

ALPER TOGAY

İSTANBUL ŞİŞLİ HAMİDİYE ETFAK EĞİTİM
VE ARAŞTIRMA HASTANESİ

UZMANLIK TEZİ

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
ŞİŞLİ HAMİDİYE
ETFAL EĞİTİM VE ARAŞTIRMA
HASTANESİ
(UZMANLIK TEZİ)

KLİNİK ÖRNEKLERDE İZOLE EDİLEN
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS KOMPLEKS
TÜRLERİNİN gyrB PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE
BELİRLENMESİ

ALPER TOGAY

DANIŞMAN
BANU BAYRAKTAR

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
LABORATUVARI

İSTANBUL-2014

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

ALPER TOGAY

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimine başladığım günden itibaren bilgi, tecrübe ve desteğini esirgemeyen, tez konumun belirlenmesi ve yürütülmesinde beni yönlendiren değerli danışmanım ve hocam Sayın Doç. Dr. PhD. Banu Bayraktar'a ve geldiği günden itibaren kapısı her daim açık olup yardımını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Elif Aktaş'a teşekkür ederim.

Güler yüzüyle her zaman uyum içinde çalıştığımız uzmanımız Sayın Dr. Emin Bulut'a ve asistanlığım süresince severek çalıştığım sevgili asistan arkadaşlarıma; ve özellikle çalışmamda çok emeği geçen Özlem Turan Teber başta tüm laboratuvar personeline ayrı ayrı teşekkür ederim.

Hayatım boyunca desteğini esirgemeyip, bugünlere gelmemi sağlayan sevgili annem, babam ve abime;

Birlikte olmaktan sonsuz mutluluk duyduğum, yardımını her zaman yanımda hissettiğim biricik eşim Dr. Bilge Togay'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca istatistik çalışmalarında yardımını esirgemeyen Prof. Dr. Ethem Erginöz'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLOLAR LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	ix
ÖZET	xi
ABSTRACT.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	xii
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. TARİHÇE	4
2.2. EPİDEMİYOLOJİ	7
2.3. TAKSONOMİ.....	9
2.4. MORFOLOJİ VE ÜREME ÖZELLİKLERİ.....	10
2.5. ANTİJENİK ÖZELLİK VE VİRULANS FAKTÖRLERİ.....	12
2.5.1. Lipit yapısındaki antijenler	12
2.5.2. Protein yapısındaki antijenler	12
2.5.3. Mikobakteriyel polisakkaridler	14
2.6. PATOGENEZ VE PATOLOJİ.....	15
2.7. MTBC ÜYELERİNİN MİKROBİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ.....	18
2.8. MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARI ORGANİZASYONU VE İŞLEVİ	20
2.9. LABORATUVAR TANI.....	21
2.9.1. Örneklerin Toplanması ve İşlenmesi	21
2.9.2. Aside Dirençli Boyama Yöntemleri.....	22
2.9.3. Kültür	23
2.9.3.1. Kültür yöntemleri	24
2.9.3.2. Katı besiyerleri	24
2.9.3.3. Bifazik besiyerleri	25

2.9.3.4. Sıvı besiyerleri	25
2.9.4. İdentifikasyon.....	27
2.9.4.1. Konvansiyonel biyokimyasal yöntemler.....	27
2.9.4.2. Kromotografik Analiz	29
2.9.4.3. Moleküler yöntemler.....	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
3.1. BAKTERİ İZOLATLARI	35
3.2. HOMOJENİZASYON-DEKONTAMİNASYON-KONSANTRASYON İŞLEMİ	35
3.3. ASİDE DİRENÇLİ BOYAMA	36
3.3.1. EZN boyama:	36
3.3.2. Auromine-Rhodamine boyama:	36
3.4. KÜLTÜR	37
3.5. KONVANSİYONEL YÖNTEMLER İLE İDENTİFİKASYON.....	38
3.5.1. MGIT PNB Deneyi	39
3.5.2. Niasin Deneyi.....	39
3.5.3. Nitrat Redüktaz Deneyi.....	40
3.6. PCR-RFLP İLE İDENTİFİKASYON	41
3.6.1. Mikobakteri DNA Ekstraksiyonu	41
3.6.2. <i>hsp65</i> gen Amplifikasyonu	42
3.6.3. BstEII ve HaeIII Restriksiyon Enzimleri ile kesim	43
3.6.4. <i>gyrB</i> gen Amplifikasyonu	44
3.6.5. RsaI, TaqI ve SaqII Restriksiyon Enzimleri ile kesim.....	45
3.6.6. Agaroz Jel Elektroforezi:	46
3.7. İSTATİKSEL İNCELEMELER	48
4. BULGULAR.....	49
4.1. HASTALARA AİT ÖZELLİKLER	49
4.2. KÜLTÜR VE MİKROSKOBİK İNCELEME BULGULARI	51
4.3. İDENTİFİKASYON BULGULARI.....	54
5. TARTIŞMA.....	58
KAYNAKLAR	71
ETİK KURUL KARARI	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

TABLolar LISTESi

- Tablo 1.** MTBC üyelerinin identifikasyon özellikleri
- Tablo 0:** Mikroskopik incelemede görülen ARB miktarının kantitatif değerlendirilmesi
- Tablo 3:** MTBC üyelerinin konakları
- Tablo 4:** *hsp65* PCR-RFLP için kullanılan primerler ve özellikleri
- Tablo 5:** BstEII ve HaeIII restriksiyon enzimleri ile DNA kesimi için hazırlanan karışım
- Tablo 6:** *gyrB* PCR-RFLP için kullanılan primerler ve özellikleri
- Tablo 7:** RsaI, TaqI ve SacII restriksiyon enzimleri ile DNA kesimi için hazırlanan karışım
- Tablo 8:** MTBC üyelerinin *gyrB* geninin RsaI, TaqI, SacII enzimleri yardımıyla PCR-RFLP paternleri
- Tablo 9:** Örnek türlerinin ve üremeli örneklerin yıllara göre dağılımı
- Tablo 10:** Örnek türlerinin gönderildikleri kliniklere göre dağılımı
- Tablo 11:** MGIT ve LJ kültürlerinin karşılaştırmalı sonuçları
- Tablo 12:** Mikobakteri türleri ile LJ besiyeri kültüründe üreme sonuçları arasındaki uyum
- Tablo 13:** Mikroskopik inceleme ve kültür sonuçları arasındaki uyum
- Tablo 14:** Mikroskopik inceleme ve örnek türü arasındaki uyum
- Tablo 15:** Kültürde üretilen *M.bovis* suşlarının özellikleri

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Kùltüründe mikobakteri üretilen hastaların yıllara göre cinsiyet dağılımları

Şekil 2: Kùltüründe mikobakteri üretilen hastaların yaş gruplarına göre dağılımı

Şekil 3: RsaI restriksiyon enzimiyle kesilen *gyrB* gen bölgesinin 1020 baz çiftlik bölümünün UV ışık altında görùlen agaroz jel fotoğrafı

Şekil 4: TaqI restriksiyon enzimiyle kesilen *gyrB* gen bölgesinin 1020 baz çiftlik bölümünün UV ışık altında görùlen agaroz jel fotoğrafı

Şekil 5: SaqII restriksiyon enzimiyle kesilen *gyrB* gen bölgesinin 1020 baz çiftlik bölümünün UV ışık altında görùlen agaroz jel fotoğrafı



SEMBOLLER / KISALTMALAR LISTESİ

- AIDS: Acquired immunodeficiency syndrome
ARB: Aside Dirençli Basil
BAL: Bronkoalveolar Lavaj
BCG: Bacille Calmette-Guerin
BOS: Beyin omurilik sıvısı
CDC: Center for Disease Control and Prevention (Hastalık Kontrol Merkezi)
EZN: Ehrlich- Ziehl-Neelsen
FDA: Food and Drug Administration
GLC: Gas-liquid chromatography (Gaz-sıvı Kromatografisi)
GYRB: Gyrase subunit B
HIV: Human İmmunodeficiency Virus
HPLC: High-Performance Liquid Chromatography(Yüksek performanslı sıvı kromatografisi)
Hsp 65: Heat Shock Protein 65
LJ : Löwenstein Jensen besiyeri
MGIT: Mycobacterium Growth Indicator Tube
MTBC: Mycobacterium.tuberculosis kompleks
NALC: N-asetil-L-sistein
NAP: p-nitro-asetilamino-hidroksi propiyofenon
NTM: Non Tuberculous Mycobacteria
OADC: Oleik asit, albumin, dekstroz, katalaz
OT: Old Tüberkülin
PANTA: Polimiksin B, Amfoterisin B, Nalidiksik asit, Trimetoprim, Azlosilin
PAS: Para-amino salisilik asit
PCR: Polymerase Chain Reaction
PNB: p-nitro benzoik asit
PPD: Purified Protein Derivative
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
SVS: Steril Vücut Sıvısı
TB: Tüberküloz

TLC: Thin Layer Chromatography

TCH: Tiyofen-2-karboksilik asid hidrazid

TBE: Tris Boric asit EDTA

TE: Tris EDTA

WHO: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)



ÖZET

Togay A. (2014). Klinik örneklerden izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* kompleks türlerinin gyrB PCR-RFLP Yöntemi ile belirlenmesi. Sağlık Bakanlığı Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı. Tıpta Uzmanlık Tezi. İstanbul.

Mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanması, patojen olan türlerin patojen olmayanlardan ayrımı, uygun tedavi rejiminin seçimi ve epidemiyolojik verilerin toplanması için önemlidir. Geleneksel yöntemler ile laboratuvar tanısı zaman alıcı ve zahmetli olan mikobakterilerin identifikasyonu için daha hızlı, duyarlı ve güvenilir yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. Bu çalışmanın amacı *Mycobacterium tuberculosis* kompleks suşlarının tür düzeyinde tayini ve türlere özgü risk faktörlerinin irdelenmesidir.

Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Ocak 2011-Nisan 2013 tarihleri arasında TB şüphesi ile laboratuvarımıza gönderilen 1896 hastaya ait klinik örnekten 136'sında MGIT kültür sistemi ile mikobakteri izole edilmiştir. Bu örneklerden elde edilen 117 MTBC suşu çalışma kapsamına alınmıştır.

Mikobakteri kültürü yapılması istenen klinik örnekler MGIT ve LJ besiyerlerine ekilmiş ve 136 hastadan mikobakteri üretilmiştir. MGIT kültür yöntemi ile izole edilen 136 suşun ancak 117'si (%86) LJ besiyerinde üretilmiştir. LJ'de üremeyen suşların 13'ü NTM, 6'sı MTBC'dır. Kültüründe üreme saptanan 136 örneğin 55'inde (%40) Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) ve Auromine-Rhodamine yöntemleri ile aside dirençli basil saptanmıştır.

Kültürde üreyen *Mycobacterium tuberculosis* kompleks türlerinin identifikasyonu amacıyla gyrB PCR-RFLP yöntemi uygulanarak 113 suş *M. tuberculosis*, 4 suş *M. bovis* olarak saptanmıştır.

Gelişen teknoloji ile biyokimyasal deneylere göre daha hızlı ve daha doğru tanımlama sağlayabilen, maliyeti diğer yöntemlere oranla oldukça düşük olan gyrB PCR-RFLP yönteminin mikobakteriyoloji laboratuvarlarında kullanılması fayda sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: PCR-RFLP, gyrB, *M.tuberculosis complex*, *M.tuberculosis*, *M.bovis*

ABSTRACT

Togay A. (2014) Identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains isolated from clinical specimens via gyrB PCR-RFLP method. Health Ministry the Sisli Hamidiye Etfal Training and Research Hospital Microbiology and Clinical Microbiology Laboratory. Thesis for specialisation in medicine. Istanbul

Mycobacterial identification to the species level is important for, discrimination of a nonpathogenic species from pathogenic species, selecting proper treatment regimen and collecting epidemiological data. Because the conventional methods for mycobacterial identification are time consuming and labor intensive, there is a need for rapid, sensitive, and reliable methods. The aim of this study was to determine whether species identification of *M.tuberculosis* complex strains and analyze risk factors of species.

A total of 136 mycobacterial isolates were obtained from 1896 patients submitted to the Şişli Etfal Training and Research Hospital, Microbiology and Clinical Microbiology Laboratory between January 2011 and April 2013. 117 strains which were covered in the study, were identified as MTBC.

Mycobacterial culture requested clinical samples were inoculated MGIT and LJ medium and of them 136 mycobacteria were isolated. 117 (86%) out of strains were also showed growth in LJ medium. 13of NTM and six of MTBC weren't showed growth LJ medium. Acid-fast bacilli was detected in 40 % of the mycobacterial culture positive samples with Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) and Auromine-Rhodamine stains.

Mycobacterium tuberculosis complex isolates obtained from clinical specimens were identified as 113 *M. tuberculosis* and four as *M. bovis* by using the gyrB PCR-RFLP.

In our study, it has been showed that *gyrB* PCR-RFLP method enable the identification of the MTBC. Moreover, it is a cheap, easy, and convenient method for routine use in clinical microbiology laboratories.

Key Words: PCR-RFLP, *gyrB*, *M. tuberculosis complex*, *M. tuberculosis*, *M. bovis*

1. GIRIŞ VE AMAÇ

Tüberküloz (TB) 1882 yılında tanımlanmış olmasına ve uygun tedavi seçeneklerinin geliştirilmiş olmasına rağmen, başta akciğer olmak üzere tüm organ ve sistemleri tutabilen, uygun tedavi edilmediğinde hayatı tehdit eden sekellerle sonuçlanabilen bir hastalıktır (1). 15-49 yaş aralığında bulunan kişilerde, tek bir enfeksiyöz etkene bağlı görülen ölümlerin en sık sebebidir (2).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün tahminlerine göre, dünyada her üç insandan biri (yaklaşık iki milyar kişi) *Mycobacterium tuberculosis* ile enfektedir. 2013 yılı verilerine göre 2012 yılında küresel olarak 8,6 milyon yeni olgu ortaya çıkmış, 0,3 milyon HIV ilişkili olmakla birlikte toplamda 1,3 milyon TB ilişkili ölüm olmuştur. TB olgularının ve ölümlerinin çoğunluğunu erkekler meydana getirmektedir. Ancak kadınlarda da hastalık yükü yüksektir. Kadınlarda 2012 yılında 2,9 milyon olgu ve 410 000 TB nedeniyle ölüm tahmin edilmekteyken, çocuklarda bu sayılar 530 000 olgu ve 74 000 TB nedeniyle ölüm gibidir. Küresel olarak olguların % 55'i Asya bölgesi, % 30'u Afrika bölgesi, % 7'si Doğu Akdeniz Bölgesi, % 4'ü Avrupa Bölgesi ve % 3'ü Amerika Bölgesi'nde görülmüştür. DSÖ'ne göre TB prevalansı ise, 2012 yılında 12 milyon olarak bildirmiştir (169/100 000) (3).

1980'li yıllara kadar gelişmiş ülkelerde sağlık otoriteleri tarafından uygulanan kontrol önlemlerinin ve korunma stratejilerinin etkisiyle insidanda azalma sağlanmış ancak bu yıllardan sonra HIV epidemisinin ortaya çıkması, çoklu ilaç direnci gösteren basillerin neden olduğu enfeksiyonlar, immunsupresif tedavilerin artışı, seyahatlerin yaygınlaşması, popülasyon yoğunluklarının artışı ile gelişmiş ülkelerde de epidemik bir hastalık haline gelmiştir(4, 5).

Verem Savaş Daire Başkanlığı (VSDB) 2012 raporunda; dispanser kayıtlarına göre ülkemizdeki TB insidansı 28/100000 , prevalansı 24/100000 olarak bildirilmiştir (6).

2006 yılında yedi ülkenin dahil olduğu Balkan ülkelerinden bildirilen 26 911 TB olgusunun % 76'sı Türkiye'den rapor edilmiştir (1).

Tedavi altında olmayan aktif akciğer TB olan bir hastanın yılda 10-15 kişiyi enfekte edebildiği belirlenmiştir (3, 4). TB hastalarının erken tanı ve tedavisi bu hastalıktan toplumu korumak için en etkili yoldur (7).

TB tanısında ilk basamak olan mikroskopik inceleme kolay, ucuz ve hızlı olması nedeniyle en sık kullanılan yöntemdir. Mikroskopik inceleme ile aside dirençli basil görülmesi ilk bakteriyolojik kanıttır. Günümüzde halen balgam ve diğer klinik örneklerden yayma ile ARB saptanması ve bunun kültür ile doğrulanması TB teşhisinde altın standarttır (8-10). Kültür işlemi sonucunda elde edilen mikobakterilerin özellikle de tüberküloz dışı mikobakterilerin (NTM) identifikasyonu, nadir olarak üretilen patojenlerin patojen olmayanlardan ayrımını sağlayacaktır(11). Bu sebeple identifikasyon test sonuçlarının zamanında ve doğru olarak raporlanması, hastaların tedavilerinin etkili olması, ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin doğru olarak alınabilmesi için gereklidir.

Mikobakteri türlerinin tanımlanması amacıyla kullanılan geleneksel biyokimyasal yöntemler; uygulanışının fazla emek gerektirmesi, sonuçlanmasının uzun süre alması, aynı türe ait suşların tümünün aynı fenotipik özelliği göstermemesi, değişik türlere ait suşların aynı fenotipik özelliği göstermesi ve tekrarlanabilirliğinin düşük olması önemli dezavantajlarıdır (11).

Mikobakteri türlerinin hızlı bir şekilde tanımlanması tedavinin etkinliği için oldukça önemlidir. Çünkü NTM'lerin çoğunda antitüberküloz ilaçlara karşı direnç görülmektedir. Bu durumda hastaya yararı olmayan bir ilacın gereksiz yere kullanılması ve hastanede kalış süresinin uzaması ile ekonomik kayıplara ve hasta açısından da zaman kaybına neden olmaktadır (9).

TB patojenlerinin tür düzeyinde ayrımını yapan laboratuvar yöntemlerinin kullanımının yaygınlaşması ile büyük popülasyonları içine alan bölgesel çalışmalar, şüphesiz ki gerçek olgu sayısının ortaya çıkmasına ışık tutacaktır. Doğrudan temas yoluyla veya pastörize edilmemiş süt ürünlerinin tüketilmesiyle insanlara bulaşan M.bovis farklı bölgelerde artış göstermektedir. Yapılacak olan sütün pastörizasyonu ve zorunlu kontrol programlarının uygulanması ile M.bovis enfeksiyonlarının önüne geçilebilir (9).

Son yıllarda mikobakterilerin direkt saptanması, identifikasyonu ve duyarlılık testleri için birçok moleküler yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler ile birkaç saatten birkaç güne kadar kısa sürelerde testler sonuçlanabilmektedir (12). Ancak bu yöntemlerinde standardizasyon ve kalite kontrolünde eksiklikler olduğu ve bazı türlerin tanımlanması ve ayrımında yetersiz kalabilmelerinden dolayı fenotipik ve

genotipik testlerin kombinasyonu kullanılarak mikobakteriyel tanımlamanın yapılması tavsiye edilmektedir (7, 8).

Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) yöntemi sekans analizi yöntemine göre spesifik cihaz gerektirmeyen, daha ucuz fakat ayırıcılığı daha düşük olan bir yöntemdir (13).

M.tuberculosis kompleks (MTBC) üyeleri, HPLC mikolik asit analizi, 16S rRNA dizi analizi ve *hsp65* PCR-RFLP yöntemleriyle birbirinden ayıramamaktadır(14). Bu nedenle birçok laboratuvar sonuçlarını kompleks düzeyinde vermektedir.

gyrB PCR, MTBC *gyrB* geninin bir kısmının amplifikasyonu sağladığı için MTBC izolatların tanımlanması için kullanılabilir. RsaI, TaqI, SacII enzimleri sırasıyla 675/756, 1450 ve 1410/1311 pozisyonlarındaki bölgeleri hedefler. Primer olarak, MTUB-f ve MTUB-r *gyrB* geninin 1020 baz çiftlik parçanın amplifikasyonu için kullanılır (15). Niemann ve ark (15) DNA dizi polimorfizmi nedeniyle *gyrB* geninin, dizi analizi veya PCR-RFLP yöntemi ile MTBC türlerinin ayırımını sağlayan tek marker olduğunu belirtmişlerdir.

Bu çalışmada, TB şüphesiyle laboratuvarımıza gönderilen örneklerden, Löwenstein-Jensen (LJ) ve Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) kültür yöntemleri ile izole edilen ve niasin birikimi, nitrat redüksiyonu, MGIT PNB (p-nitro benzoic asit) deneyleri ile tanımlanan 136 mikobakteri suşunun 117'si *hsp65* PCR-RFLP yöntemiyle MTBC suşu olarak tanımlanmış. Bu suşların ise *gyrB* PCR-RFLP yöntemiyle tür düzeyinde tayinleri yapılarak toplumumuzdaki MTBC tür dağılımı ile ilgili çalışmalara destek olunması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

TB insanlık tarihinin en eski ve en çok korkulan hastalıklarından birisidir. İnsanların TB basili ile ilk karşılaşmasının sosyal yaşama geçtiği milattan önce 8000 yıllarında olduğu tahmin edilmektedir. Son zamanlara kadar *M.tuberculosis*'in *M.bovis*'in genetik değişikliklere uğraması sonucunda, hayvanların evcilleştirildiği dönemde insanda hastalığa yol açtığı görüşü benimsenmişti (16). Ancak günümüzde MTBC yer alan bakterilerin moleküler epidemiyolojik çalışmalarında sağlanan bilgiler, bu görüşün değişmesine sebep olmuştur. Yeni bilgi ve bulgular, MTBC'nin atasının *M.prototuberculosis* olduğunu, ilk atadan delesyonel mutasyonlarla gelişen konak spesifik fenotipik değişimlerin sanıldığı gibi 15-35 yıl önce değil, 3 milyon yıl önce şekillenmeye başladığını göstermiştir (17).

Mycobacterium cinsi Mycobacteriaceae ailesi içindeki tek cinstir. Mikobakteriler aerop, sporsuz, katalaz üreten, hafif kıvrık ya da düzgün çomak şeklinde, dallanabilen, 0.2 ila 0.6 µm eninde, 1.0 ila 10 µm boyunda mikroorganizmalardır. Koloni morfolojisi türler arasında değişmekle birlikte S (smooth) ya da R (rough) pigmentli ya da pigmentsiz olabilir. Eski kültürler karotenoid pigmentlere bağlı olarak sarı, turuncu nadiren pembe de olabilir. Bazı türler pigment oluşturmak için ışığa gereksinim gösterirken (fotokromojen) diğerleri ışıktaki da karanlıkta da pigment oluşturabilir (skotokromojen). Bazen filamentöz ya da miçelyuma benzer üreyebilir ancak hafif bastırınca kokoid ve basil parçalarına ayrılır. H37RV suşunun genomu 4 milyon baz çifti büyüklüğündedir ve 3959 genden oluşmaktadır (18).

2.1. TARİHÇE

TB yüzyıllardır bilinen bir hastalıktır. Almanya'da bulunan ve M.Ö. 8000 yılına dek uzanan tarih öncesi insana ait iskelet kalıntılarının hastalık izi taşıdığı bulunmuştur. Milattan önce (M. Ö.) 4000- 2400'lü yıllarda Mısır'da firavunlar döneminden kalma Thebus bölgesindeki 85 mumyadan alınan organik materyalde bulunduğu ispatlanmış ve spoligotipleme ile suş tayini yapılmıştır (19).

Hipokrat M. Ö. 460'lı yıllarda erime, tükenme anlamına gelen 'fitizis' terimini kullanmıştır. İlk olarak Aristo (M.Ö. 354–322) bu hastalığın bulaşıcı olduğunu düşündüren bir özelliğinin farkına varmıştır. İngiltere' de M.Ö. 230-400 yıl önce demir çağına ait bir insan iskeletinin omurgasında ve günümüzden 5000 yıl öncesine ait Mısır mumyalarının omurgalarında TB düşündüren kemik lezyonlarına (Pott hastalığı) ve mikobakteriyel DNA'ya rastlanılmıştır (20). Romalı Celsus M. Ö. 30-50 yıllarında tüberkül tanımını literatüre geçirmiştir. İstirahat, öksürüğün kesilmesi, göğüs yakıları gibi ilk tedavi önerilerini ise M.S. II. yüzyılda yaşayan Galen ortaya koymuştur. Vesalius (M.S. 1478) fitizisli hastaların otopsilerinde kaviter lezyonları bildirmiştir (19).

Mikobakterilerin hücre duvarındaki lipitten zengin yapısı ve DNA'larındaki yüksek guanin+sitozin oranından dolayı stabilitelelerini diğer bakterilere göre daha iyi korumuş oldukları düşünülmektedir. Bu sebeple bulunan eski DNA'lar moleküler çalışmalar için ideal olmaktadır. Moleküler çalışmalar insan kalıntılarında TB tipik patolojisini göstermekte ve TB tarihi sürecinde coğrafik yayılımı ile insidansı hakkında bilgi vermektedir (20). Hindistan'da 3300 yıl, Çin'de 2300 yıl öncesine ait kayıtlarda hastalığı tarif eden yazılar bulunmaktadır. (21).

17.yy başlarında 'Büyük beyaz veba ' olarak bilinen ve ikiyüz yıl boyunca devam eden hastalığın TB olduğu ve Avrupa'da epidemik olduğu belirtilmiştir. Hastalığın patolojik ve anatomik olarak doğru tanımlanması ilk bu yüzyılda gerçekleşmiştir. Franciscus Sylvius (1614-1672) ilk olarak karakteristik akciğer nodüllerini "tüberkül" olarak tanımlamış, İngiliz doktor Richard Morton (1637-1698) tüberküllerin TB'li akciğerde her zaman var olduğunu doğrulamıştır. Pierre Desault (1675–1737) ise hastalığın bulaşıcı olduğunu, temel bulaştırıcı unsurun ise balgam olduğunu belirtmiştir. Morton, hastalığın inflamasyon (yangı-tüberkül), ülserasyon ve verem olmak üzere üç aşamadan oluştuğunu savunmuştur (20).

1882'de Robert Koch TB bakterisini tanımlayarak ve mikroskopta göstererek TB tarihinin dönüm noktasını oluşturmuştur. Patates ve agardan oluşan katı besiyeri kullanarak bakterinin saf kültürünü elde etmiştir. Koch, Paul Ehrlich tarafından geliştirilen metilen mavisi boyası ve zıt boyanma temeline dayanan bakteri boyamada yeni metodlar geliştirmiştir. 1890'da kendi adıyla anılan "Koch Postulatını" yayınlamıştır. Bu postulatıta, mikrop ve hastalık arasındaki ilişkiden bahsedilmektedir.

1895'te Röntgen X ışınlarını bulmuş, bu gelişme ile hastalığın ilerleyişinin gözlemlenebilmesinde önemli mesafe katedilmiştir (20).

1908'den 1919'a kadar geçen sürede Albert Calmette ve Camile Guerin tarafından *M. bovis*'in patojenik suşunun 230 defa seri pasajı yapılarak sonunda Calmette –Guerin veya BCG olarak bilinen hayvanlarda avirulan olan attenué suş elde edilmiştir. BCG insanlara ilk kez 1921'de aşı olarak uygulanmıştır ve halen geniş çapta uygulanmaya devam edilmektedir (16, 20).

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

Ondokuzuncu yüzyılın sonlarına doğru TB salgını, Osmanlı İmparatorluğu'nda büyük bir halk sağlığı sorunu olmuş, Balkan Savaşları ve 1.Dünya Savaşı'ndaki yoğun yoksulluk koşullarında Anadolu'ya yayılmaya başlayan hastalık, 1940' ların sonunda en yüksek düzeyine ulaşmış ve bu dönemde en sık görülen ölüm nedeni olmuştur. Ülkemizde TB ile etkin mücadele 1950'li yıllarda başlatılmıştır. Çıkarılan bir yasa ile 1960 yılında Verem Savaş Dispanserleri kurulmuştur. Doksanlı yıllarla birlikte 'Göğüs Hastalıkları ve TB alanında bilimsel dernek örgütlenmeleri gerçekleşmiş ve düzenli, disiplinli bir şekilde bilimsel çalışmalar, mezuniyet sonrası mesleki eğitimler yapılmaya başlanmıştır (22).

Tedavideki tarihsel süreçte ise ilk olarak aspirinin yapısının çok az değiştirilmesiyle para amino salisilik asit (PAS) geliştirilmiş ve bakteriyel solunumu engellediği keşfedilmiştir. İlk olarak 1944'ün sonlarında denenmiş ve hastada iyileşme gözlenmiştir. 1944'te Selman Warksman ve öğrencisi birlikte *Streptomyces griseus*' tan Streptomisini saflaştırmayı başararak tedavide dönüm noktası olmuşlardır. 1952 yılında izoniazid'in keşfini; pirazinamid, tiasetazon, etionamid ve etambutol izlemiştir. Bu keşifler satoryumların sonunu getirmiş ve tedaviler ayaktan yapılmaya başlanmıştır (19,20). 1966 yılında rifampin kullanıma girerek kemoterapideki son devrim olmuştur (19).

Tüm bu buluşların sonucunda önce hastalığın gerileme dönemine girmesi sağlanmış, ancak 1980'li yılların ortalarında tanımlanan HIV/AIDS hastalığının epidemik hale geçmesi, antitüberküloz ilaçlara karşı dirençli olan basillerin neden olduğu enfeksiyonlardaki artış ile TB varlığını güçlü bir şekilde sürdürmeye ve insanlığı tehdit etmeye devam etmektedir (9, 23).

Türkiye'de verem hastalığının durumu ile ilgili bilgilerimiz 1900'lü yılların başında İstanbul'un ölüm istatistikleri ile başlamaktadır. 20. Yüzyılın ilk yarısında ölüm kayıtları ve TB enfeksiyonu ile ilgili yapılan çalışmaların sonuçları vardır. Hasta kayıtları ise 1960'lı yıllarda başlamıştır. 2007'den itibaren Türkiye TB verilerinin ayrıntılı yer aldığı yıllık raporlar yayımlanmaktadır. Bu raporlarda verem savaşı dispanserleri (VSD)'nde kayıtlı hastaların bilgileri bireysel olarak toplanarak rapor halinde VSDB tarafından yayımlanmaktadır (6).

2.2. EPİDEMİYOLOJİ

TB tarihte olduğu gibi günümüzde de halk sağlığını tehdit eden en önemli hastalıklardan biridir ve tüm dünyada önlenemez ölümlerin en önemli sebepleri arasında yer almaktadır(24). Gelişmiş birçok ülkede 1985 yılından itibaren TB'lu hasta sayısı tekrar artışa geçmiştir(25). TB görülme sıklığının artması birçok nedene bağlanabilir: artan ilaç direnci ,yine bu yıllarda başlayan HIV/AIDS pandemisi ,damar içi ilaç kullanımının artması, sosyal yapının değişmesi, yüksek insidansın olduğu bölgelerden göç, toplu yaşam alanlarından aktif bulaş (örn. Hastane, hapisane vb.), hasta bakım hizmetlerindeki yetersizlikler (26). MTBC için bulaş kaynağı enfeksiyonlu insanlar yada sığır vb bazı memeli hayvanlardır. Bulaşta özellikle tedavi almayıp fazlaca basil çıkaran insanlar önemlidir. Toplu yaşam alanlarında (okul, çocuk yuvası, hastane) böyle hastalar büyük tehlike unsurudur. Tedavi verildiğinde bulaştırıcılık 2-3 haftada sona erer. En sık bulaş solunum yoluyla olur. TB'li kişilerin öksürük ve aksırıklarıyla etrafa saçılan damlacıkların içerdikleri basiller kolayca enfeksiyonu bulaştırabilir. Besinlerle ve özellikle çiğ içilen inek sütüyle sindirim yoluyla da bulaş olabilir. Çok yaygın olmasa da daha çok laboratuvar çalışanlarında basil içeren infekte materyalle temas sonrası deri yoluyla da bulaş görülebilir. Primer enfeksiyondan hastalığa geçiş için en riskli dönem primer enfeksiyondan sonraki ilk 1-2 yıldır. Süt çocuğu ve adölesanda

bu eğilim daha fazladır. Erkek cinste, genellikle yaş arttıkça görülme sıklığı artar. Sistemik hastalığı olanlar, immüneyi baskılayıcı tedavi alanlar ve bazı genetik faktörlere sahip olanlarda hastalığın gelişme riskini artmıştır (27).

TB epidemisi yayılmaktadır. DSÖ'nün 2013 yılı verilerine göre 2012 yılında küresel olarak 8,6 milyon yeni olgu bulunmakta iken 0,3 milyon HIV ilişkili olmakla birlikte toplamda 1,3 milyon TB ilişkili ölüm olmaktadır. TB olgularının ve ölümlerin çoğunluğunu erkekler meydana getirmektedir. Ancak kadınlarda da hastalık yükü yüksektir. Kadınlarda 2,9 milyon olgu ve 410 000 TB nedeniyle ölüm tahmin edilmekteyken, çocuklarda bu sayılar 530 000 olgu ve 74 000 TB nedeniyle ölüm gibidir. Küresel olarak olguların % 55'i Asya bölgesi, % 30'u Afrika bölgesi, % 7'si Doğu Akdeniz Bölgesi, % 4'ü Avrupa Bölgesi ve %3'ü Amerika Bölgesi'nde görülmüştür. DSÖ'ne göre TB prevalansı ise, 2012 yılında 12 milyon olarak bildirmiştir (169/100 000) (3).

VSDB 2012 raporunda; dispanser kayıtlarına göre ülkemizde 2010 yılında ülkemizde 15.183 yeni TB olgusu belirlenmiş; TB insidansı 28/100 000 , prevalansı 24/100000 olarak bildirilmiştir (6).

Sanayileşmiş ülkelerde son 10 yıl içinde TB kontrolü çabaları sonuç vermiş ve hasta sayılarında yeniden düşüş eğilimi görülmüştür (28). Tanı konulan her dört hastadan birisinin ölüyor olması, dünyada TB hastalarının yeterince tedavi edilmediklerini açık bir şekilde göstermektedir. TB ölümlerinin hemen tümü, önlenabilir ölümlerdir (29). Ülkemizde yapılan bir çok çalışmanın sonuçlarına göre; TB hastalarının çoğunluğunun genç yaşta olduğu, kadınlara göre erkeklerde 2.5 kat daha fazla sıklıkta görüldüğü, akciğer TB'nin daha yaygın olduğunu söyleyebiliriz (30).

TB'den korunma ve etkin kontrol önlemlerinin geliştirilmesinde hastalar arasındaki yayılmanın derecesini ve kaynağın bilinmesi çok önemlidir. Bunun için kökenler arasındaki benzerliğin araştırılması gereklidir. Mikobakterilerin biyokimyasal ve morfolojik özelliklerinden yararlanılarak cins ve tür düzeyinde tanımlamaları yapılabilmektedir. Tür düzeyinde tanımlama TB etiyolojisini aydınlatma bakımından yeterli olabilmektedir. Ancak, salgınlar esnasında izole edilen aynı tür içindeki birçok suşun birbiriyle klonal ilişkisinin olup olmadığını belirlemek için tür içinde farklılık gösterebilen varyantların saptanması yani alt tiplene yapılması gerekmektedir (31).

2.3. TAKSONOMİ

Mycobacterium cinsi yüksek G(guanin)+C (sitozin): (% 61-71 mol) içeren DNA'sından dolayı diğer mikolik asit içeren Gordonia(% 63-69), Tsukamurella (% 68-74), Nocardia (% 64-72) , Rhodococcus (% 63-73) ile birlikte Actinomycetales takımında sınıflandırılmış olup Mycobacteriaceae ailesinde yer alan tek cinstir (18, 32).

Günümüzde yapılan DNA hibridizasyon çalışmaları ile bazı mikobakteriler arasında DNA homolojisinin % 85-100 oranında değiştiği belirlenmiş, *M.tuberculosis* ile *M.bovis* türleri arasında % 100 benzerlik olduğu ortaya konmuştur. Restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak yapılan deneylerde de benzer sonuçlar alınmıştır (21).

Bakteriyolojik özellikleri ve DNA benzerlikleri yönünden birbirleriyle yakından ilişkili olan türler “kompleks” başlığı altında gruplandırılmaktadır. MTBC içinde; *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.bovis BCG*, *M.africanum*, *M.microti*, *M.canettii*, *M.caprae* ve *M.pinnipedii* yer almaktadır (33).

MTBC'den farklı olan mikobakteriler atipik mikobakteriler, tüberküloz dışı mikobakteriler (Mycobacterium Other Than Tuberculosis) veya NTM (Non Tuberculous Mycobacteria) olarak adlandırılır. Moleküler yöntemlerin gelişmesiyle günümüzde 200'e yakın mikobakteri türü belirlenmiştir (33).

Mikobakteriler genel olarak hızlı ve yavaş üreyenler olmak üzere ikiye ayrılırlar. 1950' lerin sonuna doğru, Ernest Runyon, *M.tuberculosis* ve *M. bovis* dışındaki mikobakterileri, üreme hızlarını, pigment üretimlerini ve koloni morfolojilerini temel alarak, fotokromojenler, skotokromojenler, nonfotokromojenler ve hızlı üreyenler olarak 4 grupta sınıflandırmıştır(34). Bu sınıflandırma uzun yıllar mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmıştır. Ancak daha sonraları tıbbi önem kazanan bazı türlerin Runyon sınıflamasına göre tanımlanmasında bazı güçlüklerle karşılaşmıştır. Halen klinik mikrobiyoloji laboratuvarları, MOTT türlerinin ön tanımlanmasında bu sınıflamadan yararlanmaktadır (32).

Mikobakterilerin hücre yapısı ve genetiği ile ilgili bilgilerimizin artışıyla yeni klinik önem kazanan mikobakterileri içine alan bir sınıflandırma, 1987' de Woods ve Washington tarafından önerilmiştir (4).

2.4. MORFOLOJİ VE ÜREME ÖZELLİKLERİ

Mikobakteriler aerop, sporsuz, hareketsiz, 0.2-0.6 µm en ve 1-10 µm boyunda, düz veya hafif kıvrık basillerdir. Lipitten zengin hücre duvarına sahip olmaları nedeniyle gram boya ile iyi boyanmazlar. Yine aynı nedenle hücre duvarını geçen boyanın uzaklaştırılması da zordur (35). Dekolorizasyon (renksizleştirme işlemi) diğer bakterilerde de alkolle yapılırken mikobakterilerde asit alkolle yapılır. Asit kullanılmasına rağmen ilk boyayı bırakmazlar. Bu nedenle ARB olarak anılırlar (18, 36). MTBC üyeleri hücre duvar yapısında bulunan trehaloz-6-6'-dimikolat (kord faktörü) maddesi varlığına bağlı olarak sıvı besiyerinde uzun kordonlar oluşturur. Virülen olmayanlarda ve MOTT'da ise görülmez (37).

Mikobakterilerin hücre duvarı üç tabakadan oluşmuştur: Sitoplazmik zarın üzerinde bulunan en iç tabaka peptidoglikan (murein) tabakadır. Mikobakterilerin peptidoglikan tabakasında diğer bakterilerden farklı olarak üç özellik bulunur. Birincisi yapısında N-asetil muramik asit yerine N-glikol muramik asit bulunmasıdır. Peptidoglikan tabakasının peptid birimlerinde hem glutamik asit hem de mezo-diaminopimelik asit ve üzerlerinde birer amid grubu bulunmaktadır. Üçüncü farklılık ise diğer bakterilerden farklı interpeptid bağlarının bulunmasıdır. Peptidoglikan tabakasının üzerinde bulunan ikinci tabaka arabinogalaktan tabakasıdır. Bu iki tabaka fosfodiester bağları ile birbirlerine bağlanır. Arabinogalaktan zincirini oluşturan arabinozlardan 10 tanesine bir mikolik asit molekülü kovalent olarak bağlanır. Bu asitler hücre duvarının kalınlığından ve büyük oranda da hücrenin aside dirençli olmasından sorumludur. Mikolik asitler trehaloz gibi bir şekerle bağlanarak kord faktörünü oluştururlar. En dış tabaka ise bir grup heterojen peptidoglikolipit veya fenolik glikolipitten oluşmuştur ve mikoit olarak adlandırılır. Hücre duvarında bulunan ve duvar ağırlığının % 60' ını meydana getiren lipitlerin çoğu uzun zincirli yağ asitlerinden oluşmaktadır. Tüberkülostearik asit, mikoserik asit ve mikolik asitleri içeren bu tabaka hidrofobik özellikte olup mikobakterileri güçlü asit-bazlara, birçok kimyasal maddeye karşı korumakta ve bazı antibakteriyel ilaçlara karşı doğal direnç sağlamaktadır (18, 38).

Zorunlu aerop bakterilerdir, ortamda % 5-10 CO₂ varlığında daha iyi ürerler. Optimal üreme ısıları 35-37°C dir, ancak 24-42°C arasında üreyebilmektedirler (18).

Çoğalabilmeleri için gerekli sıcaklık, türler arasında değişkenlik gösterirken (30-45°C) çoğu tür 37°C'de iyi üreyebilmektedir. Bazı türler mikroaerofilik şartlarda daha iyi ürerken bazıları düşük oksijen konsantrasyonuna tahammül edemez. Genel olarak patojen olanların ikiye bölünme süreleri daha uzun, üreme sıcaklıkları daha sınırlı ve asit-alkole dirençleri daha fazladır (21).

Mikobakterileri üretmek için yumurta ve patates bazlı semi sentetik katı (Löwenstein-Jensen ve Petragnani), ayrıca vitamin, katalaz enzimi, oleik asit gibi zenginleştirici maddeler içeren katı-sıvı besiyerleri (Middlebrook 7H9-12) mevcuttur. Mikobakterileri diğer bakterilerden ayıran en önemli özellik bölünme sürelerinin 18-20 saat olmasıdır, bu nedenle katı besiyerinde gözle görülür koloni oluşturmaları 15-20 günü bulmaktadır (18).

Dilüe bir inokulumdan ideal ortamda katı besiyerinde görünür koloni oluşturabilmeleri için yedi günden uzun süreye gereksinim duyanları 'yavaş üreyen mikobakteriler' olarak sınıflandırılırken yedi günden kısa sürede koloni oluşturabilenler 'hızlı üreyen mikobakteriler' grubuna dahil edilmiştir (18, 39). Son zamanlarda otomatize sistemlerde (BACTEC TB 460, MGIT 960, MB/BacT Alert, Myco-ESPII ve MYCOLOR TK) katı-sıvı besiyerleri kullanılarak bu süre on güne kadar inmiştir (40).

Koloni morfolojileri türler arasında değişken olup düz, kaba veya pürüzlü, pigmentli veya pigmentsiz olabilir. Pigment oluşumu bazen sadece ışıklı ortamda (fotokromojen), bazen de hem karanlıkta hem ışıklı ortamda (skotokromojen) olabilir. Pigmentli türlerin kolonileri genellikle keratonoid pigmente bağlı olarak sarı, portakal veya nadiren pembe rektir(18, 21).

M.tuberculosis kuruluğa oldukça dayanıklıdır, güneş görmeyen ortamda kuru balgamda 6-8 ay , katı besiyerinde 12 yıl canlı ve virulan olarak kalabilmektedir. Ancak, ısıcağa duyarlıdır; 60°C de 20 dakika, 70°C de 10 dakikada ölmektedirler. Çamaşır suyu, povidon-iyot, % 5 fenol bileşiklerine ve UV ışınlarına karşı duyarlıdırlar (9, 18).

2.5. ANTİJENİK ÖZELLİK VE VİRULANS FAKTÖRLERİ

M.tuberculosis'in virulansında rol oynayan histolitik enzimleri, endotoksin veya ekzotoksinleri yoktur. Ancak yapısında bulunan lipid, protein ve polisakkaritlerden oluşan antijenlerinin tümü immünojeniktir (9).

Bu birimlerin, immünsupresyon, makrofaj aktivasyonu, granülom oluşturma, toksisite, alternatif yoldan kompleman aktivasyonu gibi çok çeşitli etkileri vardır. Proteinler anahtar immünojen olarak kabul edilirler (32).

2.5.1. Lipit yapısındaki antijenler

M.tuberculosis hücre duvarının en dış katmanında yer alırlar.

Trehaloz-6-6-dimikolat: Konak hücre membran sistemlerine toksik etkili, akciğerde granülom oluşumunu indükleyen, immün stimulatuar etkili, kord faktör olarak da bilinen moleküldür (9).

Sülfolipidler: Fagozom-lizozom füzyonunu engelleyerek lizozim enzimlerinin etkisinden korur (9).

Fosfatidil İnozitol Mannozyd (PİM): Konağın granümatöz yanıtının ortaya çıkışında ve fagositik olmayan hücrelere bağlanmada adezin molekül olarak görev alır (9).

Mannoz- Lipoarabinomannan (ManLam): Makrofaj aktivasyonunu ve proinflatuar sitokinlerin üretimini inhibe eder. Ayrıca aktive makrofajların apoptozunu indükleyen etkili bir virulans faktörüdür (9).

2.5.2. Protein yapıdaki antijenler

Old Tüberkülin (OT):

İlk kez Koch tarafından elde edilen OT'nin infekte bireylerde, basille karşılaşmamış olanlara göre daha çabuk ve belirgin reaksiyon oluşturduğu görülmüş ve TB enfeksiyonu tanısında intradermal cilt testi olarak kullanılmıştır (21). Ancak sadece mikobakteriyel proteinler içermemesi nedeniyle saflaştırılmasına gerek duyulmuştur(41).

Purified Protein Derivated (PPD):

İlk kez Seibert ve Glenn tarafından 1941’de tanımlanmıştır. Sentetik besiyerlerinde hazırlanmış old tüberkülinin kollodyen membranlardan süzülmesi ve amonyum sülfatla çöktürülmesi sonucu elde edilmiştir

Diğer mikobakteri türleri ile oluşan enfeksiyonlarda, çapraz reaksiyonların görülmesi gibi olumsuzluklarına rağmen immunodiagnostik önemini halen korumaktadır. PPD deneyi, kişinin aktif TB olduğunu değil, TB etkeni bakteriler ile karşılaşmış karşılaşmadığını göstermektedir (9, 21).

Son yıllarda geliştirilen daha hassas protein analiz teknikleri sayesinde, MPT63, MPT64, MPT32, GroES, GroEL gibi birçok protein tanımlanmıştır. Bu teknikler sayesinde tanımlanan mikobakteriyel proteinlerin sayısı giderek artmakta ve her yeni tanımlanan protein, özel bir “Rv” numarasıyla ifade edilmektedir (9).

DSÖ 0.1 ml solüsyonda 5 TU (0.0001 mg PPD-S proteini) dozunda PPD bulunmasını önermektedir (21).

16 kDa a-crystalin (Rv 2031c): *M.tuberculosis*’ in latent ve persistan üreme fazında etkili olup, yapımı anoksik koşullarda makrofajlarda indüklenir. Serolojik testlerin hedef moleküllerindendir (9).

ESAT-6 (Rv3874) ve CFP-10 (Culture filtrat protein):

M. tuberculosis ve *M. bovis*’te bulunup *M. bovis* BCG’de bulunmayan RD1(Region of difference) gen lokusundan kodlanmaktadır ve bu proteinlere karşı oluşan interferon yanıtını T hücre sayısını göstererek in vitro ölçen kitler geliştirilmiştir. Bu yöntem yardımıyla aktif ve latent TB tanısı konabilmekte, tedaviye yanıt takip edilebilmekte ve TB’un BCG aşılmasıyla ayrımı yapılabilmektedir (42). Günümüzde aşı çalışmalarının ve serolojik testlerin en gözde molekülleri arasındadır.

Fibronektin bağlayan proteinler (Antijen 85 kompleks):

Mikobakteri hücre duvarının karakteristik yapısı trehaloz dimikolatın (Kord faktör) sentezi için gerekli olan *M.tuberculosis*’in salgıladığı major antijendir. Potansiyel koruyucu bir antijen olduğu düşünülmektedir. Mikolik asit sentezini inhibe eden izoniazidin in vitro Ag 85’in sentezini indüklediği ve tedaviye cevap vermeyen olgularda bu antijenin balgamda tespit edildiği gösterilmiştir. Son çalışmalar, TB’li hastalarda bronkoalveolar hücrelerin Ag 85’e sağlıklı insanlardan daha fazla yanıt

verdiğini ancak bu yanıtın PPD'ye olan yanıtından daha az olduğunu ortaya koymaktadır (43).

Antijen 5, antijen 6, antijen 60:

Saflaştırılmış sitoplazmik proteinlerdir. Bakteriye karşı oluşan humoral yanıtı göstermek amacıyla kullanılmaktadır. Ancak özellikle antijen 60'a dayalı ELISA (Enzim ile işaretli antikor testi) deneyi bu antijenin tüm mikobakterilerde olması ve *Nocardia* türleri ile çapraz reaksiyon vermesi nedeniyle tanıda çok yer edinmemiştir (43).

Kat G (Rv1908c): H₂O₂ ve organik asitleri parçalayan bir katalaz peroksidaz olup patogeneizde etkin rol oynamaktadır (9).

Sigma Proteinleri: *M.tuberculosis*'in değişen çevre koşullarına, stres faktörlerine uyum sağlamak için normal koşullarda ifade edilmeyen genlerin ekspresyonunu düzenleyen regülatör proteinlerdir (9).

65 kDa protein:

Konak hücre içinde çoğalan basillerden salgılandığı ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu sonucu lezyonda kazeifikasyon ve likefaksiyon oluşturduğu bulunmuştur. İmmünojenitesi yüksek olan bir ısı şok proteinidir (21).

19 kDa lipoprotein:

M.tuberculosis'in hücre duvarında bulunur. Özellikle immüniteyle ilgili çok önemli rolleri vardır. İnterferon gama (INF G) sentezini kodlayan genleri ve makrofajların INF G reseptörünü inhibe eder. Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) ve IL-12 sentezini azaltarak T lenfosit aktivasyonunu inhibe eder. Nitrojen ara ürünlerinin üretimini, MHC-I'in antijen bağlamasını inhibe eder. Monosit ve makrofajların apoptozunda görevlidir (44).

2.5.3. Mikobakteriyel polisakkaridler

Arabinoz, galaktoz, mannoz içeren polisakkarid I molekülleri geç tip aşırı

duyarlılık oluşturabilir. Polisakkarid II molekülleri ise serolojik aktivite gösterir (45).

2.6. PATOGENEZ VE PATOLOJİ

M.tuberculosis'in salgıladığı bir toksini ve virülansını belirleyen bir özelliği yoktur. TB, infeksiyon oluşumu ve bundan sonraki dönemde hastalık gelişimi olmak üzere iki aşamalı bir sürece sahiptir. İlk infeksiyon inhalasyon ile oluşur. *M.tuberculosis* mukusu geçemediğinden enfeksiyon oluşumu için mutlaka alveoler alana ulaşmalıdır. Buraya da ancak 1-10 µm'lik damlacık çekirdekleri ulaşabilir. İnsanda minimal infekte edici basil sayısı 10, tavşan ve koyalarda ise 1-3 kadardır. İnhal edilen bakterinin hastalık oluşturması hem basilin virülansına hem de alveolar makrofajın öldürme kapasitesine bağlıdır. Eğer bakteri bu asamada yok edilmezse histolojik olarak iki tip reaksiyon oluşur. Eksüdatif lezyon; bakterinin girdiği bölgede çoğalması sonucu PNL (polimorf nüveli lokosit)'lerin rol oynadığı akut ve subakut enflamasyondur. Granülomatöz (prodüktif) lezyon ise; konağın TB proteinlerine hipersensitivite geliştirmesi ile olur. Bakteri ile karşılaşan makrofajlar epitelooid hücreler haline dönerek hastalığın karakteristik yapısı olan tüberküleri oluştururlar. Tüberkülin ortasında dev hücreler çevresinde ise lenfosit ve fibroblastlar yer alır. Bir süre sonra tüberkülin orta kısmı nekroze olur (kazefikasyon nekrozu). Bu geç tip aşırı duyarlılığa bağlıdır. Bulaştan 2-8 hafta sonra meydana gelir. Eğer konağın cevabı güçlü olursa lezyon fibrozis ve kalsifikasyonla sonlanır. Bu bölge ve bölgesel lenf nodülü primer kompleks-Ghon kompleksi adını alır. Eğer konağın immun yanıtı yeterli değilse hastalık ilerler ve primer TB meydana gelir. Bazen dışarıdan tekrar basil alınması veya hastalığın reaktivasyonu ile sekonder veya reenfeksiyon TB meydana gelir.

Bulaşıcı nitelikteki bir akciğer TB'li hasta ile (yayma pozitif) karşılaşan tüberkülin deri testi negatif temaslıların yaklaşık % 30'unda TB infeksiyonu oluşur ve bu kişilerde gerek klinik gerekse radyolojik hiç bir belirti olmaksızın tüberkülin deri testi pozitiflesir. İnfekte olan bu kişilerin % 5'inde enfeksiyonu izleyen 5 yıl içinde hastalık gelişir (primer TB). Primer enfeksiyonu izleyen uzun bir latent dönemden sonra (en az 5 yıl sonra) infekte kişilerin % 5'inde hastalık gelişmektedir (sekonder TB).

TB'da, canlı bir basilinin alveole yerleşmesinden kaviter akciğer TB gelişimine kadar geçen olaylar, basil ile konakçı arasındaki bir seri "savaş" sonucu olur. Konakçı tarafından oluşturulan hücre aracılıklı immünite ve geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonları TB patogenezinde belirleyici rolü oynarlar. Bu immün yanıtlar oluşuncaya kadar TB basilinin kendisi konakçı dokularında hiç bir hasar oluşturamaz. Basil çoğalması ile konağın oluşturduğu immünolojik yanıtlar arasındaki etkileşim hastalığın hem ilerlemesini veya gerilemesini hem de gelişecek olan hastalığın tipini belirler (9, 18).

Hastalığa duyarlılıkta ırklar arasındaki farklılık ve genetik yapı önemli rol oynamaktadır. Örneğin kızılderililerin, eskimoların ve zencilerin bu hastalığa daha yatkın oldukları belirlenmiştir. Ayrıca HLA BW15 taşıyan zenciler ile HLA DR2 taşıyan kızılderililerin daha duyarlı oldukları tespit edilmiş . Yaş, cinsiyet, sosyo ekonomik durum, sigara kullanımı, alkolizm, uyusturucu madde bağımlılığı, kalabalık yasanti, diyabet, HIV ve evsizlik hastalığın gelişimi için risk faktörleri arasındadır (46, 47).

TB'nin başlıca klinik formları şunlardır:

Akciğer TB: En sık rastlanan formudur. Hastalık insandan insana yakın temas ile enfekte aerosollerin (damlacık çekirdeği) alınması ile bulaşır. TB'nin ortaya çıkabilmesi için basilin akciğerlere ulaşması gerekmektedir, konağın enfeksiyona verdiği yanıtı bağlı olarak doku hasarı ve fibrozis ile karakterizedir. Akciğere ulaşan bakteri alveoler makrofajlar tarafından fagosite edilirler konağın cevabı bu aşamada güçlü olursa bakteriler temizlenir. Eğer basil miktarı fazla ve immün sistem zayıf ise bakteri üremesine devam ederek primer odak oluşturur. Bu genelde sub plevral yerleşimlidir ve alt-orta loblarda bulunur. İki haftadan uzun süren öksürük, göğüs ağrısı, nefes darlığı ve ses kısıklığı ile başlar ve halsizlik, çabuk yorulma istahsızlık, kilo kaybı, ateş ve gece terlemesi gibi klinik bulgularla devam eder. Tanıda fiziki muayene yardımcı değildir ancak altta yatan nedenlerin belirlenmesi için zorunludur. Akciğer grafisi ve PPD pozitifliği kıymetlidir ancak kesin tanı bakteriyolojiktir. Balgam, bronşial lavaj ve aklık mide suyu gibi örneklerin mikroskopi, kültür ve nükleik asit çoğaltma yöntemleriyle incelenmesi ile tanı konulabilmektedir (9).

Miliyer TB: TB basillerinin bir odaktan hematogen yolla tüm vücuda yayılması ve çeşitli organ ve dokularda granülom geliştirmesidir. Ölüm oranı oldukça yüksektir. Başta çocuklar olmak üzere, immünsüprese hastalarda ve kronikleşmiş altta yatan hastalığı olan erişkinlerde sık görülür. Genellikle kazeöz lezyonun pulmoner vene rüptüre olması

ile ortaya çıkar. Tüberkülin testi negatiftir. Tanıda karaciğer, kemikiligi biyopsileri ve akciğer grafisi önemlidir. Genelde tanı post mortaldir (18).

TB lenfadenit: Akciğer dışı tüberküloz içinde en sık rastlanan formudur. Hastalık primer pulmoner odaktan hematogen yayılan TB basilleriyle meydana gelmektedir. En sık tutulan lenf nodları anterior servikal ve supraklaviküler lenf nodlarıdır (18).

Plevra TB: Akciğer dışı tüberkülozların en sık rastlanan ikinci klinik şeklidir. Yaşlılarda ve erişkinlerde eksüdatif plörezinin en önemli nedenidir. Plevral boşlukta toplanan sıvı membranın spesifik allerjik reaksiyonu sonucu ortaya çıkar. Tanıda sıvının incelenmesi yararlıdır ancak granülomlardan alınan biyopsi örneklerinden etken daha sık izole edilmektedir (18).

Kemik ve Eklem TB: Hematojen yayılım sonrası ortaya çıkar. Kemik TB'larının % 50'sini oluşturan "Pott hastalığı" yani TB spondilit sıklıkla torakal bölgeyi daha sonra da lomber, servikal ve sakral bölgeyi tutar. Klinikte soğuk abse olarak bilinen tipik bir tablo oluşturur. En önemli komplikasyonu paraplejidir. Tanıda effüzyon materyalinde ve biyopsi materyalinde basilin ARB boyama ile gösterilmesi ve kültürü, direkt iskelet sistemi grafileri kıymetlidir (18).

Böbrek TB: Basilin uzak bir odaktan hematogen yayılımı ile oluşmaktadır. Genellikle her iki böbrek de infektidir. Fakat yalnız birinde hastalığın ilerlediği kabul edilmektedir. Hastalık basilin, bağışıklık sisteminin etkili olamadığı hipertonic bir ortam olan kortikal medullaya yerlesmesiyle başlar. Sinsi seyredir, çoğu zaman da asemptomatiktir. İdrar kültürlerinde üreme olmaması, hematüri ve proteinüri vardır. Üç gün ard arda yoğunlaştırılmış idrarın ARB, kültür ve PZR yöntemleriyle incelenmesi ile tanı konulabilir. Ancak saprofit mikobakteriler tanıda problem oluşturmaktadır (18).

Barsak TB: Burada en sık izole edilen etken *M. bovis'* dir. Pastörize edilmemiş sütlerin içilmesi ile bulaşır. Akciğer ve larinks odagi olan hastalarda hematogen yayılımla ve enfekte balgamın yutulması ile enfeksiyon gelisir. Tanıda gaitanın incelenmesi ve kolonoskopi değerlidir (18).

TB menenjit: TB'nin en ağır klinik formudur. Her yaşta görülebilirse de özellikle 5 yaş altında sıktır. Primer enfeksiyonun erken veya geç komplikasyonu olarak gelişir. Çoğu olgunun kendisinde ya da ailesinde TB öyküsü vardır. Deri testi negatiftir. BOS basıncı artmıştır, hücre sayısı 500 altında ve lenfosit hakimiyeti vardır. Mikroskopik inceleme, kültür ve PZR tanıya yardımcı olabilmektedir (18).

TB ve HIV Enfeksiyonu: HIV ile enfekte kişilerde CD4 T lenfosit fonksiyonlarının bozulması TB basilinin bağışıklık sisteminden kaçmasına neden olur. Normal kişilerde TB basili ile karşılaşıldıktan sonra enfeksiyon gelişme riski % 10 iken HIV pozitif hastalarda bu oran bir yıl içinde % 10 dur. TB diğer fırsatçı enfeksiyonlardan daha erken ortaya çıkar, akciğer dışı bölgelere yayılımı ve mortalite oranı yüksektir (18).

2.7. MTBC ÜYELERİNİN MİKROBİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ

MTBC; *M.tuberculosis*, *M.bovis* (*M.bovis* BCG dahil), *M.africanum*, *M.microti*, *M.canettii*, *M. caprae*, ve *M. pinnipedi* türlerinden oluşur (33).

M.tuberculosis

Tüm dünyada insanda hastalık etkeni olarak en sık izole edilen mikobakteridir. Diğer kompleks üyelerinden fenotipik olarak ayırt edilebilir. Pigmentsiz, aerop ortamda, 37°C'de 2-4 haftada, R koloni yaparak ürer. Niasin biriktirir, nitratları nitrite indirger. Tiyofen-2-karboksilik asit hidrazid (T2H) varlığında ürer. Pirazinamidaz aktivitesi pozitifdir. Katalaz aktivitesi yoktur. Esas konağı insandır. Mikrokolonilerinin gözlemlendiği kültürleri boyanınca kord faktörünü oluşturduğu görülür(9).

M.bovis

Esas olarak sığırlarda enfeksiyon yapmasına rağmen keçi, kedi, köpek, geyik, porsuk ve keseli sıçan gibi geniş konak çeşitliliği gösterir. İnsan az da olsa konak olabileceği için epidemiyolojik açıdan *M.tuberculosis* ile tür düzeyinde ayırt edilmelidir. Aerobik, 6-8 haftada R yada S koloni yaparak ürer. Çoğunlukla niasin reaksiyonu vermez. Nitratları nitrite indirgemez. T2H'ya duyarlıdır, varlığında üreyemez. Pirazinamidaz aktivitesi yoktur. Katalaz aktivitesi vardır. Besiyerine piruvat eklenmesi üremesini artırır. *M.bovis* BCG 1924 yılında Calmette ve Guerin tarafından *M.bovis*'in 10 yıl boyunca 233 kez pasaj edilmesiyle elde edilmiş virulan olmayan aşı kökenidir. Mesane kanserinin tedavisinde immünsitümölan olarak kullanılırken nadiren yayılabilir (48).

M.africanum

Genel olarak Afrika'da insan TB'ye yol açan bir tür mikobakteridir. 1968 yılında Senegalli bir hastadan soyutlanmıştır. Mikroaerofilik ortamda iyi ürer. Nitratı

indirgeyemez. T2H varlığında üreyemez. Pirazinamidaz aktivitesi pozitifdir (48).

M.microti

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

M.canettii

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

M.caprae

M.caprae, daha önceleri *M.tuberculosis subsp. Caprae* (49) ve *M.bovis subsp. caprae* (50) olarak adlandırılırken genotipindeki tekrarlara dayanılarak klasik *M.bovis*, *M.pinnipedii*, *M.microti* ve atasal *M.tuberculosis* yakından ilgili olduğunu ancak modern *M.tuberculosis*'den farklı olduğu gösterilmiştir (51).

Önceleri konak olarak sığır, keçi gibi hayvanları tercih ettiği gösterilen *M.caprae*, Almanya'da 1999 ve 2001 yılları arasında yapılan çalışmayla (50) sadece hayvanlarda görülmediği insan TB vakalarına da neden olduğu gösterilmiştir. Pirazinamide olan duyarlılığı ile *M.bovis*'ten ayrılmaktadır (18).

M.pinnipedii

Konak tercihi, fenotipik ve genotipik özelliklerine dayanılarak *M.pinnipedii*, Cousins ve arkadaşları tarafından 2003 yılında MTBC'nin yeni bir üyesi olarak tanımlanmıştır(52). *M.pinnipedii*'nin doğal konağı yüzgeç ayaklılar iken kobay, tavşan, muhtemelen sığır ve insanlar için de patojen olarak kabul edilmektedir (33).

M.mungi

Son zamanlarda *M.mungi* Botsvana şeritli firavun farelerinden tespit edilmiştir ve MTBC'in sekizci üyesi olduğu iddaa edilmektedir (53).

2.8. MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARI ORGANİZASYONU VE İŞLEVİ

M.tuberculosis'in primer izolasyonunda hem sıvı hem katı besiyeri kullanılmalı, 24 saat içinde ARB sonucunu rapor etmeli, basil izolasyonunu 14 günde, tanımlamasını 24 günde tamamlamalı ve duyarlılık test sonuçlarını 28 günde rapor etmelidir (54).

TB kontrolünün önemli bir kısmı laboratuvara bağlıdır. Potansiyel olarak enfeksiyöz aerosoller mikobakteriyoloji laboratuvarında en önemli tehlikedir. Bu nedenle enfekte materyalle çalışmalarda aerosol oluşumuna yol açabilecek tüm uygulamalar, biyogüvenlik seviye II ve III güvenlik kabinlerinde standartlara uygun olarak yapılmalıdır (18, 32, 54).

Tablo 1. MTBC üyelerinin identifikasyon özellikleri *

	M. tuberculosis (%)	M.africanum (%)	M.bovis (%)	M.canettii (%)	M.microti (%)	M.pinnipedii (%)	M.caprae (%)
Üreme sıcaklığı	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C
Pigmentasyonu	N (100)	N (100)	N(100)	N (100)	N (100)	N (100)	N (100)
Niasin	+ (95)	d	-	-	+	d	-
T2H varlığında üreme (10µg/ml)	+	d	-	+	-	s	-
Nitrat indirgenmesi	+ (97)	d	-(9)	+	d	-	-
Pirazinamidaz (4 gün)	+	+	-	+	+	s	s

N, nonkromojenik; d, değişken; s, saptanmadı

Artı ve eksi işaretleri sırasıyla özelliğin varlığını ve yokluğunu gösterir.

V, değişken. Her testte CDC'nin test ettiği suşların pozitif yüzdesi parantez içinde verilmiştir ve test sonucu bu yüzdelere bağlıdır.

*18 numaralı kaynaktan modifiye edilmiştir.

2.9. LABORATUVAR TANI

Mikobakteri enfeksiyonlarının kesin tanısı, uygun klinik örneklerden bakterilerin izole edilmesiyle konur. Özellikle TB olgularının halk sağlığını tehdit ettiği günümüzde etkin mikrobiyal tedavinin hemen uygulanabilmesi, artan mikobakteri enfeksiyonlarının doğru ve güvenilir tanısının konabilmesi ve epidemiyolojik verilerin elde edilebilmesi için kısa sürede sonuç verebilen duyarlılığı ve özgülüğü yüksek tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla hızlı kültür sistemleri ve moleküler yöntemler geliştirilmiştir (18, 32, 54).

2.9.1. Örneklerin Toplanması ve İşlenmesi

Laboratuvar tanısındaki başarı klinik örneğin uygun şekilde alınması ve dikkatli bir şekilde çalışılmasına bağlıdır. Örnekler antitüberküloz tedaviye başlanmadan önce alınmalıdır.

Akciğer TB'inde inceleme için en uygun örnek balgamdır ve 3 gün arka arkaya alınan ekspektore balgam örneklerinde basil aranır. Hastanın balgam çıkaramadığı durumlarda bronkoalveolar lavaj (BAL), bronşial yıkantı suyu, bronşial biopsiler, özellikle çocuklarda gastrik aspirasyon sıvıları gibi örnekler de kullanılabilir. Böbrek TB'sinde sabah ilk idrarı olmak koşuluyla 3 gün arka arkaya alınan orta akım idrarları kullanılır. Bunların dışında infeksiyon odağına yönelik beyin omurilik sıvısı, periton, plevra, dışkı, eklem ve kemik iliği aspirasyonları ve kan gibi steril veya steril olmayan klinik örnekler işlenmek için alınır. Kan ve dışkı örnekleri ise AIDS'li hastalardan kabul edilebilir (33).

Normal flora içeren klinik örnekler ile alınmaları veya transport işlemleri esnasında sterilizasyon kurallarına uyulmadığı düşünölen klinik örneklere; organik kalıntıları sindirmek (digestion), kontaminasyona neden olan bakteri ve mantarları elimine etmek amacıyla dekontaminasyon işlemi uygulanır. Günümüze kadar çok sayıda homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemleri tanımlanmıştır: NALC (N-asetil-L-sistein)-NaOH yöntemi, % 4'lük NaOH yöntemi, Zefiran-trisodyum-fosfat yöntemi,

oksalik asit yöntemi, setilpridinyum klorid-sodyum klorid yöntemi ,sülfirik asit yöntemi. Bu yöntemler arasında en yaygın kullanılan NALC-NaOH ve % 4'lük NaOH yöntemleridir (32, 33, 39).

Ancak bu işlemlerin mikobakterilere zarar vermemesi için bu süre 15 dakikayı geçmemelidir. Süre tamamlandığında fosfat tamponu (pH 6.8) ilave edilerek nötralizasyon sağlanır ve dekontaminasyon işlemi durdurulur. Kullanılan fosfat tamponunun sterilitesinin korunması önemlidir.

Ayrıca mikobakterilerin üreme şansını artırmak için santrifüjle konsantre edilmesi de gerekir. En uygun santrifüj işlemi 3000 g (RCF)'de 15 dakika süreyle yapmaktır.

2.9.2. Aside Dirençli Boyama Yöntemleri

ARB yöntemi, hala ucuz ve hızlı bir yöntem olarak, klinik örneğin mikobakteri açısından incelenmesinde ilk başvuru olan yöntemdir. Mikobakteriler, çeperlerinde önemli yer tutan mikolik asitler nedeniyle karbol fuksin gibi boyaları özgül olarak tutarlar ve asit alkol gibi güçlü renk çıkarıcı çözeltiler ile dahi boyalarını bırakmazlar (10, 36). Yayımda ARB saptanması, klinik örnekte mikobakteri varlığını gösteren ilk bakteriyolojik kanıttır. Günümüzde halen balgam ve diğer klinik örneklerden yayma ile ARB aranması ve bunun kültür ile doğrulanması TB teşhisinde altın standarttır (8-10)

Mikobakteriler dışında *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Cryptosporidium* türleri ve *Legionella micdadei* aside dirençli olarak boyanabilir. Aside dirençli bakterilerin boyanmasında genellikle iki tip boya tercih edilir (21):

1.Karbolfuksin boyama: Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) ve Kinyoun (soğuk boyama)

2.Florokrom boyama: Auramine O ve Auramine-Rhodamine

Mikroskopik inceleme ile örnekteki 5000-10000/ml basil saptanabilmektedir. Bazik fuksin temelli boyama yönteminde en az 300 alan, florokrom boyama yönteminde ise en az 30 alan incelenmelidir (18, 32).

Mikobakterilerin saptanmasında yaymanın özgüllüğü çok yüksektir. Ancak duyarlılığı; test edilen örneğin tipi, miktarı, boyama yöntemi, inceleyen kişinin

deneyimi gibi birçok faktöre bağlı olarak % 20-80 arasında değişmektedir. CDC (Center for Disease Control and Prevention), yayma üzerinde saptanan ARB'nin niceliği hakkında bilgi verilmesini önermektedir. Bunun için yaygın kullanılan öneriler Tablo 2'de verilmiştir (32, 33).

Tablo 2: Mikroskopik incelemede görülen ARB miktarının kantitatif değerlendirilmesi

alanı) Sonuç	Görülen ARB Miktarı (Basil sayısı/inceleme alanı)	
	Karbolfüksin Boyama	Florokrom
	Boyama ×450	Boyama ×250
Negatif	0	0
0		
Şüpheli	1-2/300 alan	1-2/30 alan
1-2/70 alan		
1+	1-9/100 alan	1-9/10 alan
2-18/50 alan		
2+	1-9/10 alan	1-9/1 alan
4-36/10 alan		
3+	1-9/1 alan	10-90/1 alan
4-36/1 alan		
4+	>9/1 alan	>90/1 alan
>36/1 alan		

ARB: Aside dirençli basil

2.9.3. Kültür

Mikobakteri türlerine bağlı enfeksiyonların mikrobiyolojik tanısında kültürün önemli bir yeri vardır. Bunun nedeni, direkt mikroskobiden daha duyarlı olması, tür tayini için biyokimyasal testlere ve antimikrobiyel duyarlılık testlerine olanak sağlamasıdır(10, 36, 55).

M.tuberculosis zorunlu aerop olduğundan anaerop ortamda üremez. % 5-10 oranında CO₂'in üremeyi arttırıcı özelliği vardır. Optimal üreme sıcaklığı 35-37°C, pH

ise 7'dir. Mikobakterilerin üremeleri için özel besiyerlerine ihtiyacı vardır. Bu besiyerleri kompleks yapıda olup, katı besiyerleri ve mikobakterilerin daha kısa sürede üremelerine imkan sağlayan sıvı besiyerlerinden oluşur (18). Mikobakterilerin kültürünün yapılmasında sıvı ve katı besiyerlerinin birlikte kullanımı önerilmektedir (5).

2.9.3.1. Kültür yöntemleri

Kültür yöntemlerinin duyarlılığı çok yüksektir. Mikobakteri izolasyonunda bugün için altın standart olarak kabul edilen uygulama sıvı ve katı besiyerlerinin birlikte kullanılmasıdır. Mikobakterilerin izolasyonları ve bazı özelliklerinin saptanması için kullanılan besiyerleri katı ve sıvı olmak üzere iki tiptir. Katı özellikteki besiyerleri yumurta ve agar bazlı olmak üzere iki bölümde incelenebilir (18).

LJ ve Middlebrook besiyerlerinde gözle görünür koloni oluşturması 3-8 hafta kadar sürer. Bu sürenin azaltılabilmesi için hızlı, ticari kültür sistemleri geliştirilmiştir. Yıllardır tüm dünyada yaygın olarak kullanılan ve altın standart olarak kabul edilen hızlı kültür sistemi olan radyometrik BACTEC 460 TB (Becton Dickinson, Biosciences, Sparks, Md) sisteminde besiyerlerin radyoaktif madde içermesi, yarı otomatize olduğundan manuel doldurulup boşaltılması, enjektörlerin yoğun kullanılması, şişelerin cihazda okunmalarında çapraz kontaminasyon riski gibi nedenlerden dolayı alternatif sistemlerin geliştirilmelerine gereksinim duyulmaktadır. Bu sistemler yanında, manuel kullanım için bifazik kültüre dayalı Septi-Check AFB (BD Biosciences, Sparks MD), floresans bastırma temelli O₂ sensörlü MGIT (BD Biosciences, Sparks MD) ve tetrazolium tuz indikatörünün indirgenmesiyle işleyen MB-Redox (Heipha Diagnostics, Biotest, Heidelberg, Germany) bulunmaktadır (33).

2.9.3.2. Katı besiyerleri

Katı besiyerleri yumurta ve agar temelli olmak üzere iki çeşittir. Bakteri veya mantar kontaminasyonunun önüne geçilebilmesi için, bu besiyerlerine antimikrobiyal maddeler eklenerek selektif besiyerleri elde edilmektedir.

- Nonselektif Besiyerleri:

Yumurta bazlı olanlar: Löwenstein-Jensen, Ogawa (55), Petragnani, American Thoracic Society. Koloni oluşumunun erken dönemde saptanamaması dezavantajdır (36).

Agar bazlı olanlar: Agar bazlı besiyerlerinden en yaygın kullanılanı Middlebrook 7H10 ve 7H11'dir. Besiyerinin saydam olması nedeniyle mikroskopik yapıdaki kolonileri bile saptayarak 10-12 günlük bir sürede tanı konabilir. Middlebrook 7H10 besiyeri "National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS) tarafından agar proporsiyon yönteminde önerilmektedir (36, 56).

- **Selektif Besiyerleri:**

LJ Gruft (penisilin, nalidiksik asit), Mycobactosel LJ (sikloheksimid, linkomisin, nalidiksik asit), Mycobactosel Middlebrook 7H10, Mitchison's selektif 7H11 (karbenisilin, polimiksin B, trimetoprim laktat, amfoterisin B) (18, 32, 55).

2.9.3.3. Bifazik besiyerleri

Septi-Check (BD Biosciences): Middlebrook 7H9'dan oluşan bir sıvı besiyeri ile LJ, Middlebrook 7H11, çukulatamsı agardan oluşan üç katı besiyerinden oluşur. Ekim işlemleri sonrasında mevcut şişeler ters çevrilerek inkübe edilir ve önce günlük, sonra haftalık takibe alınır. Üremenin gözlenmesi halinde EZN boyama yapılan preparat, mikobakteri varlığı yönünden incelenir. Kan dışındaki tüm klinik örnekler için uygundur. Duyarlılığı BACTEC 460TB'ye benzer ancak üremeyi saptama zamanı daha uzundur (18, 55).

2.9.3.4. Sıvı besiyerleri

Sıvı besiyerleri mikobakterilerin hem ilk izolasyonunda hem de sub-kültürlerinin yapılmasında kullanılabilirler. Sıvı temelli besiyerlerinde yapılan kültürlerde katı temelli besiyerlerine oranla daha hızlı sonuçlar alınmakta ve izolasyon oranları da daha yüksek olmaktadır. Middlebrook 7H9 broth mikobakterilerin sub-kültürünün yapılmasında, duyarlılık testleri için inokulum hazırlanmasında, biyokimyasal testlerin ve bazı ticari sistemlerin bazal besiyeri olarak kullanılmaktadır (18).

Günümüzde mikobakterilerin izolasyonu için hazırlanmış ticari sıvı kültür sistemleri mevcuttur:

1. MB Redox (Heipha Diagnostica Biotest): Mikobakterilerin izolasyonu amacıyla antibiyotik karışımı ve renksiz tetrazolium tuzu içeren modifiye Kirchner besiyeri kullanılır. Tetrazolium tuzu, mikobakterilerin redoks sistemi sayesinde hücre yüzeyinde granüler formda biriken pembe, kırmızı ve menekşe renginde formazona indirgenir ve üreme sonucu oluşan mikrokoloniler renkli partiküller şeklinde makroskopik olarak görülebilir. Maliyeti uygundur, ancak görsel okuma esnasında fazla manuel uygulama gerektirmesi dezavantajdır (18, 32, 55).

2. MGIT (Becton Dickinson, Biosciences): Modifiye Middlebrook 7H9 broth kullanılmaktadır. Mikobakterilerin üremesini saptamak için oksijen tüketimine dayalı floresans sensörü içerir. Floresan madde, sıvı besiyerindeki oksijen varlığında maskelenmektedir. Wood lambası veya transilluminator dışında başka özel ekipmana gerek yoktur. Düşük kapasite ile çalışan laboratuvarlarda tercih edilen manuel sistemdir (18, 32).

3. BACTEC 460TB (Becton Dickinson, Biosciences): Yarı otomatize radyometrik ve altın standart bir sistemdir. BACTEC 12B besiyeri ^{14}C işaretli palmitik asit içerir. Mikobakterilerin ^{14}C işaretli palmitik asiti metabolize etmesi sonucu $^{14}\text{CO}_2$ oluşur ve bu cihaz tarafından izlenir. *M.tuberculosis* için ortalama sonuç alma süresi 9-14 gün iken NTM için 7 günden kısadır. Koloni morfolojisinin gözlenememesi, kontaminantların aşırı üremesi, radyoizotop atıklar, enjektörlerin yaygın kullanımı sonucu oluşan laboratuvar kazaları sistemin dezavantajlarıdır (18, 32).

4. MGIT 960 (Becton Dickinson, Biosciences): Tam otomatize ve radyometrik olmayan bir sistemdir. MGIT tüplerinin dibinde içine floresan madde gömülü silikonlar mevcuttur. İçerisindeki zenginleştiriciler mikobakteri dışındaki organizmaların üremesini arttırdığı için kontaminasyon oranları BACTEC 460 TB sistemine göre daha yüksektir ancak bu sisteme göre çapraz kontaminasyon oranı daha düşüktür (18, 32).

5. .BACTEC 9000 MB (Becton Dickinson, Biosciences): Tam otomatize bir sistemdir. Oksijene duyarlı floresan temelini kullanarak mikobakterileri tespit eder (15).

6. ESP II (Versatrek): Tam otomatize bir sistemdir. Selüloz sünger ve Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içeren bir sistemdir. Sistemde mikroorganizmaların üremesi sonucu oluşan gaz basıncındaki değişiklikler ölçülerek değerlendirme yapılır.

Bilgisayar destekli bir sistemdir ve besiyerinde oluşan gaz basıncındaki değişiklik grafiksel olarak bilgisayarda görüntülenir (18, 32, 55).

7.MB/BacT ALERT 3D (BioMerieux): Tam otomatize bir sistemdir. Besiyerinin dip kısmında kolorimetrik bir sensör içeren ve oluşan CO₂ düzeyini ölçerek üremeyi değerlendiren bir sistemdir. Bilgisayar desteği bulunan sistemde besiyerleri sürekli kontrol altındadır (18, 32, 55).

2.9.4. İdentifikasyon

Kültür işlemleri sonucunda izole edilen mikobakterilerin tür düzeyine kadar tanımlanabilmesi, halk sağlığı ve hastaların doğru antimikobakteriyel tedavileri için gerekli olmaktadır. Mikobakterilerin tanımlanması konvansiyonel biyokimyasal yöntemler, BACTEC NAP testi, kromatografik analiz ve moleküler yöntemler kullanılarak yapılabilir (18).

2.9.4.1. Konvansiyonel biyokimyasal yöntemler

Mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanmaları gereklidir. Her mikobakteriyoloji laboratuvarının tüm izolatları tanımlayabilecek düzeyde olması gerekli değildir. Ancak TB basillerinin etken olma sıklığı ve enfektivitesi göz önüne alındığında, en azından *M. tuberculosis* kompleksin tanımlanmasında kullanılan anahtar testlerin uygulanması gerektiği düşünölmektedir (18).

Mikobakteriler öncelikli olarak üreme süreleri, üreme sıcaklıkları, koloni morfolojileri ve pigment oluşturma özelliklerine göre gruplandırılır. Bu gruplama sonucunda tanımlanacak mikobakteri için uygulanacak olan anahtar biyokimyasal testler belirlenir. Mikobakterilerin tanımlanmasında kullanılan biyokimyasal testler; niasin testi, nitrat redüksiyon testi, katalaz testi, PNB (p-nitro benzoik asit) içeren besiyerinde üreme, TCH ile üremenin inhibe edilmesi, pirazinamidaz testi, Tween 80 hidroliz testi, arilsülfataz testi, tellurit redüksiyonu, üreaz testi, % 5 NaCl tolerans deneyi, demir uptake'i, kristal viyoletsiz MacConkey agarda üremez (18).

Üreme Hızı ve Pigment Üretimi: Uygun dilüsyonlarda katı besiyerlerine yapılan pasajlarında yedi günden önce üreyenlere hızlı üreyenler, yedi günden sonra üreyenlere yavaş üreyen mikobakteriler olarak kabul edilirler.

Karşılaştırmalı 16S rDNA dizilerinden elde edilen bilgi de kesin olarak hızlı ve yavaş

üreyenleri ayırmaktadır (18). Yavaş üreyenler pigment üretme özelliklerine göre üç gruba ayrılır: skotokromojen, fotokromojen ve nonkromojen (32). Işıktaki pigment oluşturma özelliği oksijen ve sıcaklık parametreleriyle ilişkili bulunmuştur (57).

NAP testi (Nitro- α -Acetylamino- β -Hydroxypropriophenone) Deneyi: Radyometrik BACTEC yöntemine adapte edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla yapılan çalışmalarda inhibitör maddenin 10 μ g/ml' den, 5 μ g/ml' ye düşürerek, NAP deneyinin radyometrik sistemde de başarılı sonuçlar verdiğini, deney süresinin 4-6 güne indirdiğini göstermiştir (58).

Niasin Birikimi: Niasin (nikotinik asid) mikobakterilerin metabolik süreçleri esnasındaki NAD (nikotinik asid adenin dinükleotit) ve NADP (nikotinik asid adenin dinükleotit fosfat) koenzimlerinin biyosentezinde öncül bir maddedir (18, 32).

Nitrat Redüksiyonu: Birkaç mikobakteri türü ile çoğu mikobakteri izolatları nitratların nitrite indirgenmesini katalizleyen nitrat redüktaz enzimine sahiptir. Besiyerinde nitritin varlığı, sülfanilamid ve Nnaphthylethylendiyamine ilavesi sonucu kırmızı rengin oluşmasıyla anlaşılır (32).

Tween 80 Hidrolizi: Tween 80 (polyoxyethylene sorbitan monooleate) deterjan etkilidir. pH' sı 7'ye ayarlanmış besiyerinde, Tween 80 besiyeri içerisindeki nötral kırmızısı ile bağlanır ve serbest haldeyken pH 7 iken kırmızı olan nötral kırmızısı saydam sarı renk alır. Besiyerine ekilen bir mikobakteri suşu lipaz üretebiliyorsa, Tween 80' i oleik asit ve polyoxyethylene sorbitol' e hidrolizler ve serbest kalan nötral kırmızısının rengi kırmızıya dönüşür (32).

Katalaz: Katalaz hidrojen peroksidi (H₂O₂) su ve oksijene parçalayan bir hücre içi enzimdir. Katalaz aktivitesini saptamak için iki test kullanılmaktadır: semikantitatif katalaz testi ve ısı tolerans testi(18). Semikantitatif katalaz testi mikobakterileri, ürettikleri köpüğün tüpte oluşturduğu yüksekliğe göre (45 mm' den fazla ve daha az köpük yapanlar) yüksek katalaz ve düşük katalaz üretenler olarak ikiye ayrılırlar (59). Çoğu mikobakteri türü 68°C' de ısıtılınca katalaz aktivitesini korurlar. Çoğu *M.tuberculosis* suşu diğer MTBC üyelerinden ısıya dirençli katalaz üretememeleri ile ayrılabilir. *M.gastri* de ısıya dirençli katalaz üretmez (18, 32).

Arilsülfataz Aktivitesi: Arilsülfataz enzimi renksiz bir madde olan tripotasyum fenolftalein gibi maddelerin sülfat grubu ile aromatik halka arasındaki bağı hidrolize eder. Serbest kalan fenolftalein ortam bazikleştiğinde kırmızılaşır (18). Hızlı üreyen

mikobakterileri, grup III non fotokromojenik mikobakterilerden ayırdetmede yararlı bir testtir (32).

Üreaz Aktivitesi: Üreaz enzimine sahip mikobakteriler üreyi hidrolize ederek amonyak serbestleştirir, bu da ortam pH'sını yükselterek rengin değişmesine neden olur. *M.scrofulaceum* (pozitif) ve *M.gordoniae* (negatif) türlerinin ayırımında kullanılan önemli bir testtir. *M. gastrii*' yi diğer grupIII non kromojenelerden ayırımda önemlidir (32).

Pirazinamidaz Deneyi: Pirazinamidaz enzimi pirazinamidi hidrolize ederek pirazinoik asid ve amonyağa çevirir. Besiyerine ferröz amonyum sülfat eklenirse pirazinoik asit iki değerlikli demirle birleşir, besiyeri yüzeyinin altında kırmızı renkli halka oluşur. *M.tuberculosis-M.bovis*, *M.kansasii-M. marinum*, MAC üyelerinin ayırımında pirazinamidaz testi kullanılır (18, 32).

Tiyofen-2-Karboksilik Asit Hidrazid (T₂H) ile Üremenin İnhibisyonu: Çoğu mikobakteri T₂H içeren besiyerinde üreyebilirken, *M. tuberculosis*' i seçici olarak inhibe eder. *M.bovis* suşlarının, *M.t tuberculosis* ve diğer yavaş üreyen nonkromojenlerden ayırımında özellikle yararlıdır. Bazı *M.bovis* suşlarının niasin zayıf pozitif olduğu durumlarda *M.tuberculosis*' ten ayırttırıcı özellik olmaktadır (32).

Sodyum Klorür Tolerans Deneyi: % 5' lik NaCl içeren L-J besiyerinde üreyebilme yeteneği, 28°C'de inkübe edildikleri zaman, yavaş üreyenlerden sadece *M. triviale*, *M. flavescens*' in bazı suşları, *M. abscessus* ve *M.fortuitum* için ortak bir özelliktir (18, 32).

McConkey Agarda Üreme: Kristal viyolete içermeyen McConkey agar RGM' in üremelerini sağlar. Diğer mikobakterilerin çoğu üreyemez(32).

Mikobakterilerin üreme özelliklerinin belirlenmesi ve konvansiyonel biyokimyasal yöntemlerle identifikasyonu yaklaşık 3-6 hafta veya daha uzun sürebilmektedir (32).

2.9.4.2. Kromotografik Analiz

Mikolik asit analizleri yeni mikobakteri türlerinin tanımlanması için önerilen çeşitli yöntemlerden birisidir. Mikolik asitler mikobakteri hücre duvarının önemli bir kısmını oluşturan uzun zincirli β -hidroksi yağ asitleridir. Her mikobakteri türünde farklı fonksiyonel gruplar ve farklı karbon sayılı mikolik asitler bulunur. Türe özgü bu farklılıklar kullanılarak identifikasyon yapılır. Bu amaçla Thin Layer Chromatography (TLC), High Performans Liquid Chromatography (HPLC), ve Gas Liquid

Chromatography (GLC) yöntemleri kullanılmaktadır. TLC yönteminde mikolik asitler taşıdıkları ester gruplarına göre, HPLC'de mikolik asitler polarite ve karbon sayılarına göre, GLC' de ise sadece mikolik asit değil, mikobakteri hücre duvarındaki bütün yağ içeriği incelenerek tanımlama yapılmaktadır (40). Kromatografik yöntemlerde, katı veya sıvı besiyerlerinde üremiş koloniler kullanılarak çalışılır (32).

HPLC yöntemi ile *M.bovis BCG*; *M.tuberculosis* ve *M.bovis* ' den ayrılırken, bu iki tür birbirinden ayırt edilememektedir. Kromatografik yöntemler teknik açıdan kompleks olup, pahalı ekipman ve yüksek maliyet gerektirmektedir. Ancak yeni türlerin saptanmasında faydalı olmaktadır (36, 60).

2.9.4.3. Moleküler yöntemler

M.tuberculosis genomunun bütün baz dizilimi gösterilmiştir. Genom yaklaşık 4.4 mega baz çiftinden meydana gelir ve oldukça yüksek oranda guanin-sitozin (% 62-70) içerir. Mikobakterilerin doğru şekilde tiplendirilmeleri için kullanılacak en ideal yöntem tüm genomun dizi analizini yapılmasıdır. Ancak genomun büyüklüğü dikkate alındığında bunun zaman alıcı ve maliyetinin yüksek olması kullanımını sınırlamıştır (61). Bu nedenle mikobakteri DNA'sını direkt restriksiyon enzimi ile kesimi, özgül bir bölgenin restriksiyon enzimi ile kesimi, genom üzerinde bulunan tekrarlayan bölgeleri ya da bunların arasındaki boşlukların polimorfizmini hedefleyen yöntemler geliştirilmiş ve yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (62).

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE): Bir çok bakteri için salgınların araştırılmasında ve popülasyon bazlı çalışmalarda kullanılan moleküler tiplendirmede "altın standart" kabul edilen bu yöntemde genomik DNA düşük ısılı agaroz jel içinde ekstrakte edilerek çeşitli restriksiyon enzimleriyle (*EcoR1*, *Ase1*, *Dra1*, *Spe1* ve *Xba1*) kesimin ardından belirli aralıklarla yönü değiştirilen uzun süreli elektrik akımına tabi tutularak bantların ayrışması sağlanır. Etidyum bromür ile boyanan jelde her bir izolata ait tüm bakteri genomunun restriksiyon enzim paternleri belirlenir. Sınırlı sayıda bant oluşturmaması ve buna bağlı olarak ayırım gücünün yetersiz olması *M.tuberculosis*'in epidemiyolojik çalışmalarında kullanımını kısıtlamıştır (61, 63).

PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP): PCR- RFLP yöntemi 1992 yılında Plikaytis ve ark. (64) tarafından *hsp65* geni kullanılarak mikobakterilerin hızlı bir şekilde tanımlanması için önerilmiş, daha sonra Telenti ve ark.

(14), Taylor ve ark (65), Devallois ve ark. (56) bu yöntemi rutin klinik uygulamalar için geliştirmiştir (36).

Bu yöntem ile yakın zaman diliminde farklılaşmış bakteri gruplarının tür ve alt tür ayrımında başarılı sonuçlar alınmıştır. Yavaş üreyen mikobakterilerin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılır. En sık *hsp65* geni kullanılmaktadır. *Hsp65* geninin 440 bp'lik bölümünün PCR amplifikasyonundan sonra BstEII ve HaeIII restriksiyon enzimi ile kesilmesi ve elde edilen ürünlerin agaroz jelde moleküler ağırlık standartı ile karşılaştırılarak büyüklüklerine göre değerlendirilmesi esasına dayanır. Elde edilen veriler tür saptama cetveline göre analiz edilerek tanımlama yapılır (40). Bu yöntemle MTBC üyelerinin ayrımı yapılamamaktadır. Ayrıca *M. kansasii* ve *M. gordonae* için birkaç farklı PCR-RFLP paterni tanımlanmıştır (66).

Bu yöntemin avantajları pahalı ekipman gerektirmemesi, fenotipik yöntem veya HPLC ile tanımlanamayan bazı türler dahil çoğu mikobakteri türünü tanımlayabilmesi ve hızlı bir yöntem olmasıdır. Dezavantajları ise nispeten kompleks bir işlem olması, en son tanımlanan türlerin artışına bağlı olarak türlerin kesin tanımlanmasının yapılamamasıdır. Yöntemin çok merkezli değerlendirmelerinde; jel yürütme durumlarındaki farklılıkların ve patenlerin yorumlanmasındaki tecrübe eksikliğinin sonuçların doğruluğunu etkilediği gösterilmiştir (66).

Hibridizasyon bazlı RFLP: *IS6110* RFLP: *M.tuberculosis*'de bulunan tekrarlayan bölgelerden biri de IS (insertion element)dir. Bu güne kadar dört farklı yerleşim elementi *IS6110*, *IS1081*, *IS1547* ve *IS-like* tanımlanmıştır. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanı *IS6110* 'dur. Enterobakteriyel IS3 ailesine ait 1361 baz çiftlik bir yerleşim elementidir. *M.tuberculosis* kompleksinde susdan susa yeri ve sayısı (0-25 kopya) değişkenlik göstermekle birlikte çoğunlukla 8-15 kopya halinde bulunur. Bu yöntem *M.tuberculosis* tiplendirilmesinde "altın standart" olarak kabul edilmektedir.

PGRS-RFLP: Sekonder tiplendirme yöntemlerinden biridir. *IS6110* kopyası olmayan veya düşük sayıda kopya bulunduran *M. tuberculosis* suslarının tiplendirilmesinde kullanılır. Ayırıcı dizilimlerin varlığı veya yokluğu dijital olarak gözlenmektedir. Ayırıcı dizilimler

suşlar arasında değişim göstermektedir ve hibridizasyon membranının sabitleşme yüzeyinde leke şeklinde görülmektedir. Reverse dot blot hibridizasyon metodudur. Bu yöntemle *M. bovis*, *M. microti* ve *M. canettii* suşları kolayca tiplendirilebilmektedir. Basit hızlı ve tekrarlanabilirliği yüksektir. Düşük IS6110 kopya sayılı suşların tiplendirilmesinde ayırım gücü yüksektir. Bu metot IS6110 RFLP'den sonra *M.tuberculosis*'in tiplendirilmesinde yaygın olarak kullanılan sekonder bir yöntemdir (61, 67).

Değişik sayıda sıralı tekrarlar içeren küçük uydulara dayalı metotlar: *M.tuberculosis* genomunda 41 farklı MIRU (mycobacterial interspersed repetitive units) bölgesi tanımlanmıştır. Bu lokuslar PZR bazlı tiplene metodunun temelini oluşturur. MPTR (majör polymorphic tandem repeat) ve ETR (exact tandem repeat) olmak üzere iki tip sıralı tekrar tanımlanmıştır (30, 61).

MIRU-VNTR (mycobacterial interspersed repetitive units–variable numbers of tandem repeats): Değişik sayıda sıralı tekrarlar içeren küçük uyduların (minisatellites) polimorfizmine dayalı bir yöntemdir. Sıralı tekrar lokuslarından (*tandem repeat loci*) elde edilen PZR ürünlerinin dizi analizi yapılarak sıralı tekrarların sayısı ve bunların (*tandem repeats*) her iki yanında lokalize olmuş DNA segmentlerinin büyüklüğü belirlenmektedir. Genomda bağımsız halde bulunan 12 farklı lokusdaki 'tekrarlar' değerlendirilir. Tekrarlar 52-77 oligonükleotid büyüklüğündedir. PZR ürünleri % 2'lik agaroz jelde yürütülür, her lokusdaki MIRU tekrarları bant büyüklüklerine göre değerlendirilir. Sonuçlar 12 rakamlı dijital formata çevrilir. Ayırım gücü yüksek, tekrarlanabilir ve uygulaması kolay, çok merkezli çalışmalara uygun ve otomatize edilebilir bir yöntemdir (30, 61).

ETR-VNTR(exact tandem repeat-variable numbers of tandem repeats):VNTR içeren 6 lokusun (ETR lokus A-F) amplifikasyonuna dayanan bir yöntemdir. ETR-A, ETR-B, ETR-C, ETR-D, ETR-E lokuslarına özel bir çift primerle amplifikasyon yapılmakta ve agaroz jel elektroforezinde amplifikasyon ürününün büyüklüğü ve her lokustaki ETR sayısı belirlenmektedir. Ayırım gücü ve tekrarlanabilirliği MIRU-VNTR tiplene yönteminden daha düşüktür (30, 61).

16S ve 23S rRNA : 16S ve 23S rRNA'yı kodlayan genlerin arasında kalan ve suşlar arasında farklılık gösteren bölgelerin çoğaltılması ve sonrasında restriksiyon enzimi ile kesilerek agaroz jel elektroforezinde oluşan restriksiyon enzim paternlerinin

belirlenmesi şeklinde uygulanır. Yöntemin tekrarlanabilirliği ve ayırım gücü diğer yöntemlerle kıyaslandığında yetersiz bulunmuştur (61, 68).

Arbitrarily Primed (Random Amplified) PCR (RAPD): Bu yöntemde spesifik bir DNA bölgesini çoğaltmak yerine, rastgele seçilen bir veya iki primerle DNA'daki bir çok bölgenin çoğaltılması esasına dayanır. Primerlerin bağlanma yerleri arasındaki uzaklık agaroz jel elektroforezinde farklı büyüklükte ve sayıda bantların oluşmasına neden olur. Bu metot da kullanılan primerler 10-15 baz çiftlik kısa ve G-C zengindirler. Diğer amplifikasyon şartlarından farklı olarak primerlerin bağlanma ısıları (annealing) 40-50⁰C'ye düşürülmüştür. Suşlar arasında primerlerin bağlanma yerlerinde ortaya çıkan bir mutasyon suşa özgü bant polimorfizmin oluşmasına neden olur. Elektroforez sonucu ortaya çıkan her bir izolata ait bant profilleri birbirleriyle karşılaştırılarak sonuçlar yorumlanır. Uygulama kolaylığı, kısa sürede sonuç alma ve çok sayıda örnek çalışılmasına imkan tanınması nedeniyle geniş kullanım alanı bulmuştur. Ancak en önemli dezavantajı laboratuvarlar arası standardizasyonunun sağlanmamış olmasıdır (61, 63).

PZR bazlı yöntemlerden biri de tekrarlayan bölgelerin arasında kalan bölgelerin çoğaltılmasıdır. Yöntemde iki tekrarlanan element olan IS6110 ve PGRS'nin arasında kalan DNA parçalarının çoğaltılması yapılmaktadır. Tekrarlayan bölgelerin sayısı ve aralarındaki uzaklık bant polimorfizmine neden olmaktadır. Yöntem % 96'lık prediktif değere sahiptir ve oluşan paternlerin epidemiyolojik çalışmalara uygun olduğu görülmüştür ki tekrarlayan elementin arasındaki bölgelerin amplifikasyonu için dört adet primer kullanılmaktadır. IS6110 için R1s1 ve R1s 2, PGRS için Ptbn1 ve Ptbn2 primerleri kullanılmaktadır. Primerler tekrar bölgelerin her iki ucundan dışa bakacak şekilde dizayn edilmiştir. Yöntemin tekrarlanabilirliği düşük fakat ayırım gücü yüksek bulunmuştur. Bu nedenle primer tiplene metotlarıyla grup içinde bulunan suşların doğrulanması amacıyla kullanılabilir (61).

Hasta örneklerinden direkt olarak MTBC varlığını araştırmak amacıyla çeşitli ticari moleküler tanı sistemleri geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları; Amplicor PCR Test (Roche), Amplified M. tuberculosis Direct Test (AMTD; Gen-Probe Inc.), BD Probe Tec (Becton Dickinson), GenoType Mycobacteria Direct Test (Hain Lifescience GmbH), LAMP Test (Eiken Chemical Co.Ltd.), LCx MTB Test (Abbott)'dir (36).

Tablo 3: MTBC üyelerinin konakları

Tür	Konak
<i>M. tuberculosis</i>	İnsan
<i>M. bovis</i>	Sığır, geyik, bizon, porsuk, keseli sıçan
<i>M. caprae</i>	Keçi
<i>M. africanum</i>	İnsan
<i>M. microti</i>	Tarla faresi
<i>M. canetti</i>	İnsan
<i>M. pinnipedii</i>	Fok



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. BAKTERİ İZOLATLARI

Sağlık Bakanlığı Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında Ocak 2011-Nisan 2013 tarihleri arasında TB şüphesi ile laboratuvarımıza gönderilen 1896 hastaya ait klinik örnekten 136'sında MGIT kültür sistemi ile mikobakteri izole edilmiştir. Bu örneklerden elde edilen 117 MTBC suşu çalışma kapsamına alınmıştır.

Her hasta için birden fazla gönderilen tekrarlayan aynı klinik örnekler arasından sadece tek örnekten izole edilen suş çalışmaya dahil edilmiştir. Kalite kontrol amacı ile *M.tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) suşu kullanılmıştır.

Çalışmaların tüm aşamaları sınıf II biyolojik emniyet kabini (Heraeus Instruments HS 12) içinde yapılmıştır.

3.2. HOMOJENİZASYON-DEKONTAMİNASYON-KONSANTRASYON İŞLEMİ

Laboratuvarımıza gönderilen örneklerden steril olmayıp mukoid olanlar % 4 NaOH-Sodyum sitrat-NALC çözeltisi, mukoid olmayan örnekler ise % 4 NaOH çözeltisi ile 1:1 oranında karıştırıldı ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bu sürenin sonunda nötralizasyon amacı ile 50 ml'lik tüpün ağzına kadar fosfat tamponu ilave edilip dekontaminasyon işlemi durduruldu. Bakteri yoğunluğunu arttırmak için 15-20 dakika 3000 g'de santrifüj edildi. Üst sıvı dökülüp sedimentin üzerine 1:1 oranında fosfat tamponu ilave edilerek, iyice çalkalandı. Bu işlemlerin sonucunda steril olmayan örnekler, ekim için hazır hale geldi. Steril olduğu düşünülen vücut sıvıları, BOS örnekleri NaOH ile dekontaminasyon işlemi uygulanmadan direkt ekim aşamasına alındı. İdrar örnekleri ile miktarı fazla olan vücut sıvıları santrifüj edildikten sonra dekontaminasyon işlemlerine alındı (18, 32, 55).

Gereç:

a) NaOH	4 g
Distile su	100 ml

b)Trisodyom sitrat 3 H ₂ O	2,94 g
Distile su	100 ml
c)NaOH-sodyum sitrat-NALC eriyiği için;	(a) eriyiğinden 50 ml + (b) eriyiğinden 50 ml + 0,5 g N-acetyl-L-cystein toz karıştırıldı.
d) NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	31,2 g
Distile su	1000 ml
e)Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	28,39 g
Distile su	1000 ml
f) Sodyum Fosfat Tamponu için	(d) eriyiğinden 51 ml + (e) eriyiğinden 49 ml karıştırıldı.

3.3. ASİDE DİRENÇLİ BOYAMA

Mikroskobik inceleme için her hastaya 3 adet lam hazırlandı ve dekontamine edilmiş örnek, lam üzerine 1×2 cm'lik bir alana yayılarak oda sıcaklığında güvenlik kabini içinde kurumaya bırakıldı. Lamalar alevde tesbit edildi. Lamalardan biri EZN boyama, bir diğeri de Auromine-Rhodamine boyama ile boyandı. Her boyama için pozitif ve negatif kontroller hazırlandı.

3.3.1. EZN boyama:

Lam karbolfuksin ile kaplanıp alttan yavaşça 3-5 dakika boyunca (buharlaşma) duman çıkması sağlanana kadar ısıtma işlemi uygulandı ve soğduktan sonra su ile yıkandı. % 3 asit alkolle renk giderilinceye kadar muamele edilip su ile yıkandı . Zıt boyama için lamın üzeri metilen mavisi ile kaplandı ve 1 dakika sonra su ile yıkandı. Boyanan lamalar havada kurutulduktan sonra ×1000'lik büyütmede ışık mikroskobunda incelendi (55).

3.3.2. Auromine-Rhodamine boyama:

Lam Auromine-Rhodamine boyası ile kaplanıp 15-20 dakika oda sıcaklığında beklendi. Ardından su ile yıkandı ve % 0,5 asit alkolle 2-3 dakika muamele edilip tekrar su ile yıkandı. Zemin boyası olarak hazırlanan KMnO₄ ile 2 dakika muamele

edildikten sonra su ile yıkandı. Lam havada kurutulduktan sonra boyanan preparatlar $\times 200$ 'lük ve $\times 400$ 'lük büyütmede floresan mikroskobunda incelendi (55).

EZN ve Auromine-Rhodamine boyama sonuçları Tablo 2'ye göre değerlendirilerek kantitatif olarak rapor edildi (18, 32).

Gereç: EZN boyası için		Gereç: Auramin-Rhodamin	
Bazik Fuksin	1 g	Auromin O (Sigma)	1,5 g
Fenol kristalleri	5 g	Rhodamin B (Sigma)	0,75 g
Saf etil alkol	10 ml	Gliserol	75 ml
Distile su	100 ml	Sıvı Fenol	10 ml
Asit-Alkol çözeltisi	97 ml %95'lik etil alkol + 3ml HCl	Distile su	50 ml
Metilen mavisi	0,3 g methylen blue chloride + 100 ml distile su	Asit-Alkol çözeltisi	99,5 ml etil alkol + 0,5 ml HCl
		Potasyum permanganat (KMnO ₄)	0,5 g + 100 ml distile su

3.4. KÜLTÜR

Homojenizasyon-dekontaminasyon-konsantrasyon işlemleri uygulanan örnekler, kültür için MGIT ve LJ besiyerlerine ekildi. LJ besiyerine, hazırlanan örnekten 0,5 ml ekildi ve kapakları gevşetilerek 37°C'de etüvde bir gece boyunca yatık pozisyonda bekletildi. Ertesi gün dik pozisyona getirilip 6 hafta süreyle inkübasyona devam edildi. LJ besiyerleri haftada bir kez üreme kontrolüne tabi tutuldu. Üreyen kolonilerin morfolojileri makroskobik olarak ve kolonilerden hazırlanan preparatlar EZN ile boyanarak mikroskobik olarak incelendi (55).

MGIT tüp besiyerine sırasıyla MGIT OADC (oleik asit, albumin, dekstroz, katalaz) sıvısından 0,5 ml, MGIT PANTA' dan (polimiksin B, amfoterisin B, nalidiksik

asit, trimetoprim, azlosilin) 0,1 ml ilave edildi. Ekim için hazırlanan örnekten 0,5 ml MGIT tüp besiyerine eklendikten sonra tüpün kapağı kapatılarak karıştırıldı. 37°C'de 6 hafta boyunca inkübe edildi. MGIT besiyerleri haftada üç kez üreme kontrolü amacıyla 365 nm dalga boyunda UV ışına sağlayan cihazda okutuldu. Pozitif üreme saptanan MGIT tüplerinden kontaminasyon kontrolü için kanlı besiyerine pasaj alındı ve aynı zamanda aside dirençli basil açısından EZN boyama yapıldı (55, 69).

Gereç:

MGIT tüp besiyeri (Becton Dickinson (BD),USA)

MGIT OADC çözeltisi (BD,USA)

MGIT PANTA çözeltisi (BD,USA)

LJ besiyeri (BD,USA)

3.5. KONVANSİYONEL YÖNTEMLER İLE İDENTİFİKASYON

MGIT ve LJ besiyerlerinde üreyen aside dirençli basillerin tanımlanması amacı ile MGIT PNB, nitrat redüktaz, niasin deneyleri yapıldı. MGIT PNB; mikobakterilerin identifikasyonunda yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Besiyeri içerisine eklenen inhibitör substratların varlığında üreme inhibisyonunun gözlemlenmesi temeline dayanır. Bu yöntemde kullanılan substrat olan para nitro benzoik asitin (PNB) 500µg/ml konsantrasyonunda NTM'ler üreyebilirken (dirençli), MTBC bakterileri inhibe olmaktadır (duyarlı) (70, 71).

Niasin (nikotik asit) mikobakterilerin metabolik reaksiyonları esnasında oksidasyon-redüksiyon basamaklarında önemli bir yere sahiptir. NAD ve NADP koenzimlerinin biyosentezinde öncül bir maddedir. Bütün mikobakteriler niasin üretir, ancak *M.tuberculosis*'te serbest niasinin nikotik asid mononukleotide dönüşmesini sağlayan metabolik yol bloke edilmiş olduğu için *M.tuberculosis*'de çok daha fazla birikerek besiyerine salgılanır. Yapılan deney ile besiyerine salınan niasin tespit edilmektedir (18).

Nitrat redüktaz deneyinde mikobakteriler sahip oldukları bu enzim ile ortamdaki nitratı nitrite indirgeyebilirler. Ortamdaki oluşan nitritin saptanması için önce çözeltinin pH'sı hidroklorik asit ile aside kaydırılarak nitrit iyonları nitrosonium iyonlarına dönüştürülür. Diazolaştırıcı bir madde olan sulfanamid ile diazonyum iyonları oluşur ve son olarak ortama naphtyl bileşiği eklenerek boyar madde özelliğinde olan azo bileşikleri oluşur (18).

3.5.1. MGIT PNB Deneyi

Pozitif MGIT tüpünden 1 ml sıvı alınıp 4 ml steril serum fizyolojik içeren tüpe aktararak 1:5 oranında dilüsyon yapıldı. İki adet MGIT tüp besiyeri alınarak birinci tüp kontrol, diğer tüp PNB çalışılmak üzere test tüpü olarak işaretlendi. Aseptik şartlarda 0,5 ml MGIT OADC çözeltisi her iki tüpe, 100 µl % 4 PNB çözeltisi ise sadece test tüpüne eklendi. Dilüe edilmiş bakteri süspansiyonundan 0,5 ml her tüpe ilave edilip çalkalandı. Aynı zamanda bakteri süspansiyonundan kontaminasyon kontrolü amacı ile kanlı agar besiyerine pasaj yapıldı. Tüpler 37°C'de inkübe edildi. Kontrol tüpü günlük olarak MGIT cihazında değerlendirildi ve pozitif olarak okunduğu ilk günden itibaren test tüpü değerlendirilmeye alındı. Üçüncü günün sonunda PNB içeren tüpte floresan saptanması durumunda üreyen mikobakteri NTM olarak, floresan saptanmaması durumunda ise MTBC olarak değerlendirildi (70, 71).

Gereç:

MGIT tüp besiyeri

MGIT OADC çözeltisi

%4 PNB çözeltisi

Kanlı agar

3.5.2. Niasin Deneyi

1,5 ml steril distile su, aktif üreme fazındaki (üç-dört haftalık) LJ besiyerine aktarıldı. Kolonilerden besiyerine salınan niasini elde edebilmek için öze yardımı ile koloniler besiyerinden hafifçe kazınarak 20-30 dakika eğik pozisyonda bekletildi. Sürenin sonunda bu solüsyondan 0,6'şar ml kontrol ve test tüpü olarak işaretlenmiş tüplere eklendi. Niasin sribi test tüpüne, ok işareti aşağı gelecek şekilde yerleştirilerek

tüplerin ağzı kapatıldı ve hafifçe çalkalandı. 5-10 dakika sonra tekrar hafifçe çalkalandı ve 15 dakika sonra test sonucu değerlendirildi. Renksiz görünüm niasin negatif, sarı renk varlığı niasin pozitif olarak değerlendirildi (55).

Gereç:

LJ besiyeri

Niasin test strip (BD BBL Taxo TB Niacin Test Strips)

Distile su

3.5.3. Nitrat Redüktaz Deneyi

LJ besiyerinde üreyen 3-4 haftalık kolonilerden bir öze dolusu alınıp 2 ml nitrat substratı içerisinde ezildi. Bununla birlikte MTBC olduğu bilinen bir pozitif kontrol ve ekim yapılmamış nitrat substratının kullanıldığı bir negatif kontrol çalışmaya alındı. Örnekler, pozitif ve negatif kontroller ile birlikte 37°C'de 2 saat inkübe edildikten sonra her tüpe sırasıyla 1 damla konsantre HCl, 2 damla % 0,2 sulfanilamid, 2 damla N (1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochlorid'in sudaki % 0,1'lik eriyiği damlatıldı. Tüpler oda sıcaklığında 5 dk bekletilerek renk değişikliği araştırıldı. Pembe-kırmızı renk oluşumu, nitrat redüktaz pozitif olarak değerlendirildi (55).

Gereç:

a) Fosfat tampon eriyiği (0,02M) içinde nitrat test substratı (0,01M):

NaNO ₃	0,8 g
KH ₂ PO ₄	1,17 g
Na ₂ HPO ₄	1,93 g
H ₂ O	1000 ml (final volüm)

b) Sulfanamid'in distile suda %0,2 eriyiği

c) Konsantre HCl asit

d) N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride'in sudaki %0,1'lik eriyiği

3.6. PCR-RFLP İLE İDENTİFİKASYON

Mikobakterilerin PCR- RFLP ile identifikasyonu için, hedef bölgeye uygun primerlerin ve restriksiyon enzimlerinin seçiminde, Telenti ve ark.'nın (14) yapmış olduğu çalışma kaynak olarak kullanıldı.

3.6.1. Mikobakteri DNA Ekstraksiyonu

Üreme saptanan MGIT tüp besiyeri 1 dk vortekslenildi. Steril pastör pipeti ile 0,5 ml alınarak 1,5 ml'lik ependorf tüpüne konuldu. 80°C'de 10 dakika kuru ısı bloğunda bakterilerin inaktivasyonu sağlandı. 5 dakika 14000 rpm'de santrifüj edilerek bakteriler çöktürüldü ve üstteki sıvı atıldı. % 10'luk Chelex 100 karışımından her kullanım öncesinde vortekslenerek 250 µl ependorfa ilave edildi. 10-15 sn vortekslenildi. Kuru ısı bloğunda 60°C'de 10 dakika inkübe edildi. Tekrar 10-15 sn vortekslenildi. Kuru ısı bloğunda 100°C'de 15 dakika inkübe edildi ve oda ısısında soğumaya bırakıldı. Üç dakika 14000 rpm'de santrifüj edildi. Mycobacterium DNA'sını içeren süpernatant başka bir ependorfa aktarıldı. PCR işlemi için kullanılmaya kadar -70°C'de muhafaza edildi (72).

Gereç:

a) 1M Tris:

Tris (AppliChem, Germany)	60,57 g
Distile su	500 ml
HCl asit ile	pH: 7,5' a ayarlandı

b) 0,5 M EDTA:

EDTA (Ethylendinitrilotetra acetic acid disodyum salt dihydrate)	18,6 g
Distile su	100 ml
NaOH ile	pH: 8' e ayarlandı

c) TE Buffer (10mM Tris, 1 mM EDTA) (a) eriyiğinden 10 ml + (b) eriyiğinden 2 ml karıştırıldı

d) Chelex 100 (%10): 2,5 ml TE Buffer (c) eriyiği + 7,5 ml

Distile su + 1 g Chelex 100 (Sigma)
karıştırıldı

3.6.2. *hsp65* gen Amplifikasyonu

Gereç:

10X PCR Buffer (Fermentas, Glen Burnie, Maryland, ABD)

MgCl₂ (Fermentas)

dNTP (Fermentas)

Primerler (Tb11, Tb12) (Promega)

Taq Polimeraz (Fermentas)

Distile su

Mikobakteri tür tanımlamasında kullanılan *hsp65* geninin 440 baz çiftlik bölgesinin çoğaltılması için kullanılan primerlerin özellikleri tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4: *hsp65* PCR-RFLP için kullanılan primerler ve özellikleri

Primer adı	Primer Dizisi (5'→ 3')	Ürün uzunluğu (bp)	Birleşme sıcaklığı °C
Tb 11	ACCAACGATGGTGTGTCCAT	440	60
Tb 12	CTTGTCGAACCGCATAACCT		

PCR Karışımı:

10X Buffer 5 µl

MgCl₂ (25 mM) 3 µl

dNTP (25 mM) 0,4 µl

Primer Tb11 (25 pmol)	1 µl
Primer Tb12 (25 pmol)	1 µl
Taq Polimeraz (5U/ µl)	0,5 µl
Distile su	34,1 µl

Hazırlanan PCR karışımından PCR tüplerine 45 µl dağıtıldı. Elde edilen bakteri DNA'sından 5 µl eklendi ve MyCycler™ (Bio-Rad, ABD) ısı döngü cihazında sıcaklık döngüleri aşağıda belirtildiği şekilde ayarlandı:

İlk Denatürasyon: (1 döngü)	95 °C , 4 dk
Amplifikasyon: (30 döngü)	94 °C , 1 dk denatürasyon 60 °C, 1 dk bağlanma 72 °C, 1 dk uzama
Ek polimerizasyon: (1 döngü)	72 °C, 10 dk uzama
Soğutma:	4 °C

3.6.3. BstEII ve HaeIII Restriksiyon Enzimleri ile kesim

Gereç:

BstEII Restriksiyon Enzim (Promega)

HaeIII Restriksiyon Enzim (Promega)

Restriksiyon Enzimi 10X Buffer (Promega)

Acetylated Bovine Serum Albumin (BSA) (Promega)

Distile su

Uygun hedef DNA bölgesinin bantlarının görüldüğü örnekler Tablo 5'te belirtildiği şekilde karışım hazırlanarak; BstEII enzimi için 60°C'de 2,5 saat, HaeIII enzimi için 37°C, 2,5 saat süreyle kuru ısı bloğunda veya ısı döngü cihazında inkübasyon sağlandı.

Tablo 5: BstEII ve HaeIII restriksiyon enzimleri ile DNA kesimi için hazırlanan karışım

Distile su	6,8 µl
10X RE buffer	2 µl
Acetylated BSA	0,2 µl
Restriksiyon Enzimi	1 µl
PCR ürünü	10 µl
Toplam	20 µl

3.6.4. *gyrB* gen Amplifikasyonu

Gereç:

10X PCR Buffer (Fermentas, Glen Burnie, Maryland, ABD)

MgCl₂ (Fermentas)

dNTP (Fermentas)

Primerler (MTUBf, MTUBr) (Promega)

Taq Polimeraz (Fermentas)

Distile su

MTBC tür tanımlamasında kullanılan *gyrB* geninin 1020 baz çiftlik bölgesinin çoğaltılması için kullanılan primerlerin özellikleri tablo 6’de verilmiştir.

Tablo 6: *gyrB* PCR-RFLP için kullanılan primerler ve özellikleri

Primer adı	Primer Dizisi (5'→ 3')	Ürün uzunluğu (bp)	Birleşme sıcaklığı °C
MTUBf	TCGGACGCGTATGCGATATC	1039	60
MTUBr	ACATACAGTTCGGACTTGCG		

PCR Karışımı:

10X Buffer	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
dNTP (25 mM)	0,4 µl
Primer MTUBf (25 pmol)	0,4 µl
Primer MTUBr (25 pmol)	0,4 µl
Taq Polimeraz (5U/ µl)	0,5 µl
Distile su	35,7 µl

Hazırlanan PCR karışımından PCR tüplerine 45 µl dağıtıldı. Elde edilen bakteri DNA'sından 5 µl eklendi ve MyCyclar™ (Bio-Rad, ABD) ısı döngü cihazında sıcaklık döngüleri aşağıda belirtildiği şekilde ayarlandı:

İlk Denatürasyon: (1 döngü)	80 °C , 5 dk
Amplifikasyon: (30 döngü)	94 °C , 1 dk denatürasyon 65 °C, 1 dk bağlanma 72 °C, 1 dk uzama
Ek polimerizasyon: (1 döngü)	72 °C, 10 dk uzama
Soğutma:	4 °C

3.6.5. RsaI, TaqI ve SaqII Restriksiyon Enzimleri ile kesim

Gereç:

RsaI Restriksiyon Enzim (Promega)

TaqI Restriksiyon Enzim (Promega)

SaqII Restriksiyon Enzim (Promega)

Restriksiyon Enzimi 10X Buffer (Promega)

Acetylated Bovine Serum Albumin (BSA) (Promega)

Distile su

Uygun hedef DNA bölgesinin bantlarının görüldüğü örnekler Tablo 7’de belirtildiği şekilde karışım hazırlanarak; RsaI enzimi için 37°C’de 2 saat, TaqI enzimi için 65°C’de 1,5 saat, SaqII enzimi için 37°C’de 2 saat süreyle kuru ısı bloğunda veya ısı döngü cihazında inkübasyon sağlandı.

Tablo 7: RsaI, TaqI ve SaqII restriksiyon enzimleri ile DNA kesimi için hazırlanan karışım

Distile su	6,8 µl
10X RE buffer	2 µl
Acetylated BSA	0,2 µl
Restriksiyon Enzimi	1 µl
PCR ürünü	10 µl
Toplam	20 µl

3.6.6. Agaroz Jel Elektroforezi:

Gereç:

5X TBE için:

Tris (AppliChem, Germany)	108 g
Boric Asid (AppliChem)	55 g
0,5 M EDTA (pH:8)	40 ml

distile su

1 lt' ye tamamlandı

Agaroz (AppliChem, Germany)

NuSieve GTG Agarose (Cambrex, USA)

Etidyum Bromür

Yükleme tamponu (AppliChem, Germany)

φX174 DNA/Hinf I DNA molekül ağırlık standartı (Fermentas)

Çoğaltılan PCR ürünlerinin kontrolü için agaroz jel elektroforezi yapıldı. Bu amaçla % 2' lik agaroz jel için 0,8 g agaroz tartıldı. 5X TBE, distile su ile dilüe edilerek 0,5 X TBE elde edildi. 40 ml 0,5 X TBE içine, tartılan agaroz eklendi ve mikrodalga fırında eritildi. İçerisine 4 µl etidyum bromür eklendi. Jel kalıbına tarak yerleştirilerek jel döküldü ve oda ısısında 20 dk katılaşması beklendi. Taraklar çıkarılıp, 4 µl PCR ürünü, 2 µl yükleme tamponuyla karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. 110V, 400 A'de 50 dk elektroforez (BioRad) uygulandı. Ardından UV kaynağı ile incelenerek 440 baz çiftlik hedef bölgenin kontrolü yapıldı. DNA bantlarının görüldüğü örnekler, restriksiyon enzimleriyle kesim işlemine alındı.

BstEII ve HaeIII restriksiyon enzimleriyle kesim işleminden sonra MTBC suşlarının belirlenmesi için % 2 agaroz jel hazırlandı. Agarozdan 0,8g tartılarak, 40 ml 0,5X TE buffer içinde eritildi. İçerisine 4µl etidyum bromür eklendi. Tarak yerleştirilmiş jel kalıbına dökülerek katılaşması beklendi. Ardından elde edilen ürünlerden 5 µl, yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklendi. Bant büyüklükleri φX174 DNA/Hinf I DNA molekül ağırlık standartı ve 100 bç DNA ladder ile karşılaştırılarak belirlendi. Oluşan bant paternleri karşılaştırılarak mikobakterilerin identifikasyonu sağlandı (14, 56, 65).

RsaI, TaqI ve SaqII restriksiyon enzimleriyle kesim işleminden sonra MTBC türlerinin görüntülenmesi için ve belirlenen; % 2 agaroz jel hazırlandı. Agarozdan 0,8g tartılarak, 40 ml 0,5X TE buffer içinde eritildi. İçerisine 4µl etidyum bromür eklendi. Tarak yerleştirilmiş jel kalıbına dökülerek katılaşması beklendi. Ardından elde edilen ürünlerden 5 µl, yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklendi. Bant büyüklükleri φX174

DNA/Hinf I DNA molekül ağırlık standartı ve 100 bç DNA ladder ile karşılaştırılarak belirlendi. Oluşan bant paternleri tablo 8’de gösterilen bant paternlerine göre değerlendirildi.

Tablo 8: MTBC üyelerinin *gyrB* geninin Rsa1, Taq1, SacII enzimleri yardımıyla PCR-RFLP paternleri

Enzim	Bant paterni	Tür
Rsa1	360 -560 bp	M.tuberculosis M.africanum
	360 - 480 bp	M.bovis/M.caprae
	360 - 660 bp	M.microti
Taq1	250 - 440 bp	M.tuberculosis
	440 bp	M.africanum
SacII	No digestion	M.bovis
	280 and 740 bp	M.caprae

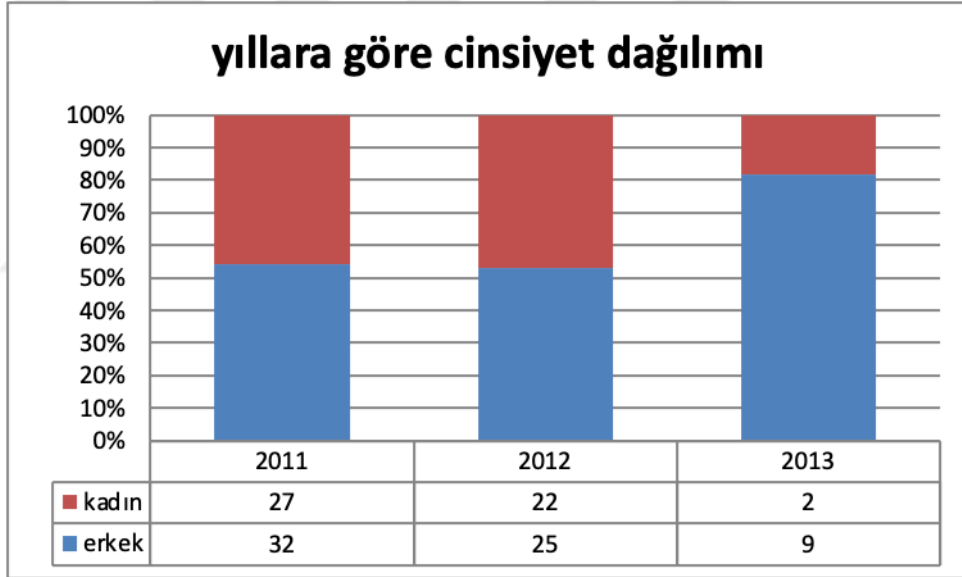
3.7. İSTATİKSEL İNCELEMELER

Verilerin değerlendirilmesi amacı ile SPSS 15.0 paket programında oranlar arasındaki farkın anlamlılık derecesi için ki-kare ve Mc-Nemar testi uygulanmış, p değerinin 0.05’ten küçük olması durumunda sonuç istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

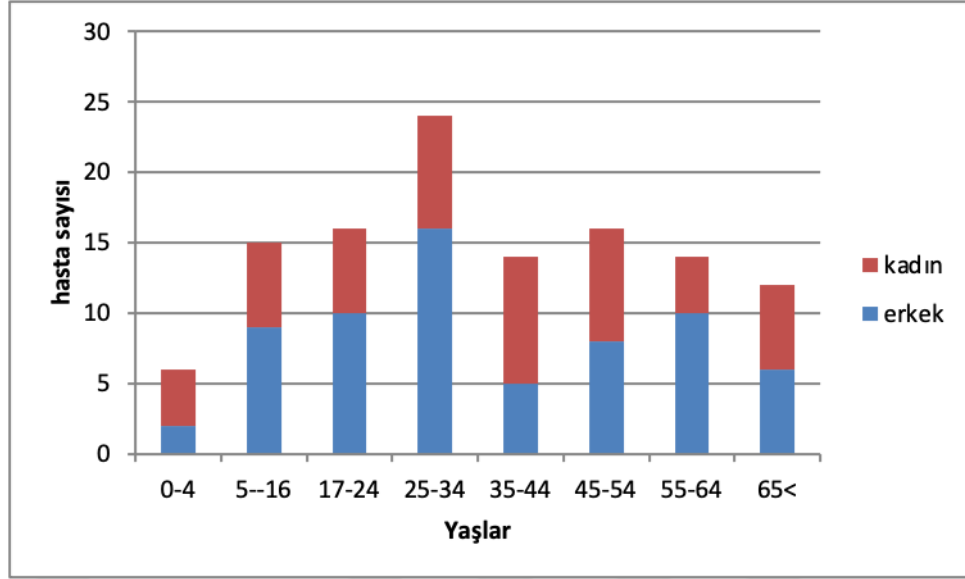
4.1. HASTALARA AİT ÖZELLİKLER

Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına Ocak 2010- Nisan 2013 tarihleri arasında TB şüphesi ile laboratuvarımıza gönderilen 1896 hastaya ait klinik örnekten 136'sında (% 7,2) MGIT kültür sistemi ile mikobakteri izole edilmiş, bu örneklerin de 117'sinde (% 6,2) MTBC tespit edilmiştir. Kültürlerinde üreme saptanan 117 olgunun yıllara göre cinsiyet (Erkek-Kadın) dağılımı (şekil 1); 2011 yılı için % 53-%47, 2012 yılı için % 59-% 41, 2013 yılı için % 82-18'dir. Örnekler toplamda ise 66(% 56) erkek 51(% 44) kadın hastaya aittir.



Şekil 1: Kültüründe mikobakteri üretilen hastaların yıllara göre cinsiyet dağılımları

Kültüründe mikobakteri üretilen hastaların yaş aralığı 0-94'dür. Hastaları yaşlarına göre grupladığımızda 0-4 yaş aralığında 6 hasta, 5-16 yaş aralığında 15 hasta, 17-24 yaş aralığında 16 hasta 25-34 yaş aralığında 34 hasta, 45-54 yaş aralığında 16 hasta, 55-64 yaş aralığında 14 hasta ve >65 yaş aralığında 12 hasta bulunmaktadır. Şekil 2'de gösterildiği gibi, pediatrik yaş grubu tüm olguların % 18'ini, genç erişkinler ise (17-44) % 46'sını oluşturmaktadır.



Şekil 2: Kültüründe mikobakteri üretilen hastaların yaş gruplarına göre dağılımı

Kültürü yapılması için laboratuvarımıza gönderilen tüm örneklerin yıllara göre dağılımı ve mikobakteri üretilen örneklerin sayısı Tablo 9’de gösterilmiştir. Laboratuvarımıza gönderilen örneklerden, mikobakteri üretilme oranı, abse (% 15), BOS (% 13), periton (% 8) ve MAS (% 7) örneklerinde tüm örneklerinin oranından (% 6) yüksek iken, idrar örneklerinde (% 2) en düşük bulunmuştur. Üreme saptanan örneklerin 67’si (% 57) akciğer TB olan olgulardan, 50’ü (% 43) akciğer dışı TB olgularından oluşmaktadır. Akciğer TB’li olguların % 40’ı, akciğer dışı TB’li olguların % 46’sı kadındır.

Tablo 9: Örnek türlerinin ve üremeli örneklerin yıllara göre dağılımı

Örnek	Üreme Olan Örnek sayısı / Toplam Örnek sayısı (%)			
	2011	2012	2013	Toplam
Balgam	32/409 (7.8)	18/472 (3.8)	7/125 (5.6)	57/1006 (6)
MAS	5/73 (6.8)	4/35 (11.4)	0/13 (0)	9/121 (7)
Abse	8/53 (15.1)	8/44 (18.2)	0/9 (0)	16/106 (15)
İdrar	1/71 (1.4)	1/129 (0.7)	2/29 (6.8)	4/229 (2)
Biyopsi	6/76 (7.9)	6/70 (8.6)	0/20 (0)	12/166 (7)
Periton	2/29 (6.9)	4/35 (11.4)	1/13 (7.6)	7/77 (9)
BOS	3/26 (11.5)	4/21 (19)	1/14 (7.1)	8/61 (13)
Plevra	1/30 (3.3)	1/32 (3.1)	0/2 (0)	2/64 (3)
Eklem Sıvısı	1/21 (4.8)	1/32 (3.1)	0/13 (0)	2/66 (3)
Toplam	59/788 (7.5)	47/870 (5.4)	11/238 (4.6)	117/1896 (6)

MAS: mide açlık suyu, BOS: Beyin omurilik sıvısı

Kültüründe mikobakteri üretilen örneklerin gönderildikleri kliniklere göre dağılımı Tablo 10’da gösterilmiştir.

Tablo 10: Örnek türlerinin gönderildikleri kliniklere göre dağılımı.

Bölümler Örnekler													Toplam	
	Çocuk	Dahiliye	G.Cerrahi	Gastroenteroloji	Göğüs H.	KBB	Nefroloji	Enfeksiyon H.	Nöroloji	Nöroşirürji	Ortopedi	Üroloji		Diğer
Balgam	3	6		5	34		2	6	1					57
MAS	8								1					9
İdrar							1			1	2			4
Abse	2	1				7	2		2	1		1		16
Plevra	1	1												2
Biyopsi			1	4		1	3	1		1	1			12
Periton Sıvısı	1	3	1				2							7
BOS	2						4	2						8
Sinovyal sıvı		1								1				2
Toplam	18	11	2	9	34	8	7	14	4	3	4	2	1	117

MAS: mide açlık suyu, BOS: Beyin omurilik sıvısı, KBB: Kulak Burun Boğaz

4.2. KÜLTÜR VE MİKROSKOBİK İNCELEME BULGULARI

Ocak 2010- Nisan 2013 tarihleri arasında TB şüphesi ile laboratuvarımıza gönderilen 1896 hastaya ait klinik örnekten 136’sında MGIT kültür sistemi ile mikobakteri izole edilmiştir. Bu örneklerin 117’si (% 86) LJ besiyerinde de üretilirken, 19 örnek sadece MGIT besiyerinde üretilmiştir (Tablo 11).

Tablo 11: MGIT ve LJ kültürlerinin karşılaştırmalı sonuçları

		MGIT		
		POZİTİF	NEGATİF	Toplam
		n(%)	n(%)	n(%)
LJ	POZİTİF	117(6,2)	0(0)	117(6,2)
	NEGATİF	19(1)	1760(92,8)	1781(93,8)

Toplam	136(7,2)	1760(92,8)	1896(100)
---------------	-----------------	-------------------	------------------

MGIT: Mycobacteria Growth Indicator Tube, LJ: Löweinstein Jensen, n: sayı

*Mc Nemar Test **p<0,05*

MGIT kültür sistemi ile LJ kültür sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p<0,05$); MGIT kültür pozitif olgularda üreme % 7,2 iken, LJ kültür sonucunda pozitiflik oranı % 6,2 olarak saptanmıştır. MGIT kültür negatif olguların tümünde LJ’de negatif sonuç alınmıştır.

Tablo 12’de gösterildiği gibi MTBC (117) saptanan örneklerin; 111’i LJ besiyerinde üretilirken, 6’sı LJ besiyerinde ürememiştir. NTM(19) saptanan örneklerin; 6’sı LJ besiyerinde üretilirken, 13’ü LJ besiyerinde ürememiştir.

Tablo 12: Mikobakteri türleri ile LJ besiyeri kültüründe üreme sonuçları arasındaki uyum

	LJ Pozitif	LJ Negatif	Toplam
	n(%)	n(%)	n(%)
MTBC	111(82)	6(4)	117(86)
NTM	6(4)	13(10)	19(14)
Toplam	117(86)	19(14)	136(100)

NTM:Non Tuberculous Mycobacteria; MTBC dışı mikobakteriler, MTBC: M.tuberculosis kompleks, LJ: Löwenstein-Jensen besiyeri, n: sayı

*Ki kare Test **p<0,05*

MTBC ile NTM arasında LJ besiyerinde üreme açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0,05$). Üretilen 57 AC örneğinin ikisi, 60 AC dışı örneğin LJ besiyerinde üremesi olmamıştır.

Kültüründe mikobakteri saptanan 136 örneğin EZN ve Auromin-Rhodamin boyama yöntemleri kullanılarak yapılan mikroskopik incelemesinde 55 (% 40) örnekte aside dirençli basil saptanmıştır. Tablo 13’te gösterildiği gibi ARB pozitif (55) saptanan örneklerin; 55’i MGIT kültür besiyerinde, 55’i LJ besiyerinde üretilirken, ARB negatif

(1841) saptanan örneklerin; 81'i MGIT kültür besiyerinde, 62'si LJ besiyerinde üretilmiştir.

Tablo 13: Mikroskopik inceleme ve kültür sonuçları arasındaki uyum

	MGIT Pozitif	MGIT Negatif	LJ Pozitif	LJ Negatif	Toplam
	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)
ARB Pozitif	55(3)	0(0)	55(3)	0(0)	55(3)
ARB Negatif	81(4)	1760(93)	62(3)	1779(94)	1841(97)
Toplam	136(7)	1760(93)	117(6)	1779(94)	1896(100)

ARB:Aside dirençli basil, MGIT:Mycobacterium Growth Indicator Tube, LJ: Löwenstein-Jensen besiyeri, n: sayı

MTBC (117) saptanan örneklerin 57'si AC örneği iken 60'ı AC dışı örnekti. AC örneklerinin 39'unda(% 68), AC dışı örneklerin 16'sında(% 27) ARB görülmüştür (tablo 14). Bu sonuçlar AC örneklerinde ARB görülmesinin AC dışı örneklere göre istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir ($p<0,05$). LJ'de üremeyen 6 örneğin ikisi AC'de dördü AC dışı alınan örneklerdendir.

Tablo 14: Mikroskopik inceleme ve örnek türü arasındaki uyum

	AC	AC dışı	Toplam
	n(%)	n(%)	n(%)
ARB Pozitif(n:55)	39(33)	16(14)	55(47)
ARB Negatif(n:62)	18(15)	44(38)	62(53)
Toplam	57(48)	60(52)	117(100)

ARB:Aside dirençli basil, AC: Akciğer örnekleri, AC dışı: Akciğer dışı örnekler, n: sayı

Ki kare Test ** $p<0,05$

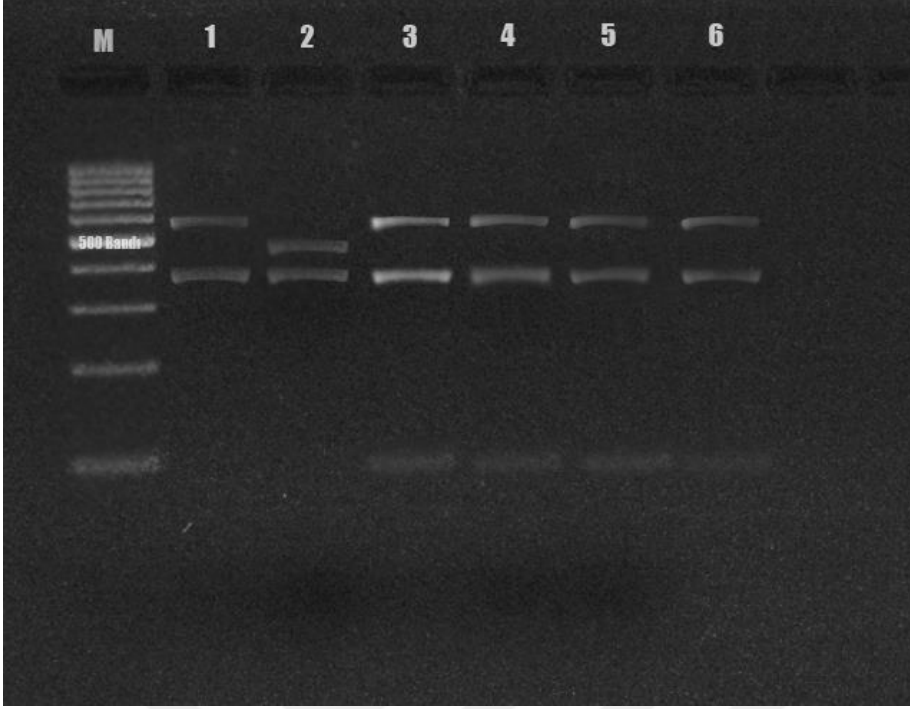
4.3. İDENTİFİKASYON BULGULARI

Kültürde üreyen mikobakterilerin identifikasyonu amacıyla; konvansiyonel testlerden, MGIT PNB, niasin, nitrat redüktaz deneyi ve moleküler bir yöntem olan *hsp65* PCR-RFLP ve *gyrB* PCR-RFLP yöntemleri kullanılmıştır. *hsp65* PCR-RFLP ile 117 suş MTBC, 19 suş NTM olarak saptanmıştır. Tablo 14'te gösterilen bant paternlerine göre *gyrB* PCR-RFLP ile 117 MTBC suşunun 113'ü *M.tuberculosis*, 4'ü ise *M.bovis* olarak saptanmıştır. Saptanan *M.bovis* suşlarının özellikleri tablo 15'te belirtilmiştir.

Tablo 15: Kültürde üretilen *M.bovis* suşlarının özellikleri

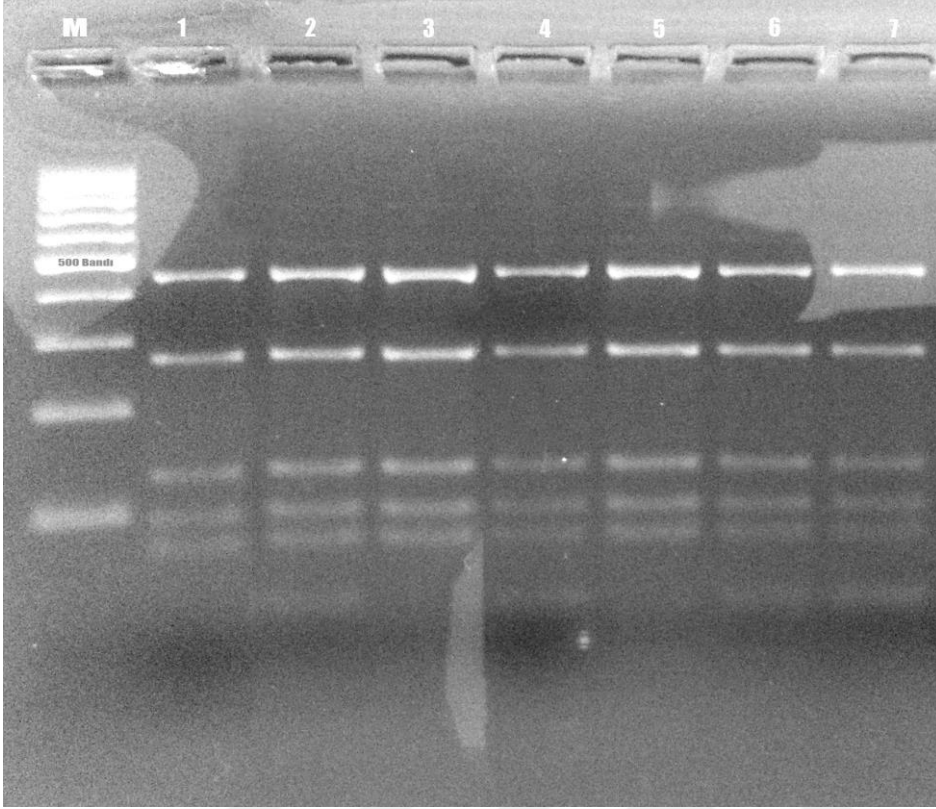
Üretildiği Yıl	Hastanın yaşı	Gönderildiği Birim	Üretilen Örnek	EZN	Rsal Paterni	SacII Paterni
2011	43	Dahiliye	balgam	(-)/(-)	360 - 480 bç	1020 bç (kesim yok)
2011	2	Çocuk hastalıkları	MAS	(-)/(-)	360 - 480 bç	1020 bç (kesim yok)
2012	23	Nefroloji	periton sıvısı	(-)/(-)	360 - 480 bç	1020 bç (kesim yok)
2013	60	Üroloji	idrar	(+)/(+)	360 - 480 bç	1020 bç (kesim yok)

NTM: *M. tuberculosis* kompleks dışı mikobakteriler, MAS: Mide Açık Sıvısı, EZN: Erlich Ziel Nelsen boyama. bç: baz çifti



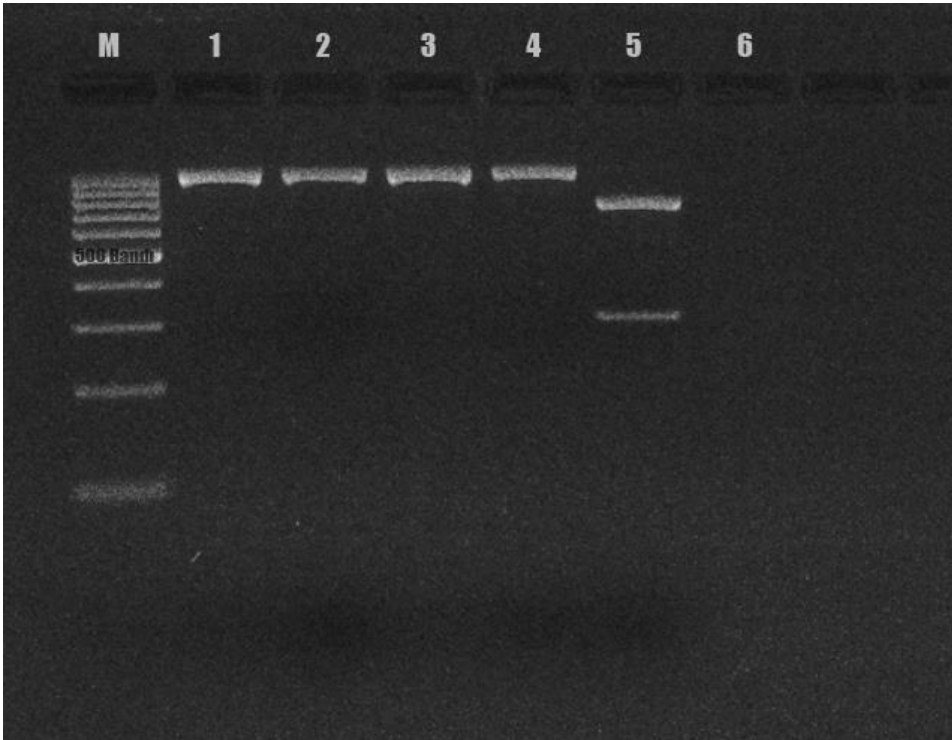
Şekil 3: RsaI restriksiyon enzimiyle kesilen *gyrB* gen bölgesinin 1020 baz çiftlik bölümünün UV ışık altında görülen agaroz jel fotoğrafı

M: 100 bç DNA marker, kolon 1, 3, 4, 5, 6: *M.tuberculosis/ M.africanum* (360-560 bç)
kolon2: *M.bovis/M.caprae* (360-480 bç)



Şekil 4: TaqI restriksiyon enzimiyle kesilen *gyrB* gen bölgesinin 1020 baz çiftlik bölümünün UV ışık altında görülen agaroz jel fotoğrafı

M: 100 bç DNA marker, kolon 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7: *M.tuberculosis*(250-440 bç)



Şekil 5: SqaII restriksiyon enzimiyle kesilen *gyrB* gen bölgesinin 1020 baz çiftlik bölümünün UV ışık altında görülen agaroz jel fotoğrafı

M: 100 bç DNA marker, kolon 1, 2, 3, 4: *M.bovis*(1020 bç), kolon 5: *M.caprae* (280-740 bç)



5. TARTIŞMA

TB, dünyada hala tek bir enfeksiyöz etkene bağlı ölüm sebepleri arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Sebebinin kesin olarak bilinmesine ve tedavisinin mümkün olmasına rağmen günümüzde halen yaygın ve mortalitesi yüksek olan bulaşıcı hastalıklardan biri olmaya devam etmektedir(3).

1980'li yıllara kadar gelişmiş ülkelerde sağlık otoriteleri tarafından uygulanan kontrol önlemlerinin ve korunma stratejilerinin etkisiyle insidansta azalma sağlanmış ancak bu yıllardan sonra HIV epidemisinin ortaya çıkması, çoklu ilaç direnci gösteren basillerin neden olduğu enfeksiyonlar, immunsupresif tedavilerin artışı, seyahatlerin yaygınlaşması, popülasyon yoğunluklarının artışı ile gelişmiş ülkelerde de epidemik bir hastalık haline gelmiştir(4, 5).

VSD'lerde kayıtlı hastaların bilgileri bireysel olarak toplanarak rapor halinde VSDB tarafından yayımlanmaktadır(6). DSÖ'nün 1997 ve sonrasında yayımlanan yıllık raporları da ülkemizdeki TB hakkında önemli bir veri kaynağıdır. DSÖ'ye her yıl belirli bir zamandan önce verilerin yollanması zorunluluğu bu verilerin hazırlanmasında olumlu bir çabaya yol açmış, zorlayıcı olmuştur(3).

DSÖ'nün 2013 yılı verilerine göre 2012 yılında küresel olarak 8,6 milyon yeni olgu bulunmakta iken 0,3 milyon HIV ilişkili olmakla birlikte toplamda 1,3 milyon TB ilişkili ölüm olmaktadır. TB olgularının ve ölümlerinin çoğunluğunu erkekler meydana getirmektedir. Ancak kadınlarda da hastalık yükü yüksektir. Kadınlarda 2,9 milyon olgu ve 410 000 TB nedeniyle ölüm tahmin edilmekteyken, çocuklarda bu sayılar 530 000 olgu ve 74 000 TB nedeniyle ölüm gibidir. Küresel olarak olguların % 55'i Asya bölgesi, % 30'u Afrika bölgesi, % 7'si Doğu Akdeniz Bölgesi, % 4'ü Avrupa Bölgesi ve % 3'ü Amerika Bölgesi'nde görülmüştür. DSÖ'ne göre TB prevalansı ise, 2012 yılında 12 milyon olarak bildirmiştir (169/100 000) (3).

TB enfeksiyonu her yaşıta görülebilir. Ancak görülme sıklığının yaş ve cinsiyet ile ilişkili olduğu düşünölmektedir. Çocuk ve genç erişkinlerde risk daha fazladır (21). Hastaların büyük çoğunluğunu, ekonomik olarak üretken oldukları dönemde bulunan erişkin erkek hastalar oluşturmaktadır (1, 23).

Türkiye'de 2012 yılında yayınlanan 2010 yılında VSD'ye kayıtlı TB hastalarının % 59,5'i (n=9.841) erkek, % 40,5'i (n=6.710) kadındır. Erkek/kadın oranı 1,5'dir. Yüz bin nüfusta olgu hızı erkeklerde yüz binde 26,6 ve kadınlarda yüz binde 18,3'tür(6). Ülkemizde yapılmış olan çalışmalarda erkek hastaların oranı % 66-81 olarak bildirilmiştir (1, 73-76). Ülkemizde olduğu gibi, yurt dışı çalışmalardan elde edilen verilere göre de TB olgularının büyük çoğunluğunu erkek hastalar oluşturmaktadır(3). Çalışmamızda da tüm bu verilerle uyumlu olarak erkek hastalar olguların (% 56) çoğunluğunu oluşturmaktadır. Erkek hastaların daha büyük çoğunlukta olmasına, iki cins arasındaki yapısal farklılığın yanısıra, toplumumuzda erkeklerin çalışma hayatında daha fazla yer almaları ve daha fazla sosyal faaliyetler içinde bulunmalarının katkısı olduğunu düşünmekteyiz.

TB hastalığının genç yaş grubunda fazla olması, salgının ve bulaşmanın sürdüğünü göstermektedir. Yaşlı nüfusta hastalığın fazla olması ise geçmişteki salgının etkisi ile enfekte olmuş insanların yaşlanınca hastalandığını ve bulaşmanın öneminin azaldığını göstermektedir.

Türkiye'de TB hastaların yaş dağılımı incelendiğinde, hastaların büyük çoğunluğunun genç yaşta olduğu görülmektedir. Bunun nedeni nüfusun büyük kısmının genç olmasıdır. Yaş gruplarında hasta sayısının nüfusa oranı yani yaş gruplarına göre hastalığın olgu hızları incelendiğinde iki ayrı zirve görülmektedir: birincisi 15-24 yaş grubudur, İkincisi de ileri yaşlardır(6). Bu durum hem ülkemizde TB salgınının kısmen sürdüğünü hem de ileri yaşlarda artış nedeniyle TB kontrolünde belirli bir başarı sağlandığını göstermektedir. Çalışmamızda ise tek zirve 25-34 yaş aralığındadır. Bunun sebebi hastanemize gelen hasta grubundan kaynaklanabilir. Ülkemizin değişik bölgelerinde olgu hızları çok farklıdır. Bu durum, ülkemizdeki hastalık kontrolünün de farklılıklar gösterdiğine işaret etmektedir.

TB prevalansının yüksek olduğu ülkelerde çocukluk çağı TB vakaları, tüm olguların % 5-20'sinden sorumlu tutulmaktadır (32). Çalışmamızda MTBC suşlarının % 18'i, 0-16 yaş grubu olan pediyatrik yaş grubundan üretilmiştir. Yurt içi ve yurt dışı çalışmalarda bildirildiği gibi TB enfeksiyonu, genç erişkinlerde daha fazla görülmektedir (3, 23, 73). Bizim çalışmamızda tüm olguları değerlendirdiğimizde TB enfeksiyonu, 18-44 yaş arası genç erişkin hastalarda (% 46) daha sık görülmüştür. Çalışmamızda pediyatrik yaş grubunda saptadığımız yüksek oran kaygı vericidir. Bu

nedenle çocukluk çağında bulaşla ilgili önlemlere TB ile savaş stratejilerinde daha ciddi yer verilmelidir.

TB hastalarının erken tanısı, etkili ve düzenli tedavileri ve tedavinin uygun takibi TB kontrol programının temelini oluşturmaktadır. TB'nin kesin tanısında kültür yöntemi altın standart olarak kabul edilmektedir (7). Basillerin identifikasyonunun ve ilaç duyarlılık testlerinin yapılabilmesi için de kültürde üretilmeleri gereklidir(36).

Yurt içi yapılan birçok çalışmada laboratuvara gönderilen örneklerden mikobakteri izolasyon oranları % 4,85-14 arasında değişmektedir (77). İspanya' da yapılmış olan bir çalışmada 1770 örnekten mikobakteri izolasyon oranı % 8,8 olarak bildirilmiştir (78). Bizim çalışmamızda laboratuvara gönderilen örnek sayısında her yıl artış görülmesine rağmen, izolasyon oranlarında artış görülmemiştir. Mikobakteri izolasyon oranlarımız 2011 yılı için % 7,5, 2012 yılı için % 5,4 ve 2013 yılı için % 4,6 bulunmuştur. Bu değerler diğer çalışmalardaki oranlar ile uyumlu bulunmuştur (77).

Akciğer dışı TB olgularında bilinen bir immün yetmezliği olmayan hastalar, tüm olguların % 15-20'sini oluşturmaktadır (79). Ülkemizde yapılan bazı çalışmalarda akciğer dışı TB oranı % 3,2-36,8 olarak belirlenmiştir (73, 74, 76, 80).

TB plörezinin dahil edilmediği çalışmalarda AC dışı TB oranı % 3.2-4.5 arasında iken, plevra ve miliyer TB'un ekstrapulmoner tutulum olarak dahil edildiği çalışmalarda oran % 36.8'e yükselmektedir(81-83). Sağlık Bakanlığı VSDB 2012 yılı raporunda, Türkiye'de 2010 yılında hastaların % 61,1'i (10.117) akciğer tutulumu, % 35,1'i (5.811) akciğer dışı organ tutulumu, % 3,8'i(623) hem akciğer hem de akciğer dışı tutulum göstermiştir(6).

Çalışmamızda ise MTBC üretilen olguların % 48,7'si akciğer dışı TB olgularına aittir. Akciğer dışı TB oranının yüksek olması, hastanemizin branş hastanesi olmayıp eğitim ve araştırma hastanesi olması nedeniyle hasta çeşitliliğinin fazla olması, göğüs hastalıkları kliniğinin sadece poliklinik ve konsültasyon hizmeti vermesi, kendi yataklarının olmaması nedeniyle aktif AC TB olgularının Göğüs hastahastalıkları hastanelerine sevk edilmeleri olabilir. Hastane popülasyonumuzun bulunduğu bölge açısından akciğer dışı TB'nin önemli bir sağlık problemi olduğunu görmektedir.

Akciğer dışı TB'nin tanısında, AC TB'ye göre daha fazla sorunla karşılaşmaktadır. Bu olgular, AC TB'ye göre daha az sayıda basil içermelerinden

dolayı, ARB mikroskopi ve kültür pozitifliği düşük olup, tanıları daha çok klinik bulguların, radyolojik ve histopatolojik yöntemlerle doğrulanması ile yapılmaktadır (84). Turunç ve arkadaşlarının (84), 113 akciğer dışı TB olgusunu inceledikleri çalışmalarında, Ancak 25 (% 22.1) olgunun örneklerinde LJ besiyerinde üreme olmuş ve olguların 89'unda (% 78.7) tanı ancak histopatolojik olarak konabilmiştir. Hastanemizde Sevgi ve ark.'nın (85) 141 akciğer dışı TB olgusunu inceledikleri çalışmada ise ARB görülme oranı % 20 iken, kültür pozitifliği % 76 bulunmuştur.

Aslan G ve ark.'nın (86) idrar örneklerinde mikobakteri izolasyonu ile ilgili yapmış oldukları çalışmada; BACTEC 460 TB, ve LJ besiyerlerini kullanarak 1004 idrar örneğinin 17'sinde mikobakteri üretebilmişlerdir. Bizim çalışmamızda laboratuvarımıza TB şüphesiyle gönderilen 890 AC dışı örnekten 60'ının kültüründe MTBC üretilmiş ve akciğer dışı örneklerden en düşük üretilme oranı % 2 olarak idrar örneklerinde saptanmıştır. Bizim sonucumuza benzer olarak Hindistan'da MGIT yöntemiyle yapılan bir çalışmada da akciğer dışı örneklerin içinde en düşük izolasyon oranı idrar örneklerinden (% 5) saptanmıştır (87). Üriner sistem TB'sinde, aralıklı bakteriüri görülmesinin ve örneklerde bulunan düşük basil sayısının izolasyon oranlarına etkisi olabileceği bilinmektedir (79). Bunun yanı sıra hastaların idrar örneği veriş zamanına dikkat etmedikleri gözlenmiştir. Basil yoğunluğunun en fazla olduğu 'sabah ilk idrarın' örnek olarak verilmesinin, kültürde mikobakteri üretme şansını arttıracakını tavsiye edilmektedir.

Yaymada ARB saptanması, klinik örnekte mikobakteri varlığını gösteren ilk bakteriyolojik kanıttır. Günümüzde halen balgam ve diğer klinik örneklerden yayma ile ARB aranması ve bunun kültür ile doğrulanması TB teşhisinde altın standarttır (8-10).

Tortoli ve ark. (88) çalışmasında, mikobakteri izole edilen 236 örneğin aside dirençli boyama yöntemiyle incelenmesinde suşların % 54'ünde, Balabanova ve ark. (89) çalışmasında (809 MTBC) %45'inde , Sorlozano ve ark (78) çalışmasında (156 mikobakteri) % 40'ında, Pfyffer, ve ark. (69) çalışmasında (180 mikobakteri) % 38'inde, Baylan ve ark. (77) çalışmasında (104 mikobakteri) % 35'inde ve Somoskovi ve ark. (90) çalışmasında (117 mikobakteri) % 19'unda, bizim çalışmamızda ise (136 mikobakteri) suşların % 40'ında, mikroskopik inceleme ile aside dirençli basil görülmüş iken sadece MTBC suşlarında bu oran % 47'ye çıkmaktadır. AC'den üretilen MTBC suşlarında ise bu oran % 68, AC dışı örneklerde % 27'dir. Bu sonuçlar AC

örneklerinde ARB görülmesinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir($p<0,05$). Örnekte bulunan az sayıdaki basilin örnek içerisinde homojen dağılmaması da mikobakteri izolasyon ve mikroskopisinin oranlarındaki değişkenliğin sebeplerinden biri olabilir.

Mikroskopik inceleme yönteminin duyarlılık düzeyini etkileyen birçok faktör vardır. İncelenen örneğin tipi, örnekteki basil yükü, örneğin işleme aşamaları, kullanılan boyama yöntemleri, çalışılan hasta popülasyonu ve en önemlisi değerlendiren kişinin tecrübesi, duyarlılığı etkileyen faktörler arasındadır(18). Çalışmalardaki sonuçların farklılığının bu sayılan etkenlere bağlı olabileceğini düşünüyoruz.

Mikobakterilerin bakteriyolojik tanısında “altın standart” olarak değerlendirilen kültür yöntemi 3-6 hafta gibi uzun bir süre gerektirmektedir. Tüberkülozun tüm dünyada ve özellikle immun yetmezlikli hastalar arasındaki insidansının artışı, daha hızlı ve etkili kültür sistemlerinin geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. Bu sistemlerden BACTEC 460 TB kültür sisteminde mikobakteri izolasyon süresinin 10-14 güne inmesi, duyarlılığının yüksek olması, MTBC/NTM ayırımının yapılabilmesi, duyarlılık testlerinin çalışılabilmesi nedeniyle tüm dünyada geçerli olan bir sistemdir ve yeni geliştirilen kültür yöntemlerinin karşılaştırılmasında standart olarak kullanılmaktadır (91). Ancak kültür şişelerinin manuel okutulması, çapraz kontaminasyon riski, ve en önemlisi radyoaktif atıkların birikimi gibi dezavantajları kullanımını kısıtlamaktadır (18). Geliştirilen kültüre dayalı sistemler arasında bulunan MGIT kültür sistemi; kolay, radyoaktif madde içermeyen, pahalı cihazlar gerektirmeyen bir tekniktir. Birçok çalışmada diğer kültür yöntemleri ile karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır (69). Bu çalışmalarda kültür sistemleri tek başına kullanıldıklarında mikobakteri izolasyon oranları BACTEC 460 TB (BD) için % 85-88, MB Bact Alert 3D (bioMerieux) için % 79,5, MB Redox (Biotest AG) için % 72, MGIT (BD) için % 76-86,5, LJ için % 69-79,5 olarak saptanmıştır. Mikobakteri izolasyon oranını arttırmak için sıvı- katı kültür sisteminin birlikte kullanılması önerilmektedir. Yukarıda bahsedilen çalışmalarda bu öneri doğrultusunda sıvı kültür sistemleri LJ besiyeri ile birlikte kullanıldığında izolasyon oranları BACTEC 460 TB için % 93-95, MB Bact Alert 3D için % 91,7, MB Redox için %88, MGIT için % 87-95,5 olarak saptanmıştır (69, 78, 88, 90).

Çalışmamızda; modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içeren MGIT besiyeri ile LJ besiyerini birlikte kullandık. Üretilen 136 mikobakteri suşunun tamamı MGIT

besiyerinde ürerken, 117'si (%86) LJ besiyerinde üremiştir. Sonuçlarımız, sıvı besiyerlerinin (MGIT), katı besiyerlerine (LJ) göre mikobakterileri üretme yönünden daha iyi olduğunu ve aralarındaki üretme farkının istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir ($p<0,05$). Katı besiyerleri koloni morfolojilerinin gözlemlenmesine olanak sağladığı gibi, nadirde olsa sıvı besiyerinde üremezken katı besiyerinden izole edilmiş suşlara da rastlanabilmektedir (80, 89). Çalışmamızda MTBC (117) saptanan örneklerin; 111'i LJ besiyerinde üretilirken, 6'sı LJ besiyerinde ürememiştir. Üremeyen altı örneğin ikisi AC örneğinin dördü AC dışı örneği olup yalnızca MGIT sıvı besiyerinde üretilmiştir. NTM saptanan 19 örneğin; 6'sı LJ besiyerinde üretilirken, 13'ü LJ besiyerinde ürememiştir. LJ'de üremenin olması MTBC lehine, üremenin olmaması ise NTM açısından istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

Mikobakterilerin tanımlanmasında kullanılan biyokimyasal deneyler, klinik laboratuvarlarda önemini hala korumaktadır. Ancak metodolojisinin yoğun emek gerektirmesi, 3-6 hafta gibi sürelerde sonuçlanması, düşük tekrarlanabilirlik göstermesi, aynı türe ait suşların farklı fenotipik özelliği göstermesi (fenotipik değişkenlik) veya farklı türlerin aynı fenotipik özelliği göstermesi (fenotipik homojenite) nedeniyle rutin klinik laboratuvarlar, daha kolay, hızlı ve güvenilirliği yüksek olan moleküler biyolojik tanımlama yöntemlerine yönelmiştir (11). Ayrıca TB dünyada süratle yayılması, dirençli suşların yüzdesinin giderek artması hızlı laboratuvar yöntemlerinin kullanımını daha da zaruri hale getirmiştir. Yeni olguların en kısa sürede tespit edilmesi; hastaların uygun tedavilerine erkenden başlanarak bulaştırıcılık sürelerinin kısaltılması için oldukça önemlidir (92).

CDC (Center for Disease Control and Prevention), TB laboratuvarlarının hızlı tanıyı sağlayabilmesi için bir düzenleme yaparak, ARB yayma sonuçlarının örneğin teslim alınmasından itibaren 24 saat, *M.tuberculosis*'in üretilmesi ve tanımlanması için 14-21 gün, duyarlılık testleri için ise 15-30 gün içinde raporlanmasını önermektedir (93).

Mikobakterilerin yeni türlerinin tanımlanmasında kullanılan yöntemlerden biri HPLC ile mikolik asit analizidir. Bu yöntem birçok referans merkezde kullanılmaktadır. Başlangıç için gerekli ekipman maliyetlerinin oldukça fazla olması ve büyük tecrübe gerektirmesi dezavantajıdır (66).

Mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan hızlı moleküler yöntemlerden biri *hsp65* PCR-RFLP yöntemidir. Bu yöntem ilk olarak 1992 yılında Plikaytis ve ark.'nın (64) çalışmasında kullanılmış, bundan kısa bir süre sonra Telenti ve ark. (14) tarafından modifiye edilerek 33 PCR-RFLP paterni tanımlanmıştır. Bu çalışmada MAC kompleksinin, *M. avium-M. intracellulare* ayrımı yapılabilmüş ve *M. fortuitum* kompleks, subtiplerine ayrılabilmiştir. Ancak *M. gordonae* için birden fazla patern gösterilmiştir. Bunu izleyen dönemlerde yapılan çalışmalarda aynı primer çifti kullanılmış ve yeni modifikasyonlar yapılarak tür saptama algoritmalarına yeni türler eklenmiştir (56, 65, 91).

Hsp65 PCR-RFLP yönteminde; tüm mikobakteri türlerinde bulunan *hsp65* geninin bir bölümü iki spesifik primer kullanılarak çoğaltılıp, oluşan ürün, restriksiyon endonükleaz enzimi olan BstEII ve HaeIII enzimleri ile spesifik bölgelerinden kesilerek, türlerin kendilerine özgü bantlar oluşturması sağlanmaktadır. Agaroz jel elektroforezi uygulanarak oluşan bantların moleküler ağırlık standartı ile karşılaştırılarak ağırlıkları belirlenip, standart algoritmadaki hangi tür ile uyduğuna bakılarak tanı konulmaktadır (37, 40).

PCR-RFLP yönteminin biyokimyasal testler ile uyumunun araştırıldığı bir çalışmada, *M. tuberculosis* için % 100, yavaş üreyen mikobakteriler için % 83,3, hızlı üreyen mikobakteriler için %98,8 uyum saptanmıştır (94).Yapılan benzer bir çalışmada patojenik hızlı üreyen mikobakterilerin tanımında *hsp65* PCR-RFLP yönteminin % 100 uyumla tanımlama yapabildiği bildirilmiştir (95).

Chimara ve ark. (96), mikobakterilerin tür tanısında *hsp65* PCR-RFLP yöntemini, biyokimyasal deneyler ile karşılaştırarak 434 suşun 321' ini her iki yöntemle uyumlu olarak tanımlamıştır. Uyumsuz bulunan 113 suş, *hsp65* gen sekans analizi ile doğrulama çalışmasına alınmıştır. 113 suşun 71'inde *hsp65* PCR-RFLP sonuçları sekans analizi ile uyumlu bulunmuştur. 30 suş daha önce tanımlanmayan 13 yeni PCR-RFLP paterni göstermiştir. 12 suş PCR-RFLP yöntemi ile sekans analizine göre yanlış tanımlama yapmıştır. Benzer bir çalışma Martin ve ark. (97) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada da 50 izolatin 43'ünde biyokimyasal deneyler ve *hsp65* PCR-RFLP yöntemi uyumlu sonuç vermiştir. Uyumsuz 7 izolat, 16S rRNA geni sekans analizi ve Genotype Mycobacteria (Hain Diagnostika) ile doğrulama çalışmasına alınmıştır. 7 izolatin ancak 2'sinde PCR-RFLP ve doğrulama yöntemi aynı sonucu vermiştir.

PCR-RFLP yöntemi sekans analizi yöntemine göre spesifik cihaz gerektirmeyen, daha ucuz fakat ayırıcılığı daha düşük olan bir yöntemdir (13).

Prob hibridizasyon testleri ise sınırlı sayıda tür tanımı yapılabildiği ve her seferinde tek tür denenerek tanım yapılabildiği için oldukça pahalı bir yöntemdir. Bu nedenle birçok araştırmacı, hızlı, ucuz ve doğru tanımlama oranı oldukça yüksek olan PCR-RFLP yöntemini rutin kullanımda önermektedir (14, 56, 65, 73, 96, 97).

Hsp65 PCR-RFLP yönteminin önemli bir dezavantajı, agaroz jel elektroforezi ile değerlendirme yapılırken, yakın büyüklükteki bantların ayrımının oldukça zor olması ve 60 baz çiftinden (bç) daha küçük olan bantların mikobakterilerin ayrımında kullanılamamasıdır (98).

PCR-RFLP yönteminde *hsp65* gen bölgesinin kullanımında dikkat edilmesi gereken bir durum, primerlerin (Tb11, Tb12) mikobakteriler dışındaki *Nocardia* ve ilişkili olduğu genusun *hsp65* genini de çoğaltmasıdır (56, 65).

Mikobakterilerin tür düzeyinde identifikasyonu için kullanılan yöntemlerin maliyet analizinin yapıldığı bir çalışmada, PCR-RFLP yöntemi gerek kurulum aşamasındaki cihazlar, gerekse hasta başına düşen test maliyeti açısından GLC, HPLC, AccuProbe yöntemlerine göre oldukça hesaplı bir yöntem olarak bulunmuştur. Bu yöntemler, test başına düşen zaman açısından incelendiğinde ise yine en avantajlı yöntem PCR-RFLP yöntemi olarak belirtilmiştir (99).

Mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanmaları, epidemiyolojik verilerin toplanması ve uygun tedavinin düzenlenmesi için de oldukça önemlidir (73).

Klinik mikobakteriyoloji laboratuvarlarında üretilen mikobakterilerin büyük çoğunluğunu MTBC oluşturmaktadır. NTM'lerin patojenik rolleri 1950'li yıllardan önce bilinmiyorken, bu tarihlerden sonra tüm dünyada, insanlarda oluşan enfeksiyonların sıklığında artış görülmüştür. Bu artış, gerek klinik mikobakteriyolojik tekniklerin gelişmesinden gerekse AIDS ve immünyetmezlikli hastaların, ve bu hastalardaki patojenitenin farkındalığının artmasından kaynaklanmaktadır. NTM'ler tüm mikobakteriyel enfeksiyonların % 0,5-30'undan sorumlu tutulmaktadır. Hastalıklardaki sıklıkları, coğrafik değişikliklerden etkilenmektedir (73). Birçok NTM türü fırsatçı patojen oldukları için, değerlendirmede American Thoracic Society tarafından önerilen kriterler göz önünde bulundurulmaktadır. Bu kriterlere ek olarak

NTM'nin doğru tanımlanması, nadir olarak üretilen patojenlerin patojen olmayanlardan ayırımını sağlayacaktır. Bu sebeple identifikasyon test sonuçlarının zamanında ve doğru olarak raporlanması, hastaların tedavilerinin etkili olması, ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin doğru olarak alınabilmesi için gereklidir (18).

Yurt dışında yapılan çalışmalarda MTBC-NTM dağılımı; İspanya'da (78) yapılan bir çalışmada % 87 - % 13, Rusya'da (89) yapılan bir çalışmada % 97- % 3, Hindistan'daki (87) bir çalışmada % 70 - % 30, Kore'deki (100) bir çalışmada % 76- % 24 olarak değişmektedir. Tayland'da (94) yapılan bir çalışmada ise farklı olarak % 25 -% 75 olarak bildirilmiştir.

Ağaçayak ve arkadaşlarının (101) çalışmasında, mikobakteri izolatlarının *hsp65* PCR-RFLP yöntemiyle incelenmesi sonucunda, en sık saptadıkları etken MTBC (% 86) iken bunu, *M. scrofulaceum* (% 8), *M. avium* (% 4) ve *M. intracellulare* (% 2) izlemektedir. Bu çalışmada NTM izolasyon oranı bizim çalışmamızdaki ile aynıdır.

Köksalan ve ark.'nın (102) 1208 mikobakteri izolatını *hsp65* PCR-RFLP yöntemiyle tanımladıkları çalışmalarında ise suşların %93'ünü MTBC, %7'sini NTM'ler oluşturmaktadır. 86 NTM izolatı arasında 13 tür tanımlanmış olup bunlardan *M.gordonae* (% 1.3) en sık izole edilen türdür. Bunu *M.fortuitum* (% 1), *M.intracellulare* (% 0,9), *M.lentiflavum* (% 0,7) izlemektedir. Bu çalışmadaki NTM izolasyon oranı bizim çalışmamızdaki oranadan daha düşük bulunmuştur.

Çalışmamızdaki NTM izolasyon oranının bölgeye göre değişmekle birlikte çoğu yurtdışını çalışmasından düşük olması, bizim için MTBC enfeksiyonlarının daha ön planda olduğunu göstermektedir. Ülkemizde yapılan çalışmalara göre ise NTM izolasyon oranlarımız (% 14) ortalamaya yakındır. Laboratuvarımızda 2007 – 2010 yılları arasında çalışmadaki NTM oranı (% 2) ile karşılaştırıldığında NTM izolasyon oranımız yıllar içinde oldukça artmıştır (72). NTM'lerin büyük çoğunluğunun antimikobakteriyel ilaçlara karşı dirençli olmaları ve tedavilerinin oldukça uzun zaman alması göz önüne alınırsa, uygulanan tedavinin etkinliği ve ülkemizin epidemiyolojik verilerine katkısı olacağı için tür düzeyinde identifikasyonlarının yapılması yerinde olacaktır.

MTBC üyeleri, HPLC mikolik asit analizi, 16S rRNA dizi analizi ve *hsp65* PCR-RFLP yöntemleriyle birbirinden ayırlanamamaktadır (14). Bu nedenle birçok laboratuvar sonuçlarını kompleks düzeyinde vermektedir.

gyrB PCR, MTBC *gyrB* geninin bir kısmının amplifikasyonu sağladığı için MTBC izolatların tanımlanması için kullanılabilir. *RsaI*, *TaqI*, *SacII* enzimleri sırasıyla 675/756, 1450 ve 1410/1311 pozisyonlarındaki bölgeleri hedefler. Primer olarak, MTUB-f ve MTUB-r *gyrB* geninin 1020 baz çiftlik parçasının amplifikasyonu için kullanılır (72).

Niemann ve arkadaşları (15) , *gyrB* gen bölgesinin 1020 baz çiftlik bölümünün, dizi analizi ve RFLP yöntemleriyle, *gyrB* DNA dizi polimorfizmlerinin MTBC türlerini ayırım gücünü değerlendirmişlerdir. Dizi polimorfizmlerini daha önceden tarif edilen dört bölgede ve ek olarak bir bölgede daha saptamışlardır. PCR-RFLP yöntemi ile 3 enzim kullanarak, MTBC türlerini aynı şekilde ayırt edebilmişlerdir. Sonuç olarak DNA dizi polimorfizmi nedeniyle *gyrB* geninin, dizi analizi veya PCR-RFLP yöntemi ile MTBC türlerinin ayırımını sağlayan tek marker olduğunu belirtmişlerdir.

Zanden ve arkadaşlarının (103) çalışmasında, 314 MTBC suşunun % 96,5'i *M.tuberculosis* ve % 2,8'i *M.bovis* olarak tanımlanırken, Parsons ve arkadaşları (104) 605 MTBC suşu ile yaptıkları çalışmada bu oranları sırasıyla % 96 ve % 3 olarak bildirmektedirler. Çalışmamızdaki 117 MTBC suşunun % 96.6 *M.tuberculosis* ve % 3,4 *M.bovis* oranlarıyla bu çalışmalar birbirine yakın bulunmuştur.

Djelouadji ve arkadaşlarının (105) Fransa'dan 110 MTBC klinik izolatının *pncA*, *oxyR*, *hsp65*, *gyrB* gen bölgelerinin sekans analizi ile tanımladıkları çalışmada 98 *M.tuberculosis*, 5 *M.bovis* BCG, 5 *M.canettii* ve 2 *M.africanum* bulmuşlardır. Aynı çalışmada yer alan verilerine göre Afrika'nın farklı bölgelerinde *M.tuberculosis* % 32-95, *M.africanum* % 4-57, *M.bovis* % 0,21-20, *M.canettii* %3,52 oranlarında görülmektedir. Dünya genelinde daha nadir türlere bakıldığında ise *M.caprae* Kuzey Asya, Avustralya ve Avrupa'da insan ve hayvan enfeksiyonlarına, *M.microti* Avrupa'da insan ve hayvan, Kanada'da ise sadece hayvan enfeksiyonlarına, *M.canettii* Doğu ve Güney Afrika'da insan enfeksiyonlarına, *M.pinnipedii* Arjantin ve Avustralya'da hayvan enfeksiyonlarına neden olmaktadır.

Kahla ve arkadaşlarının (106) Fransa'da *glpK*, *pykA* and *gyrB* gen bölgelerini pyro-sekanslama tekniği ile konvensiyonel yöntemleri karşılaştırdığı çalışmada insan ve

farklı hayvanlardan elde edilen 22 *M.tuberculosis*, 21 *M.bovis*, 3 *M.caprae*, 3 *M.microti*, 2 *M.bovis BCG*, 2 *M.pinnipedii*, 1 *M.canettii* and 1 *M.africanum tip I* suşu aynı şekilde isimlendirmiştir. Ek olarak klinikten elde edilmiş olan 127 MTBC suşu *M.tuberculosis* olarak tanımlanmıştır. Sonuç olarak pyro-sekanslama tekniğinin MTBC suşlarının tür düzeyinde tanımlama yapmak için spesifik, hızlı ve kolay rutin uygulamaya sokulabileceğine kanısına varmışlardır.

Ueyama ve arkadaşlarının (107) Japonya’da multipleks PCR ile yaptıkları çalışmada 970 örneğin 966’sı (% 99.6) *M.tuberculosis*, ikisi *M.africanum* ve ikisi *M.canettii* bulunmuştur. Abass ve arkadaşlarının (108) Sudan’da gyrB PCR-RFLP tekniği ile yapılan çalışmada 79 örnekten ikisi NTM olarak tanımlanmış, diğer örnekler *M.tuberculosis* olarak belirlenmiştir.

Gómez ve arkadaşlarının (109) İspanya’da yaptıkları GenoType® MTBC(Hain Diagnostika, Nehren, Germany) sistemi ile referans metot olarak kullanılan multipleks PCR karşılaştırmasında 103 MTBC suşunun GenoType® MTBC sistemi ile 77’si *M.tuberculosis/M.africanum II/M. canettii*, 12’si *M.bovis BCG*, 6 *M.bovis subs. bovis*, 4’ü *M.africanum tip I*, 3’ü *M.bovis subs. caprae* ve 1’i *M.microti* olarak tanımlanırken, referans metot ile 77 *M.tuberculosis*, 6 *M.bovis subs. bovis*, 12 *BCG*, 3 *M.africanum tip I*, 3 *M.bovis subs. caprae*, 1 *M.canettii* and 1 *M.microti* olarak tanımlama yapılmıştır. Karşılaştırmaya göre DNA hibridizasyon teknolojisi kullanılan bu ticari nitrosellüloz striplerinin % 99,03 doğrulukla tanımlama yaptıkları görülmüştür. Bir *M.canettii* türünü sistem *M.africanum tip I* olarak tanımlamıştır.

Ağaçayak ve arkadaşlarının (101) yaptığı çalışmada, PCR-RFLP yöntemi ile MTBC suşlarının büyük oranının *M.tuberculosis* (% 77) olduğu, bunu *M.bovis* (% 18), *M.microti* (% 2) ve *M.africanum*(% 2)’un izlediği belirlenmiştir. Bu çalışmada bizim çalışmamıza göre oldukça fazla *M.bovis suşu* ve MTBC üyesi iki farklı tür bulunmuştur.

Çoğu çalışmada olduğu gibi bizim çalışmamızda da *M.tuberculosis* suşu (% 96.6) yüksek oranda bulunmuştur. Bunu *M.bovis* (% 3.4) suşu takip etmiştir.

Laboratuvarımızda 2007 – 2010 yılları arasında yapılan çalışma verileri ile karşılaştırıldığında *M.tuberculosis* (% 94) ve *M.bovis* (% 4) oranları benzer bulunmuştur (72). Farklı olarak bizim çalışmamızda *M.caprae* saptanmamıştır.

M.tuberculosis, TB etkeni olarak önemi büyüktür. Son yıllardaki tüm gelişmelere karşın tüberküloz, dünya genelinde ve ülkemizde önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmekte olup; hastanın hızlı tanı alması, etkenin tanımlanması, etkenin

duyarlılığının belirlenmesi ile birlikte tedavinin başlaması hem hastanın kendisi hem de bakım verenler ve çevresinde yaşayanlar açısından önemlidir. Bu algoritma ne kadar hızlı tamamlanırsa insandan insana geçen bu etkenin yayılımının önüne geçilmiş olur. TB oluşturduğu farklı klinik tablolar ile de bir çok hastalığın ayırıcı tanısına girmesi açısından da önem teşkil eder.

Çalışmamızda tiplendirdiğimiz suşlardan diğeri de *M.bovis*'ti. Bununla ilgili Aydın ve arkadaşlarının (110) Mersin ilindeki beş köyden toplanan 145 sığır çiğ süt örneği inceledikleri çalışmada mikobakteri varlığı EZN boyama yöntemi, LJ besiyerinde kültür ve hsp65 PCR-RFLP ile araştırılmıştır. Toplam 145 çiğ süt örneğinden hazırlanan yaymaların EZN boyama sonucunda sadece 1 (% 0.7) örnekte ARB görülmüş, 12 (% 7.6) örneğin LJ besiyerinde kültürü pozitif olarak belirlenmiş ve 6 (% 4.1) örnekte PCR ile mikobakteri DNA'sı tespit edilmiştir. Kültürde izole edilen toplam 12 izolattan biri MTBC, 11'i (% 6.9) de NTM olarak tanımlanmıştır. MTBC izolatu spoligotiplendirme yöntemiyle *M.bovis* olarak tanımlanmıştır.

Gelişmiş ülkelerde eradikasyon çalışmaları bovin tipi TB'nin prevalansını önemli ölçüde azaltmıştır, fakat yabani hayvanlardaki rezervuarların tam eradikasyonu güçtür. Sütün pastörizasyonu ve zorunlu kontrol programlarının uygulanması ile Amerika'daki sığırlarda *M.bovis* enfeksiyonlarının insidansı %0,001'den daha aza düşmüştür(111).

Ülkemizde sığır TB kontrol programı; tüberkülin testi, laboratuvar testleri, enfekte hayvanların kesimi ve karantina işlemlerini içerir (112). Aktif sığır TB kontrol programı olmayan gelişmekte olan ülkelerde sığır TB insan sağlığı için tehdit oluşturmaktadır. Bu ülkelerde *M.bovis*'in etken olduğu enfeksiyonlar TB vakalarının ortalama % 10'unu oluşturmaktadır. Yapmış olduğumuz bu çalışmada *M.bovis* MTBC'in % 3,4'üdür. Dört *M.bovis* örneğinin biri AC, üçü AC dışı örnektir. AC dışı örnekler MAS, idrar ve periton sıvısı örnekleridir. Bu kişilerde hastalığın nedeni kontamine süt ve süt ürünleri, enfekte hayvanlarla direk temas nedeniyle olabilir. Dikkat edilmesi gereken diğer hususlar ise; mesene kanseri nedeniyle intravesiküler BCG kullanımı sonrası ve çocuklarda BCG aşısı nedeniyle TB görülebilir olmasıdır. Ama kullandığımız yöntem olan gyrB PCR-RFLP, *M.bovis* ile *M.bovis* BCG'yi ayırt edemez. (72).

Hastanemizde *M.bovis*'in sebep olduğu TB olguları her ne kadar seyrek gibi görünse de bu sonuçlar bütünü göstermemektedir. Yapılan çalışmalarda *M.bovis*'in

sıklığını göstermeye yönelik bir araştırma henüz mevcut değildir. Ancak, TB patojenlerinin tür düzeyinde ayırımını yapan laboratuvar yöntemlerinin kullanımının yaygınlaşması ile büyük popülasyonları içine alan bölgesel çalışmalar, şüphesiz ki gerçek olgu sayısının ortaya çıkmasına ışık tutacaktır.

Doğrudan temas yoluyla veya pastörize edilmemiş süt ürünlerinin tüketilmesiyle bulaşan bu etkenin önüne geçilmesi için mikrobiyoloji laboratuvarlarının ve veterinerlik birimlerinin ortak çalışması gerekmektedir. Sığırlar arasında en sık solunum yoluyla geçtiği gösterilen sığır TB'nin önüne geçmek için daha uygun barınakların yapılması ve bu yerlerin iyi havalanıp hayvanların iyi besleniyor olması gereklidir (113).

Sonuç olarak ulusal TB kontrol programının ana hedefi ülkemizin bir gerçeği olan TB hastalığının insidansını ve bu hastalık nedeniyle oluşan ölümlerin sayısını azaltmaktır. Bu programın en önemli elemanlarından biri mikobakteriyoloji laboratuvarıdır. Mikobakterilerin en kısa sürede izolasyonu, tanımlanması ve antimikobakteriyel ilaçlara karşı duyarlılığı test edilip raporlanmalı ve kayıtları sıkı bir şekilde tutulmalıdır (77).

MTBC'yi oluşturan, kliniği ve yayılımı daha iyi bilinen *M.tuberculosis*'in dışındaki türlerin tanımlanması bu etkenlerin klinik önemlerini ve yayılım şekillerini daha iyi anlamamızı sağlayacaktır. MTBC suşlarının tanımlanması ve bölgesel verilerinin oluşturularak ulusal referans laboratuvarları ile paylaşılması buna katkı sağlayacaktır. Hayvanlardan insanlara bulaşan bir zoonoz olan *M.bovis*'in evcil hayvan sürülerinde infeksiyonun taranması ve hasta hayvanların imhasının insanlarda infeksiyonun kontrol altına alınması açısından faydalı olacağı açıktır.

Gelişen teknoloji ile biyokimyasal deneylere göre daha hızlı ve daha doğru tanımlama sağlayabilen, maliyeti diğer yöntemlere oranla oldukça düşük olan *gyrB* PCR-RFLP yönteminin mikobakteriyoloji laboratuvarlarında kullanılması fayda sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Uçar E, Kılıç A, Ceyhan İ, Yılmaz S, Kılıç S, Tarhan G, et al. Ülkemizin yedi farklı bölgesinden 2003-2006 yılları arasında izole edilen Mycobacterium tuberculosis suşlarının majör antitüberküloz ilaçlara direnç oranları. Mikrobiyoloji Bülteni. 2010;44(1):11.
2. Van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. Journal of internal medicine. 2001;249(1):1-26.
3. Organization WH. Global tuberculosis report 2013. World Health Organization, 2013 9241564652.
4. Babacan F ÖU. Mikobakterilerin genel özellikleri ve Mycobacterium tuberculosis complex. Willke Topçu A SG, Doğanay M, editor: nobel tıp; 2002. 1675-90 p.
5. Woods GL. Molecular techniques in mycobacterial detection. Archives of pathology & laboratory medicine. 2001;125(1):122-6.
6. Musaonbaşıoğlu S YA, Mutlu S M, Baykal F. Türkiye’de Verem Savaşı 2012 Raporu. Ankara: 2012. .
7. Cheng VC-C, Yew WW, Yuen KY. Molecular diagnostics in tuberculosis. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2005;24(11):711-20.
8. Su W-J. Recent advances in the molecular diagnosis of tuberculosis. Journal of microbiology, immunology, and infection= Wei mian yu gan ran za zhi. 2002;35(4):209-14.
9. Babacan Funda HU. Mycobacterium tuberculosis kompleks. In: Willke Topçu A SG, Doğanay M, editor. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 2. İstanbul: Nobel Tıp; 2008. p. 2283-302.
10. de Waard JH RJ. Conventional diagnostic methods. In: Palamino JC IS, Rittacco V, , editor. Tuberculosis 2007: From basic science to patient care2007. p. 283-314.
11. Springer B, Stockman L, Teschner K, Roberts GD, Böttger E. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. Journal of Clinical Microbiology. 1996;34(2):296-303.
12. Soini H, Musser JM. Molecular diagnosis of mycobacteria. Clinical Chemistry. 2001;47(5):809-14.
13. Pourahmad F, Thompson KD, Adams A, Richards RH. Comparative evaluation of Polymerase Chain Reaction-Restriction Enzyme Analysis (PRA) and sequencing of heat shock protein 65 (hsp65) gene for identification of aquatic mycobacteria. Journal of microbiological methods. 2009 Feb;76(2):128-35. PubMed PMID: 18950664. Epub 2008/10/28. eng.
14. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger E, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. Journal of Clinical Microbiology. 1993;31(2):175-8.
15. Niemann S, Harmsen D, Rüsç-Gerdes S, Richter E. Differentiation of clinical Mycobacterium tuberculosis complex isolates by gyrB DNA sequence polymorphism analysis. Journal of clinical microbiology. 2000;38(9):3231-4.
16. Daniel TM, Bates JH, Downes KA. History of tuberculosis. Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control ASM Press, Washington, DC. 1994:13-24.

17. Huard RC, Fabre M, de Haas P, Lazzarini LC, van Soolingen D, Cousins D, et al. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of bacteriology*. 2006 Jun;188(12):4271-87. PubMed PMID: 16740934. Pubmed Central PMCID: PMC1482959. Epub 2006/06/03. eng.
18. Pfyffer GE, Murray P, Baron E, Jorgensen J, Landry M, Pfaller M. *Mycobacterium*: general characteristics, laboratory detection, and staining procedures. *Manual of clinical microbiology: Volume 1*. 2006 (Ed. 9):543-72.
19. Kayalı R, Çöplü N, Ceyhan İ, Saygan M, Esen B. Çok ilaca dirençli (ÇİD) *mycobacterium tuberculosis* suşlarının minör ilaçlara direncinin saptanması. 5. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu İzmir. 2004;226.
20. Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. *Tuberculosis 2007; from basic science to patient care*. 2007.
21. Kıyan M. *Mycobacteriaceae*. Ustaçelebi Ş Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1999;1:419-55.
22. Barış Yİ. ÇAĞLAR BOYU TÜBERKÜLOZ.
23. Coşkun F, Özyardımcı N. Tüberküloz epidemiyolojisi Akciğer arşivi. 2003;4:61-5.
24. Köksal F, Yaman A. Farklı bir bakteri topluluğu mikobakterilerde hücre duvarı yapısı. 21:34-47.
25. Cantwell MF, Snider DE, Cauthen GM, Onorato IM. Epidemiology of tuberculosis in the United States, 1985 through 1992. *Jama*. 1994;272(7):535-9.
26. Fätkenheuer G, Taelman H, Lepage P, Schwenk A, Wenzel R. The return of tuberculosis. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 1999;34(2):139-46.
27. ÖZTÜRK R. TÜBERKÜLOZDA DOĞAL DİRENÇ VE RİSK FAKTÖRLERİ.
28. Davies P. Tuberculosis and migration. *Journal of the Royal College of Physicians of London*. 1995;29(2):113-8.
29. Özkara Ş, Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H. Türkiye’de tüberkülozun kontrolü için başvuru kitabı. TC Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı, Ankara. 2003:21-2.
30. Durmaz R. Ülkemizdeki izolatların Moleküler Epidemiyolojisi 2005.
31. Iademarco MF, Castro KG, editors. *Epidemiology of tuberculosis. Seminars in respiratory infections*; 2003.
32. Winn WC, Koneman EW. *Mycobacteria. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology: Lippincott Williams & Wilkins*; 2006.
33. Pfyffer GE PF. *Mycobacterium: General characteristics, laboratory detection, and staining procedures*. In: Versalovic J CK, Jorgensen JH, Funke G, Landry ML, Warnock DW, editor. *Manual of Clinical Microbiology 10th ed*. Washington: ASM Press; 2011. p. 472-502.
34. Runyon EH. Anonymous *mycobacteria* in pulmonary disease. *The Medical clinics of North America*. 1959;43(1):273.
35. Shin J, Lee E, Lee H, Ryu S, Kim H, Chang C, et al. Prevalence of non-tuberculous *mycobacteria* in a hospital environment. *Journal of Hospital Infection*. 2007;65(2):143-8.
36. Somoskovi A, Gutierrez CM, Salfinger M. Laboratory diagnosis of tuberculosis: novel and nonconventional methods. *Reviews in Medical Microbiology*. 2008;19(2):19-38.
37. Nuran E. Mikobakterilerin tanısında, tanımlanmasında ve ilaç direncinin belirlenmesinde kullanılan moleküler yöntemler. *İnfeksiyon Dergisi*. 2003; 17:507-11.

38. Kocagöz T. Mycobacterium türlerinin genel özellikleri, Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, editör. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi.3:2277-310.
39. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. American journal of respiratory and critical care medicine. 2007;175(4):367-416.
40. Alp A. Non-Moleküler Tekniklerin Tanı Amaçlı Kullanımları.2005.
41. Schwander SK, Torres M, Sada E, Carranza C, Ramos E, Tary-Lehmann M, et al. Enhanced responses to Mycobacterium tuberculosis antigens by human alveolar lymphocytes during active pulmonary tuberculosis. Journal of Infectious Diseases. 1998;178(5):1434-45.
42. Andersen P, Munk M, Pollock J, Doherty T. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. The Lancet. 2000;356(9235):1099-104.
43. Maes R. Clinical usefulness of serological measurements obtained by antigen 60 in mycobacterial infections: development of a new concept. Klinische Wochenschrift. 1991;69(15):696-709.
44. Noss EH, Pai RK, Sellati TJ, Radolf JD, Belisle J, Golenbock DT, et al. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of Mycobacterium tuberculosis. The Journal of immunology. 2001;167(2):910-8.
45. Glatman-Freedman A, Martin JM, Riska PF, Bloom BR, Casadevall A. Monoclonal antibodies to surface antigens of Mycobacterium tuberculosis and their use in a modified enzyme-linked immunosorbent spot assay for detection of mycobacteria. Journal of clinical microbiology. 1996;34(11):2795-802.
46. Kırkıl G, Özel E, Turgut T, Deveci F, Muz MH. Akciğer Tüberkülozlu Olgularda Mevcut Risk Faktörlerinin Değerlendirilmesi. Türkiye Klinikleri Akciğer Arşivi. 2006;7(1):30-3.
47. Öztürk R. Tüberküloz Epidemiyolojisi2005.
48. Haas D. Mycobacterial diseases. Mandell, Douglas, Bennett's principles and practice of infectious diseases. 2000;4:2576-607.
49. Aranaz A, Liébana E, Gómez-Mampaso E, Galán JC, Cousins D, Ortega A, et al. Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the Mycobacterium tuberculosis complex isolated from goats in Spain. International journal of systematic bacteriology. 1999;49(3):1263-73.
50. Kubica T, Rüsç-Gerdes S, Niemann S. Mycobacterium bovis subsp. caprae caused one-third of human M. bovis-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. Journal of Clinical Microbiology. 2003;41(7):3070-7.
51. Prodinger WM, Brandstätter A, Naumann L, Pacciarini M, Kubica T, Boschirolu ML, et al. Characterization of Mycobacterium caprae isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. Journal of clinical microbiology. 2005;43(10):4984-92.
52. Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, et al. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the Mycobacterium tuberculosis complex: Mycobacterium pinnipedii sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2003;53(5):1305-14.
53. Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, van Helden PD, Warren RM, et al. Novel Mycobacterium tuberculosis complex pathogen, M. mungi. Emerging infectious diseases. 2010;16(8):1296.

54. Heifets LB. Clinical mycobacteriology. Drug susceptibility testing. Clinics in laboratory medicine. 1996;16(3):641-56.
55. Bilgehan H. Klinik mikrobiyoloji: Özel bakteriyoloji ve bakteri enfeksiyonları,(uygulama konuları ile): Fakülteler Kitapevi, Barış yayınları; 1995.
56. Devallois A, Goh KS, Rastogi N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. Journal of Clinical Microbiology. 1997;35(11):2969-73.
57. Tsukamura M. Relationship between photochromogenicity and test temperature in mycobacteria. Journal of clinical microbiology. 1981;14(2):225-6.
58. Morgan M, Doerr K, Hempel H, Goodman N, Roberts G. Evaluation of the p-nitro-alpha-acetylamino-beta-hydroxypropiofenone differential test for identification of Mycobacterium tuberculosis complex. Journal of clinical microbiology. 1985;21(4):634-5.
59. Wallace R, Silcox V, Tsukamura M, Brown B, Kilburn J, Butler W, et al. Clinical significance, biochemical features, and susceptibility patterns of sporadic isolates of the Mycobacterium chelonae-like organism. Journal of clinical microbiology. 1993;31(12):3231-9.
60. Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. Clinical microbiology reviews. 2003;16(2):319-54.
61. Durmaz R. Tüberkülozun Epidemiyolojik Araştırmalarında Laboratuvarın Yeri 11-12 Haziran Samsun2003.
62. Hoşoğlu S. Moleküler Epidemiyolojide Temel Yöntemler2004.
63. Singh SP, Salamon H, Lahti CJ, Farid-Moyer M, Small PM. Use of pulsed-field gel electrophoresis for molecular epidemiologic and population genetic studies of Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol. 1999 Jun;37(6):1927-31. PubMed PMID: 10325348. Pubmed Central PMCID: PMC84986. Epub 1999/05/15. eng.
64. Plikaytis BB, Plikaytis BD, Yakrus MA, Butler WR, Woodley CL, Silcox VA, et al. Differentiation of slowly growing Mycobacterium species, including Mycobacterium tuberculosis, by gene amplification and restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol. 1992 Jul;30(7):1815-22. PubMed PMID: 1352786. Pubmed Central PMCID: PMC265387. Epub 1992/07/01. eng.
65. Taylor TB, Patterson C, Hale Y, Safranek WW. Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. J Clin Microbiol. 1997 Jan;35(1):79-85. PubMed PMID: 8968884. Pubmed Central PMCID: PMC229515. Epub 1997/01/01. eng.
66. Vincent V, Gutiérrez M. Mycobacterium: laboratory characteristics of slowly growing mycobacteria. Manual of clinical microbiology. 2007;9:573-88.
67. Van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. J Intern Med. 2001 Jan;249(1):1-26. PubMed PMID: 11168781. Epub 2001/02/13. eng.
68. Abed Y, Davin-Regli A, Bollet C, De Micco P. Efficient discrimination of Mycobacterium tuberculosis strains by 16S-23S spacer region-based random amplified polymorphic DNA analysis. J Clin Microbiol. 1995 May;33(5):1418-20. PubMed PMID: 7542275. Pubmed Central PMCID: PMC228183. Epub 1995/05/01. eng.
69. Pfyffer GE, Welscher HM, Kissling P, Cieslak C, Casal MJ, Gutierrez J, et al. Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. J Clin Microbiol. 1997 Feb;35(2):364-8.

PubMed PMID: 9003597. Pubmed Central PMCID: PMC229581. Epub 1997/02/01. eng.

70. Giampaglia CM, Martins MC, Chimara E, Oliveira RS, de Oliveira Vieira GB, Marsico AG, et al. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* from other mycobacteria with rho-nitrobenzoic acid using MGIT960. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. 2007 Jul;11(7):803-7. PubMed PMID: 17609058. Epub 2007/07/05. eng.

71. Giampaglia CM, Martins MC, Inumaru VT, Butuem IV, Telles MA. Evaluation of a rapid differentiation test for the *Mycobacterium tuberculosis* complex by selective inhibition with rho-nitrobenzoic acid and thiophene-2-carboxylic acid hydrazide. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. 2005 Feb;9(2):206-9. PubMed PMID: 15732742. Epub 2005/03/01. eng.

72. Bayraktar B, Bulut E, Baris AB, Toksoy B, Dalgic N, Celikkan C, et al. Species distribution of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical isolates from 2007 to 2010 in Turkey: a prospective study. *J Clin Microbiol*. 2011 Nov;49(11):3837-41. PubMed PMID: 21940474. Pubmed Central PMCID: PMC3209075. Epub 2011/09/24. eng.

73. Ergin A, Kocagoz T, Us D. Evaluation of 120 mycobacterial strains isolated from clinical specimens to the species level by polymerase chain reaction-restriction enzyme analysis. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 2000;32(6):657-62. PubMed PMID: 11200377. Epub 2001/02/24. eng.

74. Aydın O, Beğendik Cömert F, Külah C, Aktaş E, Sümbüloğlu V. Zonguldak ilinde izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılığının BACTEC MGIT 960 sistemi ile belirlenmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*. 2008;38(2):61-70.

75. Ataş E, Dursun AB, Ceyhan İ, Güler ZM, Gümüşlü F, Sertkaya D. Akciğer Tüberkülozunun Erken Tanısında Lowenstein-Jensen (LJ) Besiyeri ile *Mycobacteria* Growth Indicator Tube (MGIT) Yöntemlerinin Karşılaştırılması. *Toraks Dergisi*. 2003;4(2):138-42.

76. ASLAN G, DELİALİOĞLU N, YILDIZ Ç, DİREKEL Ş, EMEKDAŞ G. MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS SUŞLARININ PRİMER ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA KARŞI DUYARLILIĞININ BELİRLENMESİNDE BACTEC 460 VE AGAR PROPORSİYON YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI.

77. BAYLAN O, KISA BÖ, ALBAY A, DOĞANCI L. MİKOBAKTERİYOLOJİ LABORATUARIMIZDA 2002 YILINDA TÜBERKÜLOZ OLGULARINDAN İZOLE EDİLEN *Mycobacterium tuberculosis* KOMPLEKS (MTC) SUŞLARI VE ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇ DUYARLILIK SONUÇLARI. *KLİMİK Dergisi*. 2007;20(1):20-2.

78. Sorlozano A, Soria I, Roman J, Huertas P, Soto MJ, Piedrola G, et al. Comparative evaluation of three culture methods for the isolation of mycobacteria from clinical samples. *Journal of microbiology and biotechnology*. 2009 Oct;19(10):1259-64. PubMed PMID: 19884789. Epub 2009/11/04. eng.

79. Aygen B MG. Akciğer dışı tüberküloz. In: Wilke Topçu A SG, Doğanay M, editor. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 1: Nobel Tıp; 2008. p. 850-9.

80. Özkütük A, Çoban H, Esen N. *Mycobacterium tuberculosis*' in izolasyonunda Lowenstein-Jensen besiyeri ile Bactec 460TB sisteminin karfl› lafl› r› lmas›(*). 1993.

81. Demiralay R. Isparta İli Verem Savaş Dispanserleri'nde Kayıtlı Akciğer Dışı Organ Tüberkülozunun Bazı Epidemiyolojik Özellikleri. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi* 2003;51(1):33-9.
82. Tavusbay N, Aksel N, Çakan A, Gülerçe G, Dereli Ş, Özsöz A. Ekstrapulmoner tüberkülozlu olgularımız. *Solunum Hastalıkları*. 2000;11:294-8.
83. Kalaç N, Başay N, Mutluay N, Bayız H, Özkul M. Ekstrapulmoner tutulum gösteren tüberküloz olguları. *Tüberküloz ve Toraks*. 1999;47(2):213-5.
84. Turunc T, Habesoglu MA, Demiroglu YZ, Karatasli M, Sen N, Ermis H, et al. [Comparative evaluation of 113 cases with severe and mild forms of extrapulmonary tuberculosis]. *Mikrobiyol Bul*. 2008 Jul;42(3):399-406. PubMed PMID: 18822882. Epub 2008/10/01. Ciddi ve hafif seyirli 113 akciğer dışı tüberküloz olgusunun karsilastirmali olarak degerlendirilmesi. tur.
85. Sevgi DY, Derin O, Alpay AS, Gunduz A, Konuklar AS, Bayraktar B, et al. Extrapulmonary tuberculosis: 7 year-experience of a tertiary center in Istanbul. *European journal of internal medicine*. 2013 Dec;24(8):864-7. PubMed PMID: 24028930. Epub 2013/09/14. eng.
86. ASLAN G, DORUK E, EMEKDAŞ G, SERİN MS, DİREKEL Ş, BAYRAM G, et al. KONVANSİYONEL VE MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE İDRAR ÖRNEKLERİNDEN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS İZOLASYONU VE TANIMLANMASI.
87. Rodrigues C, Shenai S, Sadani M, Sukhadia N, Jani M, Ajbani K, et al. Evaluation of the bactec MGIT 960 TB system for recovery and identification of Mycobacterium tuberculosis complex in a high through put tertiary care centre. *Indian journal of medical microbiology*. 2009;27(3).
88. Tortoli E, Cichero P, Piersimoni C, Simonetti MT, Gesu G, Nista D. Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: multicenter study. *Journal of clinical microbiology*. 1999;37(11):3578-82.
89. Balabanova Y, Drobniewski F, Nikolayevskyy V, Kruuner A, Malomanova N, Simak T, et al. An integrated approach to rapid diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance using liquid culture and molecular methods in Russia. *PloS one*. 2009;4(9):e7129. PubMed PMID: 19774085. Pubmed Central PMCID: PMC2744930. Epub 2009/09/24. eng.
90. Somoskovi A, Magyar P. Comparison of the mycobacteria growth indicator tube with MB redox, Lowenstein-Jensen, and Middlebrook 7H11 media for recovery of mycobacteria in clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 1999 May;37(5):1366-9. PubMed PMID: 10203488. Pubmed Central PMCID: PMC84777. Epub 1999/04/16. eng.
91. Brunello F, Favari F, Fontana R. Comparison of the MB/BacT and BACTEC 460 TB systems for recovery of mycobacteria from various clinical specimens. *Journal of clinical microbiology*. 1999;37(4):1206-9.
92. Köksalan OK. Tüberkülozda Moleküler Epidemiyolojik Tiplendirme Yöntemleri. *ANKEM Dergisi*. 2007;21(Ek 2):86-8.
93. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, Geiter LJ, Horsburgh CR, Jr., Good RC. The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J Clin Microbiol*. 1993 Apr;31(4):767-70. PubMed PMID: 8463384. Pubmed Central PMCID: PMC263557. Epub 1993/04/01. eng.
94. Cheunoy W, Prammananan T, Chairasert A, Foongladda S. Comparative evaluation of polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis: two amplified targets, hsp65 and rpoB, for identification of cultured mycobacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2005 Mar;51(3):165-71. PubMed PMID: 15766601. Epub 2005/03/16. eng.

95. Wang SX, Tay L, Sng LH. Rapid Identification of pathogenic rapidly growing mycobacteria by PCR-restriction endonuclease analysis. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*. 2005 Jan;34(1):137-40. PubMed PMID: 15726234. Epub 2005/02/24. eng.
96. Chimara E, Ferrazoli L, Ueky SY, Martins MC, Durham AM, Arbeit RD, et al. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-hsp65 in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-hsp65 patterns. *BMC microbiology*. 2008;8:48. PubMed PMID: 18366704. Pubmed Central PMCID: PMC2323382. Epub 2008/03/28. eng.
97. Martin A, Uwizeye C, Fissette K, De Rijk P, Palomino JC, Leao S, et al. Application of the hsp65 PRA method for the rapid identification of mycobacteria isolated from clinical samples in Belgium. *Journal of microbiological methods*. 2007 Oct;71(1):39-43. PubMed PMID: 17719666. Epub 2007/08/28. eng.
98. Chang PL, Hsieh WS, Chiang CL, Tuohy MJ, Hall GS, Procop GW, et al. The hsp65 gene patterns of less common Mycobacterium and Nocardia spp. by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis with capillary electrophoresis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007 Jul;58(3):315-23. PubMed PMID: 17382507. Epub 2007/03/27. eng.
99. Wong DA, Yip PC, Tse DL, Tung VW, Cheung DT, Kam KM. Routine use of a simple low-cost genotypic assay for the identification of mycobacteria in a high throughput laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003 Oct;47(2):421-6. PubMed PMID: 14522516. Epub 2003/10/03. eng.
100. Park CM, Heo SR, Park KU, Song J, Lee JH, Lee CT, et al. [Isolation of nontuberculous mycobacteria using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism.]. *The Korean journal of laboratory medicine*. 2006 Jun;26(3):161-7. PubMed PMID: 18156719. Epub 2007/12/25. kor.
101. Agacayak A, Bulut Y, Seyrek A. [Detection of Mycobacterium species distribution in the sputum samples of tuberculosis patients by PCR-RFLP method in Elazig province]. *Mikrobiyol Bul*. 2007 Apr;41(2):203-9. PubMed PMID: 17682706. Epub 2007/08/09. Elazig yoresinde tuberkulozlu hastalarin balgam orneklerinde mikobakteri tur dagiliminin PCR-RFLP yontemi ile belirlenmesi. tur.
102. Koksalan OK, Aydin MD, Eraslan S, Bekiroglu N. Reliability of cord formation in BACTEC 12B/13A media for presumptive identification of Mycobacterium tuberculosis complex in laboratories with a high prevalence of Mycobacterium tuberculosis. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2002 Apr;21(4):314-7. PubMed PMID: 12072946. Epub 2002/06/20. eng.
103. van der Zanden AG, Kremer K, Schouls LM, Caimi K, Cataldi A, Hulleman A, et al. Improvement of differentiation and interpretability of spoligotyping for Mycobacterium tuberculosis complex isolates by introduction of new spacer oligonucleotides. *J Clin Microbiol*. 2002 Dec;40(12):4628-39. PubMed PMID: 12454164. Pubmed Central PMCID: PMC154657. Epub 2002/11/28. eng.
104. Parsons LM, Brosch R, Cole ST, Somoskovi A, Loder A, Bretzel G, et al. Rapid and simple approach for identification of Mycobacterium tuberculosis complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. *J Clin Microbiol*. 2002 Jul;40(7):2339-45. PubMed PMID: 12089245. Pubmed Central PMCID: PMC120548. Epub 2002/06/29. eng.
105. Djelouadji Z, Raoult D, Daffe M, Drancourt M. A single-step sequencing method for the identification of Mycobacterium tuberculosis complex species. *PLoS*

- neglected tropical diseases. 2008;2(6):e253. PubMed PMID: 18618024. Pubmed Central PMCID: PMC2453075. Epub 2008/07/12. eng.
106. Kahla IB, Henry M, Boukadida J, Drancourt M. Pyrosequencing assay for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex species. *BMC research notes*. 2011;4:423. PubMed PMID: 22011383. Pubmed Central PMCID: PMC3214197. Epub 2011/10/21. eng.
107. Ueyama M, Chikamatsu K, Aono A, Murase Y, Kuse N, Morimoto K, et al. Sub-speciation of *Mycobacterium tuberculosis* complex from tuberculosis patients in Japan. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*. 2014 Jan;94(1):15-9. PubMed PMID: 24183617. Epub 2013/11/05. eng.
108. Abass NA, Suleiman KM, El Jalii IM. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by their GyrB polymorphism. *Indian J Med Microbiol*. 2010 Jan-Mar;28(1):26-9. PubMed PMID: 20061759. Epub 2010/01/12. eng.
109. Gomez MP, Herrera-Leon L, Jimenez MS, Rodriguez JG. Comparison of GenoType MTBC with RFLP-PCR and multiplex PCR to identify *Mycobacterium tuberculosis* complex species. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2007 Jan;26(1):63-6. PubMed PMID: 17146674. Epub 2006/12/06. eng.
110. Aydin FE, Ulger M, Emekdas G, Aslan G, Gunal S. [Isolation and identification of *Mycobacterium bovis* and non-tuberculous mycobacteria in raw milk samples in Mersin province]. *Mikrobiyol Bul*. 2012 Apr;46(2):283-9. PubMed PMID: 22639317. Epub 2012/05/29. Mersin Ilinde Cig Sutlerden *Mycobacterium bovis* ve Tuberkuloz Disi Mikobakterilerin Izolasyonu ve Tanimlanmasi. tur.
111. Health WOfA. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 2004.
112. OIE. *World animal health report; 2004 country report on Turkey*. 2004.
113. Ozmen O, Kursun O, Ozcelik M. Bovine tuberculosis in Burdur, southern Turkey: epidemiological, pathological and economic study. *The international journal of tuberculosis and lung disease* : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease. 2005 Dec;9(12):1398-402. PubMed PMID: 16466064. Epub 2006/02/10. eng.