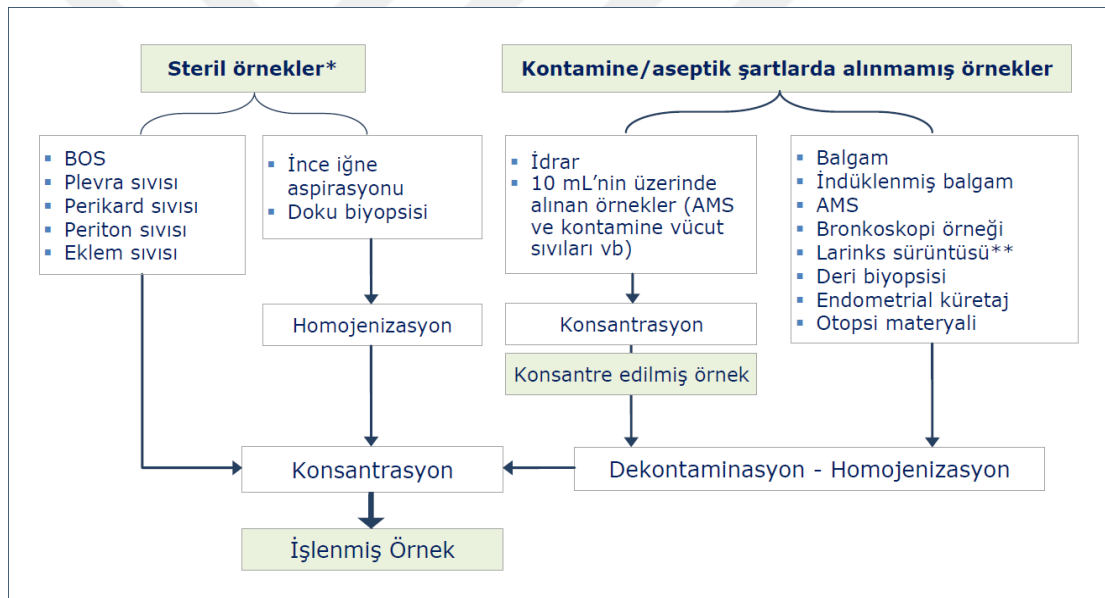
Örnek Tipi	Duyarlılık	Özgüllük	Kanıt Değeri
Xpert MTB/RIF			
Balgam	0.65	0.99	Orta
Gastrik Aspirat	0.73	0.98	Çok düşük (duyarlılık) Düşük (özgüllük)
Nazofaringeal Aspirat	0.46	1.00	Orta (duyarlılık) Yüksek (özgüllük)
Dışkı	0.61	0.98	Düşük (duyarlılık) Orta (özgüllük)
Dışkı (HIV-pozitif)	0.70	0.98	Düşük (duyarlılık) Yüksek (özgüllük)
Xpert Ultra			
Balgam	0.73	0.97	Düşük (duyarlılık) Yüksek (özgüllük)
Gastrik Aspirat	0.64	0.95	Orta
Nazofaringeal Aspirat	0.46	0.98	Çok düşük (duyarlılık) Düşük (özgüllük)
Dışkı	0.53	0.98	Orta

*Referans yöntem olarak solunum örneklerinin kültürü kullanılmıştır.** Dünya Sağlık Örgütü tarafından hazırlanan Operational Handbook on Tuberculosis Module 5'den alınmıştır.

Tüberkülozun akciğer tutulumu dışında diğer organ ve sistemlerin tutuluma da neden olduğu görülmektedir (47). Tanı için etkilenmiş olan organa göre idrar, beyin omurilik sıvısı (BOS), doku biyopsi örneği, plevra, periton ve eklem sıvısı gibi steril vücut sıvıları, apse, kemik iliği ve kan örneği kullanılabilir (45).

2.3.2. Örneklerin İşlenmesi

Tanı için laboratuvara gönderilen örneklerin büyük kısmı steril değildir ve flora bakterileriyle kontaminedir. Örneklerde bulunan mukus gibi yapıların arasında gizlenmiş olan basilleri meydana çıkarmak ve basillerin örnek içerisinde homojen şekilde dağılmasını sağlamak için homojenizasyon-dekontaminasyon işlemi uygulanmaktadır (45). Örneklerin işleme diyagramı Şekil 2.2. 'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.



Şekil 2. 2. Örneklerin işlenmesi akış diyagramı (45)

*BOS: Beyin omurilik sıvısı, AMS: Açlık mide suyu **Şekil Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi'nden alınmıştır

2.3.3. Mikroskopik İnceleme

TB tanısında mikroskopik inceleme, gerçekten de uzun bir geçmişe sahip olan ve günümüzde hala yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, hastalığın hızlı bir şekilde tespit edilmesine ve tedaviye başlanmasına olanak tanırken, maliyet açısından da daha uygun bir seçenektir. Mikroskopik inceleme genellikle asit-alkol dirençli basil (ARB) boyalarıyla yapılarak tüberküloz basilinin hızlı bir şekilde gözlemlenmesini sağlar. Bu yöntem, özellikle gelişmekte olan ülkelerde tüberkülozun

hızlı tanısında ve kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır (72). Kullanan örnek çeşidine ve farklı boyama yöntemlerine göre mikroskopik inceleme duyarlılığı % 20-85 arasında değişmektedir (73).

ARB pozitifliği alınan örneğin mililitresinde yaklaşık olarak 5.000-10.000 basil olduğunda saptanabilmektedir. Bu sebeple tüberküloz şüphesi ile gelen tüm örnekler yayma duyarlılığının düşük olması sebebiyle ve üreme durumunda ilaç duyarlılık testi yapılabilmesi amacıyla mutlaka altın standart olan kültür işlemi uygulanmalıdır (45).

Mikroskopik incelemede yayma, direkt örnekten veya işlenmiş örnekten hazırlanabilmektedir. Basilin görülme ihtimalini yükseltmek amacı ile işlenmiş örnekten yayma hazırlanması önerilmektedir. (47). Klinik örneklerde ARB varlığı araştırılırken kullanılan iki boyama yöntemi karbol fuksin ve florokrom boyama yöntemidir (45, 74).

- ✓ Karbol fuksin yöntemleri:
 - Erlich Ziehl-Neelsen (EZN)
 - Kinyoun
- ✓ Florokrom (floresan) yöntemleri:
 - Auramin O
 - Auramin-Rhodamin

Bu yöntemlerin avantaj ve dezavantajları ayrıntılı olarak Tablo 2.3'de gösterilmiştir.

Tablo 2. 3. Boyama yöntemlerinin karşılaştırılması (45)

		Karbol fuksin boyama		Florokrom boyama
		EZN	Kinyoun	Auramin O/Auramin-Rhodamin
Boyama	Bazik fuksin konsantrasyonu	% 0,3	% 3,3	Yok
	Fenol konsantrasyonu	% 4,5	% 6,7	% 3
	Isıtma	Var	Yok	Yok
	Büyütme	×1000*	×1000*	×250-×400
Mikroskopi	Görünüm	Mavi zeminde kırmızı basil		Karanlık zeminde sarı/turuncu floresan veren basil
	Göreceli duyarlılık	Orta	Düşük	Yüksek
	Göreceli özgüllük	Yüksek	Orta	Düşük**

*×1000 büyütme: ×100 objektif × ×10 oküler **EZN: Erlich Ziehl-Neelsen

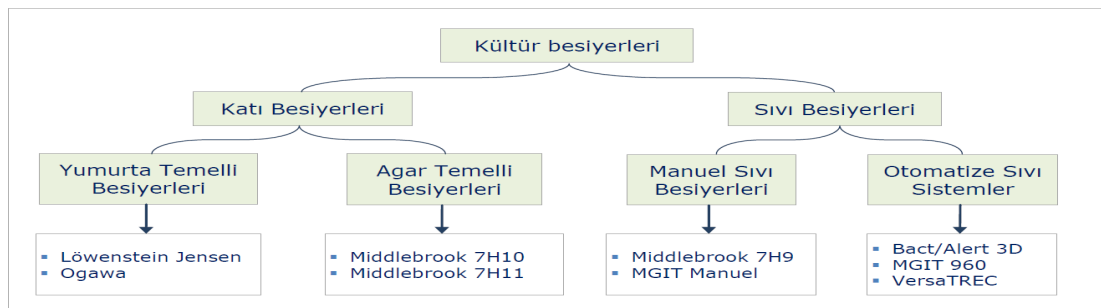
Mikroskopik olarak değerlendirme yapılırken preparata negatif diyebilmek için; ışık mikroskobu ile en az 300 alan, floresan mikroskop ile $\times 250$ büyütmede en az 30, $\times 400$ büyütmede en az 70 alan incelenmelidir. Karbol fuksin ile boyama yönteminde mavi zemine kırmızı basiller aranmaktadır (45).

Tablo 2. 4. Yaymaların değerlendirilmesi (47)

	Karbol fuksin boyama $\times 1000$	Florokrom boyama $\times 250$	Florokrom boyama $\times 400$
Negatif	0	0	0
Şüpheli	1-2/300 alan	1-2/30 alan	1-2/70 alan
+ (1 pozitif)	1-9/100 alan	1-9/10 alan	2-18/50 alan
++ (2 pozitif)	1-9/10 alan	1-9/1 alan	4-36/10 alan
+++ (3 pozitif)	1-9/1 alan	10-90/1 alan	4-36/1 alan
++++ (4 pozitif)	>9/1 alan	>90/1 alan	>36/1 alan

2.3.4. Kültür yöntemleri

Tüberkülozun kesin tanısı, basilin kültür ortamında üretilmesiyle konmaktadır. MTBK'nın bölünme süresi diğer bakterilere göre daha uzun olduğundan, kültürde üremeleri zaman almaktadır. Bu sebeple, üreme ve tanımlama süreci genellikle 6-8 haftaya kadar uzayabilmektedir (45). MTBK'nın üretilmesi için özgül besiyerler kullanılması gerekliliği önemlidir. Genellikle yumurta temelli veya agar temelli katı besiyerleri ile zenginleştirilmiş sıvı besiyerleri kullanılmaktadır. Çoğunlukla sıvı besiyerlerinde üreme daha hızlı olmaktadır. Ancak katı besiyerlerin avantajı kontamine olmuş kültürlerde kolonileri gözlemleyebilme imkanındır. Bu sebepler dikkate alındığında hem katı hem de sıvı besiyerlerinin birlikte kullanılması ve sonuçların birbirleriyle karşılaştırılması önerilmektedir (47). Kullanılabilecek besiyerleri Şekil 2.3. 'da özetlenmiştir.



Şekil 2. 3. Tüberküloz kültürü için kullanılabilecek besiyerleri (45)

*Şekil Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi'nden alınmıştır.

Kullanılacak besiyerleri ekonomik olmalı, kolay hazırlanmalı, hızlı üreme sağlamalı, mikobakterilerin dışındaki bakterilerin üremesine engel olmalı ve katı besiyerleri için üreyen koloni morfolojisi ile izolatların ön tanısı yapılabilmelidir (45).

Katı besiyerleri için üreme ve kontaminasyon takibinin ilk hafta iki defa, sonrasında 8. hafta sonuna kadar haftada bir defa yapılması önerilmektedir. Sıvı besiyerlerinin ise haftada iki defa bulanıklık, yüzeyde zar ve partikül oluşumu ile üreme takip edilmelidir (45).

2.3.4.1. Otomatize Sıvı sistemler

Günümüzde birçok laboratuvarında, tüberküloz basillerinin izole edilme süresinin kısılması ve izolasyon oranının artması nedeniyle hızlı kültür sistemleri rutin inceleme için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu sistemler genellikle sıvı besiyerleri kullanmakla birlikte, bifazik ve katı besiyerlerinin de kullanıldığı versiyonları bulunmaktadır. Bu sistemlerde gaz basıncındaki değişiklikler, CO₂ oluşumu ve oksijen kullanımı florometrik veya kolorimetrik olarak ölçülerek kültürün gelişimi izlenmektedir. BACTEC MGIT 960 (BD Biosciences, Sparks, MD), VersaTREK (ESP Culture System II) (Trek Diagnostics, Inc., Ohio), BacT/ALERT 3D (bioMerieux, Lyon, France) gibi ticari otomatize kültür sistemleri mikobakterilerin tanısı için geliştirilmiş örneklerdir (75).

2.3.4.1.1. BACTEC Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) 960 (BD, Sparks, MD)

BACTEC MGIT 960 sistemi, kültür tüplerinin cihaz içinde inkübasyonunun gerçekleştiği ve üreme kontrolünün otomatik olarak yapıldığı tamamen otomatize edilmiş bir ticari hızlı kültür sistemidir (23).

BACTEC MGIT 960 sistemi, Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içeren tüpleri kullanır ve bu tüplerin dip kısımlarında oksijene duyarlı rutenyum metal kompleksi içeren silikon bulunur. Örnekler eklenmeden önce, besiyerlerine oleik asit, albümin, dekstroza, katalaz (OADC) ve polimiksin B, azlosilin, trimetoprim, amfoterisin B (PANTA) gibi ilaçlar eklenir. Besiyerlerinde üreme olup olmadığını tespit etmek için UV ışını kullanılır. Üreme olmadığında, silikon tabakadaki UV ışığına karşı floresans

oluşmaz. Ancak üreme olduğunda, oksijen kullanımına bağlı olarak floresan madde serbest kalır ve UV ışınına karşı floresans oluşur. Bu floresans miktarı üreme birimi olarak değerlendirilir. Bu sistemin manuel olarak kullanılabilen BBL MGIT 4ml tüp besiyerleri de bulunmaktadır. Bu tüpler, UV ışığı altında makroskobik olarak değerlendirme yapılabilmesi için tasarlanmıştır ve kan dışındaki diğer tüm klinik örnekler için kullanılabilir. Yüksek kapasiteli laboratuvarlarda BACTEC MGIT 960 sistemi tercih edilirken, daha düşük kapasiteli laboratuvarlarda manuel besiyerleri kullanımı önerilmektedir (23).

2.3.4.1.2. VersaTREK (ESP Culture System II) (Trek Diagnostics, Inc., Ohio)

VersaTREK sistemi, selüloz sünger ve Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içeren bir sistemdir. Bu sistemde, mikroorganizmaların üremesi sonucu oluşan gaz basıncındaki değişiklikler ölçülerek değerlendirme yapılır. Sistemin bilgisayar destekli olması, oluşan gaz basıncındaki değişiklikleri grafiksel olarak görüntülemeyi sağlar. Besiyerlerine ekim yapmadan önce, mikobakterilerin üremesini desteklemek ve kontaminasyonu önlemek için OADC gibi bileşenler ve antibiyotik karışımı ilave edilir. Bu eklenen maddeler, mikobakterilerin uygun bir ortamda üremesini sağlayarak doğru sonuçların elde edilmesine katkıda bulunur (75).

2.3.4.1.3. BacT/ALERT 3D (bioMerieux, Lyon, France)

MB/BacT, Middlebrook 7H9 besiyeri içeren bir sistemdir ve besiyerin dip kısmında kolorimetrik bir sensör bulunur. Bu sensör, mikroorganizmaların üremesi sonucu oluşan CO₂ düzeyini ölçer ve bu sayede üremeyi değerlendirir. Sistem, bilgisayar desteğiyle çalışır ve besiyerleri sürekli olarak kontrol altında tutulur. Bu şekilde, mikroorganizmaların üremesi ve besiyerin değişen koşulları sürekli olarak izlenir ve değerlendirilir (75).

2.3.5. İdentifikasyon

Üreyen mikobakterilerin MTBK ve TDM olarak ayrımı oldukça önemlidir. Çünkü mikobakteri enfeksiyonlarının çoğunluğu MTBK'dan kaynaklanmaktadır. Bu nedenle identifikasyon sürecinde temel amaç MTBK'nın TDM'den ayrılmasını sağlamaktır. Bu ayrım genellikle üreme özellikleri ve biyokimyasal testler kullanılarak

yapılmaktadır. Ancak son yıllarda hızlı genotipik testlerin ve immünokromotografik yöntemlerin de kullanılmaya başlandığı görülmektedir. Bu yöntemler, biyokimyasal testlere göre daha hızlı sonuçlar verir ve değerlendirilmesi daha kolaydır (45).

2.3.5.1. Fenotipik Yöntemler

MTBK türleri üreme özelliklerine göre TDM'lerden ayırt edilebilmektedir. MTBK katı besiyerinde 7. günden itibaren R tipi, deve tüyü renginde pigmentsiz koloniler oluşturarak üremektedir. Sıvı kültürden üreme sonucu ARB boyama incelemesinde kord faktör (yılanvari oluşum) yaptıkları görülmektedir. Bütün bu özellikler yardımcı olmakla birlikte kesin bir ayırım yaptırmamaktadır (45).

MTBK'nın TDM'den ayırımında kullanılan biyokimyasal testler ve bu testlere ait MTBK sonuçları şu şekildedir:

- Katalaz testi; negatif
- Niasin birikim testi; pozitif
- Nitrat indirgenme testi; pozitif
- Paranitrobenzoik asit (PNB)'li besiyerinde üreme; üreme olmaz.

PNB'de üreme olmaması MTBK olarak değerlendirilmektedir.

Katalaz, niasin ve nitrat indirgenme testleri bir arada kullanılmalıdır, tek başlarına MTBK-TDM ayırımı yapamamaktadırlar (45).

Mikobakteri izolatlarının tanımlanmasında, mikolik asitlerin ekstraksiyonu ve ayrıştırılmasına dayanan kimyasal bir yöntem olan High Performance Liquid Chromatography (HPLC) kullanılabilir. Ekipman gerektirmesi ve uygulamadaki zorluklar nedeniyle yaygın kullanılmamaktadır (45).

2.3.5.2. Genotipik Yöntemler

Mycobacterium tuberculosis genomu homojendir. MTBK içerisinde yer alan türler birbirleriyle genetik olarak ilişkilidir (76). Moleküler yöntemler için hedef olan ribozomal RNA bakteri türleri arasında yüksek oranda korunurken, aynı zamanda filogenetik açıdan önemli değişken bölgeler içermektedir. 16S rRNA geninin PCR primerleri için uygun kombinasyonların oluşturulabileceği korunmuş bölgeler ve değişken bölgeler içermesi, hücre içerisinde çok sayıda kopyasının olması ve uygun

büyükölükte olması nedeni ile filogenetik tanımlama için tercih edilmektedir (77). Ayrıca MTBK önemli genetik çeşitliliğe sahiptir; genomunun geniş sekanslı polimorfizmler ve tek nükleotid polimorfizmleri içermesi filogenetik analizler için kullanışlı olmasını sağlamaktadır (78). Insertion element (IS) 6110, polimorfik GC açısından zengin tekrarlayan diziler (PGRSs), aralıklı kısa palindromik tekrarlar olarak düzenli kümelendiş polimorfizimler (CRISPRs) ve değişken numaralı ardışık tekrarlar (VNTR) gibi gen bölgeleri de MTBK tür tanımlanmasında kullanılan moleküler yöntemlerin hedefleridir (79-81).

2.3.5.3. İmmünokromotografik Yöntem

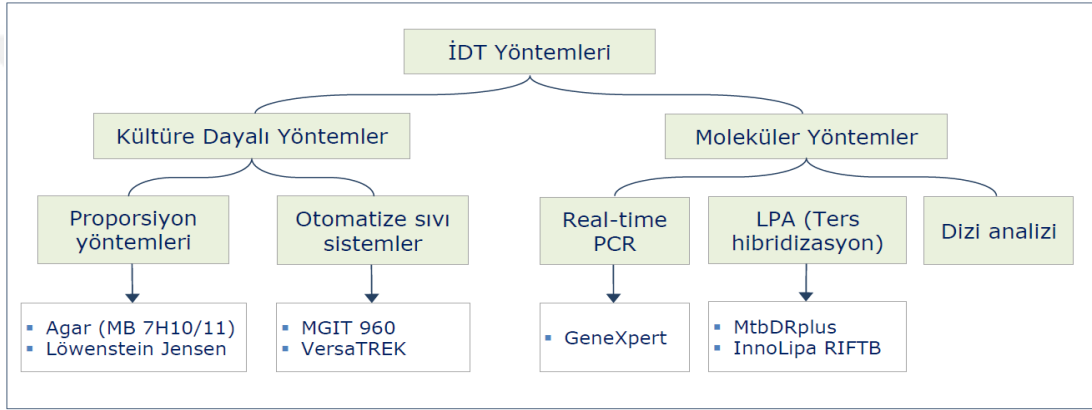
MTBK'ya özgü MPT64 antijeninin immünokromotografik temelli yöntemlerle saptanması, MTBK-TDM ayrımında kullanılan önemli bir tekniktir. Bu yöntem, MPT64 spesifik monoklonal antikor aracılığıyla MPT64 antijeninin hızlı bir şekilde tespit edilmesine dayanmaktadır. Test genellikle yaklaşık 15 dakika gibi kısa bir sürede sonuç vermekte ve katı veya sıvı kültürlerden elde edilen örneklerde çalışılabilmektedir. Kontrol ve test bantları bulunmakta bunların pozitifliği değerlendirilmektedir. Testin basit, uygulaması kolay ve güvenilir olması, laboratuvarlarda yaygın olarak tercih edilmesini sağlamaktadır. Ayrıca bu testin düşük maliyetli olması da avantajlı bir özelliktir. Bu tür hızlı ve etkili immünokromotografik temelli testler, tüberkülozun tanı ve takibinde önemli bir rol oynamaktadır. Hem laboratuvar personeli hem de hastalar için pratik ve kullanımı kolay olan bu testler, tüberküloz hastalığının doğru tanımlanmasına ve tedavi sürecinin yönlendirilmesine yardımcı olmaktadır (45, 82, 83).

2.3.6. İlaç Duyarlılık Yöntemleri

Tüberkülozda ilaç direncinin saptanması etkin tedavinin erken başlanmasını sağlayarak ilaç direncinin yayılımını azaltabilmekte, tedavi sürecini kısaltabilmekte ve böylece iyileşme oranını artırabilmektedir (45). Çoklu ilaca dirençli TB suşlarının ortaya çıkması nedeniyle hızlı ve doğru antitüberküloz duyarlılık testlerine gereksinim vardır. Duyarlılık testi, her hastadan izole edilen ilk MTBK izolatına yapılmalı ve eğer kültür pozitifliği devam ediyorsa üç ay sonra tekrarlanmalıdır. Başlangıçta izoniazid, rifampisin, etambutol ve pirazinamid gibi birincil ilaçları içermelidir (17).

En etkin antitüberküloz ilaçlardan rifampisin ve izoniazide dirençli basillerin neden olduğu tüberküloz olguları “çok ilaca dirençli tüberküloz” (ÇİD-TB) olarak tanımlanmaktadır. “Yaygın ilaç dirençli tüberküloz” (YİD-TB) ise izoniazid ve rifampisin direncine ek olarak bir kinolona ve bir de ikinci grup enjeksiyonla verilen ilaca (kanamisin, kapreomisin, amikasin) direnç olmasıdır (45).

M. tuberculosis kompleksin antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılığını tespit etmede, kültüre dayalı yöntemler (fenotipik yöntemler) ve dirence neden olan mutasyonu belirlemeye yönelik moleküler yöntemler kullanılmaktadır (45). En yaygın kullanılan ilaç duyarlılık yöntemleri Şekil 2.4’de gösterilmiştir.



Şekil 2. 4. Yaygın kullanılan ilaç duyarlılık yöntemleri (45)

* Şekil Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi’nden alınmıştır

2.3.6.1. Kültüre Dayalı Yöntemler

Agar Proporsiyon Yöntemi:

Direnç saptamada kullanılan bu yöntem dünya genelinde en çok kullanılan yöntemlerden biridir (84). Agar proporsiyon yöntemi güvenilir bir yöntemdir (45). Amaç bir ilacın kritik konsantrasyonuna dirençli olan bakterilerin kritik proporsiyon olan % 1’in üzerinde olup olmadığını tespit etmektir. Sıvı besiyerinde kültüre dayalı ticari otomatize yöntemlerde de proporsiyon yönteminin prensibi benzer şekilde kullanılmaktadır (45). Genel olarak, hesaplanan direnç yüzdesi % 1’den büyük veya eşitse, o bakteri süşunun test edilen antibiyotiğe dirençli olduğu kabul edilmektedir. Ancak, hesaplanan direnç yüzdesi % 1’den küçükse, bakteri süşunun test edilen

antibiyotiğe duyarlı olarak kabul edilmektedir. Bu değerlendirme, antimikrobiyal tedavi seçeneklerinin belirlenmesi ve uygun tedavi protokollerinin oluşturulması açısından önemlidir (84).

Direnç Oranı Yöntemi:

Bu yöntemde, direnci bilinmeyen bir suş, antitüberküloz ilaçların farklı konsantrasyonlarını içeren besiyerlerine ekilir. Aynı zamanda, ilaca duyarlı standart suş (genellikle H37Rv suşu) ilaç içeren ve içermeyen besiyerlerine ekilir. Tüpler 37 °C'de 4 hafta boyunca inkübe edilir. Sonrasında her iki suşun minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerleri belirlenir. Direnç oranı, direnci bilinmeyen suşun MİK değerinin standart suşun MİK değerine bölünmesiyle hesaplanır. Eğer bu oran ≥ 8 ise, suş denenen ilaca dirençli kabul edilir. Eğer oran ≤ 2 ise, suş ilaca duyarlı olarak kabul edilir. Bu değerlendirme yöntemi, ilaca dirençli ve duyarlı suşların ayrımını yapmak için kullanılan önemli bir yöntemdir (84).

Floresan Kültür Sistemi (BACTEC MGIT 960):

BACTEC MGIT 960 (BD, Sparks, MD, ABD) sistemi, mikobakterilerin antimikrobiyal ilaçlara duyarlılığını değerlendirmek için kullanılan bir sistemdir. Her MGIT tüpü, modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içermekte ve tabanında floresans absorbe edici bir oksijen sensörü bulunmaktadır. Bu sensör, besiyerinde çözünen oksijen varlığını algılar. Floresans bileşik, oksijen varlığında absorbe edilir, ancak mikroorganizmalar çözünmüş oksijeni kullanarak solunum yaptıkça floresans artar. Bu sistemde, ilaçlara duyarlılığın test edilmesi için primer ve sekonder ilaçlar kullanılabilir. Sistem, antimikrobiyal ilaçların etkisini değerlendirmek için antimikrobiyal ilaç içeren besiyerlerini kullanmaktadır. Mikobakteriler, bu besiyerlerinde büyüyerek ilaca duyarlılıklarını gösterirler. Sonuçlar, floresansın artışıyla belirlenmekte ve bir UV transiluminatör kullanılarak saptanmaktadır. Bu yöntem, antimikrobiyal ilaçların mikobakterilere karşı etkinliğini değerlendirmek için güvenilir bir şekilde kullanılan bir yöntemdir (23, 75).

2.3.6.2. Moleküler Yöntemler

Moleküler yöntemler, tüberküloz ve diğer mikobakteri enfeksiyonlarında ilaç direnci ile ilişkili gen mutasyonlarını tespit etmek için kullanılan önemli araçlardır. Bu

yöntemler genellikle PCR tabanlıdır ve örneklerden alınan DNA'yı analiz ederek spesifik gen mutasyonlarını belirler. Bu sayede, bir bakterinin belirli bir ilaca dirençli olup olmadığı hızlı ve doğru bir şekilde belirlenebilir (45).

Rifampisin direnciyle ilişkili mutasyonların büyük bir kısmı artık bilinmektedir. Bu mutasyonlar, genellikle rifampisin direncini saptayan gen bölgesi olan *rpoB* geninde bulunmaktadır. Özellikle *rpoB* geninin 81 baz çiftlik bir bölgesindeki mutasyonlar, rifampisin direncinin % 95'inden fazlasından sorumludur (85). Rifampisin dirençli izolatların % 90'ından fazlası diğer ilaçlara da dirençli olduğu için rifampisin direnci ÇİD-TB'nin temel göstergesi olarak kabul edilmektedir (86, 87).

Moleküler yöntemlerin, tüberküloz gibi hastalıklarda ilaç direncini belirlemede önemli bir rolü olduğu kabul edilirken, bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Bunlar arasında yüksek maliyetin öne çıkması, özellikle gelişmekte olan ülkelerde bu yöntemlerin geniş çapta kullanımını kısıtlayabilir. Ayrıca, sessiz mutasyonlar olarak adlandırılan ve ilaç direnciyle ilişkili olmayan mutasyonların saptanması, gereksiz endişelere veya yanlış sonuçlara yol açabilir (88). Moleküler yöntemler genellikle DNA eldesi, hedef DNA'nın amplifikasyonu ve mutasyonların saptanması gibi adımlardan oluşur. Bu yöntemler, belirli mutasyonları hızlı ve hassas bir şekilde tespit edebilir, ancak maliyet ve diğer pratik dezavantajlar göz önünde bulundurulmalıdır (89).

2.3.6.2.1. Line prob assay (LPA-Ters hibridizasyon)

Katı fazda ters hibridizasyon esasına dayanan bu yöntem birinci basamak TB ilaçlarına dirençli RD-ÇİD TB'nin saptanması için 10 yıldan uzun süredir DSÖ tarafından onaylanmıştır (90). GenoType MTBDRplus (Hain Lifesciences-Bruker, Nehren, Germany) ve Nipro NTM+MDRTB II (Osaka, Japan) adında iki modeli mevcuttur. Daha hassas olan yeni nesil sürümleri (GenoType MTBDRsl version 2.0) florokinolonlar ile ikinci basamak enjektabl ilaçlarla ilişki mutasyonları saptayabilmekte ve ÇİD-TB'nin tedavisinin başlanmasına rehberlik etmektedir (91).

2.3.6.2.2. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

LAMP testi izotermal koşullarda *Mycobacterium tuberculosis* 'i 6 primer seti kullanılarak çoğaltılır. Testte izotermal çoğaltma sıcaklığı olan 63 °C'de aktif olan polimeraz enzimi kullanılır. Nonspesifik işlemler engellenir ve çapraz bulaş riskini azaltan kapalı tüp sistemi kullanılır. Yüksek miktarda DNA üretilir ve reaksiyonun spesifikliğı sayesinde floresansın veya bulanıklığın görsel olarak bakılmasını mümkün kılar. Jel elektroforezi veya cihazla tespit yapma ihtiyacını ortadan kaldırır (92)

2.3.6.2.3. DNA Dizi Analizi

Dizi analizi genomu hızlı bir şekilde analiz etmek için kullanılan referans yöntemdir (93). Bu yöntem türlerin tanımlanmasına, örnekteki bilinen ve yeni mutasyonların saptanmasına, ilaç direncinin tespit edilmesine ve mikroorganizmanın evriminin tahmin edilmesine olanak sağlamaktadır (94). En yaygın kullanılan dizi analizi tekniğı olan Sanger'in dizi analizi yönteminde DNA polimerazlar, deoksinükleotid trifosfatlar (dNTP) ve dideoksinükleotid trifosfatları (ddNTP) substrat olarak kullanılmaktadır. DNA dört deoksiribonükleotid trifosfatın (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) birbirine bağlanmasıyla oluşan bir polimerdir ve yeni nükleotidler bir önceki nükleotidin 3'OH ucuna eklenmektedir. Burada ddNTP'ler 3'OH ucu içermez ve sentez sırasında eklendiğinde reaksiyon durmakta ve zincirin son nükleotidini oluşturmaktadır. DNA dizileri kapiller jel elektroforezi ile okunmaktadır (95). Yeni nesil dizileme yöntemi ile geleneksel fenotipik kültür veya kültür tabanlı testlerin aksine sonuçlar çok daha hızlı elde edilmektedir. Proba özgü hedeflerle sınırlı tespit yapabilen prob tabanlı testlerden farklı olarak da tüm genom için ayrıntılı ve doğru dizi analizi bilgileri elde edilebilmektedir (96).

2.3.6.2.4. Spoligotiplendirme (Spacer oligonucleotide typing)

Spoligotiplendirme bir tür DNA parmak izi tespit etme tekniğıdir. Bu teknik, *Mycobacterium tuberculosis* türüne özgü olan bir genetik bölgeleri analiz ederek farklı tüberküloz suşlarını tanımlamayı sağlar. MTBK izolatlarının genotiplerini belirlemek için izolatlardaki kromozomal "Direct Repeat (DR)" lokusunda bulunan polimorfizmlerin gösterilmesine dayanmaktadır. Spoligotiplendirme genellikle tüberküloz epidemiyolojisi, hastalık yayılımı ve genetik çeşitlilik üzerine araştırmalar

yapmak için kullanılır. Bu yöntem, hastalığın yayılma yollarını anlamak, belirli suşların belli bir coğrafi bölgede yaygınlığını belirlemek ve tedaviye dirençli suşları izlemek gibi amaçlarla kullanılmaktadır (97).

2.3.6.2.5. MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number of Tandem Repeat)

MIRU-VNTR yönteminde MTK izolatlarının genotiplerinin belirlenmesinde 41 farklı değişken sıralı tekrar (VNTR) bölgesi tespit edilmiş ve bunlara MIRU denilmiştir (98). MIRU-VNTR tiplendirme yöntemi, MTBK suşlarının epidemiyolojik özelliklerini belirlemede kullanılan en hızlı yöntemdir. Bu yöntemin ayırım gücü yüksektir. Farklı laboratuvarlarda tekrarlanabilir ve uluslararası standartlara uygundur (99).

2.3.6.2.6. IS6110 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Insertion sequence IS6110 yalnızca MTBK suşlarında bulunan genetik bir elementtir. Bu özellik IS6110'u biyolojik örneklerde MTBK tanısında değerli bir araç haline getirmektedir. Ek olarak IS6110, MTBK kromozomunda çoklu kopyalarda bulunmaktadır. TB gelişen hastalardan izole edilen suşların IS6110 RFLP analizi, yıllar içinde aynı kalıpları göstermiştir. Standartize edilmiş IS6110 RFLP tiplemesi TB epidemiyolojik belirteci olan 25 yıldan uzun süredir altın standart olmuştur. Fakat son yıllarda yerini MIRU-VNTR, tüm genom analizi, spoligotiplendirme gibi yöntemler almıştır (100).

2.3.6.2.7. Xpert MTB/RIF ve Ultra (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA)

DSÖ'den onay almış, pulmoner ve extra pulmoner klinik örneklerden eşzamanlı olarak hem *M. tuberculosis*'in varlığını hem de rifampisin direncinin yaklaşık % 95'inden sorumlu mutasyonları saptamada kullanılan bir moleküler tanı testidir. Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) testi, RIF ilaç direncine neden olan mutasyonlarla birlikte MTBK'yı tespit etmek için *rpoB* geninin 81 bp'lik RRDR (rifampicin resistance determining region) hedef bölgesine özgü, aynı multipleks reaksiyonda gendeki farklı hedef sekanslarının tamamlayıcısı olan ve farklı renkli bir florofoz ile işaretlenmiş, beş farklı nükleik asit probu (A-E) kullanan, kartuş tabanlı, otomatik semi-nested real-time PCR sistemidir. Bu beş farklı prob, *rpoB*

geninin rifampicin resistance determining region (RRDR) bölgesindeki A (507-511 kodonları), B (512-518 kodonları), C (518-523 kodonları), D (523-529 kodonları) ve E (529-533 kodonları) sekanslara hibridize olmaktadır (101, 102).

MTBK varlığının pozitif olarak kabul edilebilmesi için, beş probdan en az ikisinin bir döngü eşiği (Cycle threshold, Ct) ≤ 38 olması gerekmektedir. Bir veya daha fazla probun hibridizasyonunu göstermeyen herhangi bir suş veya ilk ve son Ct arasındaki fark 3,5'ten fazla olduğunda ise RR-TB pozitif olarak değerlendirilmektedir (101, 103).

Xpert MTB/RIF, TB tanısında ve RIF direnç tespitinde ileriye doğru büyük bir adım olmuştur. Fakat ARB negatif hastalarda, HIV ile ilişkili TB'de ve rifampisin direncinin belirlenmesinde bazı kısıtlılıklara sahiptir. Cepheid tarafında bu kısıtlılıklar göz önüne alınarak Xpert MTB/RIF Ultra (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) geliştirilmiştir. MTBK saptama duyarlılığını arttırmak için iki farklı çoklu kopya amplifikasyon hedefi içermektedir. (IS6110 ve IS1081) Ultra ayrıca tamamen nested nükleik asit amplifikasyonu, daha fazla termal döngü, geliştirilmiş akışkanlar ve enzimler içermektedir. Bütün bunların sonucunda Ultra tespit sınırı (limit of detection-LOD) 16 CFU/ml olarak geliştirilmiştir. Xpert MTB/RIF için bu değer 114 CFU/ml'dir (104).

Xpert MTB/RIF ve Xpert MTB/RIF Ultra numune olarak balgam ve işlenmiş balgam için teknik talimat içermektedir. Üretici firma Cepheid akciğer dışı numuneler için teknik talimat sağlamamaktadır (105). Yapılan çalışmanın sonuçlarına göre Xpert MTB/RIF için kültür sonuçlarıyla kıyaslandığında farklı örnek çeşitlerinin duyarlılıkları şu şekildeydi: lenf dokusu için % 96, tüm doku örnekleri için % 88, plevral sıvı için % 34, mide aspirat sıvısı için % 78, beyin omurilik sıvısı için % 85 ve plevral sıvı dışındaki diğer seröz sıvılar için % 67'dir (106).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Mayıs 2023 – Mart 2024 tarihleri arasında, Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi Göğüs Hastalıkları polikliniğine başvuran tüberküloz ön tanısı alan 20 hasta ve polikliniğe farklı sebeplerle başvuran 20 gönüllü üzerinden yürütüldü. Örnek alımı için hastalardan aydınlatılmış onam formu alındı. Yetişkin popülasyonda, akciğer tüberkülozlu hastalardan ve kontrol grubundan alınan dışkı örnekleri PCR yöntemiyle çalışılarak dışkının akciğer tüberkülozu tanısında geçerli bir örnek olup olamayacağını değerlendirdi.

Güç analizi: Dışkı tüberküloz PCR ve balgam tüberküloz PCR testlerinin balgam tüberküloz kültürü pozitif ve akciğer tüberkülozu ile uyumlu semptomları olan hasta grubu ile balgam tüberküloz kültür sonucu negatif ve klinik olarak tüberküloz şüphesi olmayan kişileri ayırma yeteneği için % 80’lik bir AUC beklentisinin istatistiksel olarak anlamlı olacağı beklentisi için gruplarda gerekli minimum katılımcı sayısı 17’şer olarak tahmin edilmiştir ($\alpha=0,05$, $1-\beta=0,90$). Güç analizi Medcalc version 18.11.3 programında yapıldı. Yapılan güç analizine göre çalışmaya 20 tüberküloz hastası ve 20 sağlıklı gönüllü dahil edildi.

Çalışma öncesi Gaziantep Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu’ndan 15.03.2023 tarih ve 2023/40 sayı numarası ile izin alınmıştır. Ayrıca çalışmamız Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje no: TF.UT.23.12)

3.1. Hasta Gönüllü Grubun Seçilmesi ve Örneklerin Toplanması

Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi Göğüs Hastalıkları kliniğine başvuran akciğer tüberkülozu ön tanısı olan hastalardan tanısal amaçlı tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen balgam örneklerinden MTBK PCR sonucu pozitif olarak değerlendirilen kişiler hasta grup içerisinde çalışmaya dahil edildi. Bu hastalara laboratuvar işletim sisteminden (LİS) kayıtlı telefon numarası üzerinden ulaşılarak hastaneye çağırıldı ve gönüllü olur formu imzalatılarak dışkı örneği vermeleri istenerek uygun kaplara örnek alındı. Balgam örnekleri mikroskopik,

kültür ve PCR yöntemleriyle değerlendirildi. Dışkı örnekleri PCR yöntemi ile değerlendirildi.

3.2. Kontrol Grubunun Seçilmesi ve Örneklerin Toplanması

Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama hastanesi Göğüs Hastalıkları kliniğine başvuran ve öksürük, gece terlemesi, kilo kaybı gibi tüberküloz enfeksiyonu belirtileri olmayan, klinik ve laboratuvar olarak tüberküloz tanısı konmamış hastalardan farklı sebeplerle hastaneye başvuruları esnasında gönüllü olur formu imzalatılarak balgam ve dışkı örneği vermeleri istendi. Uygun kaplarda örnekler alındı. Balgam örnekleri mikroskopik olarak, kültür ve PCR yöntemleriyle değerlendirildi. Dışkı örnekleri PCR yöntemi ile değerlendirildi.

3.3. Toplanan Balgam Örneklerinin İşlenmesi

Hasta ve sağlıklı gönüllülerden toplanan balgam örnekleri tek kullanımlık, steril, vidalı kapların içerisinde tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarına kabul edildi. Örnekler dekontaminasyon ve homojenizasyon işlemlerine tabi tutuldu. Daha sonra konsantrasyon işlemi uygulandı. Yapılan işlemler biyogüvenlik kabini (Class II B2) gerçekleştirildi. İşlemler yapılırken kişisel koruyucu ekipman giyildi.

Dekontaminasyon-homojenizasyon işlemi için balgam örneğinden 5 ml 50 ml'lik steril dibi konik polipropilen tüplere aktarıldıktan sonra eşit miktarda (1:1 oranında) daha önce hazırlanmış olan NALC (N-asetil L-sistein) – NaOH ile karıştırılıp tüpün kapağı sıkıca kapatıldıktan sonra örnek sıvı hale gelene kadar (15-30 saniye) vortekslendi.

NALC-NaOH solüsyonu hazırlanışı:

% 4 NaOH (500ml) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, ABD) ve % 2,9 sodyum sitrat dehidrat (500 ml) (Merck, Darmstadt, Almanya) solüsyonları karıştırılarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi (NaOH final konsantrasyonu % 2'dir). Kullanım öncesinde üzerine 5 g NALC eklendi.

NALC-NaOH solüsyonu ile karıştırılmış olan balgam örneği 15 dakika bekletildi. Bekleme süresince tüpler 5 dakikada bir birkaç saniye vortekslendi. Üzerine 50 ml seviyesine kadar fosfat tampon (pH:6,8) çözeltisi eklenerek 3000 × g'de 10

$^{\circ}\text{C}$ 'de 20 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı kısmı, uygun bir dezenfektan içeren atık kabına dikkatli bir şekilde döküldü. Çökelti üzerine 1-2 ml fosfat tampon çözeltisi eklenerek hazırlanan karışım ARB ve kültür işlemlerinde kullanıldı.

3.4. Toplanan Balgam Örneklerinin Mikroskopik Olarak Değerlendirilmesi

Örnekler EZN yöntemi ile boyanıp değerlendirildi. Kurşun kalem ile rodajlı lam üzerine hasta ve gönüllülerin örnek numaraları yazıldı. Daha sonra işlem görmüş örnekten, çökeltiden Pastör pipeti ile 1-2 damla, lamın ortasında yaklaşık 1×2 cm'lik alan içinde dairesel hareketler ile yayıldı. Hazırlanan örnekler bir gece biyogüvenlik kabininde (Class II B2) bekletilerek kurutuldu. Kurumuş yaymalar Bunsen bekinde alevden geçirilerek lama sabitlendi.

Hazırlanan yaymalar boya düzeneği üzerine birbirine temas etmeyecek şekilde yerleştirildikten sonra preparatların üzerini tamamen kaplayacak şekilde karbol fuksin döküldü. Yaymalar 5 dakika boyunca buhar çıkacak fakat kaynamayacak şekilde alttan ısıtıldı. Buharlaşma ile boya eksilen yaymalara boya eklenerek ısıtma işlemine devam edildi. Daha sonra lamlar nazıkçe su ile yıkandı ve eğilerek getirilerek üzerlerindeki su süzdürüldü. Üzerine sonrasında % 3'lük asit-alkol çözeltisi döküldü. Bu işleme renksizleşene kadar (1-2 dakika) devam edildi. Su ile yıkanan yaymaların üzerindeki su süzdürüldükten sonra metilen mavisi döküldü. 1-2 dakika beklendikten sonra yaymalar tekrar yıkandı ve dik bir konumda oda ısısında kurumaya bırakıldı.

Kurumuş olan yaymalar ışık mikroskopunda $100\times$ 'lük büyütmede en az 300 alan incelenecek şekilde Tablo 2.4.'daki verilere göre değerlendirildi.

3.5. Toplanan Balgam Örneklerinin Kültür Değerlendirmesi

Katı Besiyerine Ekim

İşlenmiş balgam örneğinde 0,3 ml pastör pipet ile alınarak Löwenstein Jensen (LJ) (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, ABD) besiyerine eklendi. İlk bir hafta yatık daha sonrasında dik bir şekilde 37°C etüvde bekletildi. İlk hafta iki kere daha sonrasında 8. haftaya kadar haftada bir kere üreme açısından kontrol edildi. Üreme görülmesi halinde preparat hazırlanıp, EZN yöntemiyle boyandı ve ARB varlığı açısından incelendi.

Sıvı Besiyerine Ekim

BACTEC MGIT 960 (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, ABD) sisteminde, modifiye Middlebrook 7H9 içeren MGIT besiyerleri (7 ml) ile MGIT 960 supleman kiti (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, ABD) kullanıldı. Supleman kiti içerisinde, OADC polimiksin B, amfoterisin B, nalidiksik asit, trimetoprim ve azlosilin (PANTA) içeren antibiyotik karışımı bulunmaktadır. MGIT üreme desteği şişesinden, 15 ml alınarak BBL MGIT PANTA içerisine eklenmiş, bu karışımdan da 0,8 ml alınarak MGIT besiyerlerine eklendikten sonra işlenmiş balgam örneğinden 0,5 ml inoküle edildi. Ekim yapılan besiyerleri üstündeki barkod cihaza okutulduktan sonra yüklendi. MGIT 960 içindeki besiyerleri 37 °C’de inkübe edilmekte ve içindeki foto dedektörleriyle 60 dakikada bir floresan ısıma seviyesini otomatik olarak ölçerek üremeyi kontrol etmektedir. Üreme durumunda cihaz sesli uyarı vererek üremenin olduğu besiyerlerinin bulunduğu kısımda “+” işaretinin ışığı yanmaktadır. Üreme olan yer açılıp pozitif besiyerleri çıkarıldıktan sonra ARB yöntemiyle boyandı. İmmürokromotografik yöntemle MTBK doğrulaması yapıldı.

3.6. MGIT 960 Sistemi ile Duyarlılık Araştırılması

MTBK olarak saptanan suşların streptomisin, INH, RIF ve etambutole duyarlılıkları üreme tespit edildikten sonraki beş gün içinde MGIT 960 SIRE (Streptomisin, INH, RIF, etambutol) kiti (SIRE kiti) kullanılarak MGIT 960 sistemi ile değerlendirildi.

Antibiyotik solüsyonlarının hazırlanması:

SIRE kiti içerisinde liyofilize halde rifampisin bulunmaktadır. Liyofilize antibiyotik şişesine 4 ml steril distile su eklenerek 83 µg/ ml RIF içeren antibiyotik solüsyonları elde edildi.

Duyarlılık deneyi için MGIT besiyerlerinin hazırlanması:

Antimikrobiyal duyarlılığı değerlendirebilmek için her bir suş özel beş tane MGIT besiyeri hazırlandı. Birinci besiyeri kontrol amaçlı diğer besiyerleri test edilecek antibiyotikleri değerlendirmek amaçlı işaretlendi. Aseptik koşullarda her besiyerine SIRE üreme desteğinden 0,8 ml ilave edildi. Daha sonra bütün besiyerlerine antibiyotikler 100’er µl eklendi, kontrol besiyerine ise hiçbir antibiyotik eklenmedi.

İnokulumun hazırlanması:

Antibiyogram üreme tespit edildikten sonraki iki gün içerisinde yapıldıysa pozitif sonuç veren MGIT besiyeri direkt kullanıldı. Üreme tespit edildikten sonraki 3-5. günde yapılıyorsa, pozitif kültür şişesinden 1 ml alınarak 4 ml steril fizyolojik tuzlu su içeren tüpe ilave edilip 1:5 oranında sulandırıldı.

Ekim işlemi ve MGIT besiyerlerinin cihaza yüklenmesi:

Pozitif kültür şişesinden tamamı farklı antibiyotikler içeren besiyerlerine 0,5'er ml ilave edildi. Besiyerleri çalkalanarak iyice karıştırıldı. Pozitif kültür şişesinden 0,1 ml alınıp 10 ml steril fizyolojik tuzlu su içeren tüpe eklenerek süspansiyon 1:100 oranında sulandırılarak kontrol şişesi için hazırlandı. Sulandırılmış (1:100 oranında) süspansiyondan 0,5 ml alınıp kontrol şişesine eklendi. Hazırlanan besiyerleri barkodları okutularak cihaza yerleştirildi.

3.7. Toplanan Balgam Örneklerinin PCR Değerlendirmesi

İşlenmemiş balgam örneğinden 0,5 ml alınarak 1:2 oranında 1 ml Xpert MTB/RIF Ultra (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) kit içeriğinde bulunan sample reagent ile 15 ml'lik falkon tüpü içerisinde karıştırıldı. 10 saniye vortekslendikten sonra 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonrasında cihaza yüklendi. Çıkan sonuçlar değerlendirildi.

Xpert MTB/RIF Ultra çalışması

MTBK saptama duyarlılığını arttırmak için iki farklı çoklu kopya amplifikasyon hedefi içermektedir. (IS6110-IS1081) Tespit sınırı (limit of detection- LOD) 16 CFU/ml olarak geliştirilmiştir. **MTBK varlığının pozitif** olarak kabul edilebilmesi için çoklu kopya problemlerinden biri veya her ikisinin pozitif saptanması (Ct <37 olması) ve en az iki *rpoB* probunun pozitif saptanması (Ct <40 olması) gerekmektedir. Ultra semi kantitatif olarak Xpert MTB/RIF ile aynı kategorileri kullanmaktadır. Bunlar high (yüksek), medium (orta), low (düşük) ve very low (çok düşük)'tür. Bunlara ek olarak 'trace' kategorisi mevcuttur. Bu en düşük basil yükünü ifade etmektedir. **Trace sonucu** için çoklu kopya problemlerinden biri veya her ikisinin pozitif olması (Ct <37 olması) ve birden fazla *rpoB* probunun negatif olması (Ct <40 olmaması) gerekmektedir. Xpert MTB/RIF Ultra rifampisin direnç tespitinde Xpert

MTB/RIF'den farklı olarak melting-temperature (erime sıcaklığı) temelli bir yöntem kullanılmaktadır. Dört *rpoB* probunun tümü vahşi tip profilinde tanımlanan erime sıcaklığı (T_m) piklerine sahipse rifampisin direncinin olmadığı kabul edilmektedir. Trace sonuçlarda *rpoB* problemlerinin T_m değeri değerlendirilemediği için rifampisin direnci değerlendirilememektedir. Trace sonucu HIV pozitif veya şüpheli olan hastalarda, çocuklarda ve akciğer dışı örneklerde görüldüğünde tedaviye başlanılmalıdır. Diğer hasta gruplarında tekrar edilmeli ve klinik ve radyolojiyle birlikte değerlendirilmelidir (104).

3.8. Toplanan Dışkı Örneklerinin PCR Değerlendirmesi

Hasta ve sağlıklı gönüllülerden toplanan dışkı örnekleri hastalardan alındıkları gün Dünya Sağlık Örgütü'nün de önerdiği şekilde işleme alındı (16, 107). Dondurularak saklanmadı. Yine Dünya Sağlık Örgütü'nün önerisiyle PCR yöntemiyle Xpert MTB/RIF Ultra cihazıyla değerlendirildi. Dışkı cihaza yüklenmeden önce

- 0,5 gram dışkı hassas terazide tartılarak 15 ml falkon tüpüne konuldu ve üzerine 10 ml Sheathers solüsyonu (% 56'lık süktroz solüsyonu) eklendi.
- Plastik öze yardımıyla karıştırılarak 30 saniye vortekslendi.
- 1 dakika $100 \times g$ 'de santrifüj edildi.
- 30 dakika beklendikten sonra üzerinde oluşan supernatan kısımdan 0,5 ml alınarak 15 ml'lik başka bir falkon tüpüne aktarıldı ve bunun üzerine 1,8 ml sample reagent eklendi.
- Bu da 20 kez elde çalkalandıktan sonra 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- Karışımın 2 ml'si cihazın kartuşuna eklendi. Daha sonra kartuş cihaza yüklenerek sonuçlar değerlendirildi.

Sheathers solüsyonunun hazırlanışı (107):

DSÖ'nün önerisine göre 355 ml distile su içerisine 454 g süktroz (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, ABD) eklenerek $121^{\circ}C$ 'de 15 dakika otoklavlandı. Soğutulan solüsyon 50 ml'lik falkon tüplerine konarak $+4^{\circ}C$ 'de en fazla bir ay süreyle kullanılmak üzere stoklandı.

3.8. İstatistiksel Yöntem

Verilerin analizi SPSS 18.0 Paket Programı kullanılarak yapıldı. Yeni tanı testinin etkinlik istatistikleri olarak duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer (PPD), negatif prediktif değer (NPV) ve doğruluk değerleri ve % 95 güven aralıkları hesaplanmıştır. Bu istatistiklerin güven aralıklarının % 50'nin üstünde olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Balgam ve dışkı PCR'da ulaşılan Ct değerleri Wilcoxon işaretli sıralar testi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. $p < 0,05$ değeri istatistiksel anlamlılık olarak kabul edildi.



4. BULGULAR

Çalışmamızda Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi Göğüs Hastalıkları kliniğine başvuran kişilerden 20 TB ön tanıli hasta gönüllü ve 20 TB kliniği olmayan gönüllü analiz edildi.

Hasta gönüllülerin yaş ortalaması 50,1, median yaşı 48 (minimum 22, maksimum 78) idi. Çalışmaya katılan hastaların % 25'i (n=5) kadın, % 75'i (n=15) erkekti. İlkokul mezunlarının oranı % 65 (n=13), ortaokul mezunlarının % 20 (n=4), lise mezunlarının ise %15'di (n=3). Gelir düzeyleri değerlendirildiğinde % 80'ninin (n=16) aylık geliri asgari ücret altındaydı. Kalan % 20'sinin (n=4) ise üzerindeydi. Hastalardan % 90'ı (n=18) evli, % 10'u (n=2) ise bekarı. Diyabet, hipertansiyon gibi kronik hastalık öyküsü mevcut olan hasta oranı % 75'di (n=15). Sağlıklı gönüllülerin yaş ortalaması 37,6, median yaşı 33,5 (minimum 21, maximum 63) idi. Çalışmaya katılan sağlıklı gönüllülerin % 50'si (n=10) kadın, % 50'si (n=10) erkekti. İlkokul mezunlarının oranı % 10 (n=2), lise mezunlarının oranı % 45 (n=9), üniversite mezunlarının oranı ise %45'di (n=9). Gelir düzeyleri değerlendirildiğinde % 25'inin (n=5) aylık geliri asgari ücret altındaydı. Kalan % 75'inin (n=15) ise üzerindeydi. Sağlıklı gönüllülerin % 65'i (n=13) evli, % 35'i (n=7) bekarı. Diyabet, hipertansiyon gibi kronik hastalık öyküsü mevcut olan hasta oranı % 35'di (n=7). Tablo 4.1. hasta ve sağlıklı gönüllülerin sosyodemografik verileri ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Tablo 4. 1. Hasta ve sağlıklı gönüllülerin sosyodemografik verileri

	Hasta Gönüllü Sayısı	Sağlıklı Gönüllü Sayısı
Cinsiyet		
Kadın	5 (% 25)	10 (% 50)
Erkek	15 (% 75)	10 (% 50)
Eğitim Durumu		
İlkokul	13 (% 65)	2 (% 10)
Ortaokul	4 (% 20)	0 (% 0)
Lise	3 (% 15)	9 (% 45)
Üniversite	0 (% 0)	9 (% 45)
Gelir Düzeyi		
<10.000 TL	16 (% 80)	5 (% 25)
10.000-30.000 TL	3 (% 15)	7 (% 35)
>30.000 TL	1 (% 5)	8 (% 40)
Medeni Durum		
Evli	18 (% 90)	13 (% 65)
Bekar	2 (% 10)	7 (% 35)
Kronik Hastalık Durumu		
Var	15 (% 75)	7 (% 35)
Yok	5 (% 25)	13 (% 65)

Sağlıklı gönüllülerin ARB, balgam kültür, balgam PCR ve dışkı PCR sonuçları değerlendirildiğinde tamamı negatif olarak saptandı. Hasta gönüllülerin tamamının balgam PCR sonucu pozitif bulundu. Hastalardan % 40'ının (n=8) balgam ARB sonucu pozitif, kalan % 60'ının (n=12) balgam ARB sonucu negatif saptandı. Hastaların % 85'inin (n=17) balgam kültür sonucu pozitif, kalan %15'inin (n=3) ise negatif değerlendirildi. Hastalardan % 10'u (n=2) dışında tamamının (n=18) dışkı PCR sonucu pozitif saptandı. Hastalardan % 15'inin (n=3) balgam kültür sonucu negatif olmasına rağmen balgam PCR sonucu pozitif. Aynı hastalardan ikisinin dışkı PCR sonucu da pozitif. Bir hastanın ise balgam PCR ve kültür sonuçları pozitif olmasına rağmen dışkı PCR sonucu negatif saptandı. Ayrıntılı bir şekilde ARB, kültür ve PCR sonuçları Tablo 4.2. 'da gösterilmiştir.

Tablo 4. 2. Hasta gönüllülerin ARB, balgam PCR, dışkı PCR ve kültür sonuçları

	Balgam ARB sonucu	Balgam PCR Ct sonucu	Dışkı PCR Ct sonucu	Balgam kültür sonucu
1.Hasta	Negatif	19.7	20.9	Pozitif
2.Hasta	Negatif	31.7	22.3	Pozitif
3.Hasta	Pozitif (++)	16.6	16.3	Pozitif
4.Hasta	Negatif	18.9	Negatif	Negatif
5. Hasta	Pozitif (++)	16.1	16.6	Pozitif
6. Hasta	Negatif	19.6	26.6	Negatif
7. Hasta	Negatif	22.9	Negatif	Pozitif
8. Hasta	Pozitif (+)	16.1	16.3	Pozitif
9. Hasta	Negatif	25.3	25.4	Negatif
10. Hasta	Negatif	17.1	24.1	Pozitif
11. Hasta	Negatif	17.1	16.9	Pozitif
12. Hasta	Negatif	18.9	19.2	Pozitif
13. Hasta	Pozitif (+++)	16.4	16.4	Pozitif
14. Hasta	Pozitif (+++)	16.2	17.6	Pozitif
15. Hasta	Pozitif (++)	17	17.6	Pozitif
16. Hasta	Negatif	16.20	18.7	Pozitif
17. Hasta	Negatif	16.20	16.4	Pozitif
18. Hasta	Negatif	16.2	16.4	Pozitif
19. Hasta	Pozitif (++)	16.4	21.9	Pozitif
20. Hasta	Pozitif (++)	16.1	17.7	Pozitif

PCR'da ulaşılan balgam ve dışkı Ct değerleri Wilcoxon işaretli sıralar testi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. $p < 0,05$ değeri istatistiksel anlamlılık olarak kabul edildi. İki farklı örnek tipini değerlendiren yöntemler arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0,2429$). Her iki testin anlamlı derecede yakın sonuç verdiği tespit edildi.

Hasta gönüllüler arasında sadece birinin balgam PCR sonucunda rifampisin direnci saptandı. Dışkı PCR sonucunda da aynı şekilde rifampisin direnci tespit edildi. Yapılan balgam kültür sonucu ile rifampisin direnci fenotipik yöntemle de saptandı. Türkiye Halk Sağlığı Laboratuvarına gönderilen örnek ile sonuç doğrulandı. Diğer balgam PCR pozitif saptanan örneklerin tamamı rifampisin duyarlıydı ve uyumlu olarak dışkı PCR sonuçlarının tamamı da rifampisin duyarlı bulundu.

Balgam kültür sonucu referans olarak kabul edildiğinde dışkı PCR testinin duyarlılığı % 94,1, özgüllüğü % 91,3, pozitif prediktif değeri (PPD) % 88,8 ve negatif prediktif değeri (NPD) % 95,4 şeklinde hesaplandı. Karşılaştırılan sonuçlar ayrıntılı olarak Tablo 4.3. 'de gösterilmiştir.

Tablo 4. 3. Balgam kültür ve dışkı PCR sonuçlarının karşılaştırılması

		Tüberküloz balgam kültür sonucu		
Tüberküloz dışkı PCR sonucu		Pozitif	Negatif	Toplam
	Pozitif	16	2	18
	Negatif	1	21	22
	Toplam	17	23	40

* Referans kabul edilen test: Balgam kültür testi

Karşılaştırılan test: Dışkı PCR testi

Balgam kültür sonucu referans olarak kabul edildiğinde balgam PCR testinin duyarlılığı % 100, özgüllüğü % 86,9, PPD % 85 ve NPD % 100 şeklinde hesaplandı. Karşılaştırılan sonuçlar ayrıntılı olarak Tablo 4.4'de gösterilmiştir.

Tablo 4. 4. Balgam kültür ve balgam PCR sonuçlarının karşılaştırılması

		Tüberküloz balgam kültür sonucu		
Tüberküloz balgam PCR sonucu		Pozitif	Negatif	Toplam
	Pozitif	17	3	20
	Negatif	0	20	20
	Toplam	17	23	40

*Referans kabul edilen test: Balgam kültür testi

Karşılaştırılan test: Balgam PCR testi

Balgam PCR sonucu referans olarak kabul edildiğinde dışkı PCR testinin duyarlılığı % 90, özgüllüğü % 100, PPD % 100 ve NPD % 90,9 şeklinde hesaplandı. Karşılaştırılan sonuçlar ayrıntılı olarak Tablo 4.5. 'de gösterilmiştir.

Tablo 4. 5. Balgam PCR ve dışkı PCR sonuçlarının karşılaştırılması

		Tüberküloz balgam PCR sonucu		
Tüberküloz dışkı PCR sonucu		Pozitif	Negatif	Toplam
	Pozitif	18	0	18
	Negatif	2	20	22
	Toplam	20	20	40

*Referans kabul edilen test: Balgam PCR testi

Karşılaştırılan test: Dışkı PCR testi

Hasta gönüllülerin değerlendirilen balgam kültür-balgam PCR-dışkı PCR sonuçlarının toplu analizi Tablo 4.6'da gösterilmiştir.

Tablo 4. 6. Balgam kültür-balgam PCR-dışkı PCR sonuçlarının toplu analizi

	Dışkı PCR-Balgam kültür karşılaştırılması	Balgam PCR -Balgam kültür karşılaştırması
Duyarlılık	% 94,1	% 100
Özgüllük	% 91,3	% 86,9
PPD	% 88,8	% 85
NPD	% 95,4	% 100

*PPD: Pozitif prediktif değer, NPD: Negatif prediktif değer

5. TARTIŞMA

Tüberküloz tüm dünyada yaygın görülen ve ölümlere yol açan enfeksiyöz bir hastalıktır (1). Erken tanı hem hastanın tedaviye erken başlamasını sağlamakta hem de hava yoluyla daha fazla kişiye bulaşmasının önlemektir. Tanı da balgam kültürü altın standart olmakla birlikte sonuçlanması hem zaman alıcıdır hem de her hasta rahatlıkla balgam verememektedir. Balgam veremeyen hastalardan açlık mide suyu, bronkoalveolar lavaj gibi farklı örnekler elde edilip çalışılabilmektedir. Fakat bu örneklerin elde edilmesi hem hasta için travmatik hem de ekipmana ihtiyaç duyulan maliyetli yöntemlerdir. Dışkı akciğer tüberkülozu tanısında son yıllarda kullanılmaya başlanan bu alanda yeni bir örnek türüdür. Bizim çalışmamızda noninvaziv, kolay elde edilebilen alternatif bir örnek olarak dışkının akciğer tüberkülozu tanısında kullanılmasını desteklemektedir.

Akciğer tüberkülozlu çocuk ve adölesanlarda dışkı kullanılarak MTBK saptanması ve bunun TB tanısında ilk tanı yöntemi olarak kullanılması DSÖ tarafından Ocak 2020'den beri önerilmektedir (108). Bizler de bu önerinin yetişkin popülasyon için geçerli olup olmayacağını değerlendirmek amacıyla 18 yaş üstü akciğer tüberkülozlu ve sağlıklı erişkinlerde çalışmamızı yürüttük. Çalışmamızda toplamda 20 tüberküloz hastası ve 20 sağlıklı gönüllü bireyde Xpert MTB/RIF Ultra (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) ile dışkı örneğinde MTBK saptanmasını değerlendirdik.

Çalışmamızda balgam kültürü referans test olarak kabul edildiğinde dışkı Xpert MTB/RIF Ultra testinin duyarlılığı % 94,1, özgüllüğü % 91,3, PPD % 88,8 ve NPD % 95,4 olarak saptandı. Liu ve ark. (109) Xpert MTB/RIF kullanarak 31 hasta ve 34 sağlıklı toplamda 65 kişi üzerinde yaptığı benzer bir çalışmada aynı şekilde kültür referans yöntem olarak kabul edildiğinde duyarlılık % 90, özgüllük % 93,5, PPD % 93,5 ve NPD % 91,2 olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada balgam veremeyen ağır hasta grubu çalışmaya alınmıştır. Aynı hasta grubunda gastrik aspirat örneği de PCR ile değerlendirilmiş ve duyarlılığı % 56,5 hesaplanmıştır. Bu da dışkı duyarlılığının çok altındadır.

Yu ve ark. (110) yaptığı bir çalışmaya erişkin yaş grubundan 96 TB hastası ve 34 sağlıklı gönüllü dahil edilmiş, Xpert MTB/RIF Ultra ve Xpert MTB/RIF kullanılarak dışkı örnekleri değerlendirilmiştir. Referans test olarak balgam kültürü kabul edildiğinde dışkı PCR duyarlılığı Xpert MTB/RIF için % 68,6, özgüllüğü % 88,6, Xpert MTB/RIF Ultra için % 78,4, özgüllüğü % 77, 2 olarak hesaplanmıştır. Çocuk yaş grubunda Kabir ve ark. (111) yaptığı başka bir çalışmada kültür altın standart kabul edildiğinde dışkı Xpert MTB/RIF duyarlılığı % 37,9, özgüllüğü % 100 ve Xpert MTB/RIF Ultra duyarlılığı % 58,6, özgüllüğü % 88,1 olarak hesaplanmıştır.

Mesman ve ark. (59) tarafından 259 tüberküloz semptomlu çocuk hasta üzerinde yapılan bir çalışmada büyük çocuklarda, ARB pozitifliği, kaviter lezyon varlığı pozitif dışkı PCR sonucu ile ilişkili bulunmuştur. Bu özellikler erişkin yaş grubunda geçirilen tüberkülozda daha sık görülmektedir. Bu sebeple çocuklara oranla erişkin tüberküloz hasta grubunda dışkı pozitif saptanma oranı daha yüksek beklenmektedir.

Dışkı PCR sonuçları balgam ARB sonuçlarıyla yakın ilişkilidir. Yetişkin yaş grubunda Kokuto ve ark. (112) tarafından yapılan 56 TB hastasının, 37 sağlıklı gönüllünün dahil edildiği başka bir çalışmada Xpert MTB/RIF kullanılmış referans yöntem olarak balgam kültür pozitifliği ve/veya balgam Xpert MTB/RIF pozitifliği kabul edilmiştir. Dışkı PCR duyarlılığı ARB pozitif hasta grubunda % 100, ARB negatif hasta grubunda % 50 ve ARB şüpheli sonuçlanan hasta grubunda % 81 olarak değerlendirilmiştir. Tüm hasta grupları dahil edildiğinde özgüllüğü % 100 olarak hesaplanmıştır. Bizim çalışmamızda da ARB sonucu pozitif olan sekiz hastanın tamamının balgam kültür, balgam Xpert MTB/RIF ve dışkı Xpert MTB/RIF sonucunun pozitif olduğu görüldü. Rahman ve ark. (113) yaptığı başka bir çalışmada 102 TB hastası 50 sağlıklı gönüllü dahil edilmiş ve balgam kültür referans yöntem alındığında dışkıda Xpert MTB/RIF duyarlılığı % 94,8, özgüllüğü ise % 100 olarak hesaplanmıştır. Yine aynı çalışmada dışkı Ct değerleri ile balgam ARB sonuçları arasında anlamlı korelasyon bulunmuştur ($p<0.01$) (113). Bu durum hastaların basil yükünün yüksek olması ile ilişkilendirilmiştir.

Literatüre bakıldığında Xpert MTB/RIF veya Xpert MTB/RIF Ultra kullanılarak dışkıdan tüberküloz basilinin saptanmasında birkaç faktöre bağlı olarak

farklı duyarlılık ve özgüllük sonuçları bulunabilmektedir. Dışkıda PCR yöntemini inhibe edebilecek organik ve inorganik maddeler bulunmaktadır. Bunlar yanlış veya yetersiz sonuçlara sebep olabilmektedir. Bu sebeple PCR öncesi dışkı üzerinde bazı müdahalelere ihtiyaç vardır. Bu müdahale sırasındaki testte kullanılan dışkı miktarı, numunenin işlem öncesinde dondurulup dondurulmaması, santrifüj yapılıp yapılmaması gibi farklılıklar farklı sonuçlar oluşmasına sebep olmaktadır. 2013 yılında Nicol ve ark. (114) tarafından çocuk yaş grubunda yapılan bir çalışmada dışkı işlem öncesi -80 °C’de dondurulmuş ve işlem için 0,15 g dışkı kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda balgam kültürü referans test kabul edildiğinde duyarlılık % 47,1, özgüllük % 99,0 bulunmuştur. Düşük duyarlılık düzeyi dışkı miktarının az olmasına ve dondurulmasına bağlanabilmektedir. DSÖ dışkının çalışma öncesi dondurulmasını kesinlikle önermemektedir (71). Dışkının dondurulmasının bakterinin genetik yapısına zarar verdiği ve tespit edilme oranını azalttığı düşünülmektedir (115). Bu sebeple bizim çalışmamızda toplanan dışkı dondurulmadan aynı gün işleme alınarak değerlendirilmiştir.

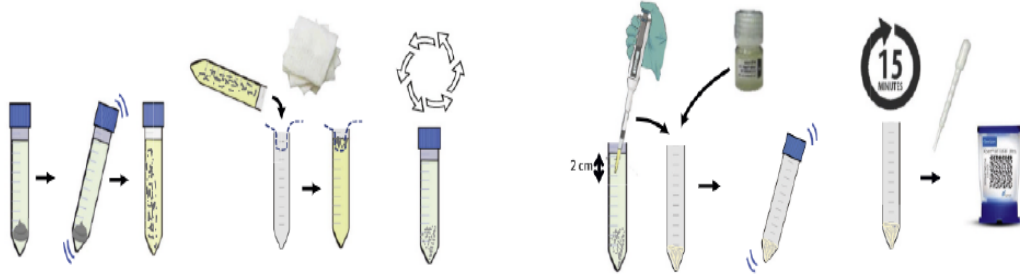
Çalışma esnasında kullanılacak dışkı miktarı da sonuçları etkileyebilmektedir. Banada ve ark. (55) yaptığı bir çalışmada tüberküloz ile enfekte edilen makaklardan alınan dışkı örnekleri değerlendirildiğinde 0,6 g dışkının 0,2 g ve 1,2 g dışkıya göre daha iyi performans gösterdiği görülmüştür. Yine aynı çalışmada 20 tüberküloz hastası, 20 sağlıklı çocuk değerlendirilmiştir. Dışkı miktarı 0,6 g olarak alındığında duyarlılık % 85, özgüllük % 100, 1,2 g olarak alındığında duyarlılık % 84, özgüllük % 94 olarak tespit edilmiştir. Dışkı miktarındaki artışla içerdiği tüberküloz basil miktarı artmakta fakat bununla birlikte dışkı içerisindeki diğer komponentlerde arttığı için PCR’ı inhibe edebilmektedir. Çok düşük miktardaki dışkı ise yetersiz gelmektedir (55). Yapılan başka bir çalışmada hem içerdiği basil miktarının yeterli olması hem de PCR yöntemini inhibe edecek yabancı komponentlerin daha az olması sebebiyle 0,5 g dışkının kullanımının ideal olduğu düşünülmektedir (59). Bizim çalışmamızda da DSÖ’nün de önerdiği şekilde 0,5 g dışkı örneği kullanılmıştır (71).

Lounnas ve ark. (116) DSÖ tarafından önerilen dışkı Xpert MTB/RIF değerlendirmesi öncesinde yapılan işlemlerin (kullanılan dışkı miktarı, manuel çalkalama, filtrasyon uygulama, sedimentasyon süresi gibi) farklı versiyonlarının aynı

grup hasta örneği üzerinde denendiği bir çalışma yapmıştır. Çalışmada 0,5 g ve 1 g dışkı örneği, filtrasyon işlemi uygulanması durumuna ve 30 dk, 60 dk ve 90 dk sedimentasyon süresine göre farklı kombinasyonlarda değerlendirilmiştir. Sonuç olarak 13 kombinasyon kıyaslandığında en iyi sonuçların 0,5 g dışkı kullanılarak işlem sırasında manuel çalkalama yapılarak, filtrasyon yapılmadan 30 dk sedimentasyon süresi verilerek sağlandığı görülmüştür. Şekil 5.1.'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir. Gebre ve ark. (117) yaptığı bir derlemeye göre dışkı örneğinin santrifüjlenmesi yüksek duyarlılık sağlamaktadır. Bizde çalışmamızı Lounnas ve ark. (116) önerdiği optimize methoda santrifüj yöntemini ekleyerek gerçekleştirdik. Bu da çalışmamızda yüksek duyarlılık ve özgüllük elde etmemizi sağlamıştır.

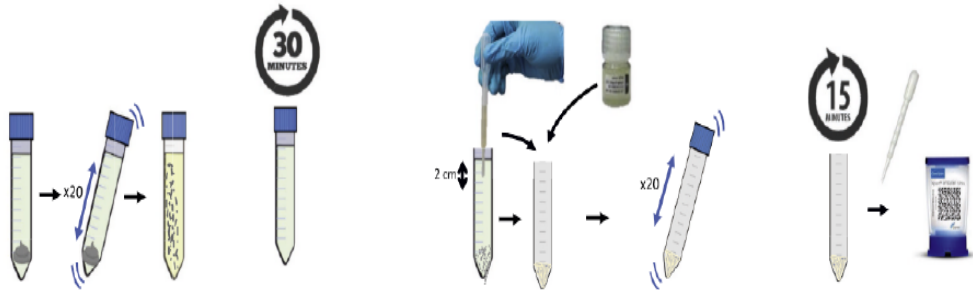
A. Original (reference) method

1. Add **0.5 g** of stool in **10 ml** of Sheather's solution + vortex shaking
2. Filtration through a gauze into a new 15 ml Falcon tube
3. Centrifugation at **100xg** for **1 minute**
4. Transfer **0.5 mL** from the **top** of the specimen to a 15 ml Falcon tube and add **1.8 mL** of Sample Reagent + vortex shaking
5. Incubation and transfer to the Xpert Ultra cartridge



B. Optimised method

1. Add **0.5 g** of stool in **10 ml** of Sheather's solution + shake 20 times
2. Sedimentation during **30 minutes**
3. Transfer **0.5 mL** from the **top** of the specimen to a 15 ml Falcon tube and add **1.8 mL** of sample reagent + shake vigorously 20 times
4. Incubation and transfer to the Xpert Ultra cartridge



Şekil 5. 1. Referans yöntem ile optimize edilmiş yöntemin karşılaştırılması (116)

2022 yılında dünya genelinde tahminen 410.000 kişide çoklu ilaca dirençli veya rifampisine dirençli TB (ÇİD-RD TB) gelişmiştir (1). Çok ilaca dirençli tüberküloz hastalarının erken teşhisi, tedaviye erken başlanması ve dirençli suşun yayılmasını azaltmak için hızlı saptanması çok önemlidir (118). Xpert MTB/RIF veya Xpert MTB/RIF Ultra kullanılarak tüberküloz basili saptandığı gibi rifampisin direnç geni de tespit edilmektedir (104). Rahman ve ark. (113) 89 dışkı örneğini Xpert MTB/RIF ile değerlendirdiği çalışmada % 96,6'sı (n=86) rifampisin duyarlı, % 3,4'ü (n=3) ise rifampisin dirençli saptanmıştır. Bu sonuçlar balgam Xpert MTB/RIF rifampisin direnç sonuçlarıyla tamamen uyumlu bulunmuştur. Bizim çalışmamızda sadece bir hastada balgam PCR sonucuna göre rifampisin direnci tespit edilmişti. Bu sonuç kültür ile doğrulanmıştır. Kalan bütün hastaların balgam PCR, dışkı PCR ve kültür sonuçları uyumlu olarak rifampisin duyarlı saptanmıştır.

Akciğer tüberkülozlu hasta dışkıları PCR yöntemi kullanılarak pek çok çalışmada değerlendirilmiş ve anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Dışkı örneği birkaç çalışmada ARB ve kültür yöntemleriyle de değerlendirilmiş fakat duyarlılığına dair anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. Tüberküloz hastalarının dışkı kültürü balgam kültürü ile kıyaslandığında % 30'un altında duyarlılığa sahiptir (119). Abaye ve ark. (58) tarafından 117 erişkin HIV (+) tüberküloz şüpheli hastada yapılan bir çalışmada 33 hastanın balgam kültürü pozitif saptanmıştır. Bu hastaların dışkı kültürleri balgam kültürleriyle kıyaslandığında duyarlılık % 30,3, özgüllük ise % 96,4 bulunmuştur. Dışkı ARB sonuçları aynı şekilde balgam kültürleriyle kıyaslandığında duyarlılık % 12,1, özgüllük % 100 hesaplanmıştır. Rahman ve ark. (113) yaptığı başka bir çalışmada balgam kültür sonuçlarıyla kıyaslandığında dışkı ARB duyarlılığı % 53,9, özgüllüğü % 100, dışkı kültür duyarlılığı % 35,3, özgüllüğü % 100 olarak değerlendirilmiştir. Musisi ve ark. (115) yaptığı çalışmada ise balgam kültürü referans yöntem kabul edildiğinde dışkı kültür duyarlılığı % 44, özgüllüğü % 80, PPD %48, NPD ise %48 hesaplanmıştır. Aynı çalışmada dışkı kültürü % 21 oranında kontaminasyon sebebiyle belirsiz sonuç vermiştir. Bu durumun yüksek mikrobiyal dansite ve çeşitlilik sebebiyledir. Görüldüğü gibi dışkı ARB ve kültür sonuçları tanıda kullanılabilecek seviyede değildir. Bütün bu sebeplerden dolayı bizim çalışmamızda dışkı örneğini sadece PCR yöntemiyle değerlendirilmiştir. ARB ve kültür yöntemleri kullanılmamıştır.

Çalışmamızda 2 (% 10) hastanın balgam kültür sonucu negatif olmasına rağmen balgam ve dışkı PCR sonucu pozitif olarak saptanmıştır. Bu hastaların ikisi de tedavi gören takip hastalarıydı. Balgam ve dışkıda saptanan basil ölü basil olarak değerlendirildi. Çünkü hastalar düzenli tedavilerini almakta ve semptomatik olarak da düzelmekteydi. Yapılan çalışmalarda tedavi takibinde bir süre daha balgamla ölü basil atılımı olabileceği bunun Xpert MTB/RIF gibi PCR testleri ile tespit edilebileceği görülmüştür (13). Bizim çalışmamızda da hastaların negatif balgam kültür sonucuna rağmen pozitif PCR sonuçları ölü basil atılımı olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda 1 (%5) hastanın balgam kültür ve dışkı PCR sonucu negatif olarak saptanmasına rağmen balgam PCR sonucu pozitif saptanmıştır. Bu hasta tedavi gören takip hastasıydı. Kültür pozitifliği ölü basil saçılımı olarak değerlendirilirken balgam PCR pozitif olmasına rağmen dışkı PCR negatifliği mevcut basil yükünün dışkıda tespit edilemeyecek düzeyde düşük olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tüberküloz tanısında dışkı örneği yeni bir tanısal numune olarak son yıllarda karşımıza çıkmıştır. Bizim çalışmamızda da akciğer tüberkülozlu yetişkin hastalarda dışkı PCR değerlendirmesinin yeni bir tanısal yöntem olup olamayacağı değerlendirilmiştir ve % 90 üzerinde duyarlılık ve özgüllük elde edilerek dışkının yetişkin hasta grubunda akciğer tüberküloz tanısında kullanılabilecek bir numune olduğu kanısına varılmıştır.

Özellikle immün yetmezlikli hasta grubu başta olmak üzere nörolojik defisiti olan hastalar, yoğun bakım hastaları ve herhangi bir sebeple balgam veremeyen hastalar için akciğer tüberkülozu tanısında dışkı örneği muhakkak akla getirilmelidir. Çalışmamızda kullandığımız PCR işlemi öncesi sükröz yüzdürme yöntemi, basit ve her laboratuvarında rahatlıkla uygulanabilir bir yöntemdir. Türkiye’de henüz akciğer tüberküloz tanısında dışkı örneği kullanımı yaygın değildir. Fakat klinik mikrobiyologların ve klinisyenlerin ortak çalışmasıyla rutine sokulmalıdır. Bu sayede hem hasta için hem hekim için birçok fayda sağlayacaktır.

Sonuç olarak, dışkı PCR erişkin yaş grubunda akciğer tüberkülozu tanısı için yüksek derecede özgül ve duyarlı bir tekniktir. Hızlı, noninvaziv bir ön test olarak potansiyel kullanıma sahiptir. Tanısal duyarlılığı artırmak için PCR işlemi öncesi farklı dışkı hazırlama yöntemleri geliştirilmeye devam etmektedir. Literatür tarandığında çalışmamız bu alanda Türkiye’de yapılan ilk çalışmadır.

7. KAYNAKLAR

1. WHO. Global Tuberculosis Report 2023 World Health Organization Erişim linki: <https://iris.who.int/handle/10665/373828>. Erişim tarihi: Mart 2024
2. Houben RM, Dodd PJ. The global burden of latent tuberculosis infection: a re-estimation using mathematical modelling. *PLoS medicine*. 2016;13(10):e1002152.
3. Emery JC, Richards AS, Dale KD, et al. Self-clearance of *Mycobacterium tuberculosis* infection: implications for lifetime risk and population at-risk of tuberculosis disease. *Proceedings of the Royal Society B*. 2021;288(1943):20201635.
4. Behr MA, Edelstein PH, Ramakrishnan L. Is *Mycobacterium tuberculosis* infection life long. *Bmj*. 2019;367.
5. Tiemersma EW, van der Werf MJ, Borgdorff MW, Williams BG, Nagelkerke NJ. Natural history of tuberculosis: duration and fatality of untreated pulmonary tuberculosis in HIV negative patients: a systematic review. *PloS one*. 2011;6(4):e17601.
6. Small PM, Pai M. Tuberculosis diagnosis time for a game change. *Mass Medical Soc*; 2010.
7. Kox L, Rhienthong D, Miranda AM, et al. A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 1994;32(3):672-8.
8. Lachnik J, Ackermann B, Bohrssen A, et al. Rapid-cycle PCR and fluorimetry for detection of mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002;40(9):3364-73.
9. Montenegro SH, Gilman RH, Sheen P, et al. Improved detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Peruvian children by use of a heminested IS6110 polymerase chain reaction assay. *Clinical Infectious Diseases*. 2003;36(1):16-23.
10. Rossi MC, Gori A, Zehender G, et al. A PCR-colorimetric microwell plate hybridization assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. avium* from

culture samples and Ziehl-Neelsen-positive smears. *Journal of clinical microbiology*. 2000;38(5):1772-6.

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

12. Kesarwani V, Singh N, Kashyap B, Kumar A. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* on stool specimens by PCR among patients with pulmonary tuberculosis. *Journal of Family Medicine and Primary Care*. 2022;11(1):97.

13. Cordova J, Shiloh R, Gilman RH, et al. Evaluation of molecular tools for detection and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in stool specimens from patients with pulmonary tuberculosis. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48(5):1820-6.

14. Vandal OH, Pierini LM, Schnappinger D, Nathan CF, Ehrt S. A membrane protein preserves intrabacterial pH in intraphagosomal *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature medicine*. 2008;14(8):849-54.

15. El Khechine A, Henry M, Raoult D, Drancourt M. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in the stools of patients with pulmonary tuberculosis. *Microbiology*. 2009;155(7):2384-9.

16. WHO. Consolidated Guidelines On Tuberculosis: Module 5: Management Of Tuberculosis In Children And Adolescents. 2022 World Health Organization Erişim linki: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/352522>. Erişim tarihi: Mart 2024

17. Procop GW, Church DL, Hall GS, et al. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* 2017.

18. Mason RJ, Broaddus J, Martin TR, King J, T.E., Schraufnagel D, Murray JF. *Murray and Nadel's Respiratory Medicine* 2011.

19. Riedel S, Hobden JA, Miller S, et al. *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology*. Education M-H, 2019.

20. Sastry AS, Bhat S. *Essentials of medical microbiology*: JP Medical Ltd; 2018.

21. Van Ingen J, Rahim Z, Mulder A, et al. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerging infectious diseases*. 2012;18(4):653.
22. Alexander KA, Laver PN, Michel AL, et al. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerging infectious diseases*. 2010;16(8):1296.
23. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical microbiology*: Elsevier Health Sciences; 2015.
24. Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. *Clinical microbiology reviews*. 2006;19(4):658-85.
25. Levinson WE. *Review of medical microbiology and immunology*: McGraw-Hill Education; 2018.
26. Timpe A, Runyon EH. The relationship of "atypical" acid-fast bacteria to human disease: A preliminary report. *Reviews of Infectious Diseases*. 1981;1098-103.
27. Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 2003;83(1-3):91-7.
28. Jankute M, Cox JA, Harrison J, Besra GS. Assembly of the mycobacterial cell wall. *Annual review of microbiology*. 2015;69:405-23.
29. Chatterjee D. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Current opinion in chemical biology*. 1997;1(4):579-88.
30. Köksal F, Yaman A. Farklı bir bakteri topluluğu mikobakterilerde hücre duvar yapısı. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu,, Samsun, Sempozyum Kitabı. 2003:34-47.
31. Raffetseder J. *Interplay of human macrophages and Mycobacterium tuberculosis phenotypes*: Linköping University Electronic Press; 2016.
32. Todar K. *Todar's online textbook of bacteriology*: University of Wisconsin Madison Wisconsin; 2004 Erişim linki: <http://textbookofbacteriology.net/>. Erişim tarihi: Mart 2024

33. Rao N, Meena LS. Biosynthesis and virulent behavior of lipids produced by *Mycobacterium tuberculosis*: LAM and cord factor: an overview. *Biotechnology research international*. 2011;2011.
34. Briken V, Porcelli SA, Besra GS, Kremer L. Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Molecular microbiology*. 2004;53(2):391-403.
35. Iwai K, Maeda S, Murase Y. Archaeology of tubercle bacilli and tuberculosis. *Kekkaku:[Tuberculosis]*. 2010;85(5):465-75.
36. Elliott T, Casey A, Lambert PA, Sandoe J. *Medical Microbiology and infection*: John Wiley & Sons; 2011.
37. WHO. Global Tuberculosis Report 2022 World Health Organization: Erişim linki: <https://iris.who.int/handle/10665/363752>. Erişim tarihi: Mart 2024
38. TC Sağlık Bakanlığı. *Türkiye Verem Savaş Raporu*. Ankara: Sağlık Bakanlığı Yayınları. 2023.
39. Riley RL, Mills C, O'grady F, Sultan L, Wittstadt F, Shivpuri D. Infectiousness of air from a tuberculosis ward: ultraviolet irradiation of infected air: comparative infectiousness of different patients. *American Review of Respiratory Disease*. 1962;85(4):511-25.
40. Kaufmann SH, Cole ST, Mizrahi V, Rubin E, Nathan C. *Mycobacterium tuberculosis* and the host response. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201(11):1693.
41. Özkara ř. *Klinisyenler için tüberküloz klavuzu*. Ankara: Nobel Tıp Kitabevi. 2002:67-96.
42. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases Book: 2-Volume Set*: Elsevier health sciences; 2019.
43. González Saldaña N, Macías Parra M, Hernández Porras M, Gutiérrez Castellón P, Gómez Toscano V, Juárez Olguin H. *Pulmonary Tuberculosis*:

Symptoms, diagnosis and treatment. 19-year experience in a third level pediatric hospital. BMC infectious diseases. 2014;14(1):1-7.

44. Dowdy DW, Basu S, Andrews JR. Is passive diagnosis enough The impact of subclinical disease on diagnostic strategies for tuberculosis. American journal of respiratory and critical care medicine. 2013;187(5):543-51.

45. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı.Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi Ankara. 2014.

46. Yüce A, Özyurt M, Sürücüoğlu S, Uzun M, Sarıgüzel N. Mycobacterium tuberculosis veTüberküloz. 1. Baskı 2016. 54-67 p.

47. T.C. Sağlık Bakanlığı Tüberküloz Tanı ve Tedavi Rehberi Yayın No: 1129. Ankara; 2019.

48. WHO. Operational Handbook on Tuberculosis Module 5: Management of tuberculosis in children and adolescents 2022 World Health Organization: Erişim linki: <https://iris.who.int/handle/10665/352523>. Erişim tarihi: Mart 2024

49. Noeske J, Dopico E, Torrea G, Wang H, Van Deun A. Two vs. three sputum samples for microscopic detection of tuberculosis in a high HIV prevalence population. The International journal of tuberculosis and lung disease. 2009;13(7):842-7.

50. Pfyffer GE. Mycobacterium: general characteristics, laboratory detection, and staining procedures. Manual of clinical microbiology. 2015:536-69.

51. Oberhelman RA, Soto-Castellares G, Caviades L, et al. Improved recovery of Mycobacterium tuberculosis from children using the microscopic observation drug susceptibility method. Pediatrics. 2006;118(1):e100-e6.

52. Starke JR, Correa AG. Management of mycobacterial infection and disease in children. The Pediatric infectious disease journal. 1995;14(6):455-70.

53. Andresen D. Microbiological diagnostic procedures in respiratory infections: mycobacterial infections. Paediatric respiratory reviews. 2007;8(3):221-30.

54. Hartung T, Maulu A, Nash J, Fredlund V. Suspected pulmonary tuberculosis in rural South Africa-Sputum induction as a simple diagnostic tool? South African Medical Journal. 2002;92(6):455-8.
55. Banada PP, Naidoo U, Deshpande S, et al. A novel sample processing method for rapid detection of tuberculosis in the stool of pediatric patients using the Xpert MTB/RIF assay. PloS one. 2016;11(3):e0151980.
56. Moussa HS, Bayoumi FS, Mohamed AMA. Gene Xpert for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in stool specimens from children with presumptive pulmonary tuberculosis. Annals of Clinical & Laboratory Science. 2016;46(2):198-203.
57. Sultana S, Ansar A, Saif-Ur-Rahman K. Protocol: Stool specimen for diagnosis of pulmonary tuberculosis in adults: protocol for a systematic review and meta-analysis. BMJ open. 2021;11(8).
58. Abaye GE, Abebe T, Worku A, Tolessa D, Ameni G, Mihret A. Detection of Mycobacterium tuberculosis from the stool of HIV sero-positive individuals suspected of pulmonary tuberculosis. PloS one. 2017;12(5):e0177529.
59. Mesman AW, Soto M, Coit J, et al. Detection of Mycobacterium tuberculosis in pediatric stool samples using TruTip technology. BMC infectious diseases. 2019;19:1-7.
60. Owens S, Abdel-Rahman IE, Balyejusa S, et al. Nasopharyngeal aspiration for diagnosis of pulmonary tuberculosis. Archives of disease in childhood. 2006.
61. Conde MB, Loivos AC, Rezende VM, et al. Yield of sputum induction in the diagnosis of pleural tuberculosis. American journal of respiratory and critical care medicine. 2003;167(5):723-5.
62. Franchi LM, Cama RI, Gilman RH, Montenegro-James S, Sheen P. Detection of Mycobacterium tuberculosis in nasopharyngeal aspirate samples in children. The Lancet. 1998;352(9141):1681-2.
63. Maartens G. Advances in adult pulmonary tuberculosis. Current opinion in pulmonary medicine. 2002;8(3):173-7.

64. Mafirakureva N, Klinkenberg E, Spruijt I, et al. Xpert Ultra stool testing to diagnose tuberculosis in children in Ethiopia and Indonesia: a model-based cost-effectiveness analysis. *BMJ open*. 2022;12(7):e058388.
65. Tan H-K, Fan S-J, Xu Y-C, et al. The clinical diagnostic value of Xpert MTB/RIF for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in gastric aspirates. *Bioscience Reports*. 2020;40(6):BSR20200138.
66. Luo W, Lin Y, Li Z, Wang W, Shi Y. Comparison of sputum induction and bronchoscopy in diagnosis of sputum smear-negative pulmonary tuberculosis: a systemic review and meta-analysis. *BMC Pulmonary Medicine*. 2020;20(1):1-9.
67. Ruiz Jiménez M, Guillén Martín S, Prieto Tato LM, et al. Induced sputum versus gastric lavage for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children. *BMC infectious diseases*. 2013;13:1-6.
68. Ulmar D, Ornstein GG. Gastric examination in pulmonary tuberculosis with negative sputum: diagnostic importance. *Journal of the American Medical Association*. 1933;101(11):835-6.
69. Alonso J. Immunity and pathophysiology of respiratory tract infections. *Medecine et Maladies Infectieuses*. 2008;38(8):433-7.
70. Donald P, Schaaf H, Gie R, Beyers N, Sirgel F, Ventert A. Stool microscopy and culture to assist the diagnosis of pulmonary tuberculosis in childhood. *Journal of tropical pediatrics*. 1996;42(5):311-2.
71. WHO. Consolidated Guidelines on Tuberculosis: Module 3: Diagnosis: Tests for TB Infection. 2022 World Health Organization: Erişim linki: <https://iris.who.int/handle/10665/362936>. Erişim tarihi: Mart 2024
72. WHO. Global Tuberculosis Report 2018 World Health Organization: Erişim linki: <https://iris.who.int/handle/10665/274453>. Erişim tarihi: Mart 2024
73. Alp A. Tüberkülozun laboratuvar tanısında güncel durum. *Hacet Tıp Derg*. 2011;42:28-33.

74. Leber AL. Clinical microbiology procedures handbook: John Wiley & Sons; 2020.
75. Isenberg HD. Clinical microbiology procedures handbook. 2004.
76. Musser JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clinical microbiology reviews*. 1995;8(4):496-514.
77. Rajendhran J, Gunasekaran P. Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiological research*. 2011;166(2):99-110.
78. Tsolaki AG, Hirsh AE, DeRiemer K, et al. Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: insights from genomic deletions in 100 strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101(14):4865-70.
79. McEvoy CR, van Pittius NCG, Victor TC, van Helden PD, Warren RM. The role of IS6110 in the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 2007;87(5):393-404.
80. Van Embden J, Van Gorkom T, Kremer K, Jansen R, Van der Zeijst B, Schouls L. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Journal of bacteriology*. 2000;182(9):2393-401.
81. Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Molecular microbiology*. 2000;36(3):762-71.
82. Martin A, Bombeeck D, Fissette K, et al. Evaluation of the BD MGIT TBc Identification Test (TBc ID), a rapid chromatographic immunoassay for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex from liquid culture. *Journal of microbiological methods*. 2011;84(2):255-7.
83. Yu M-C, Chen H-Y, Wu M-H, al. Evaluation of the rapid MGIT TBc identification test for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex strain detection. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49(3):802-7.

84. Tansel Ö. Klasik antibiyotik duyarlılık test yöntemleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. 2003:11-2.
85. Cesur S, Şimşek H. Çoklu İlaça ve Yaygın İlaça Dirençli Tüberküloz İçin Hızlı Tanı Yöntemleri. Ortadoğu Medical Journal/Ortadoğu Tıp Dergisi. 2015;7(2).
86. Rahman A, Sahrin M, Afrin S, et al. Comparison of Xpert MTB/RIF assay and GenoType MTBDR plus DNA probes for detection of mutations associated with rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis. PloS one. 2016;11(4):e0152694.
87. Mani C, Selvakumar N, Narayanan S, Narayanan P. Mutations in the rpoB gene of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from India. Journal of clinical microbiology. 2001;39(8):2987-90.
88. Cho S-N. Current issues on molecular and immunological diagnosis of tuberculosis. Yonsei medical journal. 2007;48(3):347-59.
89. Horne DJ, Kohli M, Zifodya JS, et al. Xpert MTB/RIF and Xpert MTB/RIF Ultra for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. The Cochrane database of systematic reviews. 2019;2019(6).
90. Ling DI, Zwerling AA, Pai M. Rapid diagnosis of drug-resistant TB using line probe assays: from evidence to policy. Expert review of respiratory medicine. 2008;2(5):583-8.
91. WHO. The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs: policy guidance: World Health Organization; 2016.
92. Fox W. Various Combinations of Isoniazid with Streptomycin or with PAS in the Treatment of Pulmonary Tuberculosis. Group.1(1).
93. Drobniewski F, Rüsch-Gerdes S, Hoffner S. Antimicrobial susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis (EUCAST document E. DEF 8.1)—report of the Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis of the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). *Clinical microbiology and infection*. 2007;13(12):1144-56.

94. Nguyen TNA, Anton-Le Berre V, Bañuls A-L, Nguyen TVA. Molecular diagnosis of drug-resistant tuberculosis; a literature review. *Frontiers in microbiology*. 2019;10:794.

95. Üstek D, Abacı N, Sırma S, Çakiris A. Yeni nesil DNA dizileme. *Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*. 2011;1(1):11-8.

96. MacLean E, Kohli M, Weber SF, , et al. Advances in molecular diagnosis of tuberculosis. *Journal of clinical microbiology*. 2020;58(10):10.1128/jcm. 01582-19.

97. Zeng X, Li H, Zheng R, et al. Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by use of ligation-based amplification and melting curve analysis. *Journal of clinical microbiology*. 2016;54(9):2384-7.

98. Biltekin N, Ülger M, Kayar MB, ve ark. Tüberkülozlu Hastalara Ait *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks İzolatlarının MIRU-VNTR ve Spoligotiplendirme Yöntemleri ile Genotiplendirilmesi. 2023.

99. Zeytinli ÜO, Köksal F. Çukurova Bölgesinde Akciğer Tüberkülozlu Hastalardan İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* Suşlarının Spoligotiplendirme ve MIRU-VNTR Yöntemiyle Tiplendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*. 2012;46(2):202-10.

100. Gonzalo-Asensio J, Pérez I, Aguiló N, et al. New insights into the transposition mechanisms of IS6110 and its dynamic distribution between *Mycobacterium tuberculosis* complex lineages. *PLoS genetics*. 2018;14(4):e1007282.

101. Uddin MKM, Rahman A, Ather MF, et al. Distribution and frequency of *rpo B* mutations detected by Xpert MTB/RIF assay among Beijing and Non-Beijing Rifampicin resistant *Mycobacterium Tuberculosis* isolates in Bangladesh. *Infection and Drug Resistance*. 2020:789-97.

102. Chakravorty S, Simmons AM, Rowneki M, et al. The new Xpert MTB/RIF Ultra: improving detection of *Mycobacterium tuberculosis* and resistance to rifampin in an assay suitable for point-of-care testing. *MBio*. 2017;8(4):10.1128/mbio. 00812-17.

103. Helb D, Jones M, Story E, et al. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48(1):229-37.
104. WHO. Meeting Report of a Technical Expert Consultation: Non-inferiority analysis of Xpert MTB/RIF Ultra compared to Xpert MTB/RIF 2017 World Health Organization: Erişim linki: <https://iris.who.int/handle/10665/254792>. Erişim tarihi: Mart 2024
105. Chin JH, Ssengooba W, Grossman S, Pellinen J, Wadda V. Xpert MTB/RIF Ultra: Optimal procedures for the detection of Mycobacterium tuberculosis in cerebrospinal fluid. Elsevier; 2019. p. 16-8.
106. Maynard-Smith L, Larke N, Peters JA, Lawn SD. Diagnostic accuracy of the Xpert MTB/RIF assay for extrapulmonary and pulmonary tuberculosis when testing non-respiratory samples: a systematic review. *BMC infectious diseases*. 2014;14:1-15.
107. WHO. Practical manual of processing stool samples for diagnosis of childhood TB. 2022 World Health Organization: Erişim linki: <https://iris.who.int/handle/10665/353599>. Erişim tarihi: Mart 2024
108. WHO. Molecular assays intended as initial tests for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB and rifampicin resistance in adults and children: rapid communication. 2020 World Health Organization: Erişim linki: <https://iris.who.int/handle/10665/330395>. Erişim tarihi: Mart 2024
109. Liu R, Liang Q, Shang Y, et al. GeneXpert of stool versus gastric lavage fluid for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in severely ill adults. *Infection*. 2019;47:611-6.
110. Yu X, Wang F, Ren R, et al. Xpert MTB/RIF Ultra Assay Using Stool: an Effective Solution for Bacilli Identification from Adult Pulmonary Tuberculosis Suspects without Expecterated Sputum. *Microbiology Spectrum*. 2023;11(4):e01265-23.
111. Kabir S, Rahman SM, Ahmed S, al. Xpert Ultra assay on stool to diagnose pulmonary tuberculosis in children. *Clinical Infectious Diseases*. 2021;73(2):226-34.

112. Kokuto H, Sasaki Y, Yoshimatsu S, Mizuno K, Yi L, Mitarai S, editors. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) in fecal specimens from adults diagnosed with pulmonary tuberculosis using the Xpert MTB/rifampicin test. Open forum infectious diseases; 2015: Oxford University Press.
113. Rahman SM, Maliha UT, Ahmed S, et al. Evaluation of Xpert MTB/RIF assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in stool samples of adults with pulmonary tuberculosis. PLoS one. 2018;13(9):e0203063.
114. Nicol MP, Spiers K, Workman L, et al. Xpert MTB/RIF testing of stool samples for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children. Clinical infectious diseases. 2013;57(3):e18-e21.
115. Musisi E, Sessolo A, Kaswabuli S, et al. High *Mycobacterium tuberculosis* bacillary loads detected by tuberculosis molecular bacterial load assay in patient stool: a potential alternative for nonsputum diagnosis and treatment response monitoring of tuberculosis. Microbiology spectrum. 2022;10(1):e02100-21.
116. Lounnas M, Diack A, Nicol MP, et al. Laboratory development of a simple stool sample processing method diagnosis of pediatric tuberculosis using Xpert Ultra. Tuberculosis. 2020;125:102002.
117. Gebre M, Cameron LH, Tadesse G, Woldeamanuel Y, Wassie L. Variable diagnostic performance of stool Xpert in pediatric tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. Open forum infectious diseases; 2021: Oxford University Press US.
118. Sibandze DB, Kay A, Dreyer V, et al. Rapid molecular diagnostics of tuberculosis resistance by targeted stool sequencing. Genome medicine. 2022;14(1):52.
119. Walters E, Demers A-M, Van der Zalm MM, et al. Stool culture for diagnosis of pulmonary tuberculosis in children. Journal of clinical microbiology. 2017;55(12):3355-65.

EKLER