

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**THIN LAYER 7H11 AGARIN MİKROBİYELERİN
İZOLASYON VE İDENTİFİKASYONUNDAKİ DEĞERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

FERİHA BAŞOĞLU

**DANIŞMAN
PROF. DR. MELTEM UZUN**

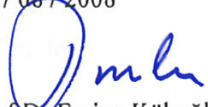
**MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI
MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2008

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

18 / 08 / 2008


Prof. Dr. Emine Kökoğlu
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Mikrobiyoloji
Programın seviyesi : Yüksek Lisans Doktora
Anabilim Dalı : Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD
Tez Sahibi : Feriha Başoğlu
Tez Başlığı : Thin Layer ~~7441~~ Agarın Mikobakterilerin İzolasyon ve
İdentifikasyonundaki Değerinin Araştırılması
Sınav Yeri : Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD.
Sınav Tarihi : 18 / 08 / 2008

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

| | | |
|-------------------------------------|--|---|
| 1. Prof. Dr. Bülent Gürler | İstanbul Tıp Fak. Mikrobiyoloji AD. |  |
| 2. Prof. Dr. Emel Bozkaya | İstanbul Tıp Fak. Mikrobiyoloji AD. |  |
| 3. Prof. Dr. Mine Küçükler | İstanbul Tıp Fak. Mikrobiyoloji AD. |  |
| 4. Prof. Dr. Meltem Uzun (Danışman) | İstanbul Tıp Fak. Mikrobiyoloji AD. |  |
| 5. Prof. Dr. Ayşegül Yağcı | Marmara Üniv. Tıp Fak. Mikrobiyoloji AD. |  |

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 çalışmasıyla 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.

Feriha BAŞOĞLU



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Bülent Gürler'e ilgi ve yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tez konumun belirlenmesi ve yürütülmesi de dahil olmak üzere yüksek lisans eğitimim süresince, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, öğrencisi olduğum için kendimi şanslı hissettiğim değerli hocam Sayın Prof. Dr. Meltem Uzun'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Rahmiye Berkiten, Sayın Prof. Dr. Ergene Büğet, Sayın Prof. Dr. Selim Badur, Sayın Prof. Dr. Emel Bozkaya, Sayın Prof. Dr. Şengül Derbentli, Sayın Prof. Dr. Mine Anğ Küçükler, Sayın Prof. Dr. Nezahat Gürler, Sayın Prof. Dr. Yıldız Yeğenoğlu, Sayın Prof. Dr. O. Şadi Yenen, Sayın Prof. Dr. Gülden Yılmaz, Sayın Prof. Dr. Ali Ağaçfidan, Sayın Prof. Dr. Çiğdem Kayacan, Sayın Prof. Dr. Betigül Öngen, Sayın Prof. Dr. Salih Türkoğlu, Sayın Prof. Dr. M. Derya Aydın, Sayın Prof. Dr. Ali Öner, Sayın Prof. Dr. Zayre Erturan, Sayın Doç. Dr. Özden Büyükbaba Boral'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca laboratuvar bilgi ve deneyimlerini her zaman paylaşan Dr. Dilek Şatana ve Araş. Gör. Gonca Erköse Genç'e çok teşekkür ederim.

İstatistiksel hesaplamaların yapılmasında büyük yardımı olan Sayın Prof. Dr. Ahmet Dirican'a çok teşekkür ederim.

Değerli arkadaşlarım MSc. Seyda İğnak, MSc. Özlem Güven, MSc. Defne Gümüş, MSc. Deniz Sertel, MSc Fatma Bıyık, MSc. Mehmet İlkaç'a ve ayrıca birlikte çalıştığım tüm arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Yetişmemde büyük özveri gösteren, sevgi ve desteklerini her zaman hissettiğim sevgili annem, babam ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1458

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|------|
| TEZ ONAYI | İİ |
| BEYAN | İİİ |
| İTHAF | İV |
| TEŞEKKÜR..... | V |
| İÇİNDEKİLER | VI |
| TABLolar LİSTESİ | Vİİİ |
| ŞEKİLLER LİSTESİ..... | İX |
| SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ | X |
| ÖZET | Xİ |
| ABSTRACT..... | Xİİ |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 3 |
| 2.1. Tarihçe | 3 |
| 2.2. Sınıflandırma | 4 |
| 2.3. Morfoloji ve boyanma özellikleri | 5 |
| 2.4. Hücre Duvarı | 6 |
| 2.5. Üreme ve Biyokimyasal Özellikleri | 9 |
| 2.6. Klinik öneme sahip mikobakteri türleri | 11 |
| 2.6.1. <i>M. tuberculosis</i> kompleksi..... | 11 |
| 2.6.2. Nontüberküloz mikobakteriler..... | 12 |
| 2.7. Patogenez | 12 |
| 2.8. Epidemiyoloji | 13 |
| 2.9. Mikrobiyolojik Tanı..... | 16 |
| 2.9.1. Örneklerin alınması ve laboratuvara gönderilmesi | 16 |
| 2.9.1.1. Balgam..... | 17 |
| 2.9.1.2. Bronşiyal aspirat, bronkoalveolar lavaj sıvısı ve akciğer biyopsi örneği | 17 |
| 2.9.1.3. Gastrik lavaj sıvısı | 17 |
| 2.9.1.4. İdrar | 18 |
| 2.9.1.5. Vücut sıvıları..... | 18 |
| 2.9.1.6. Doku örnekleri (lenf nodu, deri ve diğer biyopsi örnekleri)..... | 18 |

| | |
|--|----|
| 2.9.1.7. Dışkı | 18 |
| 2.9.1.8. Abse içeriği, abse aspiratı ve yara örnekleri | 18 |
| 2.9.1.9. Kan | 19 |
| 2.9.1.10. Tanı için uygun olmayan örnekler | 19 |
| 2.9.2. Mikroskopik inceleme..... | 19 |
| 2.9.2.1. Homojenizasyon, dekontaminasyon ve yoğunlaştırma yöntemi..... | 20 |
| 2.9.3. Kültür | 23 |
| 2.9.3.1. Konvansiyonel besiyerleri | 24 |
| 2.9.3.2. Bifazik Besiyerleri..... | 25 |
| 2.9.3.3. Sıvı Besiyerleri..... | 26 |
| 2.9.3.4. Otomatize ve yarı otomatize kültür sistemleri | 27 |
| 2.9.4. Moleküler tanı yöntemleri | 30 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM..... | 32 |
| 3.1. Mikroskopi ve kültür işlemleri | 32 |
| 3.1.1. Mikroskopi ve Kültür öncesi işlemler..... | 32 |
| 3.1.2. Erlich-Zeehl Nelsen (EZN) Yöntemi | 34 |
| 3.1.3. Kültür | 35 |
| 3.1.3.1. Löwenstein-Jensen besiyeri | 35 |
| 3.1.3.2. Bactec MGIT 960 besiyeri..... | 36 |
| 3.1.3.3. Thin layer 7H11 agar (TLA) besiyeri..... | 37 |
| 3.1.4. İdentifikasyon | 38 |
| 3.1.4.1. BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, Sparks, MD) | 38 |
| 3.1.4.2. GenoType MTBC (Hain Lifescience GmbH, Almanya)..... | 39 |
| 3.2. İstatistiksel analiz..... | 43 |
| 4. BULGULAR..... | 44 |
| 5. TARTIŞMA | 54 |
| KAYNAKLAR | 65 |
| ETİK KURUL KARARI..... | 75 |
| ÖZGEÇMİŞ | 77 |

TABLolar LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Tablo 2-1 <i>M. tuberculosis</i> kompleksi'nin biyokimyasal özellikleri | 10 |
| Tablo 2-2: Karbol fuksin ve fluorokrom yöntemiyle boyanmış preparatların değerlendirilmesi ve sonuçların bildirilmesi | 23 |
| Tablo 3-1: NALC-NaOH solüsyonunun hazırlanması. | 33 |
| Tablo 3-2: Karbol fuksin yöntemiyle boyanmış preparatların değerlendirilmesi ve sonuçların bildirilmesi | 35 |
| Tablo 3-3: PZR master miksi | 40 |
| Tablo 3-4: PZR programı. | 40 |
| Tablo 3-5: Çalışma sonunda çıkabilecek paternler | 43 |
| Tablo 4-1: Örnek türüne göre mikobakterilerin izolasyon oranları. | 44 |
| Tablo 4-2: Mikobakterilerin izole edildiği örnek türleri, örnek türüne göre preparat pozitifliği ve izole edildikleri besiyerlerine göre dağılımları. | 45 |
| Tablo 4-3: Preparat sonucuna göre besiyerlerinde görülen üreme oranları. | 46 |
| Tablo 4-4: Besiyerlerinde ortalama üreme zamanı. | 47 |
| Tablo 4-5: LJ, BACTEC MGIT 960 ve TLA besiyerlerinde izolasyon ve kontaminasyon oranları. | 48 |
| Tablo 4-6: İzole edilen 32 mikobakteri suşunun identifikasyon sonuçları. | 48 |

ŞEKİLLER LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Şekil 2-1 Hücre duvar yapısı | 7 |
| Şekil 4-1: TLA besiyerinde en erken 3 günde görülen mikrokoloni morfolojisi. | 52 |
| Şekil 4-2: TLA besiyerinde 8. günde mikrokoloni morfolojisi. | 53 |
| Şekil 4-3: TLA besiyerinde 15. günde mikrokoloni morfolojisi | 53 |

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ATCC: American Type Culture Collection

CDC: Center of Disease Control and Prevention

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

LJ: Löwenstein-jensen besiyeri

MAC: Mycobacterium avium kompleksi

MDRTB: Çok ilaca dirençli tüberküloz

MTBC: Mycobacterium tuberculosis kompleksi

OADC: Oleik asit-albümin-dekstroz-katalaz

PANTA: Polimiksin-amfoterisin B-nalidiksik asit-trimetoprim-azlosilin

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

TLA: Thin layer agar

XDRTB: Yaygın ilaç dirençli tüberküloz

ÖZET

Başoğlu F.(2008) Thin Layer 7H11 agarın mikobakterilerin izolasyon ve identifikasyonundaki değerinin araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2008.

Çalışmamızda, TLA besiyerinin mikobakterilerin izolasyonu ve ön identifikasyonundaki performansı, LJ ve BACTEC MGIT 960 sisteminden alınan sonuçlarla karşılaştırılarak belirlenmiş ve bu besiyerinin rutin kullanımdaki yeri araştırılmıştır.

İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'na tüberküloz tanısı amacıyla gönderilen toplam 700 klinik örnek çalışmaya dahil edilmiş ve örneklerin BACTEC MGIT 960, TLA ve LJ besiyerlerinde kültürü yapılmıştır. Kırk altı klinik örnekte Mycobacterium cinsi bakteriler üremiş ve bu bakterilerin %97,8'i BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, Sparks, MD) sistemiyle, %82,6'sı TLA besiyeriyle ve %56,5'i LJ besiyeriyle izole edilmiştir. Preparat inceleme sonucu pozitif örneklerde BACTEC MGIT 960, TLA ve LJ besiyerleriyle izolasyon süresinin sırasıyla 8,94, 7,70, 22,25 gün; preparat inceleme sonucu negatif örneklerde ise sırasıyla 15,85, 14,28 ve 27,85 gün olduğu saptanmıştır. TLA besiyeri ve BACTEC MGIT 960 sistemi izolasyon süresi açısından karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmezken ($p>0,05$); LJ besiyerindeki izolasyon süresinin bu iki besiyerinden anlamlı derecede uzun olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Çalışmamızda TLA besiyerinin izolasyon oranı ve süresi açısından BACTEC MGIT 960 sistemi ile benzer, konvansiyonel LJ besiyerinden ise üstün olduğu sonucuna varılmıştır. TLA besiyerinde üreyen 38 mikobakteri suşunun kenarları düzensiz koloni oluşturduğu ve yüzeylerinin kord formunda olduğu belirlenmiş ve bu suşlar M tuberculosis kompleksi olarak tanımlanmıştır. Ancak GenoType MTBC ile yapılan identifikasyonda bir suş nontüberküloz mikobakteri olarak tanımlanmıştır. Çalışmada tek bir TLA besiyerinden nontüberküloz mikobakteri izole edildiği için MTBC ve nontüberküloz mikobakteri kolonileri arasındaki fark gözlenememiş; ancak tüm MTBC suşlarının kenarları düzensiz koloni oluşturduğu ve üzerlerinin kord şeklinde görüldüğü belirlenmiştir. Çalışma sonunda GenoType MTBC (Hain Lifescience GmbH, Almanya) ile 27 suş M. tuberculosis, 2 suş nontüberküloz mikobakteri, 2 suş M. bovis ve 1 suş M. bovis BCG olarak tanımlanmıştır.

Anahtar Kelimeler : Thin Layer 7H11 agar, Mikobakteri, Mikrokoloni, Kord faktörü
Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:1458.

ABSTRACT

Başıoğlu, F. (2008). Evaluation of Thin Layer 7H11 agar in the isolation and identification of mycobacteria. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Microbiology and Clinical Microbiology. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2008

In our study, the performance of TLA medium for isolation and presumptive identification of Mycobacteria was determined by comparing the results obtained from LJ and BACTEC MGIT 960 system and the routine utilisation of this medium was investigated. Seven hundred clinical samples sent to İstanbul Medical Faculty Department of Microbiology and Clinical Microbiology, Mycobacteriology Laboratory for the diagnosis of tuberculosis were included in the study and the samples were cultured on BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, Sparks, MD), TLA and LJ media. Mycobacterium spp. was cultivated in forty six clinical samples and 97.8 % of these bacteria were isolated by BACTEC MGIT 960 system, 82.6 % by TLA medium and 56.5 % by LJ medium. The isolation time with BACTEC MGIT 960, TLA and LJ medium was found to be 8.94, 7.70, 22.25 days respectively for smear positive samples and 15.85, 14.28 and 27.85 days for smear negative samples. While no statistically significant difference was found between the isolation time of TLA medium and that of BACTEC MGIT 960 system ($p>0.05$), the isolation time of LJ medium was detected to be longer than that of those two media ($p<0.05$). In our study the isolation rate and the isolation time of TLA medium was found similar to those of BACTEC MGIT 960 and superior to those of conventional LJ medium. The colony morphologies of 38 Mycobacterium isolates in TLA medium was detected to be irregular-edged colonies and cord formation and these isolates were identified as M.tuberculosis complex. However, one isolate was identified as non-tuberculosis Mycobacterium by Genotype MTBC (Hain Lifescience GmbH, Almanya) identification. The difference between the colony morphology of MTBC and non-tuberculosis mycobacteria couldn't be observed because only one non-tuberculosis mycobacterium was isolated in TLA medium. However, it was found that all MTBC isolates formed irregular-edged colonies and cord formation. As a result of the study, 27 isolates were identified as M. tuberculosis, 2 isolates were as non-tuberculosis mycobacteria, 2 isolates were as M. bovis and 1 isolate was as M. bovis BCG with Genotype MTBC kit.

Key Words: Thin Layer 7H11 agar, Mycobacteria, Microcolony, Cord factor

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University.

Project No.1458

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tüberküloz, tarihin en eski hastalıklarından biri olmasına, etkeninin kesin olarak bilinmesine ve tedavisinin mümkün olmasına rağmen gelişmekte olan ülkelerde hala yaşamı tehdit edici bir hastalık olmaya devam etmektedir (18, 32).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) verilerinde 1980-2005 yılları arasında 90 milyon tüberküloz hastası bildirilmiştir. Ayrıca her yıl 8.8 milyon yeni olgu bildirilmekte ve 1.7 milyon kişi bu hastalık sebebiyle ölmektedir. Hastalık etkeni bakterinin günümüzde ilaçlara direnç kazanması tüberkülozun çok daha ciddi ve çözülmesi çok daha zor bir sorun olarak karşımıza çıkmasına neden olmaktadır. DSÖ'nün tahminlerine göre etkin kontrol önlemleri geliştirilmezse 2020 yılına gelindiğinde yeni infekte olmuş kişilerin sayısı 1 milyarı bulacaktır (91).

Tüberkülozun kontrolünde hızlı tanı ve tedavi uygulamaları, bulaşma riskini önemli ölçüde azaltması açısından önemlidir (32). Tüberküloz tanısında ilk basamak aside dirençli boyama yöntemlerinin uygulanmasıdır. Ancak yetersiz bakteri içeren akciğer ve akciğer dışı tüberkülozlu hastaların örneklerinde duyarlılığının düşük olduğu bildirilmektedir (18). Konvansiyonel tanıda kullanılan yumurta bazlı Löwenstein-Jensen, Petraghani ve American Trudeau Society besiyerlerinde kültür süresi 6-8 hafta olmakla birlikte mikobakteriler ancak 18-21 günde izole edilmektedir. Agar temelli Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11 besiyerlerinde ise kültür süresi 6-8 hafta olmakla beraber besiyerleri mikroskop altında incelendiğinde ortalama 10-12 günde mikrokolonileri görmek mümkün olmaktadır (59, 88).

Son yıllarda özellikle gelişmiş ülkelerde yeni tanı tekniklerinin ortaya koyulması için çalışmalar sürdürülmektedir. Günümüzde birçok laboratuvar da rutin incelemede konvansiyonel besiyerlerinin yanısıra, tüberküloz etkeni bakterilerin izolasyon süresini kısaltan ve yüksek izolasyon oranı sağlayan hızlı kültür sistemleri kullanılmaktadır. Bu sistemlerin birçoğunda sıvı besiyerleri kullanılırken, katı ve bifazik besiyerlerinin kullanıldığı sistemler de bulunmaktadır. Hızlı kültür sistemleri arasında yer alan yarı otomatize Bactec 460 TB, uzun yıllardır başarı ile kullanılan bir sistemdir. Günümüzde alternatif izolasyon sistemlerin de geliştirilmiştir ve yenileri için çalışmalar devam etmektedir. Bugün var olan sistemler arasında tam otomatize BACTEC MGIT 960, Versa Trek, MB/BacT, Bactec 9000 MB kültür sistemleri bulunmaktadır. Bu sistemler

arasında izolasyon oranı açısından önemli bir fark olmamakla birlikte; konvansiyonel katı besiyerlerine göre daha yüksek, Bactec 460 TB sistemine göre daha düşük oranda izolasyon sağladıkları bildirilmektedir. Bir çok çalışmada tam otomatize sistemlerde izolasyon süresi ortalama ≤ 14 gün olarak saptanmış (5, 11, 71) ve en yüksek izolasyon oranının Bactec 460 TB ve katı besiyeri kombinasyonu ile sağlandığı bildirilmiştir (78). Kontaminasyon oranları açısından tam otomatize sistemler birbiri ile karşılaştırıldığında önemli bir fark bulunmamıştır (1, 11, 45). Bununla birlikte bu sistemlerdeki kontaminasyon oranının Bactec 460 TB ve katı besiyerlerine göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (5, 14, 71). Ancak pahalı cihaz gerektiren bu tekniklerin tüberküloz prevalansının yüksek olduğu ülkelerde kullanılması için yeterli mali kaynak bulunmamaktadır. Son yıllarda geliştirilen moleküler yöntemler de identifikasyonda ve epidemiyolojik araştırmalarda başarıyla kullanılmaktadır. Ancak tüberkülozun en sık görüldüğü fakir ülkelerde bu tekniklerin de kullanımı için yeterli mali kaynak bulunmamaktadır (66).

Tüm bu nedenlerden dolayı maliyeti düşük, hızlı ve güvenilir mikobakteri kültür sistemlerinin ve besiyerlerinin geliştirilmesi için çalışmalar sürdürülmektedir. Bu besiyerlerinden biri olan Thin Layer 7H11 agar (TLA); Middlebrook 7H11 besiyeri içerisine antibiyotik karışımı (piperasilin, amphoteresin B, trimetoprim) ve oleik asit-albumin-dekstroz-katalaz (OADC) ilave edilerek hazırlanan modifiye bir besiyeridir. Bu besiyerinde mikobakteriler tarafından oluşturulan mikrokoloniler erken dönemde (yaklaşık 10-11 gün) görülebilmekte, koloni morfolojisi ve kord oluşturma eğilimine göre ön identifikasyon yapılabilmektedir (52,89).

Çalışmamızda, TLA besiyerinin mikobakterilerin izolasyonu ve ön identifikasyonundaki performansı, LJ ve BACTEC MGIT 960 sisteminden alınan sonuçlarla karşılaştırılarak belirlenmiş ve bu besiyerinin rutin kullanımdaki yeri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Mycobacterium cinsinin 150 milyon yıldan daha uzun süredir varolduğu ve *M.tuberculosis*'in ilk atasının büyük ihtimalle 3 milyon yıl önce Doğu Afrika'da ortaya çıktığı tahmin edilmektedir. *M. tuberculosis* kompleksi'nin modern üyelerinin kökeninin ise yaklaşık 15.000-35.000 yıl önce görüldüğü bildirilmektedir (21, 46).

M. tuberculosis'in, sığırlarda bulunan *M. bovis*'in mutanı olduğu ve bu bakterinin insanlara sığırların evcilleştirilmeye başlanmasıyla geçtiği tahmin edilmektedir. *M. bovis* ile infekte hayvan etlerinin yenmesi veya sütlerinin içilmesiyle insanlar bu bakteri ile infekte olmuş, infekte kişilerde özellikle boyun lenf bezi ve kemik tutulumları görülmüş ve bakteri daha sonra genetik yapısını değiştirerek insan akciğerlerini tutan ve solunumla bulaşan, insan tipi tüberküloz bakterisi haline gelmiştir. Daha sonra bu bakteri insanların toplu yaşamaya geçişiyle birlikte, önce kabile içi daha sonra kabileler arası yayılım göstermeye başlamıştır (46).

Tüberküloza ait ilk bulgular Mısır, Hindistan ve Çin'de sırasıyla 5000, 3300 ve 2300 yıl önce belgelenmiştir. Mısır ve Aztek mumyalarında tipik iskelet anomalileri ve pott abseleri bulunmuş; ayrıca eski Mısır insan resimlerinde de bu anomalilere rastlanmıştır (21).

Hippocrates (MÖ 460) tüberkülozu, zamanın yaygın hastalığı olarak tanımlamış, genellikle 18-35 yaş arasındaki kişilerde görüldüğünü ve neredeyse her zaman ölümle sonuçlandığını bildirmiştir. Aristotle (MÖ 384-322), hastalığın bulaşıcı olduğunu düşünmüş, Yunanlı bir çok yazar hastalığın kalıtsal olduğuna inanmıştır. Hippocrates'ten sonra Yunanlı ünlü doktor Clarissimus Galen (MS 131-201), tüberkülozu, akciğer, göğüs veya boğaz ülserasyonu ve buradaki iltihap varlığına bağlı olarak öksürük, düşük ateş ve vücudun kötüye gidişiyle karakterize bir hastalık olarak tanımlamıştır. Ayrıca yetersiz beslenme hastalığı olarak da tarif etmiştir (46).

Hastalıkla ilgili kesin patolojik ve anatomik bulgular 17. yüzyılda tanımlanmaya başlanmış; veremli hastalarda etken bakteri varlığında akciğer ve diğer vücut bölgelerindeki karakteristik ve kalıcı değişiklikler ilk kez Amsterdamlı Frasciscus tarafından ortaya konmuştur. Frasciscus'un 1679'da yayımladığı Opera Medica'da,

tüberkülden ülser ve kavite oluşumuna kadar hastalığın ilerleyişi tarif edilmiştir (37, 46).

Günümüzde de önemini koruyan tüberküloz hastalığına tarihsel süreçte, hastaların eriyerek ölmesine neden olduğu için tüketim hastalığı (Consumption), hastaları soldurarak öldürdüğü için “Beyaz veba” veya “Beyaz ölüm” (White Plaque, White Death), yüzyıllar boyunca birçok kişinin ölümüne neden olduğu içinde “Ölümün kaptanı” (Captain of the death) gibi birçok isim verilmiştir. Romalılar ise hırıltılı nefes alıp verme ve öksürükle balgam çıkarma anlamına gelen “Phthisis” adını vermişlerdir (7, 27).

Tüberküloz hastalığının etkeni olan *M.tuberculosis* ilk kez 1882 yılında Dr. Robert Koch tarafından mikroskopta gösterilmiş; 1884’de kültürü yapılmıştır ve 1890 yılında “old tüberkülin” ile hastalığın özel immunité ve alerjisi ortaya koyulmuştur. Bakteri ilk başlarda *Bacterium tuberculosis* olarak adlandırılmış; ancak daha sonra 1886 yılında Lehmann ve Neuman tarafından koloni morfolojisi ve yavaş üreme özelliği nedeniyle *M. tuberculosis* olarak isimlendirilmiştir. 1921 yılında Calmette ve Guérin BCG aşısını, 1939’da Sebert ve Glenn PPD testini bulmuştur (46).

2.2. Sınıflandırma

Mycobacterium cinsi (genus), Eubacteria üst aleminin (superregnum), Firmicutes bölümünün (divisio), Actinomycetes sınıfının (classio), Mycobacteria takımından (ordo), Mycobacteriaceae ailesine (familia) dahil olup, bu ailedeki tek cinstir. Mikobakteri türleri hücre duvarlarındaki yüksek lipid içeriği ve DNA yapısındaki yüksek G+C (%61-71) oranı ile mikolik asit içeren diğer türler olan *Gordonia* (%63-69), *Tsukamurella* (%68-74), *Nocardia* (%64-72) ve *Rhodococcus* (%63-73) cinsleri ile benzer fenotipik özelliklere sahiptirler (29, 59).

Mikobakteriler diğer bazı cinsler ile benzerlik gösterirler; ancak hücre duvarlarında yer alan ve karbon ve enerji kaynağı olarak kullandıkları bir çok mikolik asit ile diğer cinslerden ayrılmaktadırlar. Bakteri hücre kuru ağırlığının yarısından fazlasını oluşturan lipitler aynı zamanda hücredeki membranöz organellerin ve hücre membranının yapı ve fonksiyonunda da yer almaktadırlar.

Bakteriyolojik özellikleri ve DNA homolojileri açısından birbirleri ile yakın ilişkisi olan türler kompleks başlığı altında gruplandırılırlar. *M. tuberculosis* kompleksi

(MTBC) içinde yer alan türler *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum tip I-II*, *M. pinnipedii*, *M. microtii*, *M. canettii* ve *M. caprae*'dir. Bu türler dışında kalan mikobakteriler ise nontüberküloz mikobakteriler (NTM) olarak adlandırılırlar (29, 59, 82, 88).

Mikobakterilerin bir çoğu çevrede serbestçe yaşayıp çoğalabilmektedir ve nadiren de olsa hastalığa neden olmaktadır. Sadece bazı mikobakteri türleri yüksek vertebralılarda hastalık etkeni olmaktadır. Bu türler organizmaya girdiğinde mononükleer fagositler içerisinde canlılıklarını sürdürebilmektedir. Çevrede çoğalamayan konağa bağımlı yaşayan mikobakteri türleri, *M. leprae*, *M. lepraemurinum*, *M. avium subs. paratuberculosis* ve MTBC üyeleridir. MTBC içerisinde yer alar türler invitro ortamda üretilbilirken, *M. leprae* ve *M. lepraemurium* türlerinin in vitro koşullarda kültürü yapılamamaktadır.

MTBC'ini oluşturan bakteriler "tüberkül bakterileri" olarak isimlendirilirler ve farklı etiyolojik etkenlerin özgül konakları vardır. *M. tuberculosis*, *M. africanum tip I* ve *II* ve *M. canettii* insan patojenidirler. *M. bovis* ve *M. microti* hayvanlarda hastalık yapan türlerdir. Bu türler insanlara da geçebilmekte ve hastalığa neden olabilmektedir (6). Keçi ve foklardan izole edilen farklı türler *M. bovis*'in alt türleri veya varyantı olarak tanımlansa da *M. caprae* ve *M. pinnipedii* olarak isimlendirilmişlerdir (82).

2.3. Morfoloji ve boyanma özellikleri

Mikobakteriler, sporsuz, hareketsiz, kapsülsüz, 0.3-0.6 µm eninde ve 1-10 µm boyunda düz veya hafif kıvrık, ince çomak şeklinde, zorunlu aerop bakterilerdir. Mikobakterilerde hücre yapısı sitoplazma, membran ve bunları çevreleyen yüksek oranda lipid içeren hücre duvarından oluşmaktadır. Sitoplazmada serbest olarak bulunan tek bir kromozomu vardır ve etrafı zarla çevrili değildir. DNA yapısındaki G+C (%61-70) oranı yüksektir (39, 56, 59, 77).

Mikobakteriler eski kültürlerden veya kazeöz lenf bezlerinden hazırlanan preparatlarda koktan, dallanmış filamentöz şekle kadar değişen formlarda görülebilmektedirler. Tipik eğri çomak şekli *M. microtii* için belirleyici olmaktadır (29, 82).

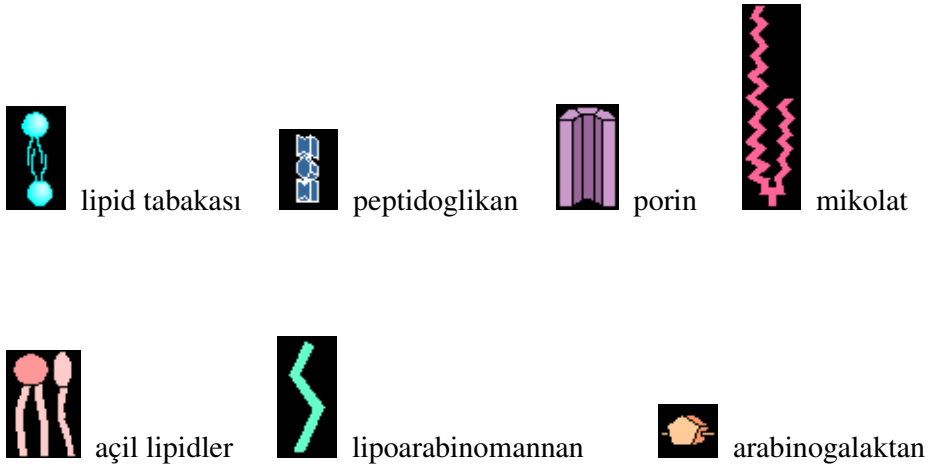
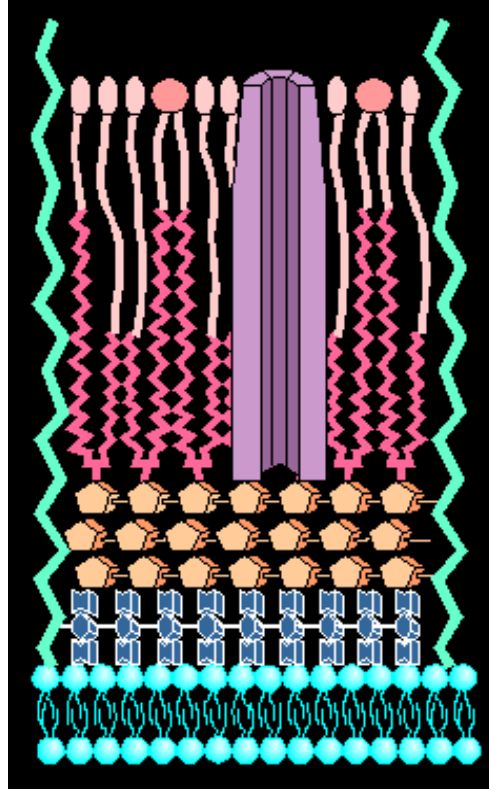
Mikobakteriler hücre duvarlarındaki yüksek lipid içeriği nedeniyle Gram yöntemi ile boyanmazlar. Bu nedenle mikobakterilerin boyanması için özel yöntemler

kullanılmaktadır. Bu bakteriler asit ve alkolle dekolorizasyona rağmen bir kez aldıkları boyayı geri vermedikleri için “aside ve alkole dirençli bakteriler” olarak tanımlanırlar. Boyama işlemi yapılabilmesi için boya, suda erir organik bir madde (fenol) içinde eritilmeli ve boyama işlemi sırasında preparatlara alttan ısı uygulanmalıdır. Aside dirençli bakteriler için karbol fuksin ve fluorokrom olmak üzere iki yöntem kullanılmaktadır. Karbol fuksin boyası kullanılan Ehrlich-Ziehl- Neelsen (sıcak boyama) ve Kinyoun (soğuk boyama) yöntemlerinde bakteriler kullanılan zıt boyanın rengine göre mavi veya yeşil zemin üzerinde kırmızı renkte görülürler. Bu yöntemler ile boyanan preparatlar 100X immersiyon objektifi ile ışık mikroskopunda incelenir. Fluorokrom yöntemi ile boyanan preparatta mikobakteriler kullanılan filtreye göre siyah zemin üzerinde sarı-portakal rengine floresan verirler ve bu preparatlar floresan mikroskopunda incelenirler (59, 77, 88).

Elektron mikroskobu ile hücre içindeki bazı yoğun granüller saptanabilir. Bu granüllerin polifosfattan oluştuğu ve enerji deposu olarak kullanıldığı; ayrıca oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarının gerçekleştiği bölgeler olduğu tahmin edilmektedir (6).

2.4. Hücre Duvarı

Mikobakterilerin hücre duvar yapısı diğer Gram pozitif ve negatif bakterilerden oldukça farklı ve kompleks bir yapıdır . İlerleyen kimyasal, moleküler ve ultrastrüktürel araştırmalar bakteri hücre duvarının yapısı ve burada meydana gelen reaksiyonlar ile ilgili önemli bilgiler sağlamıştır (23).



Şekil 2-1 Hücre duvar yapısı (38).

Bu kompleks yapının en iç tabakası diğer bakterilerde de olduğu gibi plazma membranıdır. Mikobakterilerin plazma membranı lipopolisakkarit içeren diğer bakteri membranlarından farklı değildir ve aktinomiçesler ile ortak yapıları vardır (6, 8, 49).

Ancak diğer bakterilerden farklı olarak hücre membranında lipoarabinomannan, lipomannan ve fosfatidilinozitol mannozid bulunmaktadır. Hücre membranı, osmotik basıncın dengesini, hücre içine madde giriş – çıkışını ve hücre bütünlüğünü sağlamaktadır. Ayrıca farklı görevleri olan proteinler içermektedir. Bu proteinlerin görevleri, ortamdaki moleküler konsantrasyonu ayarlamak, metabolik işlemler ve enerji üretiminde enzim olarak görev yapmak, sitoplazmadaki genetik metabolik mekanizmalar için protein translokasyon sinyallerini ve besin ve iyonların selektif geçişini sağlamaktır. Enzimler; hücre membranı ve duvar sentezinde, hücreler arası septum oluşumunda, hücre dışı proteinlerin sentezlenmesi ve salgılanmasında ve DNA replikasyonunda görevlidirler. Ancak hala mikobakterilerin hücre membranı ile ilgili spesifik bilgiler çok azdır (6).

Diğer bir çok bakteride olduğu gibi mikobakterilerde de plazma membranı hücre duvarı ile çevrilidir. Hücre duvarı, hücreye mekanik destek sağlamakta ve bakterinin karakteristik bütünlüğünü ve içeriğini korumaktadır. Hücre duvarının iç kısmında kor tabakası yer almaktadır. Bu tabaka, peptidoglikan, arabinogalaktan, mikolik asit, açiltrehalozları, oligosakkarit içeren lipidler ve fosfatidilinositolün glikozil türevlerinden oluşmaktadır. Ayrıca bu tabakada antijenik özelliğe sahip glikoproteinler ve porin yapılar da bulunmaktadır. Kor tabakasının iskeletini, peptidoglikanlar ve bunlara kovalent bağlarla bağlanmış heteropolisakkarit yapıdaki arabinogalaktanlar oluşturmaktadır. Arabinogalaktanlar, peptidoglikana bağlandıktan sonra arabinozu bağlarlar ve daha sonra mikolik asitler de bu yapıya bağlanırlar (6, 8). Hücre duvar yapısında bol miktarda lipid ve mikolik asit bulunması ve bunların asimetric dizilişleri bakteriye yüksek bir hidrofobisite kazandırmakta ve geçirgenliği azaltmaktadır. Bu yapı nedeniyle mikobakteriler Gram yöntemiyle boyanmazlar ve boyanmaları için özel yöntemlere gereksinim vardır. Ayrıca hücre duvarının bu özelliğinden dolayı bakteriler hidrofilik antibiyotiklere, metal iyonlarına, dezenfektan gibi kimyasal toksinlere, hücresel toksinlere, asit ve alkalilere ve alanin boyalara karşı doğal dirençlidirler. Mikobakterilerin en dışında polisakkarit, protein ve az miktarda lipid içeren kapsül yer almaktadır. Bu yapı mikobakterileri makrofaj içine girdikten sonra lizozomal etkiden korumaktadır (8, 39).

2.5. Üreme ve Biyokimyasal Özellikleri

Mikobakteriler zorunlu aerob bakterilerdir. Ortamda %5-10 CO₂ bulunması üremelerini hızlandırır. Bakterilerin bölünme süreleri diğer bakterilerden farklı olarak 12-18 saattir. Bu nedenle de kültürlerde kolonilerin görünür hale gelmesi için uzun bir süre (ortalama 21 gün) gerekmektedir ve besiyerleri 3-8 hafta 37 °C'de inkübe edilmelidir (9, 39, 41).

Bu bakterilerin üremelerini sağlamak için yüksek lipid içeren özel besiyerleri kullanılmalıdır. Kullanılan besiyerleri genellikle yumurta-patates veya serum-agar temellidir. Ayrıca diğer bakterilerle kontaminasyonu minimuma indirmek için besiyerlerine malaşit yeşili veya diğer anilin boyaları; selektif hale getirmek için antibiyotik katılabilir (49, 59). Yumurta temelli besiyerleri Löwenstein-Jensen, Petragani ve American Trudeau Society'dir. Bu besiyerlerinde *M. tuberculosis* kompleksi üyeleri kuru, sarımsı, karnabahara benzer koloniler oluştururlar. Agar temelli besiyerleri Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11'dir. Bu besiyerleri mikroskop altında incelendiğinde 7-10 günde mikrokoloniler görülebilmektedir. Bu besiyerleri %5-10 CO₂'li ortamda inkübe edilmelidir (9, 29).

Mikobakteriler gliserin, glikoz ve sitratları karbon kaynağı olarak, asid aminler, asparagin ve amonyum tuzlarını da azot kaynağı olarak kullanırlar. Lipid ihtiyaçlarını ise yumurta sarısından sağlarlar. Konak dokuya girdikleri zaman konak metabolitlerini kendi yararlarına kullanırlar. Hatta sadece karbonhidratları kullanmakla kalmayıp lipaz ve proteaz üreterek lipid ve proteinleri de kullanmaktadırlar (6).

MTBC üyelerinin optimal üreme dereceleri, koloni morfolojileri ve biyokimyasal özellikleri Tablo 2-1'de verilmiştir.

Tablo 2-1 *M. tuberculosis* kompleksi'nin biyokimyasal özellikleri (85).

| Tür | Üreme dereceleri | Koloni tipi | Niasin | T2H'de üreme | Nitrat redüksiyonu | (kabarcıkların mm'si) | Semikuantitatif katalaz | Katalaz (68 °C) | Tween 80 hidrolizi | Tellirit redüksiyonu | % 5 NaCl'e tolerans | Aril sülfataz (3 gün) | Üreaz | Pirazinamidaz (4 gün) |
|------------------------|------------------|-------------|--------|--------------|--------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------|--------------------|----------------------|---------------------|-----------------------|-------|-----------------------|
| M. tuberculosis | 37 | R | + | + | + | < 45 | | - | +/- | -/+ | - | - | +/- | + |
| M.bovis | 37 | Rt | - | - | - | < 45 | | - | - | ND | - | - | +/- | - |
| M.bovis BCG | 37 | R | - | - | - | < 45 | | - | +/- | ND | - | - | + | - |
| M. africanum | 37 | R | V | V | V | < 45 | | - | - | - | - | - | + | + |
| M. canettii | 37 | Sm | - | + | + | < 45 | | - | - | ND | ND | - | ND | + |
| M. microtii | 37 | Sm | + | - | V | < 45 | | - | ND | ND | ND | ND | + | + |
| M. caprae | 37 | Sm | - | - | - | < 45 | | - | +/- | ND | - | - | ND | ND |
| M. pinnipedii | 37 | R | V | N D | - | < 45 | | - | - | ND | ND | ND | ND | ND |

V: Değişken, R: Pürüzlü, Sm: Düz, Rt: Pürüzlü ve ince, ND: Tanımlanmamış.

2.6. Klinik öneme sahip mikobakteri türleri

2.6.1. *M. tuberculosis* kompleksi

Bu kompleks içinde *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.africanum* tip I-II, *M.microtii*, *M.canettii*, *M. caprae* ve *M. pinnipedii* yer almaktadır.

2.6.1.1. *M. tuberculosis*: Günümüzde tüberküloz hastalarından en sık izole edilen türdür. DNA hibridizasyon çalışmaları *M. tuberculosis* ile *M. bovis* arasında %100 benzerlik olduğunu ortaya koymuştur. *M. tuberculosis* gliserin içeren sıvı besiyerinde 3 haftada yüzeyde kalınca bir zar oluşturarak ürer. Yumurta veya agar temelli besiyerlerinde 2-3 haftada ürerler. Besiyerlerinde gliserin varlığının üremelerini hızlandırdığı bildirilmektedir. Yumurta temelli besiyerlerinde koloni morfolojileri, düzensiz, yüzeyi pürüklü, kuru ve siğil görünümünde, kirli beyaz, bazen sarımtırak koloni oluştururlar. Sarı pigment oluşumu, koagüle serumlu besiyerlerinde daha belirgin olmaktadır. Niasin ve nitrat redüksiyon testi pozitifdir.

2.6.1.2. *M. bovis*: Genellikle sığırlarda tüberküloz oluşturan türdür; ancak insan tüberkülozu etkenleri arasında da ikinci sırada yer almaktadır. *M. tuberculosis*'den farklı olarak yumurta temelli besiyerlerinde yavaş ürer (4-8 hafta), gliserin üremelerini güçleştirir ve gliserinli besiyerlerinde, önceleri yüzeyde ince zar sonra dipte çökelti oluşturarak üremektedirler. Yumurta temelli besiyerlerinde küçük, yuvarlak, düzgün, hafif kabarık, nemli, beyazımtırak koloniler oluşturmaktadırlar. Pigment oluşturmazlar. Niasin ve nitrat redüksiyon testi negatifdir.

2.6.1.3. *M. africanum*: Batı Afrikada nadiren hastalık oluşturan türdür. *M. africanum* tip I ve II olmak üzere iki alt türü vardır. Yumurta temelli besiyerinde, basık, mat, R tipi koloni oluştururlar. Biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri *M. tuberculosis* ve *M. bovis* arasında değişiklik göstermektedir.

2.6.1.4. *M. microtii*: İlk kez kemirgen hayvanlardan izole edilmiştir; ancak insanlarda da tüberküloz hastalığına neden olmaktadır. Boyalı preparatta tipik kıvrık görünüme sahiptir (6, 9, 29, 59).

2.6.1.5. *M. canettii*: Genellikle çocuklarda lenfadenopatiye ve HIV pozitif hastalarda yaygın tüberkuloza neden olmaktadır. Yumurta temelli besiyerlerinde düz, yuvarlak, parlak koloniler oluştururlar.

2.6.1.6. *M. pinnipedii*: Kompleksin en yeni üyesidir. Genellikle lenf nodlarında, akciğer, plevra ve dalakta granülatöz lezyonlar oluşturmaktadır. (6, 9, 29, 59, 82)

2.6.1.7. *M. caprae*: İlk kez İspanya'daki keçilerden izole edilmiş ve daha sonra insanlardan da izole edilmiştir. Bu bakteriyi *M. bovis*'den ayıran en büyük farklılık pirazinamide duyarlı olmasıdır (61).

2.6.2. Nontüberküloz mikobakteriler

Normalde çevrede bulunan, MTBC ve *M. leprae* dışında kalan ve tüberküloz benzeri hastalık tablosu oluşturan mikobakterilerdir. Bu bakterilerin çoğu toprak ve sulara bulunurlar, altta yatan akciğer hastalığı olan, immunsuprese kişilerden veya perkutan travma sonucunda, fırsatçı patojen mikroorganizmalar olarak izole edilirler ve kolaylıkla insandan insana geçmezler. Nontüberküloz mikobakteriler üreme hızı, pigment oluşturma ve ışığa reaksiyon özellikleri esas alınarak sınıflandırılmışlardır. Sadece ışık varlığında pigment oluşturan ve yavaş üreyenler “fotokromojen”, hem ışık hem karanlıkta pigment oluşturan ve yavaş üreyenler “skotokromojen”, pigmentsiz yavaş üreyenler “kromojen olmayan” ve “hızlı üreyenler” olmak üzere 4 gruba ayrılmaktadırlar (9, 39, 59)

2.7. Patogenez

Tüberküloz klinik infeksiyon hastalığı için tipik bir örnektir. Primer veya sekonder olmak üzere iki şekilde ortaya çıkar. Primer tüberküloz bireyin tüberküloz etkeni bakterilerle ilk defa infekte olmasıdır.

Daha önce hiç tüberküloz etkeni bakterilerle karşılaşmamış duyarlı birey, hasta kişilerin hapşırması, öksürmesi ile havaya yayılan, havada asılı kalan ve 1-3 bakteri içeren damlacık çekirdeğini solunum yoluyla aldığından infeksiyon meydana gelir. Damlacık çekirdeği ile alveollere ulaşan bakteriler, konağın ilk savunma mekanizmasını aşarak hayatta kalmayı başarır ise, primer infeksiyon adı verilen bir sürecin başlamasına neden olurlar. Bu süreçte hücrel immun yanıt gelişirse hastalık oluşmadan olay sonlanır; ancak konağın immun yanıtı yetersiz ise primer infeksiyonun ilerlemesi ile

primer tüberküloz meydana gelir ve bakteriler immun sistem hücreleri tarafından tamamen yok edilemeyip, yıllarca canlılıklarını koruyarak sessiz (dormant) kalırlar. Sekonder tüberküloz (postprimer, reinfeksiyon, erişkin tüberkülozu), infeksiyonun toplumla yayılmasında en önemli rolü oynayan tüberküloz şeklidir ve endojen reinfeksiyon, primer tüberkülozun ilerlemesi ve ekzojen reinfeksiyon olmak üzere üç şekilde ortaya çıkar.

1. Endojen reinfeksiyon: İnfeksiyona karşı direncin azaldığı durumlarda veya kolaylaştırıcı faktörler varlığında primer lezyonlardaki canlı kalmış bakterilerin yayılması ile meydana gelebilir.
2. Primer tüberküloz infeksiyonunun ilerlemesi: Primer infeksiyonda meydana gelen lezyonlar iyileşemez, bölgesel olarak ilerler ve kavern oluşursa meydana gelir.
3. Eksojen reinfeksiyon: Primer tüberküloz geçirmiş bir kişi, dışardan tekrar tüberküloz etkeni bakteri alırsa, süper infeksiyon şeklinde meydana gelir (26, 28, 36, 42, 56, 59).

2.8. Epidemiyoloji

Günümüzde dünya nüfusunun 1/3'ü (toplam 2 milyar kişi) *M.tuberculosis* ile infektidir. Her yıl yaklaşık 9 milyon yeni vaka bildirilmekte ve 1,7 milyon kişi bu hastalık sebebiyle ölmektedir (50, 55, 74, 91). Tüberküloz dünyadaki ölüm nedenleri arasında 17. Sırada, infeksiyondan ölüm nedenleri arasında ise dördüncü sırada yer almaktadır. Buna HIV/AIDS ve tüberkülozun birlikte olduğu vakalar dahil değildir. Bu hastalar da dahil edildiği zaman bu oran daha da artmakta ve tüberküloz infeksiyondan ölüm nedenleri arasında ilk sıralara çıkmaktadır (58). Genellikle vakaların küçük bir oranını çocuklar oluştururken, tüberküloz insidansının yüksek olduğu bazı ülkelerde vakaların %15'ten fazlasını çocukların oluşturduğu görülmektedir (87).

Günümüzde gün aşırı bir kişi *M. tuberculosis* ile infekte olmaktadır. Tedavi görmemiş aktif tüberkülozlu bir kişi, yılda ortalama 10-15 kişiyi infekte etmektedir (55).

DSÖ'nün 2008 yılı raporuna göre, 2006 yılında 9,2 milyon yeni olgu bildirilmiş ve 1,5 milyon kişi tüberküloz nedeniyle hayatını kaybetmiştir (91). Tüberküloz

insidansı ülkeler arasında farklılıklar göstermektedir. Sahra-altı Afrika, Güney Doğu Asya ve Doğu Avrupa gibi gelişmekte olan veya gelişmemiş ülkelerin bulunduğu bölgelerde, tüberküloz insidansı en yüksektir ve hastaların %95'i, tüberküloz nedeniyle ölenlerin %99'u bu bölgelerde yer alan ülkelerdendir (55, 56).

1950 yılında tüberküloz hastalarının tedavi edilebilmesi ve gerekli önlemlerin alınmasıyla birlikte gelişmiş ülkelerde tüberküloz insidansı her yıl %10-15 oranında azalma göstermiştir. 2020 yılına kadar hastalığın eradike edileceği tahmin edilirken, HIV enfeksiyonunun tüm dünyaya giderek yayılması ile, özellikle 1980 yılından itibaren, insidans önemli derecede artış göstermiştir (33, 40, 58). HIV, tüberküloz gelişimi için en önemli potansiyel risk faktörüdür. *M.tuberculosis* enfeksiyonunun reaktivasyonu için riski artırmakla kalmayıp aynı zamanda *M.tuberculosis* reenfeksiyonu veya enfeksiyondan hemen sonra tüberkülozun hızla ilerleme riskini de artırmaktadır. Koinfekte kişilerde hastalık gelişme riski çok yüksektir. HIV ile ilişkili tüberküloz gelişen kişilerde her iki hastalık da tedavi edilebilir ve önlenabilir olmasına rağmen HIV ve tüberkülozun endemik olduğu ve gelişmekte olan fakir ülkelerde koinfeksiyon insidansı yükselmeye devam etmektedir. Dünyada HIV seropozitif kişilerde tüberküloz yaygın fırsatçı enfeksiyon etkenidir ve sıklıkla AIDS'li hastalarda ölüme neden olmaktadır (33, 58).

Corbett ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre 2000 yılında 8.3 milyon yeni tüberküloz vakası bildirilmiştir. Yeni tüberkülozlu yetişkinlerin (15-49 yaş arası) %9'u aynı zamanda HIV ile enfektedir, ancak bu oran DSÖ Afrika bölgesinde %31 ve bazı gelişmiş ülkelerde, özellikle Amerika'da %26'dır (19). 2004 yılında yeni tüberküloz olgularının %13'ünün HIV ile enfekte olduğu bildirilmiştir; ancak bu oran ülkeden ülkeye değişiklik göstermektedir. Bu oran Batı Pasifik bölgesinde %1,4 iken Afrika bölgesinde %34'tür. Bostwana, Güney Afrika, Zambiya ve Zimbabve'de HIV ve tüberküloz ile koinfeksiyon oranı %50'ye ulaşmaktadır (25).

HIV/AIDS pandemisi ile birlikte en az izoniazid ve rifampisine karşı dirençli *M.tuberculosis* ile meydana gelen tüberküloz olarak tanımlanan çok ilaca dirençli tüberküloz (MDRTB) ve son olarak florokinolon ilaçların herhangi birine ve üç parenteral ikinci sıra ilaç olan amikasin, kapreomisin ve kanamisin en az birine dirençli MDRTB olarak tanımlanan yaygın ilaç dirençli tüberküloz (XDRTB) önem kazanmıştır (58, 95).

Amerika’da tüberküloz vakaları ile MDRTB vakaları sayısındaki artış paralellik göstermektedir. Örneğin MDRTB hastalarının sıklığı 1980 başlarında %0,4 iken 1991’de %3,5’e yükselmiştir ve bu hastaların çoğu New York’ta bulunmaktadır. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) araştırmalarına göre en az 8 MDRTB salgını New York, New Jersey, Miami’de meydana gelmiştir ve bu hastaların yaklaşık %90’ı HIV seropozitif olarak bulunmuştur. Çoklu lojistik regresyon analizlerinde HIV enfeksiyonunun; coğrafik lokasyon, önceden tedavi görmüş olmak, yaş ve ırktan bağımsız olarak MDRTB için risk faktörü olduğu görülmüştür (12).

KwaZulu Natal ve Güney Afrika bölgelerinde 2001-2002 yıllarında yeni TB olgularında MDRTB oranı %1.7 olarak rapor edilmiştir (90); aynı bölgede yapılan çalışmada 2003 yılından 2006 yılına kadar tüberküloz ve HIV tedavisi alan kişilerde MDRTB oranı %9’dur (30).

2000-2001 yılları arasında KwaZulu Natal’da HIV ve tüberküloz ile koinfekte 119 kişiyle yapılan çalışmada bu hastaların 6’sının (%5) XDRTB hastası olduğu bildirilmiştir (90).

2005-2006 yılları arasında Afrika’da yapılan çalışmada 2203 balgam örneği ile çalışılmış ve 221 (%10,0) MDRTB, 53 (%2,4) XDRTB hastası saptanmıştır. XDRTB hastalarının 44 (%83,0)’ünün aynı zamanda HIV pozitif hastalar olduğu ve 53 XDRTB hastasının ortalama yaşam sürelerinin 16 gün olduğu bildirilmiştir (31).

2007 yılında Hindistanda yapılan bir çalışmada, HIV ve tüberküloz ile koinfekte 24 kişinin 12 (%50,0)’sinin MDRTB, 4 (%16,6)’ünün de XDRTB olduğu bildirilmiştir. XDRTB hastalarının ortalama yaşam süresinin 2,6 ay olduğu belirtilmiştir (69).

HIV ile ilişkili MDRTB ve XDRTB, tüm dünya ülkelerinde özellikle TB insidansının yüksek olduğu ve AIDS epidemisinin devam ettiği ülkelerde önemli bir sağlık sorunudur. MDRTB ve XDRTB prevalansının eski Sovyetler Birliği, Asya, Dominik Cumhuriyeti ve Arjantina gibi yüksek olduğu ülkelerde TB kontrol programları uygulanmadığı sürece HIV ile ilişkili MDRTB ve XDRTB prevalansı yükselecektir (58).

Türkiye’de ise HIV enfeksiyonunun tüberküloz üzerine etkisi tam olarak bilinmemektedir. Kurutepe ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada risk grubunda bulunan 340 tüberkülozlu kişinin sadece birinde HIV pozitifliği saptanırken (43), Yücesoy ve

arkadaşlarının yaptığı çalışmada 103 tüberküloz hastasının hiçbirinde HIV pozitifliği saptanmamıştır (96). Yenen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da tüberküloz hastalarının hiçbirinde anti-HIV antikoru belirlenememiştir (94).

TC Sağlık Bakanlığı verem savaşı dairesi başkanlığının 2007 yılı raporunda; akciğer tüberkülozu olgularının %79'una mikroskopi yapılmış ve %57'sinde pozitiflik saptandığı bildirilmiştir. Bu hastaların %47'sine kültür yapılmış ve kültür pozitiflerin oranının %38 olduğu belirlenmiştir. Bir kohort oluşturmayan antibiyotik duyarlılık testlerinin sonuçları incelendiğinde, en az bir ilaca dirençli saptanan suş oranı yeni hastalarda %14,4, tedavi görmüş hastalarda ise %34,8 olduğu bildirilmektedir. Yeni hastalarda izoniazid ve streptomisine direnç yüksek iken tedavi görmüşlerde izoniazid ve rifampisine direnç yüksektir. Çok ilaca direnç oranı yeni olgularda %3,1, tedavi görmüşlerde %17,7'dir. Türkiyede toplam MDRTB hasta sayısının 191 olduğu bildirilmektedir (34).

2.9. Mikrobiyolojik Tanı

2.9.1. Örneklerin alınması ve laboratuvara gönderilmesi (29, 59, 78, 88)

Tüberküloz tanısı için birçok farklı klinik örnek alınabilir. Klinik örneklerin büyük bir kısmını solunum yolundan alınan balgam, trakeal ve bronşiyal aspirat ve bronkoalveolar lavaj sıvısı oluşturmaktadır. Beyin omurilik sıvısı (BOS), plevra ve periton sıvısı gibi steril örnekler, idrar, açlık mide suyu, doku parçaları da yaygın olarak incelenen diğer örneklerdir. Kan ve dışkı örnekleri ise sadece immun yetmezliği olan kişilerden tercih edilir.

Klinik örnekler laboratuvara steril, tek kullanımlık, sızdırmaz, fiksatif veya koruyucu madde içermeyen, burgulu kapaklı kaplar içinde gönderilmelidir. Yanlış preparat pozitifliğine sebep olabileceği için örnek gönderilirken parafilm içeren kaplar tercih edilmemelidir. Transport besiyerine veya koruyucu bir maddeye gerek yoktur. Çok küçük miktarda alınan biyopsi örneği kurumayı önlemek için steril fizyolojik serum içerisine koyulmalıdır. Eğer örneğin laboratuvara ulaştırılması 1 saatten uzun sürecekse, kan örnekleri hariç diğer örnekler +4 °C'de bekletilmelidir. Aynı şekilde laboratuvara gelen örnekler de işleme alınana kadar +4 °C'de bekletilmelidir. Kan örneği direkt olarak hasta başında besiyerine ekilmelidir. Eğer hemen ekim yapılamıyorsa 10 ml kan polyanetilen, sitrat veya heparin içeren steril tüplere alınarak

hemen karıştırılmalı ve laboratuvara gönderilmelidir. Bu şekilde laboratuvara gönderilen kan örneği hemen işleme alınmayacaksa oda ısısında bekletilmelidir .

2.9.1.1. Balgam

Akciğer tüberkülozunun tanısı için en sık incelenen örnektir. Hastalara örnek alınmadan önce eğitim verilmeli, tükürük veya burun salgısının uygun olmadığı anlatılmalı ve sabah balgamı tercih edilmelidir. Hastalardan 3 gün üst üste en az 5-10 ml olacak şekilde alınan sabah balgamı tanı için uygundur. Balgam çıkarmakta zorlanan kişilere %10'luk tuzlu su veya %10 gliserin + %15 tuzlu su karışımı solutularak balgam çıkarması sağlanmalıdır. Bu şekilde alınan indüklenmiş balgam en az 10 ml olmalıdır ve tükürükle karıştırılabileceğinden hastanın istek kağıdında indüklenmiş balgam olduğu belirtilmelidir. Kontaminasyon nedeniyle 24 saat biriktirilmiş balgam tanı için uygun değildir.

2.9.1.2. Bronşiyal aspirat, bronkoalveolar lavaj sıvısı ve akciğer biyopsi örneği

Balgam çıkaramayan akciğer tüberkülozlu hastalardan, invazif teknikler kullanılarak örnek alınmaktadır. Bronkoskopi yapılmış bir önceki hastadan bulaşma olmaması için bronkoskopların temizliğine çok dikkat edilmelidir. Saprofit mikobakterilerle yalancı pozitif sonuçlar alınabileceği için, bronkoskoplar çeşme suyuyla temas ettirilmemelidir. Tanı konulmasında zorluk çekilen hastalardan ince iğne aspirasyonu örneği ve akciğer biyopsisi gibi örnekler almak da mümkündür.

Hastadan alınan bronkoalveolar lavaj sıvısının miktarı en az 5 ml, bronşiyal aspirat sıvısının mümkün olduğunca fazla miktarda ve biyopsi örneğinin en az 1 gr olması önerilmektedir. Alınan bu örnekler uygun kaplar içerisinde ve transport kurallarına uygun olarak laboratuvara gönderilmelidir.

2.9.1.3. Gastrik lavaj sıvısı

Balgamını yutan yeni doğanlardan, çocuklardan ve zihinsel engelli kişilerden gastrik lavaj yoluyla mideden örnek alınmaktadır. Kişinin gece boyunca yuttuğu ve midesinde biriken balgamı elde edebilmek için üç gün üst üste en az 5-10 ml örnek sabah aç karnına nazogastrik sonda aspirasyonu ile uzman kişiler tarafından alınmalıdır. Alınan örnek 4 saat içinde işleme alınmayacaksa, bakteriler enzimler ve mide asidinin etkisiyle tahrip olacağından, steril tek kullanımlık falkon tüplere alınan örneğin üzerine 100 mg sodyum karbonat ilave edilmeli ortam nötr hale getirilmelidir.

2.9.1.4. İdrar

Üriner sistem tüberkülozundan şüphelenildiğinde sabah ilk idrar örneği 40 ml olacak şekilde üç gün üst üste, orta akım tekniğiyle, steril kap içerisine alınmalıdır. Gece boyunca bakteriler mesanede birikeceğinden, sabah ilk idrarın alınması izolasyon şansını artırır. Yirmidört saat biriktirilmiş veya az miktardaki idrarla çalışmak uygun değildir.

2.9.1.5. Vücut sıvıları

Beyin omurilik sıvısı (BOS), plevra, periton, perikard sıvısı veya sinovyal sıvılar aseptik koşullarda aspirasyon veya cerrahi yöntemlerle alınmalıdır. Kanlı örneklerin koagüle olmasını engellemek için sodyum polyanetol sülfat eklenebilir. Vücut sıvılarında mikobakteri sayısı az olduğundan bu sıvılardan mümkün olduğunca fazla miktarda alınıp incelenmelidir. BOS'nın en az 2 ml; diğer örneklerin ise en az 10-15 ml hatta mümkünse 50 ml olması önerilmektedir.

2.9.1.6. Doku örnekleri (lenf nodu, deri ve diğer biyopsi örnekleri)

Doku örnekleri en az 1 gr olmalıdır. Aseptik koşullarda alınmalı ve steril kaplar içerisinde laboratuvara gönderilmelidir. Örnekler tuzlu su veya bir başka sıvı içerisine konmamalı, gazlı beze sarılmamalıdır. Formalin içerisinde gönderilen biyopsi örnekleri preparat ve kültür işlemleri için uygun değildir. Az miktardaki biyopsi örneklerinin üzerine kurumaması için çok az miktarda steril serum fizyolojik ilave edilebilir.

2.9.1.7. Dışkı

Dışkı örneği AIDS hastalarının gastrointestinal sisteminden *Mycobacterium avium* kompleksinin (MAC) izolasyonu için tercih edilmektedir. Rutin tanı için kullanılan bir örnek değildir. Kültür yapılmadan önce preparat hazırlanıp incelenmeli, preparatta fazla miktarda aside dirençli bakteri görülürse kültür işlemi uygulanmalıdır.

2.9.1.8. Abse içeriği, abse aspiratı ve yara örnekleri

Bu örnekler aseptik koşullarda aspirasyon yöntemiyle alınmalıdır. Kutanöz lezyonlarda lezyonun kenarından iğneyle girilerek örnek aspire edilmelidir. Bu örneklerden optimum üreme sıcaklığı 30°C olan mikobakteriler de izole edilebileceğinden, ikinci bir kültür hazırlanıp bu sıcaklıkta inkübe edilmelidir.

2.9.1.9. Kan

MAC yaygın tüberküloz hastalığında en sık izole edilen mikobakterileri içerir; bu nedenle kandan izole edildiklerinde genellikle klinik hastalıkla ilişkili oldukları düşünülür. Eğer kan alınır alınmaz ekilmeyecek ve laboratuvara ulaştıktan sonra işleme alınacaksa pıhtılaşmayı engellemek için polyanetilen sülfat, heparin veya sitrat içeren tüplere alınmalıdır. EDTA'lı ve pıhtılaşmış kan, tüberküloz tanısı için uygun değildir. Kanın direkt katı besiyerine ekilmesi önerilmemektedir. Eğer kan hemen işleme alınmayıp bekletilecekse oda ısısında bekletilmelidir.

Yapılan son çalışmalar, monitörize sistemlerin (BACTEC MYCO/F LYTIC ve MB/BacT ALERT) MAC bakteriyemisi tanısında daha duyarlı ve hızlı olduğunu göstermiştir.

2.9.1.10. Tanı için uygun olmayan örnekler

Tanı için laboratuvara kabul edilmeyen örnekler; çok az miktarda olan veya tükürük içeren balgam, sürüntü örneği, 24 saat biriktirilmiş idrar veya balgam örneği, kırık, sızdıran, etiketsiz kaplarda gönderilmiş örnekler, 7 günden fazla bekletilen örnekler ve buzdolabında bekletilmiş kan örneğidir.

2.9.2. Mikroskopik inceleme

Tüberküloz tanı yöntemlerinin amacı, klinik örneklerde mikobakterilerin varlığını göstermek ve hastalık etkeni olan türü izole etmektir. Bu nedenle tüberküloz tanısı için alınan klinik örneklerden hazırlanan preparatlar ilk olarak özel yöntemlerle boyanır ve mikroskopta incelenir. Kültür yapılmaksızın klinik örneğin yalnızca mikroskopta incelenmesi, enfeksiyona karar vermek için yeterli olmadığından etkenin tanımlanması, antitüberküloz duyarlılık deneylerinin yapılması ve epidemiyolojik açıdan incelenebilmesi için, klinik örneklerin mikobakterilerin üreyebileceği özel ortamlara ekilmesi gereklidir. Kültür yöntemleri, uzun yıllardır tüberküloz tanısında en güvenilir yöntem olarak varlığını korumaktadır.

Tüberküloz tanısı amacıyla laboratuvara gönderilen birçok klinik örnek, mikobakterilerle birlikte, kontaminasyona neden olan bakteri ve mantarları ve bu mikroorganizmaların çoğunluğunun etrafını sararak çevre şartlarına dirençli hale gelmelerine neden olan lökosit, eritrosit, vücut sıvıları ve doku gibi organik kalıntıları da içerir. Kontaminasyona neden olan bu mikroorganizmalar çok daha kısa sürede

üreyebildikleri için, besiyerlerinde mikobakterilerin üremesini baskılar. Bu nedenle normal flora içeren, alım ve transport işlemleri sırasında sterilizasyon kurallarına uyulmadığı düşünülen klinik örneklere; organik kalıntıları sindirmek ve kontaminasyona neden olan bakteri ve mantarları elimine etmek amacıyla homojenizasyon ve dekontaminasyon işlemi uygulanır (70, 78).

2.9.2.1. Homojenizasyon, dekontaminasyon ve yoğunlaştırma yöntemi

Homojenizasyon ve dekontaminasyon işlemleri için bazı yöntemlerde tek bir madde kullanılırken (%4 NaOH), bazı yöntemlerde bu iki işlem için ayrı ayrı maddeler kullanılır. Günümüzde mikobakteriyoloji laboratuvarlarında en çok N-Asetil-L-Sistein (NALC)+sodyum hidroksit (NaOH) yöntemi tercih edilmektedir. Bu yöntemde NALC mukolitik, %4'lük NaOH dekontaminan ve %2,9'luk sodyum sitrat klinik örnekte bulunabilecek ağır metal iyonlarını bağlayarak NALC'ın inaktive olmasını önlemek amacıyla kullanılır. NALC oksijene duyarlı olduğu için hazırlanan bu karışım en fazla 24 saat kullanılabilir ve NALC'ın tartım işlemleri sırasında ambalajın ağzı uzun süre açık bırakılmamalıdır (29, 59, 86).

Mikobakteri açısından değerlendirilecek olan örnekler önce 50 ml'lik steril burgulu kapaklı falkon tüplerine alınmalıdır. Daha sonra üzerine örneğin miktarı kadar NALC – NaOH karışımı ilave edilmeli ve 15 dakika oda ısısında bekletilmelidir. Bekleme süresinin başlangıcında tüpler 30 saniyeyi geçmeyecek sürede vortekslenmelidir. Vorteksleme işlemi uzun süre yapılırsa mikobakteriler zarar görebilir. Bu nedenle bu süre aşılmamalıdır. On beş dakikanın sonunda dekontaminasyon işlemini durdurmak için tüpe 50 ml işaretine kadar 0.067 M fosfat tamponu (pH: 6.8) ilave edilmelidir. Kullanılan fosfat tamponunun steril olması ve bu sterilitenin korunması önemlidir. Dekontaminasyon işlemini durdurduktan sonra yoğunlaştırma işlemi için tüpler ≥ 3000 xg'de 15 – 20 dakika santrifüjde çevrilir ve üst sıvı, içinde dezenfektan (%0,1-1 sodyum hipoklorit, %70 alkol vb.) bulunan kaba dökülmelidir. Lamlar üzerine çizilmiş 1X2 cm'lik alanlara sedimentten yayma yaparak preparat hazırlandıktan sonra tüp içine 1-2 ml steril fosfat tamponu veya %2'lik sığır albümini ilave edilmelidir. Eğer kültür işlemi için radyometrik Bactec yöntemi kullanılacaksa fosfat tamponu tercih edilmeli ve örnek uygun besiyerlerine ekilmelidir (78).

Standart olarak kullanılan NALC-NaOH yönteminin yanısıra, zefiran trisodyum fosfat, oksalik asit, ogawa-Kudoh, setilpiridinyum klorid-sodyum-klorid ve sülfirik asit gibi yöntemler de tanımlanmıştır (59, 78, 86).

Homojenizasyon sonrası sedimentten hazırlanan preparatın mikroskopik incelenmesi günümüzde hala en hızlı ve ucuz tanı yöntemi olarak varlığını korumaktadır. Bu yöntemle infeksiyöz hastalar tanınmakta ve gerekli önlemler alınabilmektedir (68, 70).

Mikobakterilerin mikroskopik incelenmesinde, karbolfuksin yöntemi (sıcak boyama Erlich-Ziehl-Neelsen, soğuk boyama Kinyoun) ve fluorokrom yöntemi (auromine O, auromine-rhodamine) olmak üzere farklı yöntemler tercih edilebilmektedir (59, 68, 70, 84).

Aside dirençli boyama yöntemlerinin prensibi, mikobakterilerin lipidden zengin hücre duvarlarının primer boya ile boyandıktan sonra (boya mikolik asitlere bağlanır), asit alkolle muamele sonucunda boyayı bırakmamasına dayanmaktadır. Bu nedenle mikobakterilere “aside dirençli bakteri” de denilmektedir .

Preparatlar karbol fuksin bovalarıyla boyandığında, mikobakteriler ilk aldıkları boya ile boyanırlar ve asit alkolle dekolorizasyona rağmen boyayı bırakmazlar ve zeminin zıt boya ile boyanması sonucunda kullanılan zıt boyaya göre mavi veya yeşil zemin üzerinde pembe-kırmızı renkli bakteriler şeklinde görülürler. Fluorokrom yönteminde ise bakteriler, floresan izotiyosiyanat filtreli mavi ışıkta, koyu zemin üzerinde sarı veya turuncu-kırmızı renkli bakteriler şeklinde görülürler.

Mikobakteriler boyandıktan sonra mikroskopta 1-10 µm uzunluğunda, 0.2-0.6 µm genişliğinde hafif kıvrık veya düz çomak şeklinde görülürler. Sıvı besiyerinden hazırlanan preparatlarda MTBC bakterileri kord formunda görülürler (29, 59, 70).

Karbol fuksin yöntemi ile boyanmış preparatlarda negatif sonuç vermeden önce 1000X büyütme ile en az 300 alan taranmalıdır. Fluorokrom yöntemi ile boyanan preparatlar 250X büyütme ile incelenmeli ve negatif sonuç vermeden önce 30 alan taranmalıdır. Bunu sağlamak amacıyla 1X2 cm’lik alana yayılmış örneğin üç kez boyuna veya altı kez enine incelenmesi gereklidir ve sonuçlar Tablo 2-2’ye göre yorumlanmalıdır (65, 80).

Örnekte 10^6 /ml mikobakteri bulunması durumunda mikroskopik incelemede sonuç pozitif olacaktır. Ancak örnekte 10^4 /ml mikobakteri bulunması durumunda pozitiflik oranının %60 civarında olacağı bildirilmektedir (59). Mikroskopik incelemenin duyarlılığı %22-80 aralığında değişmektedir. Direkt mikroskopik incelemenin duyarlılığını etkileyen faktörler; örneğin tipi, mikobakterinin türü, dekontaminasyon işleminin etkisi, boyama yöntemi, yaymanın kalınlığı ve preparatı inceleyen kişinin deneyimidir. Akciğer tüberkülozunda duyarlılığı düşüren en önemli faktör hastanın yetersiz balgam çıkarmasıdır. Solunum yolu örneklerindeki mikroskopi pozitifliği diğer örneklerden daha fazladır. Fluorokrom boyama yönteminin karbol fuksin boyama yöntemine göre daha duyarlı olduğu bildirilmektedir (75, 76, 84). Ancak bu yöntemle pozitif bulunan preparatlar EZN yöntemiyle tekrar boyanarak sonuç konfirme edilmelidir.

Aside dirençli boyamanın vücut sıvılarındaki tanı değeri solunum yolu örneklerine göre oldukça düşüktür. Çünkü vücut sıvılarında mikobakteri sayısı daha azdır. Beyin omurilik sıvısı ve diğer vücut sıvılarında mikobakteri konsantrasyonunu artırmak için santrifüj işlemi etkili bir yol değildir. Çünkü bu sıvıların yoğunluğu nedeniyle mikobakteriler santrifüj işlemi sonrasında üst sıvıda da kalmaktadırlar. Bu nedenle böyle örneklerin polikarbonat membran filtrasyon yöntemi ile işlenmesi ve mikobakterilerin yoğunlaştırılması önerilmektedir (59, 78, 86)

Tablo 2-2: Karbol fuksin ve fluorokrom yöntemiyle boyanmış preparatların değerlendirilmesi ve sonuçların bildirilmesi (70, 78)

| SONUÇ | Aside dirençli bakteri sayısı/mikroskop alanı | | |
|----------------------------------|---|-------------------|---------|
| | Fuksin Boyama (1000X) | Fluorokrom Boyama | |
| | | 250X | 450X |
| Aside dirençli bakteri görülmedi | 0 | 0 | 0 |
| Şüpheli | 1-2/300 | 1-2/30 | 1-2/70 |
| 1+ | 1-9/100 | 1-9/10 | 2-18/50 |
| 2+ | 1-9/100 | 1-9/10 | 2-18/50 |
| 3+ | 1-9/1 | 1-9/1 | 4-36/4 |
| 4+ | >9/1 | >90/1 | >36/1 |

2.9.3. Kültür

Hasta örneğinde 10^1 - 10^2 /ml bakteri bulunması kültür ortamında bakteriyi üretmek için yeterlidir. Mikroskopik incelemede mikobakteri görülmesi ön tanıda önemlidir ancak tüberkülozun kesin tanısı için bakterinin kültürde üretilip identifiye edilmesi gerekmektedir. Mikobakterilerin izole edilmeleri ve çeşitli özelliklerinin incelenmesi amacıyla kullanılan konvansiyonel besiyerleri katı ve sıvı olmak üzere iki tiptir (29, 59, 88).

2.9.3.1. Konvansiyonel besiyerleri

- Katı besiyerleri

Katı özellikteki besiyerlerini yumurta bazlı ve agar bazlı olmak üzere iki bölümde incelemek mümkündür.

Tam yumurta veya yumurta sarısı içeren yumurta temelli besiyerleri arasında en yaygın kullanılan Löwenstein-Jensen (L-J) besiyeridir. Ancak Petragnani ve American Trudeau Society besiyerleri de tercih edilebilir. L-J besiyeri, *M.tuberculosis* dışındaki mikobakterilerin üretilmesi için güvenilir bir besiyeri olmasada; tipik koloni morfolojisi oluşturmaları ve daha bol üremeleri nedeniyle primer izolasyonda önerilmektedir. Kontaminasyon olasılığı yüksek örneklerden mikobakterilerin üretilmesi için L-J besiyerinde 2 kat fazla malaşit yeşili içeren Petragnani besiyeri kullanılır. American Trudeau Society besiyeri ise L-J besiyerinden daha düşük konsantrasyonda malaşit yeşili içermektedir; bu nedenle kontaminasyona neden olan bakteriler daha kolay ürerler ve mikobakterilerin de büyümesi daha az inhibe olarak daha erken bir dönemde daha büyük koloniler meydana gelir. Bu besiyerleri iyi bir tampon kapasitesine, uzun raf ömrüne sahiptir ve ayrıca bir çok mikobakterinin üremesini sağlamaktadırlar. Bu besiyerlerinin dezavantajı, kolonilerin örnekteki kalıntılardan ayrılmasının zor olması, ilaç duyarlılık testlerinin başarılı bir şekilde yapılamaması ve kolonilerin 18-24 gün gibi uzun sürede oluşmasıdır (29, 88).

Yumurta temelli besiyerlerinin opak görümlü olmasına karşın agar temelli besiyerleri şeffaftır. Bu nedenle ekim yapılan besiyerleri 10-12 gün sonra mikroskop altında incelendiğinde oluşan kolonileri görmek mümkündür. Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11 en çok tercih edilen agar temelli besiyerleridir. Agar temelli besiyerleri daha çok duyarlılık deneyleri için tercih edilirler. Kontaminasyona neden olan bakteriler bu besiyerinde yavaş ürerler, bu besiyerleri pahalıdır ve raf ömürleri 1 ay gibi kısa bir süreyi kapsar. Bu besiyerlerinin hazırlama, inkübasyon ve saklanma koşulları iyi bilinmeli ve uygulanmalıdır; çünkü aşırı sıcak ve ışık maruziyeti besiyerinde bozulmalara ve mikobakterilere karşı toksik etkili olan formaldehitin salgılanmasına neden olmaktadır.

M.bovis şüpheli örnekler için Middlebrook besiyerine %0.2 piruvik asit ilave edilmelidir. 7H10 agara %0.25 L-asparagine veya %0.1 potasyum aspartat ilave

edilmesi, bakterinin niasin üretimini artırır. Middlebrook 7H11 agar, izoniazid direnci olan *M.tuberculosis* suşlarının üremesini hızlandırır (29, 59).

Bu besiyerlerinin yanısıra kontaminasyona neden olan mikroorganizmaların üremesini etkin bir şekilde engellemek amacıyla selektif besiyerleri olan L-J Gruft, Mycobactosel L-J, Mitchinsonselektif 7H11 de kullanılabilir. Yumurta bazlı selektif besiyeri olan L-J Gruft, penisilin ve nalidiksik asit, Mycobactosal L-J, sikloheksimid, linkomisın ve nalidiksik asit içerir. Mitchison selektif 7H11 agar karbenisilin, polimiksin B, trimetoprim laktat ve amfoterisin B ilave edilerek selektif hale getirilir. Selektif besiyerleri belli bir örnek için kullanılacaklarsa tek başlarına kullanılmazlar, non-selektif olan, agar veya yumurta bazlı besiyerleri ile birlikte kullanılmalıdır.

Thin Layer Agar besiyeri, Middlebrook 7H11'in modifiye edilmesiyle elde edilen; mikobakterilerin hızlı tanısını ve koloni morfolojisine göre ön identifikasyonunu sağlayan bir besiyeridir . Bu besiyerinin tüberkülozun rutin tanısındaki yerini araştıran Welch ve ark.'nın 1995 yılında yaptıkları çalışmada konvansiyonel yöntemlerle bakterinin izole edilme süresinin ortalama 23 gün sürdüğü belirtilirken TLA ile ortalama 11 günde üremenin görüldüğü bildirilmiştir (89). Mejia ve ark.'nın 1999 yılında yaptığı çalışmada ise preparat pozitif örneklerde izolasyon süresi TLA besiyerinde $10,1 \pm 8,1$ gün, negatif örneklerde ise $18,7 \pm 9$ gün olarak bildirilmiştir (52). Robledo ve ark.'nın yaptıkları çok merkezli bir çalışmada ise TLA besiyerinde ortalama üreme zamanı 11,5 gün olarak bildirilmiştir (66).

Kanlı agar mikobakteri izolasyonu için alternatif bir besiyeridir. Drancourt ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada %5 koyun kanlı agar besiyerinin primer izolasyonda kullanılabileceği, *M. tuberculosis*'in kanlı agarda 1-2 haftada ürediği ve bu besiyerinde yumurta temelli besiyerlerinden daha fazla koloni oluşturduğu bildirilmiştir (22). Yapılan ilk çalışmalar duyarlılık testleri için de alternatif bir besiyeri olduğunu ve sonuçların 2 haftada elde edilebildiğini göstermektedir (16, 17).

2.9.3.2. Bifazik Besiyerleri

Septi-Chek sistemi, modifiye 7H9 sıvı besiyeri ve 3 tip katı (modifiye edilmiş L-J, Middlebrook 7H11 ve çukolatamsı agar) besiyerinin kullanıldığı bifazik bir kültür sistemidir. Çukolatamsı agar kontaminasyonu belirlemek amacıyla kullanılır. Kültür işleminden önce besiyerine oleik asit, gliserin, glukoz, pridoksal HCl, azlosilin, katalaz, albümin, nalidiksik asit, polimiksin B, amfoterisin B ve trimetoprim içeren supleman

ilave edilir. Daha sonra işlenmiş örneklerin ekimi yapılır ve besiyerinin kapağı kapatılır. Ekim yapılan besiyerleri 24 saat ters olarak bekletilmeli ve süre sonunda ters duran besiyerleri düz konuma getirilmelidir. Kültür süresince besiyerleri ara sıra hafifçe çalkalanarak sıvı besiyerinin katı besiyerine teması sağlanmalıdır. Bu yöntemin duyarlılığı BACTEC 460 TB sistemi ile benzerdir. İzolasyon süresi BACTEC sistemine göre daha uzundur ancak bu yöntem ile konvansiyonel metotlara oranla daha kısa sürede izolasyon sağlanabilir. Sistem kan dışındaki tüm klinik örnekler için uygundur (59).

2.9.3.3. Sıvı Besiyerleri

Sıvı besiyerleri içinde yer alan Dubos Tween albümin ve Middlebrook 7H9, mikobakterilerin stok suşlarının subkültürlerinin yapılması ve diğer in vitro deneylerde inokulum hazırlanması amacıyla kullanılır. Bunun yanında bakteri sayısının az olduğu steril bölgelerden alınan klinik örneklerde, bakteriyi çoğaltmak ve dolayısıyla izolasyon şansını artırmak amacıyla da kullanılabilir. Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri, çoğu hızlı kültür sisteminde temel besiyeri olarak kullanılmaktadır (59, 88)

Günümüzde birçok laboratuvarında, konvansiyonel besiyerlerinin yanı sıra tüberküloz erkeni bakterilerin izolasyon süresinin çok daha kısa ve izolasyon oranının çok daha yüksek olduğu hızlı kültür sistemleri rutin inceleme amacıyla kullanılmaktadır. Çoğunda sıvı besiyeri kullanılmakla birlikte bifazik ve katı besiyerlerinin kullanıldığı sistemler de mevcuttur ve bu sistemlerde CO₂ oluşumu ve oksijen kullanımı fluorometrik veya kolorimetrik olarak ölçülür. Primer izolasyonda sıvı besiyerlerine ilave olarak bir de katı besiyeri kullanılması CDC tarafından önerilmiştir ve bu kombinasyonla mikobakterilerin izolasyon şansının arttığı bilinmektedir (78).

-MB Redox

Cihaz gerektirmeyen MB Redox sisteminde mikobakterilerin izolasyonu amacıyla antibiyotik karışımı ve renksiz tetrazolium tuzu içeren modifiye Krichner besiyeri kullanılır. Tetrazolium tuzu mikobakterilerin redoks özelliği sayesinde hücre yüzeyinde granüler formda biriken pembe, kırmızı ve menekşe renginde formozana indirgenir ve üreme sonucu oluşan renkli partiküller şeklinde makroskobik olarakta görülebilir.

2.9.3.4. Otomatize ve yarı otomatize kültür sistemleri

-BACTEC 460 TB Sistemi (Becton Dickinson, Sparks, MD)

Bactec 460 TB sistemi mikobakteriyolojik tanı için geliştirilen ilk yarı otomatize sistemdir (83). Sistemde izolasyonun yanısıra, *M. tuberculosis* kompleksi ve tüberküloz dışı mikobakterilerin ayrımı yapılabilmekte ve *M. tuberculosis* kompleksi suşlarının primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılığı denetlenmektedir. Bactec 12B (Middlebrook 7H12) besiyerinin kullanıldığı sistem; besiyerlerinde bulunan ¹⁴C işaretli palmitik asitin kullanılması sonucu oluşan ¹⁴CO₂'in, 0-999 sayısal değerleri arasında üreme indeksi (GI) olarak ölçülmesi prensibi ile çalışmaktadır. Ekim işleminden önce besiyerlerine, kontaminasyona neden olan bakterilerin üremesini engellemek amacıyla polimiksin B, azlosilin, nalisiksik asit, trimetoprim ve amfoterisin B (PANTA) içeren antibiyotik karışımı ilave etmek gereklidir. Steril örnekler, mikobakterilerin üremesini artırmak için polioksietilen stearat ilave edilmelidir. Steril olmayan örneklerin dekontaminasyonu için, Sodyum dodesil sülfat/sodyum hidroksit (SDS-NaOH) gibi yöntemler Bactec 460 TB sistemi ile uyumlu olmasına rağmen NALC-NaOH yöntemi kullanılmalıdır. Ekim işleminden sonra besiyerleri 42 gün boyunca inkübe edilmeli ve ilk 15 gün haftada 2 kez, daha sonra haftada 1 kez olmak üzere kontrol edilmelidir (59, 83).

Bactec 460 TB sisteminde mikobakterilerin izolasyon süresi oldukça kısadır. Bu süre preparat pozitif olan örneklerde 3-20 gün; preparat negatif olan örnekler de ise 9-30 gün'dür. Bactec 460 TB sisteminin dezavantajı; koloni morfolojisinin gözlenememesi, pahalı olması, radyoaktif madde içermesi, cihazda yapılan rutin kontroller sırasında çapraz kontaminasyon riskinin bulunmasıdır (5, 11, 44, 67).

-BACTEC MGIT 960 Sistemi (Becton Dickinson, Sparks, MD)

BACTEC MGIT 960 sisteminde kullanılan, Middlebrook 7H9 sıvı besiyeridir ve besiyerlerinin bulunduğu tüplerin dip kısımlarında oksijene duyarlı rutenyum metal kompleksi içeren silikon bulunmaktadır. Klinik örneklerden besiyerlerine ekim yapılmadan oleik asit-albümin-dekstroz-katalaz (OADC) ve PANTA ilave edilmelidir. Sistemde kullanılan besiyerlerinde herhangi bir üreme olmadığında oksijen varlığına bağlı olarak silikon tabakaya gönderilen ultraviyole (UV) ışınına karşı floresans oluşmazken, mikobakteri veya diğer mikroorganizmalar ürettiğinde oksijenin kullanılması sonucunda UV ışınına karşı floresans oluşmakta ve oluşan floresans miktarı üreme indeksi olarak değerlendirilmektedir. BACTEC MGIT 960 tam otomatize

bir sistem olmakla birlikte, besiyerleri UV ışığı altında makroskobik olarak da değerlendirilebildiğinden manuel kullanıma da uygundur. Kan haricinde diğer tüm klinik örnekler için kullanılabilir (59, 83, 88).

Bu sistem, duyarlılık ve izolasyon süresi açısından BACTEC 460 TB sistemi ile benzerlik göstermektedir ve bu özellikleriyle katı besiyerlerinden daha üstündür. Ancak bu sistemin kontaminasyon oranı Bactec 460 TB sistemine oranla daha yüksektir. Yapılan çalışmalarda BACTEC MGIT 960 sisteminin izolasyon süresinin preparat pozitif örneklerde 9-19 gün, preparat negatif örneklerde ise 14-29 gün olduğu bildirilmektedir. Bactec 460 TB sistemi ile izolasyon süresi açısından benzerlik gösterdiği; ancak konvansiyonel yöntemlerden daha hızlı olduğu bildirilmektedir (48, 71, 72, 73, 79).

Bactec MGIT 960 sisteminin Bactec 460 TB'ye göre en büyük avantajı çapraz kontaminasyonu azaltması, enjektörle inokülasyona gerek olmaması, radyoizotop kullanılmaması ve UV kaynağından başka cihaza gerek olmamasıdır. Dezavantajı ise yüksek kontaminasyon oranına sahip olması, kan veya bol kanlı örneklerin floresan saçılımını engellemesi ve bazı dekontaminasyon yöntemleri ile uyumsuzluk göstermesidir. Manuel ve otomatize MGIT sistemi ilaç duyarlılık testi için Bactec 460 TB sistemi ile eşdeğerdir (59, 83).

-Versa TREK

Selüloz sünger ve OADC ilave edilerek modifiye edilmiş Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içeren bir sistemdir. Sistemde mikroorganizmaların üremesi sonucu oluşan gaz basıncındaki değişiklikler ölçülerek değerlendirme yapılır. Bilgisayar destekli bir sistemdir ve besiyerlerinde oluşan gaz basıncındaki değişiklik grafiksel olarak bilgisayarda görüntülenir. Besiyerlerine ekim yapılmadan önce; steril örnek ekilecekse polimiksin B, azlosilin, fosfamisin, nalidiksik asit ve amfoterisin B (AS), kontamine örnek ekilecekse polimiksin B, vankomisin, nalidiksik asit, ve amfoterisin B (PVNA) antibiyotik karışımı ilave edilmelidir. Örnekler besiyerine enjektör ile ekilmelidir.

Bir çok çalışma bu sistemin katı besiyerlerinden daha iyi olduğunu göstermiştir; fakat diğer otomatize ve yarı otomatize sistemlerden daha avantajlı olduğu gösterilmemiştir (80, 92, 93).

-BacT/Alert 3D

Besiyerinin dip kısmında kolorimetrik bir sensör içeren ve oluşan CO₂ düzeyini ölçerek üremeyi değerlendiren bir sistemdir. Bilgisayar desteği bulunan sistemde besiyerleri sürekli kontrol edilir. Steril örnekler ekilmenden önce reconstitution sıvısı ilave edilirken, steril olmayan örneklerin ekiminden önce polimiksin B, amfoterisin B, nalidiksik asit, trimetoprim, vankomisin ve azlosilin içeren antibiyotik karışımı ilave edilmelidir. Sistem kan haricindeki tüm klinik örnekler için uygundur (83).

Yapılan birçok çalışma bu sistemin konvansiyonel yöntemlerden çok daha hızlı ve duyarlı olduğunu göstermiştir; ancak otomatize ve yarı otomatize sistemlerden önemli bir farkı olduğu gözlenmemiştir (1, 11, 60).

-Bactec 9000 MB

Besiyerindeki oksijen kullanımının fluoresans ile belirlendiği bir sistemdir. Modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyerlerine ekimden önce PANTA ilave edilir. Sistemde balgam ve diğer solunum yolu örnekleri için Myco/F sputa, kan ve diğer steril vücut bölgelerinden alınan örnekler için MycoF/lytic besiyeri kullanılır (88).

İnkübasyon

A. Sıcaklık: Kültürlerin optimum inkübasyon sıcaklığı 35-37 °C'dir. *M.marinum*, *M. ulcerans*, *M.chelonea* veya *M. haemophilum* şüpheli deri ve yumuşak doku örneklerinin kültürleri daha düşük sıcaklıklarda inkübe edilmelidir. Bu örnekler iki besiyerine ekilmelidir ve bir tanesi 25-33 °C'de inkübe edilmelidir. Bactec 460 TB besiyerleri için 36-38 °C uygundur. Radyoizotopla işaretli substratın metabolize olduğu optimum sıcaklık 36-38 °C olduğu için Bactec 460 TB besiyerleri için daha düşük sıcaklıklar izolasyon süresinin uzamasına neden olur.

B. Atmosfer: Katı besiyerlerinin %5-10 CO₂'li ortamda inkübe edilmesi mikobakterilerin üremelerini stimüle etmektedir. Middlebrook agar besiyerleri CO₂'li ortamda inkübe edilirken, yumurta bazlı besiyerleri sadece inkübasyondan sonraki ilk 7-10 gün CO₂'li ortamda inkübe edilmeli, daha sonra bu besiyerleri normal atmosfer koşullarında tutulmalıdır. CO₂ inkübatörü yetersiz ise besiyerleri CO₂ üreten poşetler içinde inkübe edilebilir. Desikatör içerisinde inkübasyon mikobakterilerin üremesi için uygun değildir. Çünkü mikobakterilerin üremesi için gerekli oksijen ortamda

bulunmamaktadır. Sıvı besiyerlerinin inkübasyonu için yüksek CO₂ konsantrasyonunun olmasına gerek yoktur. Normal atmosferde inkübe edilmelidirler.

C. Süre: Klinik örneklerin ekildiği besiyerlerinin inkübasyon süresi 6-8 haftadır. Preparat pozitif olan örneklerde üreme olmazsa inkübasyon süresi 4 hafta kadar uzatılmalıdır. Katı besiyerleri inokülasyondan sonra, örnek besiyeri tarafından absorbe edilene kadar yüzeyi yukarı bakacak şekilde eğik konumda bırakılmalı ve sonrasında düz konuma getirilmelidir (29, 59, 88).

2.9.4. Moleküler tanı yöntemleri

Tüberküloz tanısında hala mikroskopik inceleme ve kültür yöntemleri altın standart olmakla birlikte; son yıllarda ilaca dirençli suş izolasyonundaki artış ve bakterinin konvansiyonel yöntemlerle uzun sürede izole edilmesi, hastalığın kontrolünde soruna neden olmuş ve tanı testlerinin geliştirilmesi gerekli hale gelmiştir. PZR gibi amplifikasyon teknikleri ile, bakterinin DNA ve RNA'sı hedeflenerek mikobakteri türleri tanımlanabilmekte ve ilaç direnci olan suşların genetik mutasyonları sekanslama veya hibridizasyon teknikleri ile saptanabilmektedir (3,15, 68).

PZR tekniği ilk kez 1985 yılında Kary Mullis tarafından geliştirilmiş ve daha sonra mikobakterilerin identifikasyonu için kromozomal DNA veya rRNA aranmasına yönelik çeşitli yöntemler bulunmuştur. 1990 yılından itibaren birçok laboratuvarında çeşitli in house PZR teknikleri kullanılmaya başlanmıştır; ancak bu tekniğin hala standardize edilememesi sıklıkla yalancı pozitif ve negatif sonuçlar alınmasına neden olmaktadır (83). Bu nedenle de günümüzde yeni amplifikasyon teknikleri geliştirilmiştir. Bu tekniklerin bir kısmı Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylanmıştır; fakat bir kısmı ile ilgili çalışmalar hala devam etmektedir.

Moleküler yöntemler tercihen preparat pozitif olan hasta örneklerinde MTBC saptanması için kullanılmaktadır. Bu tekniklerin primer amplifikasyon hedefleri, IS 6110 gen dizisi ve 16 S rRNA geni ile 23 S rRNA'dır. Bu testlerin kullanılmasıyla 3-8 saat içinde sonuç almak mümkün olmaktadır.

Gen-Probe tarafından geliştirilmiş Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (San Diego, CA, USA) ve Cobas AMPLICOR MTB Assay (Roch Molecular Systems, Basel, Switzerland) hedef çoğaltma prensibiyle çalışan ve FDA tarafından onaylanmış sistemlerdir (83). Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct

testinin duyarlılığı preparat pozitif örneklerde %91,7-100 arasında iken preparat negatif örneklerde %65,5-92,9'dur. Özgüllüğü ise %98,5-98,9 arasında değişmektedir (2, 54). Cobas AMPLICOR MTB Assay yönteminin duyarlılığı preparat pozitif örneklerde %90-100 arasında değişirken; preparat negatif örneklerde bu oran %50-95,9'a düşmektedir. Sistemin özgüllüğü ise %98,8-99,7 aralığındadır Ancak her iki sistem için de hasta seçimi gereklidir ve duyarlılık-özgüllük oranları ülkelere göre farklılık göstermektedir (10, 20).

Bu sistemlerin haricinde, BD ProbeTec ET (BD Biosciences), QR System Analyser (Organon Teknika), LCx Analyser (Abbott), Q beta replicase amplified probe assay-Galileo versiyon (Downers Grove, IL) testleri de bulunmaktadır.

Moleküler yöntemler direkt tanı dışında identifikasyon amacıyla da başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Katı veya sıvı besiyerlerinde sıklıkla üreyen *M.tuberculosis* kompleksi, *M. avium* kompleksi ve *M.kansasii* gibi mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanabilmeleri için mikobakterilerin rRNA'larına hibridize olan özgül DNA-probları geliştirilmiştir. AccuProbe (Gen -Probe, San Diego, CA) ve Line Probe Assay INNO LIPA Mycobacteria, mikobakterilerin identifikasyonu için uzun süredir kullanılmaktadır (83).

Yeni geliştirilen GenoType MTBC (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany) *M.tuberculosis* kompleksinde yer alan türlerin identifikasyonunda kullanılmaktadır. Multiplex PZR tekniği ile hedef gen bölgeleri çoğaltılarak, strip üzerinde bulunan 11 prob ile hibridizasyon sağlanmakta ve oluşan bant profiline göre tür tanısı yapılabilmektedir. Bu testin özgüllük ve duyarlılığı %70-100 arasındadır (57, 62, 63, 81).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'na tüberküloz tanısı amacıyla gönderilen toplam 700 klinik örnek (322 balgam, 51 bronkoalveolar lavaj sıvısı, 23 açlık mide suyu, 153 idrar, 27 biyopsi, 14 BOS, 34 abse, 36 plevra sıvısı, 40 periton diyaliz sıvısı, eklem sıvısı gibi steril vücut sıvıları) EZN yöntemiyle boyanarak mikroskopta incelenmiş ve örneklerin BACTEC MGIT 960, LJ ve TLA besiyerlerinde kültürü yapılmıştır. Tüm İzolasyon ve identifikasyon işlemleri emniyet kabininde (Heraeus Instrument, Almanya) gerçekleştirilmiştir. İzole edilen suşlar Bactec MGIT p-NBA testi ile *M. tuberculosis* kompleksi veya nontüberküloz mikobakteri olarak tanımlanmış; ancak kesin identifikasyon GenoType MTBC kiti (Hain Lifescience GmbH, Almanya) ile yapılmıştır. Kit ile çalışırken pozitif kontrol olarak ATCC 35822, negatif kontrol olarak su kullanılmıştır.

3.1. Mikroskopi ve Kültür İşlemleri

3.1.1. Mikroskopi ve kültür öncesi işlemler

Tüberküloz tanısı için laboratuvara gönderilen steril olmayan örnekler NALC-NaOH yöntemi kullanılarak dekontamine ve homojenize edilmiştir. Steril örneklere ise bu işlem uygulanmadan direkt preparat hazırlanmış ve besiyerlerine ekim yapılmıştır.

NaOH çözeltisi

Ticari olarak satılan toz halindeki NaOH (MERCK, Darmstadt, Almanya) 40 gr olacak şekilde tartılmış ve 1 lt filtre edilmiş distile su içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra 120⁰C'de 10 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Trisodyom sitrat çözeltisi

Ticari olarak satılan trisodyum sitrat dihidrat (C₆H₅Na₃O₇.2H₂O) (Fluka Chemika, İsviçre) 29 gr olacak şekilde tartılmış ve filtre edilmiş 1 lt distile su içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra 120⁰C'de 10 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir ve hazırlanan bu çözeltiler oda sıcaklığında saklanmıştır.

Dekontaminasyon ve homojenizasyon işlemi için kullanılan NALC-NaOH çözeltisinin hazırlanması

Önceden hazırlanmış NaOH ve trisodyum sitrat çözeltileri steril koşullarda 50'şer ml alınarak karıştırılmıştır. Ticari olarak toz halinde satılan NALC ($C_5H_9NO_3S$) (MERCK, Darmstadt, Almanya)'dan bu karışım içine 0,5gr ilave edilerek çözüldürülmüştür (Tablo 3-1). NALC oksijene duyarlı olup aktivitesini ancak 24 saat koruyabildiği için bu çözelti günlük olarak her dekontaminasyon işlemi öncesi yeniden hazırlanmıştır.

Tablo 3-1: NALC-NaOH solüsyonunun hazırlanması (71).

| Solüsyon hacmi (ml) | %4 NaOH (ml) | %2,9 Sodyum sitrat (ml) | NALC (gr) |
|----------------------------|---------------------|--------------------------------|------------------|
| 50 | 25 | 25 | 0,25 |
| 100 | 50 | 50 | 0,50 |
| 200 | 100 | 100 | 1,00 |
| 500 | 250 | 250 | 2,50 |
| 1000 | 500 | 500 | 5,00 |

Fosfat tamponu

Ticari olarak satılan toz halindeki potasyom fosfat (KH_2PO_4) (Riedel-de Haen, Almanya) ve di-Natriyumhidrojenfosfat-2-hidrat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) (Riedel-de Haen, Almanya)'tan sırasıyla 4,535 gr ve 5,935 gr tartılmış ve 1 lt filtre edilmiş distile su içerisinde çözüldürülerek $120^{\circ}C$ 'de 10 dakika steril edilmiştir. Otoklavlandıktan sonra oda sıcaklığında saklanmıştır.

Yöntem uygulanmadan önce örnekler 50 ml'lik falkon tüplere boşaltılmış ve üzerlerine bir katı olacak şekilde NALC-NaOH solüsyonu ilave edilerek 15 dakika oda

sıcaklığında bekletilmiştir. Sürenin başlangıcında tüpler 30 saniyeyi geçmeyecek şekilde vortekslenmiştir. Süre sonunda 50 ml çizgisine kadar pH 6,8 fosfat tamponu ilave edilen tüpler >3000xg'de 15 dakika satrifüjde çevrildikten sonra üst sıvı içinde dezenfektan bulunan bir kaba boşaltılmıştır.

3.1.2. Erlich-Ziehl Neelsen (EZN) Yöntemi

Karbol fuksin hazırlanması

200 ml %95'lik etil alkol içerisinde 3 gr bazik fuksin çözündürülmüş ve 1 gece oda sıcaklığında bekletilmiştir. 100 ml fenol kristali 1900 ml distile su ile sulandırılmıştır. Bu iki karışım karıştırılıp süzöldükten sonra kullanılmıştır.

Metilen mavisi hazırlanması

1000 ml distile su içerisinde 3 gr metilen mavisi çözündürülmüştür.

Kullanılmamış lamlar üzerine çizilmiş olan 1x2 mm'lik alana, dekontamine ve homojenize edilmiş klinik örneklerin sedimentinden yayılmış ve bu preparatlar havada kurutulduktan sonra 3 kez alevden geçirilerek fikse edilmiştir. Daha sonra lamların tüm yüzeyini kaplayacak şekilde karbol fuksin çözeltisi dökülmüş ve 2 dakika boyunca duman çıkacak şekilde alttan ısıtılmıştır. Lamlar alttan ısıtılırken boyanın kaynamamasına dikkat edilmiştir. Süre sonunda preparat üzerindeki boya kap içerisinde dökülerek lam su ile yıkanmıştır. Daha sonra asit-alkol karışımı ile kırmızı renk akmayıncaya kadar dekolazasyon işlemi uygulanmıştır. Bu işlem sonunda lamlar su ile yıkanmış ve üzerlerine metilen mavisi dökülerek 30 saniye bekletilmiştir. Süre sonunda lamlar su ile yıkanmış ve bir süre kuruması için oda ısısında bekletilmiştir.

Lamlar kuruduktan sonra üzerine 1 damla sedir yağı damlatılarak ışık mikroskopunda immersiyon objektifi (X100) ile incelenmiş ve sonuçlar Tablo 3-2'ye göre değerlendirilmiştir.

Tablo 3-2: Karbol fuksin yöntemiyle boyanmış preparatların değerlendirilmesi ve sonuçların bildirilmesi (70, 78)

| Sonuç | Aside dirençli bakteri sayısı/mikroskop alanı Fuksin boyama (1000X) |
|---|--|
| Aside dirençli bakteri görülmedi | 0 |
| Şüpheli | 1-2/300 |
| 1+ | 1-9/100 |
| 2+ | 1-9/100 |
| 3+ | 1-9/1 |
| 4+ | >9/1 |

3.1.3. Kültür

3.1.3.1. Löwenstein-Jensen besiyeri

1000 ml besiyerinin içeriği;

| | |
|---------------------|--------|
| L-asparagin | 3,6 g |
| Monopotasyum fosfat | 2,5 g |
| Magnezyum sülfat | 0,24 g |
| Sodyum sitrat | 0,6 g |
| Malaşit yeşili | 0,4 g |
| Patates unu | 30 g |
| Gliserol | 12 ml |
| Distile su | 600 ml |
| Yumurta | 400 ml |

Ticari olarak satılan toz halindeki karışım (Acumedia 7245) 37.3 gr olarak tartılmış ve 600 ml distile su içinde çözündürülerek 12 ml gliserol ilave edildikten sonra Koch kazanında 100 °C'de eritilmiş ve otoklavda 120 °C'de 15 dakika steril edilmiştir. Besiyeri 50-60 °C'ye kadar soğutulduktan sonra karışımın üzerine, steril şartlarda hazırlanmış, homojenize edilmiş, 1000 ml yumurta ilave edilerek çalkalanmış ve 6-8 ml olacak şekilde steril 15 ml'lik burgulu kapaklı tüplere bölünmüştür. İçinde besiyeri bulunan tüpler yatık bir şekilde koagülatör içerisine yerleştirilmiş ve 85 °C'de 1 saat bekletilerek koagüle edilmiş ve bu işlem üç gün üst üste tekrarlanmıştır. Sterilizasyon kontrolü yapıldıktan sonra besiyerleri +4 °C'de saklanmıştır.

3.1.3.2. Bactec MGIT 960 besiyeri

Ticari olarak satılan, içerisinde 7 ml modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri bulunan ve dip kısmı 16x100 mm'lik alanda yer alan flouresan içerikli bir silikon ile kaplı BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) 960 besiyerleri kullanılmıştır.

Besiyeri içeriği;

- Modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri.....5,9 g/l
- Kazein pepton.....1,25 g/l

BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube, 110 µl flouresan indikatörü ve 7 ml sıvı besiyeri içermektedir. İndikatör kısmında silikon içinde 4,7-diphenyl-1, 10-phenanthroline rutenyum chloride pentahydrate bulunmaktadır.

Liyofilize antibiyotik karışımı olan BBL MGIT PANTA içerisine 15 ml BACTEC MGIT Growth Supplement ilave edilerek çözülmüş ve ekim işlemi öncesinde her tüp içerisine 0,8 ml olacak şekilde ilave edilmiştir.

PANTA içeriği;

- Polimiksin B.....6000 units/l
- Amfoterisin B.....600 µg/l
- Nalidiksik asit.....2400 µg/l
- Trimetoprim.....600 µg/l
- Azlosilin.....600 µg/l

BACTEC MGIT Growth Supplement içeriği;

| | |
|------------------------------------|----------|
| Sığır albümini..... | 50 g/l |
| Dekstroz..... | 20 g/l |
| Polioksietilen stearat (POES)..... | 1,1 g/l |
| Katalaz..... | 0,03 g/l |
| Oleik asit..... | 0,1 g/l |

3.1.3.3. Thin layer 7H11 agar (TLA) besiyeri

900 ml besiyerinin içeriği;

| | |
|-----------------------------|----------|
| Pancreatic digest of casein | 1 gr |
| Monopotasyum fosfat | 1,5 gr |
| Disodyum fosfat | 1,5 gr |
| Monosodyum glutamat | 0,5 gr |
| Amonyum sülfat | 0,5 gr |
| Sodyum sitrat | 0,4 gr |
| Ferrik amonyum sitrat | 0,04 gr |
| Magnezyum sülfat | 0,05 gr |
| Çinko sülfat | 0,001 gr |
| Bakır sülfat | 0,001 gr |
| Piridoksin | 0,001 gr |
| Agar | 13,5 gr |
| Biyotin | 0,5 mg |
| Kalsiyum klorid | 0,5 gr |
| Malaşit yeşili | 0,25 gr |

Ticari olarak satılan toz halindeki Middlebrook 7H11 agar (Becton Dickinson, USA) 19 gr olarak tartılmış ve 900 ml distile su içinde çözüldürülerek otoklavda 120 °C'de 10 dakika steril edilmiş ve 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra üzerine 100 ml

oleik asit-albümin-dekstroz-katalaz (OADC), 50 mg piperacillin, 20 mg amphotericin B ve 20 mg trimetoprim ilave edilmiştir. Hazırlanan besiyeri 60 X 15 cm'lik Petri kutularına 5 ml olacak şekilde bölünmüştür (66). Besiyerleri yüzeylerinin kuruması için oda sıcaklığında 24 saat bekletildikten sonra +4 °C'de saklanmıştır.

Steril olarak kabul edilmeyen örnekler kültür öncesi uygulanan işlemlerden sonra, steril örnekler direkt olarak bir adet Löwenstein-Jensen (LJ) besiyerine 0,2 ml, bir adet Thin-Layer 7H11 (TLA) besiyerine 0,1 ml ve bir adet BACTEC MGIT 960 besiyerine 0,5 ml olacak şekilde ekilmiştir.

Löwenstein-Jensen besiyeri 36 °C'de normal atmosferde, Thin-Layer 7H11 agar besiyeri 36 °C'de %10 karbondioksitli ortamda 6 hafta süresince inkübe edilmiştir. LJ besiyerleri haftada 1 kez makroskopik olarak incelenmiş ve koloni oluşumu takip edilmiştir. Oluşan kolonilerden preparat hazırlanmış, preparatlar EZN yöntemiyle boyanıp mikroskopta incelenerek aside dirençli bakteri varlığı araştırılmıştır. TLA besiyerleri ise haftada 2 kez olmak üzere 6 hafta boyunca mikroskop altında incelenerek mikrokoloni varlığı araştırılmıştır. Mikrokolonilerin morfolojisi ve kord oluşturma eğilimine bakılarak *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi açısından ön değerlendirme (ön identifikasyon) yapılmıştır. BACTEC MGIT 960 besiyerleri ekim işleminden sonra cihaz içerisine yerleştirilmiş ve 40 gün süresince inkübe edilmiştir. Üreme olan besiyerlerinden preparat hazırlanarak EZN yöntemiyle boyanmış ve aside dirençli bakteri varlığı araştırılmıştır. Bu sistemde izole edilen mikobakteriler p-NBA (paranitrobenzoik asit) testi ile *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi ve nontüberküloz mikobakteriler olarak tanımlanmıştır.

3.1.4. İdentifikasyon

3.1.4.1. BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, Sparks, MD)

Bu sistemde üreyen suşlar *M. tuberculosis* kompleksi ve nontüberküloz mikobakteriler olarak tanımlanmıştır.

p-NBA reaktifinin hazırlanması

İlk olarak 5 ml distile su içerisine 1 ml HCl ilave edilmiştir. Ayrı bir tüp içerisinde 5 ml distile suya 0,5 gr NaOH ilave edilerek çözülmüştür.

80 ml distile su içerisine 4 gr p-NBA ve 1 gr NaOH eklenerek sarı renkli (pH nötr) bir çözelti hazırlanmış ve pH indikatörü olarak kullanılan phenolphthaleinden 1

damla damlatılıp renk pembeye dönmüştür. Daha sonra rengin tekrar sarıya dönmesi için önceden hazırlanmış HCl solüsyonundan damlatılmış ve beyaz çökelti oluşmuştur. Çökelti yok oluncaya kadar karıştırılmış ve çökeltinin tamamen çözünmediği durumda ise önceden hazırlanan NaOH solüsyonundan damlatılmıştır. Hazırlanan solüsyonun rengi sarı olana kadar bu işlemler yapılmış ve daha sonra son hacim distile su eklenerek 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan bu reaktif küçük şişelere bölünerek 120 °C'de 10 dakika otoklavlanmış, daha sonra +4 °C'de saklanmıştır.

p-NBA testi

Üreme olan her BACTEC MGIT 960 besiyeri için 2 tüp hazırlanmıştır. Bu tüplerin biri kontrol; diğeri ise p-NBA testi için kullanılmıştır. Her iki tüpe Growth Supplement/MGIT PANTA antibiyotik karışımından 0,5'er ml eklenmiştir. p-NBA işaretli tüp içerisine 0,1 ml p-NBA reaktifi eklenmiştir. Üreme olan BACTEC MGIT 960 besiyerinden distile su ile ¼ oranında sulandırım yapılmış ve bu sulandırmadan her iki tüpe 0,5'er ml eklenmiştir. Tüpler cihaza yerleştirilmiş ve kontrol tüpünün üreme indeksi 400'e ulaşınca cihaz sinyal vermiştir. p-NBA test tüpünün üreme indeksi 10 ise izole edilen bakteri *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi, >10 ise nontüberküloz mikobakteri olarak değerlendirilmiştir.

3.1.4.2. GenoType MTBC (Hain Lifescience GmbH, Almanya)

DNA izolasyonu

2 ml'lik ependorf tüpüne BACTEC MGIT 960 besiyerinden 1 ml aktarılmış ve 15 dakika 10000 xg'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra üst sıvı atılmış ve bakteri peleti 300 µl steril distile su içerisinde vortekslenerek çözülmüştür. Bu şekilde hazırlanmış bakteri süspansiyonu 95 °C'de 20 dakika ısı bloğunda ve daha sonra 15 dakika ultrasonik su banyosunda inkübe edilmiştir. Bu işlemlerden sonra bakteri duvarı parçalanarak açığa çıkan DNA'yı elde etmek için örnekler 5 dakika son hızda (13000 xg) santrifüj edilip süpernatanttan 5 µl alınarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) işleminde kullanılmıştır.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Önce PZR master miksi (45 µl) Tablo 3-3'te verilen miktarlar doğrultusunda hazırlanmıştır.

Tablo 3-3: PZR master miksi

| Reaktif | Miktar |
|----------------------------|---------------|
| PN miks (PNM) | 35µl |
| 10x PZR buffer | 5 µl |
| MgCl ₂ | 4 µl |
| Distile su | 1 µl |
| TaqGold polymerase | 0,4 µl |
| Örnek | 5 µl |
| Toplam PZR reaksiyon hacmi | 50,4 µl |

Örnekler Tablo 3-3'te verilen miktarlara göre hazırlanan PZR miksi ile karıştırıldıktan sonra Tablo 3-4'te belirtilmiş PZR programına ayarlanmış PZR cihazına yerleştirilmiş ve 2 saat 15 dakika süresince PZR işlemi yapılmıştır.

Tablo 3-4: PZR programı

| | PZR öncesi | PZR | | PZR | | | Son Uzama |
|-------------------------|-------------------|------------|-------|------------|-------|-------|------------------|
| Sıcaklık (°C) | 95 °C | 95 °C | 58 °C | 95 °C | 53 °C | 70 °C | 70 °C |
| Süre (dakika:sn) | 05:00 | 00:30 | 02:00 | 00:25 | 00:40 | 00:40 | 08:00 |
| Döngü sayısı | 1 | 10 | | 20 | | | |

Hibridizasyon

Ön işlemler;

- a.Çalkalamalı su banyosunun ısısı 45 °C'ye ayarlanmıştır.
- b.Hibridizasyon (HYB) ve yıkama (STR) solüsyonları 37 °C'ye kadar ısıtılmıştır.
- c.Konjugat-c (CON-C) ve substrat-c (SUB-C) (+4 °C'de korundu) dışındaki solüsyonlar oda sıcaklığında bekletilerek ısıtılmıştır.
- d. Uygun tüpler kullanılarak CON-C ve SUB-C konsantreleri kendi sulandırma solüsyonları ile 1:100 oranında sulandırılmıştır.
 1. 20 µl denatürasyon (DEN) solüsyonu, tablanın örneklerin çalışılacağı kuyucuklarının köşelerine pipetlenmiştir.
 - 2.PZR ile çoğaltılmış örneklerden 20 µl alınarak DEN solüsyonuna ilave edilmiş, oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir.
 3. Tablanın örneklerin koyulduğu kuyucuklarına dikkatlice önceden ısıtılmış 1 ml HYB solüsyonu ilave edilip renk elde edilene kadar çalkalanmıştır.
 4. Stripler kuyucuklara dikkatli bir şekilde yerleştirilmiş ve bu işlem sırasında ters dönmüş stripler olmuşsa temiz pipet ucu yardımıyla düzeltilmiştir.
 5. Tabla önceden hazırlanan karıştırıcıda 45 °C'de 30 dakika çalkalanarak inkübe edilmiştir.
 6. Bu işlem sonunda hibridizasyon solüsyonu kuyucuklardan atık kabına dökülerek tamamen boşaltılmıştır.
 7. Her bir kuyucuğa 1 ml STR solüsyonu eklenmiş ve 15 dakika 45 °C'de çalkalanarak inkübe edilmiştir.
 8. Süre sonunda STR solüsyonu kuyucuklardan atık kabına dökülerek boşaltılmış ve kuyucuklar içerisinde kalan bir miktar sıvı, tabla ters çevrilerek üst ucu kurutma kağıdına emdirilerek uzaklaştırılmıştır.
 9. Herbir kuyucuktaki strip üzerine 1 kez 1ml yıkama solüsyonu (RIN) eklenip 1 kere çalkalanarak yıkanmış ve bu sıvı bir önceki maddede anlatıldığı gibi dökülerek boşaltılmıştır.

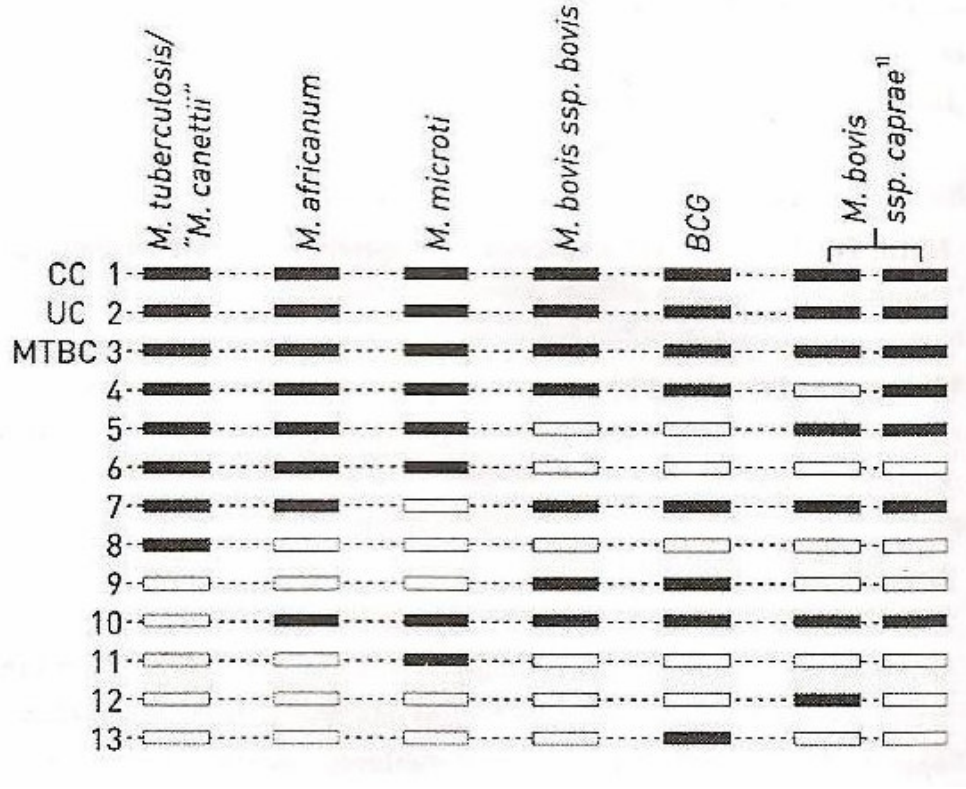
10. Kuyucuklardaki striplerin üzerine 1 ml daha önceden sulandırılmış konjugat eklenip 30 dakika çalkalanarak inkübe edilmiştir.
11. İnkübasyon sonrası konjugat dökülerek boşaltılmış ve her bir strip 2 kez 1 ml RIN, 1 kez de 1 ml distile su ile 1'er dakika çalkalanarak yıkanmıştır.
12. Her bir strip üzerine 1 ml daha önceden sulandırılmış substrat solüsyonu eklenerek oda ısısında bantların oluşmasına göre 3 ile 20 dakika arasında çalkalamadan inkübe edilmiştir.
13. Stripler iki kez distile su ile yıkanarak bant oluşma işlemi sonlandırılmıştır.
14. Tüm bu işlemlerden sonra stripler kuyucuklardan alınarak kurutma kağıdı arasında konulup kurutulduktan sonra değerlendirmeye alınmıştır.

Geno Type MTBC Sonuç Değerlendirilmesi

Aşağıdaki koşulların sağlandığı durumlarda çalışma değerlendirilmeye alınmıştır.

- 1- Konjugat kontrol bandının oluşması
- 2- Genel kontrol: Bilinen tüm mikobakterileri ve yüksek G+C içeriği olan Gram pozitif bakterileri tanımlanmaktadır. Eğer konjugat kontrol ve genel kontrol bantları oluşmuş ama mikobakterilere özgü diğer band patternleri oluşmamışsa bakteri türünü tanımlamak için ek yöntemler uygulanmalıdır. Band oluşum gücü, genel kontrol kadar veya daha güçlü ise, band patternleri değerlendirmeye alınmıştır.
- 3- Tür kontrol: Oluşabilecek band paterni *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi olduğunu göstermektedir.

Tablo 3-5: Çalışma sonunda çıkabilecek paternler



Band no 1 (CC): Konjugat kontrol

Band no 2 (UC): Genel kontrol

Band no 3 (MTBC): MTBC spesifik band

¹¹: Sağ taraftaki band paterni %5 *M. bovis ssp caprae*'i gösterir.

3.2. İstatistiksel analiz

Preparat sonucu ile kültür yöntemlerindeki pozitiflik arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olup olmadığı Fisher's Exact testi ile, besiyerlerindeki izolasyon süresi ile preparat sonuçları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olup olmadığı Mann-Whitney U testi ile ve besiyerleri arasında preparat sonucuna bakılmaksızın sadece izolasyon süresi açısından anlamlı fark olup olmadığı Post Hoc Dunns testi ile hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'na tüberküloz tanısı amacıyla gönderilen toplam 700 klinik örnek (322 balgam, 51 bronkoalveolar lavaj sıvısı, 23 açlık mide suyu, 153 idrar, 27 biyopsi, 14 BOS, 34 abse, 36 plevra sıvısı, 40 periton diyaliz sıvısı, eklem sıvısı gibi steril vücut sıvıları) incelenmiştir. Yediyüz klinik örneğin 46 (%6,57)'sından mikobakteri izole edilmiş (en az bir besiyerinden) olup 26 (%53,28) suş solunum yolundan alınan örneklerde, 20 (43,47) suş solunum yolu dışından alınan örneklerde üremiştir.

Tablo 4-1: Örnek türüne göre mikobakterilerin izolasyon oranları.

| Örnek Türü | Pozitif/Toplam örnek sayısı | Pozitiflik oranı (%) |
|----------------------|-----------------------------|----------------------|
| Balgam | 23/322 | % 7,14 |
| BAL | 3/51 | % 5,88 |
| Plevra sıvısı | 0/36 | % 0 |
| Abse | 11/34 | % 32,35 |
| AMS | 3/23 | % 13,04 |
| İdrar | 1/153 | %0,65 |
| Biyopsi | 1/27 | % 3,70 |
| BOS | 1/14 | % 7,14 |
| Diğer sıvılar | 3/40 | % 7,50 |
| Toplam | 46/700 | % 6,57 |

AMS: Açlık mide suyu; BAL: Bronkoalveolar lavaj sıvısı; BOS: Beyin omurilik sıvısı; Diğer sıvılar: asit sıvısı, eklem sıvısı, ejekulat, perikard ponksiyon sıvısı, transtrakeal aspirat, periton diyaliz sıvısı, toraks mayii.

Kültürü pozitif bulunan 46 örneğin 17 (%36,95)'sinin preparatı da pozitif bulunmuştur. Mikobakterilerin izole edildiği örnek türleri, örnek türüne göre preparat pozitifliği ve izole edildikleri besiyerlerine göre dağılımları Tablo 4-2'de gösterilmiştir.

Tablo 4-2: Mikobakterilerin izole edildiği örnek türleri, örnek türüne göre preparat pozitifliği ve izole edildikleri besiyerlerine göre dağılımları.

| Klinik örnek (n=46) | Preparat (+) | LJ | TLA | BACTEC MGIT 960 |
|--------------------------------|---------------------|-----------|------------|----------------------------|
| Balgam (23) | 12 | 10 | 16 | 23 |
| İdrar (1) | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Abse (11) | 3 | 10 | 11 | 10 |
| Biyopsi (1) | - | 1 | 1 | 1 |
| BOS (1) | - | - | 1 | 1 |
| BAL (3) | 1 | 1 | 2 | 3 |
| Asit sıvısı (2) | - | 2 | 2 | 2 |
| Ekleme sıvısı (1) | - | - | 1 | 1 |
| Açlık Mide Suyu (3) | - | 1 | 3 | 3 |
| TOPLAM (46) | 17 | 26 | 38 | 45 |

LJ: Löwentein-Jensen; TLA: Thin layer agar.

Kültür sonucu pozitif bulunan 26 solunum yolu örneğinin 13 (%50,0)'ünün preparatı da pozitif olarak bulunmuş; LJ besiyerinde 11, TLA besiyerinde 18 ve BACTEC MGIT 960 sisteminde 26 örnekte pozitiflik saptanmıştır. Kültür sonucu

pozitif bulunan ve solunum yolu dışından alınan 20 örneğin ise 4 (%20)'ünde preparat pozitifliği saptanmış ve LJ besiyerinde 15, TLA besiyerinde 20, BACTEC MGIT 960 besiyerinde 19 örnekte pozitiflik belirlenmiştir.

Preparat sonucu ile kültür yöntemlerindeki pozitiflik arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olup olmadığı Fisher's Exact testi kullanılarak hesaplanmıştır. LJ ve MGIT 960 besiyerindeki üreme oranları ile preparat sonucunun pozitif ya da negatif olması arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki görülmezken ($p>0,05$); TLA besiyerindeki üreme oranları ile preparat sonucunun pozitif olması arasında anlamlı derecede bir ilişki olduğu görülmüştür ($p<0,05$), (Tablo4-3).

Preparat sonucu pozitif örneklerin her üç besiyerindeki üreme oranları birbirine yakinken, preparat sonucu negatif örneklerin LJ besiyerindeki üreme oranı diğer besiyerlerinden oldukça düşük bulunmuştur. İstatistiksel açıdan anlamlı bir fark olup olmadığı yeterli sayıda pozitif örnek olmadığı için hesaplanamamıştır (Tablo 4-3).

Tablo 4-3: Preparat sonucuna göre besiyerlerinde görülen üreme oranları.

| Preparat pozitifliği | Örnek sayısı | Pozitif sayısı (%) | | |
|----------------------|--------------|--------------------|-------------|-----------------|
| | | TLA | LJ | BACTEC MGIT 960 |
| ++++ | 1 | 1 (%100) | - | 1 (%100) |
| +++ | 2 | 2 (%100) | 1 (%50) | 2 (%100) |
| ++ | 6 | 6 (%100) | 5 (%83,33) | 6 (%100) |
| + | 8 | 8 (%100) | 6 (%75) | 8 (%100) |
| Negatif | 29 | 21 (%72,41) | 14 (%48,27) | 28 (%96,55) |

Besiyerlerindeki izolasyon süresi ile preparat sonuçları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olup olmadığı Mann-Whitney U testi kullanılarak hesaplanmış ve her üç besiyeri için de preparat sonucu pozitif örneklerde izolasyon süresinin

preparat sonuc negatif örneklere göre anlamlı derecede kısa olduğu saptanmıştır ($p<0,05$), (Tablo 4-4).

Besiyerleri arasında preparat sonucuna bakılmaksızın sadece izolasyon süresi açısından anlamlı fark olup olmadığını saptamak amacıyla Post Hoc Dunns testi kullanılmıştır. TLA ve BACTEC MGIT 960 besiyerlerinin arasında izolasyon süresi açısından anlamlı bir fark görülmezken ($p>0,05$); LJ besiyerindeki izolasyon süresinin bu iki besiyerine oranla anlamlı derecede uzun olduğu saptanmıştır ($p<0,05$).

Tablo 4-4: Besiyerlerinde ortalama üreme zamanı.

| Besiyeri | Preparat pozitif Üreme süresi (gün) | Preparat negatif Üreme süresi (gün) | P* |
|------------------------|--|--|-----------|
| BACTEC MGIT 960 | 8,94 (6-13) | 15,85 (4-32) | <0,05 |
| LJ | 22,25 (13-31) | 27,85 (21-41) | <0,05 |
| TLA | 7,70 (5-12) | 14,28 (4-24) | <0,05 |

*: Mann-Whitney U testi

Besiyerleri izolasyon ve kontaminasyon oranları açısından değerlendirildiğinde; en yüksek kontaminasyon oranının LJ besiyerinde, en düşük kontaminasyon oranının da TLA besiyerinde olduğu; en yüksek izolasyon oranının BACTEC MGIT 960 besiyerinde, en düşük izolasyon oranının LJ besiyerinde olduğu saptanmıştır (Tablo 4-5).

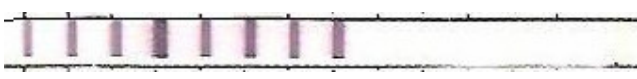
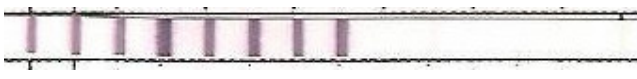



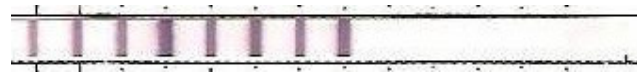
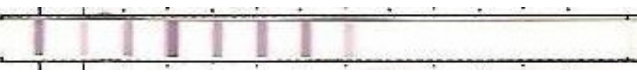
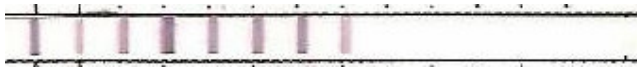




Tablo 4-5: LJ, BACTEC MGIT 960 ve TLA besiyerlerinde izolsayon ve kontaminasyon oranları.


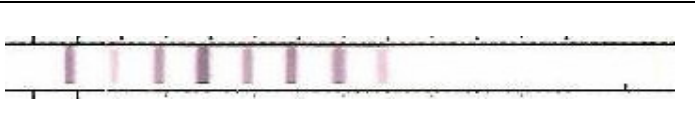
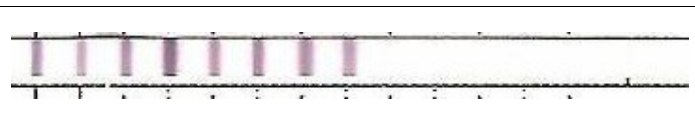
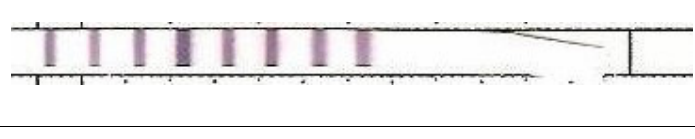
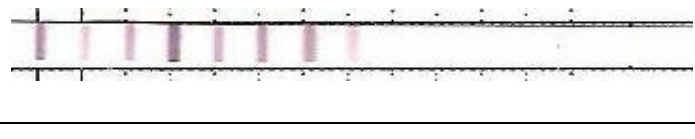
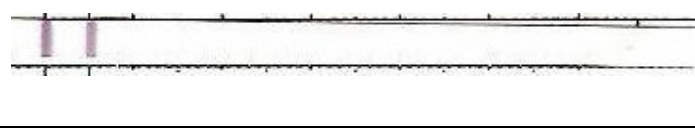
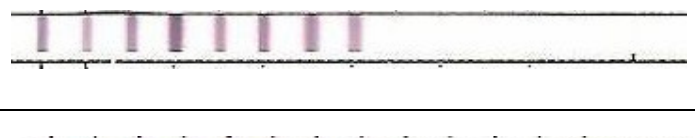

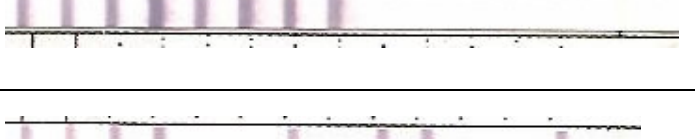
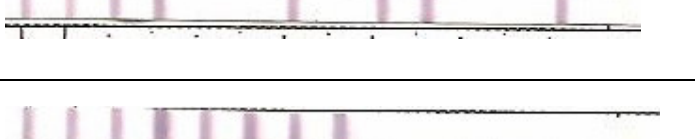
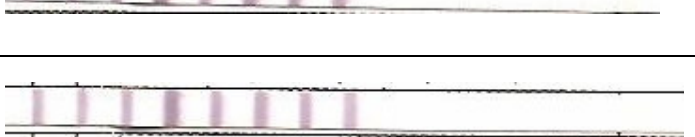

| | LJ | BACTEC MGIT 960 | TLA |
|----------------------------|--------------|-----------------|-------------|
| İzolasyon oranı | 26 (%60,86) | 45 (%97,82) | 38 (%82,60) |
| Kontaminasyon oranı | 106 (%15,14) | 58 (%8,28) | 41 (%5,85) |

Klinik örneklerden izole edilen mikobakteriler GenoType MTBC kiti kullanılarak tanımlanmıştır. Çalışmada besiyerleri izolasyon süresi ile izolasyon ve kontaminasyon oranları açısından karşılaştırıldığı için 14 mükerrer örnek çalışma dışı bırakılmamış; ancak identifikasyon aşamasında aynı hastaya ait örneklerden izole edilen bu 14 suş çalışma kapsamına alınmayarak sadece 32 suş identifiye edilmiştir. Pozitif kontrol olarak ATCC 35822 suşu, negatif kontrol olarak saf su kullanılmıştır. Çalışma sonunda 27 suş *M. tuberculosis*, 2 suş nontüberküloz mikobakteri, 2 suş *M. bovis* ve 1 suş *M. bovis* BCG olarak identifiye edilmiştir. İdentifiye edilen bakterilerin band profilleri Tablo 4-6'da gösterilmiştir.

Tablo 4-6: İzole edilen 32 mikobakteri suşunun identifikasyon sonuçları.

| Örnek türü | CC UC MTBC 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 M | Bakteri türü |
|----------------|--------------------------------------|-----------------------|
| 1 Balgam | | <i>M.tuberculosis</i> |
| 2 Balgam | | <i>M.tuberculosis</i> |
| 3 Assit Sıvısı | | <i>M.tuberculosis</i> |
| 4 BOS | | <i>M.bovis</i> |

| | | | |
|----|--------------------|--|----------------|
| 5 | Balgam |  | M.tuberculosis |
| 6 | Balgam |  | M.tuberculosis |
| 7 | Balgam |  | M.tuberculosis |
| 8 | Balgam |  | M.tuberculosis |
| 9 | Balgam |  | M.tuberculosis |
| 10 | Balgam |  | M.tuberculosis |
| 11 | Abse |  | M.tuberculosis |
| 12 | Abse |  | M.tuberculosis |
| 13 | İdrar |  | M.tuberculosis |
| 14 | Balgam |  | M.tuberculosis |
| 15 | Eklemler sıvısı |  | M tuberculosis |
| 16 | Balgam |  | M.tuberculosis |

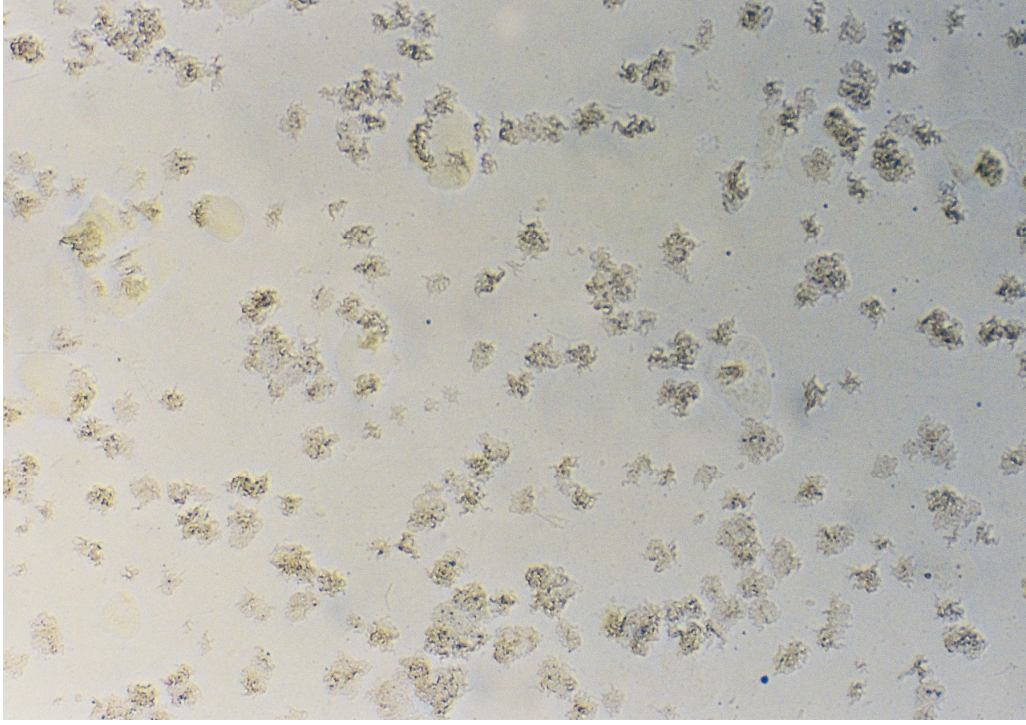
| | | | |
|----|-------------|--|---------------------------|
| 17 | Balgam |  | Nontüberküloz mikobakteri |
| 18 | Abse |  | M.tuberculosis |
| 19 | Asit sıvısı |  | M.tuberculosis |
| 20 | Abse |  | M.tuberculosis |
| 21 | Balgam |  | M.tuberculosis |
| 22 | Balgam |  | Nontüberküloz mikobakteri |
| 23 | BAL |  | M.tuberculosis |
| 24 | Abse |  | M.tuberculosis |
| 25 | BAL |  | M.tuberculosis |
| 26 | Biyopsi |  | BCG |
| 27 | Balgam |  | M.tuberculosis |
| 28 | AMS |  | M.tuberculosis |

| | | | |
|----|------------------------------|--|----------------|
| 29 | Abse | | M.tuberculosis |
| 30 | Periton diyaliz sıvısı | | M.tuberculosis |
| 31 | BAL | | M.tuberculosis |
| 32 | Abse | | M.bovis |
| 33 | ATCC 35822 | | Mtuberculosis |
| 34 | (-) kontrol | | |

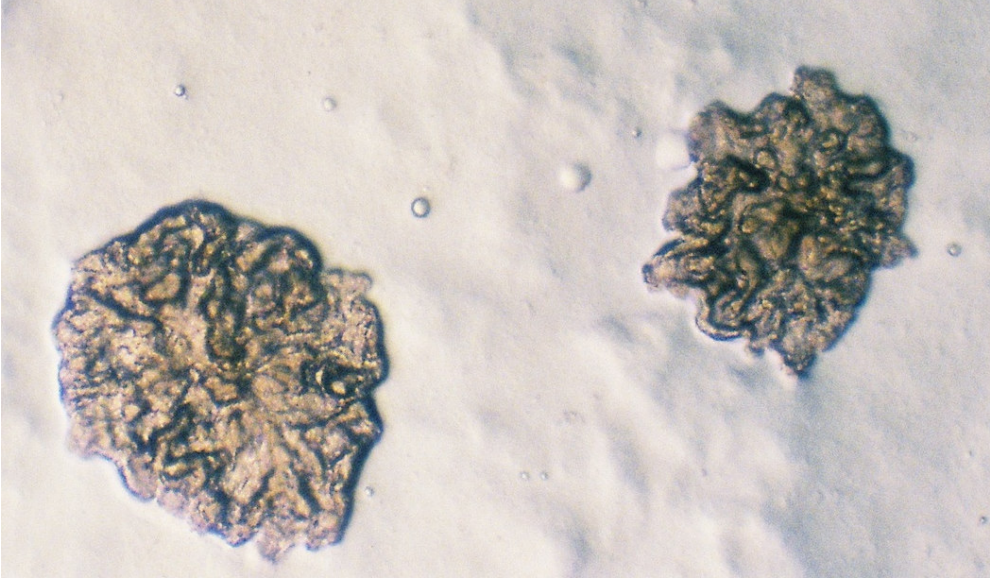
TLA besiyerinde üreyen 38 mikobakteri suşunun kenarları düzensiz koloni oluşturduğu ve yüzeylerinin kord formunda olduğu belirlenmiş ve bu suşlar *M.tuberculosis* kompleksi olarak tanımlanmıştır. Ancak GenoType MTBC ile yapılan identifikasyonda bir suş nontüberküloz mikobakteri olarak tanımlanmıştır. Çalışmada tek bir TLA besiyerinden nontüberküloz mikobakteri izole edildiği için MTBC ve nontüberküloz mikobakteri kolonileri arasındaki fark gözlenememiş; ancak tüm MTBC suşlarının kenarları düzensiz koloni oluşturduğu ve üzerlerinin kord şeklinde görüldüğü belirlenmiştir. Şekil 4-1, 4-2 ve 4-3'te TLA besiyerinde üreyen mikobakterilerin 100X büyütme ile 3'üncü, 8'inci ve 15'inci günlerde görülen mikrokoloni morfolojisi gösterilmiştir. Mikobakterilerin koloni morfolojisinin diğer bakteri kolonilerinden belirgin şekilde farklı olduğu ve kolayca ayırt edilebildiği gözlenmiştir.

TLA besiyeri, preparat sonucu pozitif örneklerden mikobakteri izolasyon oranının yüksek olması, izolasyon süresinin kısa olması, otomatize sistemlerden daha ucuz olması ve mikobakterilerin ön identifikasyonuna olanak sağlaması gibi avantajları nedeniyle tüberküloz yükünün fazla olduğu sosyo-ekonomik düzeyi düşük ülkelerde

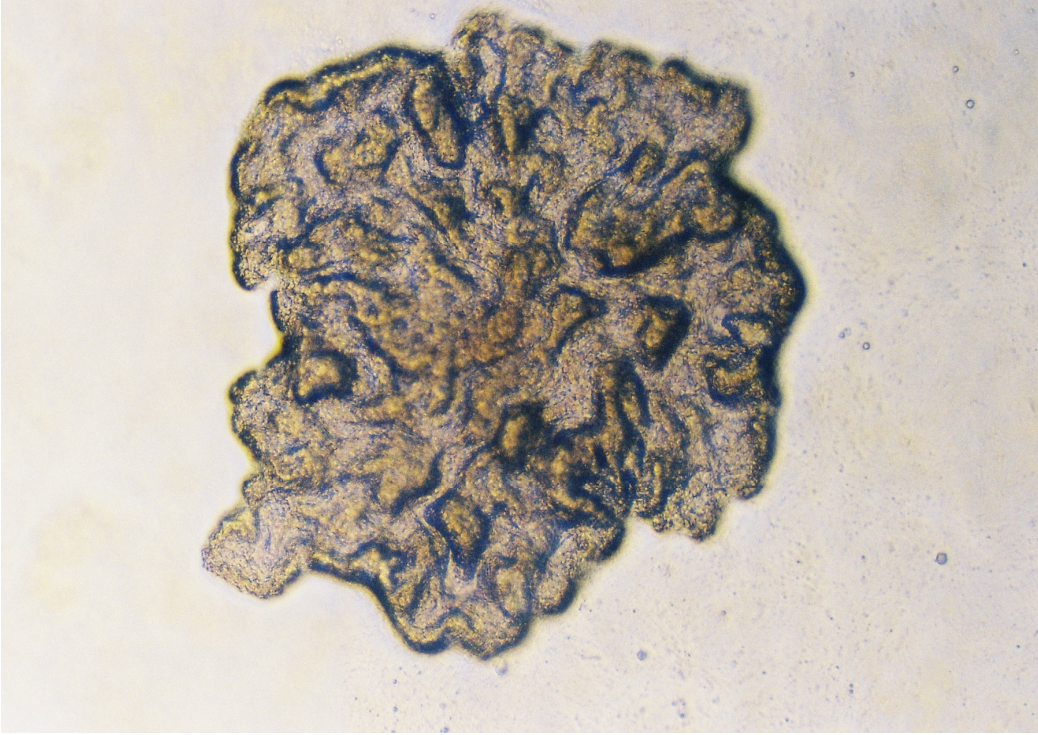
tercih edilebilecek bir besiyeridir. Ancak ekim yapılmış besiyerlerinin incelenmesi uzun zaman aldığı için, iş yükünün fazla olduğu laboratuvarlarda kullanılmasının uygun olmadığı düşünülmektedir.



Şekil 4-1: TLA besiyerinde en erken 3 günde görülen mikrokoloni morfolojisi.



Şekil 4-2: TLA besiyerinde 8. günde mikrokoloni morfolojisi.



Şekil 4-3: TLA besiyerinde 15. günde mikrokoloni morfolojisi

5. TARTIŞMA

Tüberkülozun kontrolünde hızlı tanı ve tedavi uygulamaları bulaşma riskini önemli ölçüde azaltmaktadır (32). Tüberküloz tanısında ilk basamak aside dirençli boyama yöntemlerinin uygulanmasıdır. Ancak yetersiz bakteri içeren akciğer ve akciğer dışı tüberkülozlu hastaların örneklerinde duyarlılığının düşük olduğu bildirilmektedir (18). Konvansiyonel tanıda kullanılan yumurta temelli Löwenstein-Jensen, Petraghani ve American Trodeau Society besiyerlerinde kültür süresi 6-8 hafta olmakla birlikte, mikobakteriler ancak 18-21 günde izole edilmektedir (71, 72). Bunların yanısıra agar temelli Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11 besiyerleri de tanıda kullanılmaktadır. Bu besiyerlerinin kültür süreleri de 6-8 hafta olmakla beraber, besiyerleri mikroskop altında incelendiğinde ortalama 10-12 günde mikobakteri mikrokolonilerini görmek mümkündür (59).

Son yıllarda özellikle gelişmiş ülkelerde yeni tanı tekniklerinin ortaya koyulması için çalışmalar sürdürülmektedir. Günümüzde birçok laboratuvarında rutin incelemede konvansiyonel besiyerlerinin yanısıra, tüberküloz etkeni bakterilerin izolasyon süresini kısaltan ve yüksek izolasyon oranı sağlayan hızlı kültür sistemleri kullanılmaktadır. Bu sistemlerin birçoğunda sıvı besiyerleri kullanılırken, katı ve bifazik besiyerlerinin kullanıldığı sistemler de bulunmaktadır. Hızlı kültür sistemleri arasında yer alan yarı otomatize Bactec 460 TB, uzun yıllardır başarı ile kullanılan bir sistemdir. Günümüzde alternatif izolasyon sistemlerin de geliştirilmiştir ve yenileri için çalışmalar devam etmektedir. Bugün var olan sistemler arasında tam otomatize BACTEC MGIT 960, Versa Trek, MB/BacT, Bactec 9000 MB kültür sistemleri bulunmaktadır. Bu sistemler arasında izolasyon oranı açısından önemli bir fark olmamakla birlikte; konvansiyonel katı besiyerlerine göre daha yüksek, Bactec 460 TB sistemine göre daha düşük oranda izolasyon sağladıkları bildirilmektedir. Bir çok çalışmada tam otomatize sistemlerde izolasyon süresi ortalama ≤ 14 gün olarak saptanmış (5, 11, 71) ve en yüksek izolasyon oranının Bactec 460 TB ve katı besiyeri kombinasyonu ile sağlandığı bildirilmiştir (78). Kontaminasyon oranları açısından tam otomatize sistemler birbiri ile karşılaştırıldığında önemli bir fark bulunmamıştır (1, 11, 45). Bununla birlikte bu sistemlerdeki kontaminasyon oranının Bactec 460 TB ve katı besiyerlerine göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (5, 14, 71). Ancak pahalı cihaz gerektiren bu tekniklerin tüberküloz

prevalansının yüksek olduğu ülkelerde kullanılması için yeterli mali kaynak bulunmamaktadır. Son yıllarda geliştirilen moleküler yöntemler de identifikasyonda ve epidemiyolojik araştırmalarda başarıyla kullanılmaktadır. Ancak tüberkülozun en sık görüldüğü fakir ülkelerde bu tekniklerin de kullanımı için yeterli mali kaynak bulunmamaktadır (66).

Tüm bu nedenlerden dolayı maliyeti düşük, hızlı ve güvenilir mikobakteri kültür sistemlerinin ve besiyerlerinin geliştirilmesi için çalışmalar sürdürülmektedir. Bu besiyerlerinden biri olan Thin Layer 7H11 agar (TLA); Middlebrook 7H11 besiyeri içerisine antibiyotik karışımı (piperasilin, amphoteresin B, trimetoprim) ve oleik asit-albumin-dekstrozu-katalaz (OADC) ilave edilerek hazırlanan modifiye bir besiyeridir. Bu besiyerinde mikobakteriler tarafından oluşturulan mikrokoloniler erken dönemde (yaklaşık 10-11 gün) görülebilmekte, koloni morfolojisi ve kord oluşturma eğilimine göre ön identifikasyon yapılabilmektedir (52,89).

Yapılan çalışmalarda TLA besiyeri ile konvansiyonel yöntemlerin izolasyon oranları karşılaştırılmış ve preparat sonucu pozitif örneklerde bu oranın aynı, preparat sonucu negatif örneklerde ise farklı olduğu bildirilmiştir (52, 66).

Robledo ve ark.'nın (66) 2006 yılında yaptıkları çalışmada 1118 örneğin 190 (%16,99)'ında üreme olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, preparat sonucu pozitif örneklerin hem TLA hem LJ besiyerlerinde pozitif sonuç verdiği, negatif örneklerin %4,4'ünün TLA besiyerinde, %3,2'sinin LJ besiyerinde pozitif olduğu belirlenmiştir.

Mejia ve ark. (52)'nin 1999 yılında yaptıkları çalışmada, 761 örneğin 84 (%11,03)'ünde pozitiflik saptanmıştır. Preparat sonucu pozitif örneklerin tümü hem LJ hem TLA besiyerlerinde; negatif örneklerin ise % 4,57'si LJ besiyerinde, %2,18'i TLA besiyerinde pozitiflik vermiştir.

Welch ve ark. (89)'nin 1993 yılında 270 suş ile yaptıkları çalışmada TLA besiyerinde suşların %83'ü, LJ ve Middlebrook 7H11 besiyerlerinde %93'ünün ürediğini bildirmişlerdir.

Srisuwanvilai ve ark. (73)'nin 2008 yılında 2566 örnek ile yaptıkları ve BACTEC MGIT 960 ile LJ besiyerlerini karşılaştırdıkları çalışmada, 1417 (%55,22) örnekte mikobakterilerin ürediğı, preparat sonucu pozitif olan 1044 örneğin %87'sinin BACTEC MGIT 960 sisteminde, %77'sinin LJ besiyerinde ürediğı bildirilmiştir.

Preparat sonucu negatif olan 1522 örneğin ise %30'unun BACTEC MGIT 960 sisteminde, %14'ünün LJ besiyerinde pozitiflik verdiği belirlenmiştir.

Badak ve ark. (5)'nin 1996 yılında yaptıkları çalışmada, 1441 örneğin 178 (%12,35)'inde üreme saptanmıştır. Preparat sonucu negatif olan 85 örneğin %75,2'sinin BACTEC MGIT 960'da, %72,9'unun, BACTEC 460 TB'de, %58,8'inin LJ besiyerinde pozitif olduğu bildirilmiştir. Preparat sonucu pozitif 93 örneğin ise %94,6'sının BACTEC MGIT 960'da, %95,7'sinin BACTEC 460 TB'de, %93,5'inin LJ besiyerinde pozitif olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada kullanılan besiyerleri izolasyon oranları açısından karşılaştırıldığında, preparat sonucu pozitif örneklerde fark gözlenmemiş; ancak preparat sonucu negatif örneklerde BACTEC MGIT 960 ve BACTEC 460 TB sistemlerinde izolasyon oranının LJ besiyerinden anlamlı derecede fazla olduğu gözlenmiştir.

Togneri ve ark. (79)'nin 2000 yılında yaptıkları çalışmada, preparat pozitif örneklerin BACTEC MGIT 960 besiyeri ile %85'inden, LJ/Stonebring besiyerlerinin birlikte kullanılmasıyla %92'sinden mikobakteri izole edildiği bildirilmiştir. Preparat negatif örneklerdeki izolasyon oranının, BACTEC MGIT 960 sistemi ile %25,3; LJ besiyeri ile %88,2, Stonebrink besiyeri ile %70,6 olduğu saptanmıştır. Bu çalışma ile BACTEC MGIT 960 sisteminin, diğer besiyerleri ile birlikte kullanılmasının, izolasyon oranını artırmadığı gösterilmiştir.

Chien ve ark. (14)'nin 2000 yılında 365 örnek ile yaptıkları çalışmada, 124 mikobakteri izole edilmiş ve BACTEC MGIT 960 besiyerindeki kültür pozitifliği %94, LJ besiyerinde %75,8 olarak bildirilmiş, iki besiyeri arasında izolasyon oranları açısından anlamlı derecede fark olduğu saptanmıştır.

Hanna ve ark. (35)'nin 1999 yılında 353 örnek ile yaptıkları çalışmada 362 mikobakteri izole edilmiş ve izolasyon oranının BACTEC MGIT 960 ile % 80, BACTEC 460 TB ile % 75, katı besiyerleri (LJ, Middlebrook 7H11 agar) ile %69 olduğu bildirilmiştir.

Somoskovi ve ark. (72)'nin 1999 yılında yaptıkları çalışmada 486 örneğin 117(%24,07)'sinde kültür pozitifliği saptanmış ve bakterilerin 112'sinin *M. tuberculosis* olduğu bildirilmiştir. BACTEC MGIT 960 sisteminin izolasyon oranının %79,5; MB Redox'un %71,8; LJ besiyerinin %62,4; Middlebrook 7H11 besiyerinin ise %58,1 olduğu gözlenmiştir. Çalışmada BACTEC MGIT 960 sisteminin izolasyon oranı ile;

hem LJ hem de Middlebrook 7H11 besiyelerinin izolasyon oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark saptanmıştır.

Lee ve ark. (47)'nin 2003 yılında yaptığı çalışmada, BACTEC MGIT 960 sisteminde izolasyon oranının %100, LJ besiyerinde %87,2 ve Middlebrook 7H11 besiyerinde % 75,7 olduğu bildirilmiştir. BACTEC MGIT 960 sisteminde izolasyon oranının diğer besiyelerinden anlamlı derecede fazla olduğu bulunmuştur.

Gil-Setas ve ark. (32)'nin 2004 yılında 2110 örnek ile yaptıkları çalışmada LJ, MB/BacT ve Middlebrook 7H11 besiyeleri kullanılmış ve 159 suş izole edilmiştir. Bu suşların 86'sı LJ besiyerinde, 99'u Middlebrook 7H11 besiyerinde ve 100'ü MB/BacT sisteminde üremiştir.

Somoskovi ve ark. (71)'nin 2000 yılında yaptıkları çalışmada 377 örneğin 57 (%15,11)'inde pozitiflik olduğu bildirilmiş; BACTEC MGIT 960 sisteminde %94,6, BACTEC 12B besiyerinde %92,7 ve LJ besiyerinde %81,8 oranında pozitiflik olduğu saptanmıştır. BACTEC MGIT 960 ile LJ besiyelerinin izolasyon oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark olduğu bildirilmiştir.

Chew ve ark. (13)'nin 1998 yılında yaptıkları çalışmada 603 örneğin 109 (%18,07)'unda pozitiflik saptanmış ve BACTEC MGIT 960 sisteminde izolasyon oranının %93, BACTEC 460 TB sisteminde %95, LJ besiyerinde %87 olduğu bildirilmiştir. LJ ile diğer besiyeleri arasında, izolasyon oranları açısından anlamlı derecede fark olduğu gösterilmiştir.

Tortolli ve ark. (81)'nin 1999 yılında yaptıkları çalışmada 2567 örneğin 236 (%9,19)'sında pozitiflik saptanmış; BACTEC MGIT 960 sisteminin izolasyon oranının %80, BACTEC 460 TB sisteminin %85, LJ besiyerinin %71 olduğu belirlenmiştir. Bu üç sistemin izolasyon oranları arasında anlamlı bir fark bulunmadığı bildirilmiştir.

Macondo ve ark. (51)'nin 2000 yılında yaptıkları çalışmada BACTEC MGIT 960 sisteminin izolasyon oranı %91,9, LJ besiyerinin ise %54,9 olarak bildirilmiştir.

Rivera ve ark. (65)'nin 1997 yılında yaptıkları çalışmada BACTEC MGIT 960 sisteminde izolasyon oranının %99,2 ve LJ besiyerinde %89,3 olduğu saptanmıştır.

Rishi ve ark. (64)'nin 2007 yılında yaptıkları çalışmada 500 örneğin 258 (%51,6)'inde pozitiflik saptanmış ve BACTEC MGIT 960 sisteminin izolasyon oranı %50,6 (256/500), LJ besiyerinin ise %33,6 (165/500) olarak belirlenmiştir.

Ataş ve ark. (4)'nın 2003 yılında akciğer tüberkülozu olduğu düşünülen 22 hastanın balgam örnekleri ile yaptığı çalışmada, tüm örneklerin preparat inceleme sonuçlarının negatif olduğu ve örneklerin %31,8'inin BACTEC MGIT 960 sisteminde, %27,2'sinin LJ besiyerinde pozitif sonuç verdiği bulunmuştur.

Levidiotou ve ark. (48)'nin 1999 yılında yaptıkları çalışmada BACTEC MGIT 960 sisteminde mikobakteri izolasyon oranının %89,65, LJ besiyerinde ise %80,46 olduğu bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmada iki besiyeri arasında izolasyon oranı açısından anlamlı bir fark bulunmadığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'na gelen 700 örnek incelenmiş ve bu örneklerin 46 (%6,57)'sında üreme saptanmıştır. Preparat inceleme sonucu pozitif olan 17 örneğin tümü hem TLA hem BACTEC MGIT 960 besiyerlerinde, 12 (%70,50)'si LJ besiyerinde pozitif sonuç vermiştir. Preparat inceleme sonucu negatif olan 26 örneğin 14 (%48,27)'ü LJ besiyerinde, 21 (%72,41)'i TLA besiyerinde, 28 (%96,55)'i ise BACTEC MGIT 960 besiyerinde pozitif sonuç vermiştir. Çalışmamızda preparat inceleme sonucu pozitif olan örneklerin TLA ve LJ besiyerlerinden izolasyon oranları, Robledo ve ark.(66) ile Mejia ve ark. (52)'nin yaptıkları çalışmalardaki bulgulardan farklılık göstermektedir. Çalışmamızda, preparat inceleme sonucu negatif örneklerin bu besiyerlerindeki üreme oranları, Robledo ve ark. (66)'nin çalışmasındaki bulgularla uyumluluk gösterirken, Mejia ve ark.(52)'nin yaptıkları çalışmada elde edilen bulgulara göre farklı bulunmuştur.

Çalışmamızda en yüksek izolasyon oranı BACTEC MGIT 960 sistemiyle sağlanmış ve bu sistemin kullanıldığı çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (5, 14, 73). Ancak Togneri ve ark.(79)'nin çalışmasında BACTEC MGIT 960 sisteminde izolasyon oranının LJ besiyerinden daha düşük olduğu bildirilmiştir. Ekimden önce örneklerin Petroff yöntemi ile işlenmesinin izolasyon oranını etkilediği düşünülmüştür.

Yapılan çalışmalar tüberküloz etkeni bakterilerin izolasyon süresinin, preparat inceleme sonucuna bakılmaksızın TLA besiyeri ve BACTEC MGIT 960 sisteminde, konvansiyonel besiyerlerine (LJ) göre daha kısa olduğunu göstermektedir (53, 66, 73, 89).

Mejia ve ark. (52)'nin 1999 yılında yaptıkları çalışmada mikobakteri izolasyon süresinin preparat inceleme sonucu pozitif örneklerde TLA besiyerinde $10,1 \pm 8,1$ gün,

LJ besiyerinde $20 \pm 5,7$ gün; negatif örneklerde ise TLA besiyerinde $18,7 \pm 9$ gün, LJ besiyerinde $29,6 \pm 8,26$ gün olduğu bildirilmiştir.

Welch ve ark. (89)'nın 1995 yılında yaptıkları çalışmada konvansiyonel yöntemlerle (LJ ve Middlebrook 7H11) bakterinin izolasyon süresinin ortalama 23 gün, TLA besiyeri ile ortalama 11 gün olduğu gözlenmiştir.

Mejia ve ark. (53)'nin 2004 yılında yaptıkları çalışmada TLA besiyeri için ortalama izolasyon süresinin 11 gün ve LJ besiyeri için 26,5 gün olduğu saptanmıştır.

Robledo ve ark. (66)'nin 2006 yılında yaptıkları çalışmada TLA besiyeri ile ortalama tanı süresi 11,5 gün, LJ besiyeri ile ise 30,5 gün olarak belirlenmiştir.

Yapılan tüm çalışmalar TLA besiyerinde mikobakteri izolasyon süresinin, LJ besiyerinden daha kısa olduğunu göstermektedir (52, 53, 66, 89).

Srisuwanvilai ve ark. (73)'nin 2008 yılında BACTEC MGIT 960 ve LJ besiyerlerini karşılaştırdıkları çalışmada mikobakterilerin izolasyon sürelerinin; preparat inceleme sonucu pozitif örneklerde sırasıyla 9 ve 26 gün, preparat inceleme sonucu negatif örneklerde ise 14 ve 35 gün olduğu gözlenmiştir.

Somoskovi ve ark. (71)'nin 2000 yılında yaptıkları çalışmada preparat inceleme sonucu pozitif örneklerden mikobakterilerin izolasyon süresinin BACTEC MGIT 960 sisteminde ortalama 12,6 gün, BACTEC 12B besiyerinde 13,8 gün, LJ besiyerinde ise 20,1 gün; preparat inceleme sonucu negatif örneklerde ise BACTEC MGIT 960 besiyerinde 15,8 gün, BACTEC 12B besiyerinde 17,7 gün ve LJ besiyerinde 42,2 gün olduğu bildirilmiştir.

Somoskovi ve ark. (72)'nin 1999 yılında yaptıkları çalışmada preparat inceleme sonucu pozitif örneklerde mikobakterilerin üreme sürelerinin BACTEC MGIT 960 sisteminde ortalama 7,2 gün, MB Redox sisteminde 6,9 gün, LJ besiyerinde 20,4 gün ve Middlebrook 7H11 besiyerinde 17,6 gün; preparat inceleme sonucu negatif olan örneklerden izolasyon süresinin ise sırasıyla 19, 15, 28 ve 21 gün olduğu saptanmıştır.

Levidiotou ve ark. (48)'nin 1999 yılında yaptıkları çalışmada, BACTEC MGIT 960 ve LJ besiyerlerinin ortalama izolasyon süresi preparat sonucu pozitif örneklerde sırasıyla 8 ve 30 gün, preparat sonucu negatif örneklerde ise sırasıyla 15 ve 30 gün olarak bildirilmiştir.

Togneri ve ark. (79)'nın 2000 yılında yaptıkları çalışmada preparat inceleme sonucu pozitif olan örneklerde mikobakterilerin izolasyon süresi BACTEC MGIT 960 sisteminde 18,7 gün, LJ ve Stonebreak (S) besiyerlerinde 20,6 gün; preparat inceleme sonucu negatif olan örneklerde ise sırasıyla 29, 38,5 ve 26,5 gün olarak belirlenmiştir.

Hanna ve ark. (35)'nin 1999 yılında yaptıkları çalışmada mikobakterilerin izolasyon süresinin BACTEC MGIT 960 sisteminde 14,4 gün, BACTEC 460 TB sisteminde 15,2 gün ve katı besiyerlerinde (LJ, Middlebrook 7H11) 24 gün olduğu bildirilmiştir.

Rishi ve ark. (64)'nin 2007 yılında yaptıkları çalışmada mikobakterilerin üremesi için gereken zamanın BACTEC MGIT 960 sisteminde ortalama 9,66 gün, LJ besiyerinde ise 28,81 gün olduğu belirlenmiştir.

Ataş ve ark. (4)'nin 2003 yılında yaptıkları çalışmada, BACTEC MGIT 960 sisteminde mikobakterilerin izolasyonu için gerekli ortalama sürenin 13,28 gün, LJ besiyerinde ise 27,33 gün olduğu bildirilmiştir.

Tortoli ve ark. (81)'nin 1999 yılında yaptıkları çalışmada BACTEC MGIT 960 sisteminde mikobakterilerin ortalama izolasyon süresinin 13,3 gün, BACTEC 460 TB sisteminde 14,8 gün ve LJ besiyerinde 25,6 gün olduğu saptanmıştır.

Badak ve ark. (5)'nin 1996 yılında yaptıkları çalışmada ortalama izolasyon süresinin BACTEC MGIT 960 sisteminde 11 gün, BACTEC 460 TB sisteminde ise 8 gün olduğu bildirilmiştir.

Chien ve ark. (14)'nin 2000 yılında yaptıkları çalışmada mikobakteri izolasyon süresinin BACTEC MGIT 960 sisteminde 10,7 gün, LJ besiyerinde ise 30,6 gün olduğu bildirilmiştir.

Gil-Setas ve ark. (32)'nin 2004 yılında yaptıkları çalışmada mikobakteri izolasyon süresinin Middlebrook 7H11 besiyerinde 11 gün, MB/BacT besiyerinde 16 gün ve LJ besiyerinde 19,5 gün olduğu saptanmıştır.

Chew ve ark. (13)'nin 1998 yılında yaptıkları çalışmada BACTEC MGIT 960, BACTEC 460 TB ve LJ besiyerlerinde ortalama izolasyon süresinin sırasıyla *M. tuberculosis* kompleksi (MTBC) için 22, 14 ve 27 gün olduğu bildirilmiştir.

Lee ve ark. (47)'nin 2003 yılında yaptıkları çalışmada BACTEC MGIT 960 ve LJ besiyerlerinde MTBC ortalama izolasyon süresi sırasıyla 11,6 ve 20,1 gün olarak bildirilmiştir.

Macondo ve ark. (51)'nin çalışmasında MTBC'nin ortalama izolasyon süresi BACTEC MGIT 960 sisteminde 10,5 gün ve LJ besiyerinde 20,1 gün olarak bildirilmiştir.

Rivera ve ark. (65)'nin 1997 yılında yaptıkları çalışmada MTBC'nin izolasyon süresinin BACTEC MGIT 960 sisteminde ortalama 15,7 gün ve LJ besiyerinde ortalama 29,9 gün olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda preparat inceleme sonucu pozitif örneklerde mikobakterilerin ortalama izolasyon süreleri BACTEC MGIT 960 sisteminde 8,94 gün, TLA besiyerinde 7,70 gün ve LJ besiyerinde 22,25 gün; preparat inceleme sonucu negatif örneklerde ise sırasıyla ortalama 15,85, 14,28, 27,85 gün olarak saptanmıştır. İstatistiksel analiz sonucunda preparat inceleme sonucu pozitif olan örneklerde izolasyon süresinin negatif örneklere göre anlamlı derecede kısa olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Üreme süresi açısından besiyerleri birbiriyle karşılaştırıldığında, LJ besiyerinde üreme süresinin diğer besiyerlerine oranla anlamlı derecede uzun olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar yapılan tüm çalışmalarla uyumluluk göstermiştir. Preparat sonucuna bakılmaksızın TLA ve BACTEC MGIT 960 sisteminde izolasyon süresinin benzer olduğu görülmüştür ($p>0,05$).

Tüberküloz etkeni bakterilerin izolasyonu için kullanılan besiyerlerinde kontaminasyon oranları yapılan çalışmalarda farklılıklar göstermektedir (35, 52, 66).

Robledo ve ark. (66)'nin 2006 yılında yaptıkları çok merkezli bir çalışmada LJ ve TLA besiyerleri kullanılmış ve bu besiyerlerinin kontaminasyon oranlarının farklı laboratuvarlarda değişik oranlarda olduğu bildirilmiştir. Kontaminasyon oranları LJ besiyerinde %3 (%1,1-9,9) ve TLA besiyerinde %5,1 (%2,7-9,5) olarak belirtilmiştir.

Mejia ve ark. (52)'nin yaptıkları çalışmada TLA besiyerinde kontaminasyon oranının %16,5 olduğu bildirilmiştir.

Hanna ve ark. (35)'nin 1999 yılında otomatize sistemler ve konvansiyonel yöntemleri kullanarak yaptıkları çalışmada, kontaminasyon oranları BACTEC MGIT

960 için %8,1, BACTEC 460 TB için %4,9, katı besiyerleri (LJ ve Middlebrook 7H11) için ise %21,2 olarak bildirilmiştir.

Rishi ve ark. (64)'nın 2007 yılında BACTEC MGIT 960 ve LJ besiyerlerini kullanarak yaptıkları çalışmada, kontaminasyon oranları sırasıyla %13,4 ve %27,2 olarak saptanmıştır.

Badak ve ark. (5)'nin 1996 yılında BACTEC MGIT 960, BACTEC 460 TB ve LJ besiyerleri kullanarak yaptıkları çalışmada kontaminasyon oranlarının sırasıyla %5,7, %3,9 ve %6,7 olarak bildirilmiştir.

Tortolli ve ark. (81)'nin 1999 yılında yaptıkları çalışmada BACTEC MGIT 960 sisteminde kontaminasyon oranı %10, LJ besiyerinde kontaminasyon oranı %17 olarak bildirilmiştir.

Somoskovi ve ark. (71)'nin 2000 yılında yaptıkları çalışmada ise LJ besiyerinde kontaminasyon oranının (%1,2) BACTEC MGIT 960 (%3,7) ve BACTEC 460 TB (%2,9) otomatize sistemlerinden daha düşük olduğu bildirilmiştir.

Srisuwanvilai ve ark. (73)'nin 2008 yılında yaptıkları çalışmada, LJ besiyerinde kontaminasyon oranının (%10) BACTEC MGIT 960 sisteminden (%12) daha düşük olduğu saptanmıştır.

Chien ve ark. (14)'nin 2000 yılında yaptıkları çalışmada kontaminasyon oranları, BACTEC MGIT 960 sistemi için %5,5 iken LJ besiyeri için %4,1 olarak bildirilmiştir.

Lee ve ark. (47)'nin 2003 yılında yaptıkları çalışmada kontaminasyon oranları BACTEC MGIT 960 sistemi için %15,1, LJ besiyeri için %10,1 ve Middlebrook 7H11 besiyeri için %9,7 olarak bildirilmiştir.

Levidiotou ve ark. (48)'nin 1999 yılında yaptıkları çalışmada kontaminasyon oranları BACTEC MGIT 960 ve LJ besiyerleri için sırasıyla %8,8 ve %3 olarak bildirilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan BACTEC MGIT 960 sistemi, LJ ve TLA besiyerlerindeki kontaminasyon oranları %8,28, %15,14 ve %5,85 olarak saptanmıştır. TLA besiyerinde kontaminasyon oranı Robledo ve ark. (66)'nin yaptıkları çalışmadaki oran ile uyumluluk gösterirken, Mejia ve ark. (52)'nin çalışmasındaki orandan daha

düşüktür. Çalışmamızda TLA besiyerindeki kontaminasyon oranı, LJ besiyerinden daha düşük bulunurken, diğer iki çalışmada TLA besiyerindeki kontaminasyon oranının daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda BACTEC MGIT 960 sisteminde kontaminasyon oranının LJ besiyerinden daha düşük olduğu saptanırken Somoskovi ve ark. (71), Srisuwanvilai ve ark. (73), Chien ve ark. (14), Lee ve ark. (47), Levidiotou ve ark. (48)'nın yaptıkları çalışmalarda BACTEC MGIT 960 sistemde kontaminasyon oranının LJ besiyerinden daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Hanna ve ark. (35), Rishi ve ark. (64), Badak ve ark. (5), Tortolli ve ark. (81)'nin çalışmalarında bulunan kontaminasyon oranları çalışmamızdaki oranlarla uyumluluk göstermektedir. Besiyerlerindeki kontaminasyon oranları arasındaki bu farklılığın, çalışan kişilerin ekim işlemi sırasındaki çalışma koşullarına ve çalışma kurallarına uyup uymamalarına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalarda TLA besiyerinde üreyen mikobakterilerin, koloni morfolojisi ve kord oluşturma eğilimlerine göre ön identifikasyonunun yapılabileceği bildirilmektedir (52, 66, 89). Welch ve ark. (89)'nin yaptıkları çalışmada MTBC kolonilerinin kenarlarının düzensiz ve yüzeylerinin kord şeklinde görüldüğü; nontüberküloz mikobakteri kolonilerinin ise düzgün kenarlı, ortası koyu, kenarları açık renkte, sahanda yumurta görünümünde olduğu bildirilmiştir. Robledo ve ark. (66)'nin yaptıkları çalışmada ise az sayıda nontüberküloz mikobakteri izole edildiği için koloni morfolojisindeki farkın gözlenemediği belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda da TLA besiyerinde sadece bir nontüberküloz mikobakteri ürediği için MTBC ve nontüberküloz mikobakteri kolonileri arasındaki fark gözlenememiş; ancak tüm MTBC suşlarının kenarlarının düzensiz koloni oluşturduğu ve üzerlerinin kord şeklinde görüldüğü belirlenmiştir.

TLA besiyeri, preparat sonucu pozitif örneklerden mikobakteri izolasyon oranının yüksek olması, izolasyon süresinin kısa olması, otomatize sistemlerden daha ucuz olması ve mikobakterilerin ön identifikasyonuna olanak sağlaması gibi avantajları

nedeniyle tüberküloz yükünün fazla olduğu sosyo-ekonomik düzeyi düşük ülkelerde tercih edilebilecek bir besiyeridir. Ancak ekim yapılmış besiyerlerinin incelenmesi uzun

zaman aldığı için, iş yükünün fazla olduğu laboratuvarlarda kullanılmasının uygun olmadığı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Alcaide F, Benitez MA, Martin R, Escriba JM. Evaluation of the BACTEC MGIT 960 and MB BAC/T system for routine detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3131-3132.
2. Alcalá L, Ruiz-Serrano MJ, Hernangomez S et al. Evaluation of the upgraded amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test (Gen-Probe) for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and non-respiratory specimens. *Diagn Microbial Infect Dis* 2001; 41: 51-56.
3. Arnold J. Molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin microbiol infect* 2007; 13: 120-128.
4. Ataş E ve ark. Akciğer tüberkülozünün erken tanısında Lowenstein-Jensen (LJ) besiyeri ile mycobacteria growth indicator tube (MGIT) yöntemlerinin karşılaştırılması. *Toraks Derg* 2003; 4 (2): 138-142.
5. Badak FZ, Kısa DL, Setterquist S et al. Comparison mycobacteria growth indicator tube with BACTEC 460 for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1996; 34 (9): 2236-2239.
6. Barrera L. The basics of clinical bacteriology. In Palomino JC, Leao SC, Ritacco V, editors. *Tuberculosis 2007 Brazil*; 2007; pp: 93-112.
7. Bates JH, Stead WW. The history of tuberculosis as a global epidemic. *Med Clin North Am* 1993; 77: 1205-1217.
8. Beran V, Havelkova M, Kaustova J, Dvorska L, Pavlik I. Cell wall deficient forms of mycobacteria: a review. *Veterinarni Medicina* 2006; 51 (7): 365-389.
9. Bilgehan H. *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. Fakülteler Kitapevi, Barış Yayınları, İzmir. 3. Baskı, 2002:571-595.
10. Bogard M, Vincelette J, Antinozzi R, et al. Multicenter study of a commercial, automated polymerase chain reaction system for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimen in routine clinical practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20: 724-731.

11. Brunello F, Favari F, Fontana R. Comparison of the MB/BacT and BACTEC 460 TB Systems for Recovery of Mycobacteria from Various Clinical Specimens. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (4): 1206-1209.
12. Center for Disease Control. Multidrug resistant tuberculosis outbreak on an HIV ward-Madrid Spain, 1991-1995. *MMWR Morb Mort Wkly Rep* 1996; 45: 330-333.
13. Chew WK, Lasaitis RM, Schio FA, Gilbert GL. Clinical evaluation of the mycobacteria growth indicator tube (MGIT) compared with radiometric (BACTEC) and solid media for isolation of mycobacterium species. *J Med Microbiol* 1998; 47 (9): 821-827.
14. Chien HP, Yu MC, Wu MH, Lin TP, Luh KT. Comparison of the BACTEC MGIT 960 with Löwenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4 (9): 866-870.
15. Cho S, Brennan PJ. Tuberculosis: diagnostics. *Tuberculosis* 2007; 87: 14-17.
16. Coban AY, Bilgin K, Uzun M et al. Susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin on blood agar. *J Clin microbiol* 2005; 43: 1930-1931
17. Coban AY, Cihan CC, Bilgin K et al. Blood agar for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against first-line drugs. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006; 10: 450-453.
18. Colenbunders R, Bastian I. A review of the diagnosis and treatment of smear-negative pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4(2): 97-107.
19. Corbett EL, Charalombous S, Moloji VM et al. Human immunodeficiency virus and the prevalence of undiagnosed tuberculosis in African gold miners. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;673-9.
20. D'amato RF, Wallman AA, Hochstein LH et al. Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis by using Roch AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* PCR test. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1832-1834.
21. Daniel TM. The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine* 2006; 100: 1862-1870.

22. Drancourt M, Carrieri P, Gevaudan MJ, Raoult D. Blood agar and *Mycobacterium tuberculosis*: the end of a dogma. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1710-1711.
23. Draper P, Daffe M. The cell envelope of mycobacterium tuberculosis with special reference to the capsule and outer permeability barrier. In Tuberculosis and the Tubercle bacillus. ASM Press, Washington DC 2005, pp:261-173.
24. Drobniowski F A, Caws M, Gibson A, Young D. Modern Laboratory diagnosis of tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 141-147.
25. Dye C. Global epidemiology of tuberculosis. *Lancet* 2006; 367: 938-940.
26. Esen N. Tüberkülozda konak patojen ilişkileri. 6. Ulusal mikobakteri sempozyum kitabı. Kızılcahamam, Ankara; 2006. S.121-126.
27. Evans CC. Historical background. In: PDO Davies editor. Clinical tuberculosis. Second edition London, UK 1998; pp:1-20.
28. Fitzgerald D, Haas DW. *Mycobacterium tuberculosis*. In: Mandell GL, Bennett JE, and Dolin R, editors. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th edition. Churchill Livingstone. An imprint of elsevier 2005: 2852-2886.
29. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS: Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. Elevent Edition, US 2002. pp: 538-571.
30. Gandhi N, Moll A, Pawinski R, Zeller K, Lalloo U, Friedland G. Favorable outcomes of integration of TB and HIV treatment in a rural South Africa: the Sizonqoba study. Toronto: XVI International AIDS Conference, 2006 (abstr MOPE0181).
31. Gandhi NR, Moll A, Sturm AW, Pavinski R, Govender T, Lalloo U, Zeller K, Andrews J, Friedland G. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in rural area of South Africa. *Lancet*. 2006; 368 (9547): 1575-80.
32. Gil- Setas A, Torraba L, Fernadez JL, Martinez-Artola V, Ollite J. Evaluation of the MB/BacT system with Middlebrook 7H11 and Lowenstein-Jensen media for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Clinl Microbiol and Infect*. 2004; 10 (3): 224-228.

33. Gooze L, Daley CL. Tuberculosis and HIV. *HIV InSite Knowledge Base Chapter* 2003. erişim: 03.05.2008.
34. Gümüşlü F, Özkara ř, Özkan S, Baykal F, Güllü Ü. Türkiye’de verem savaşı, 2007 raporu. Verem Savaşı Dairesi Başkanlığı. Ankara 2007.
35. Hanna BA et al. Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (3): 748-752.
36. Hernandez-Pando R, Chacon-Salinas R, Serfin-Lopez J, Estrada İ. Immunology, pathogenesis, virulence. İn: Palomino JC, Leao SC, Ritacco V, editors. *Tuberculosis* 2007 Brazil; 2007. pp. 157-206.
37. Herzog H. History of Tuberculosis. *Respration* 1998; 65: 5-15.
38. <http://web.uct.ac.za/depts/mmi/lsteyn/cellwall.html>. 1996. erişim: 19 mayıs 2008.
39. Jenkins PA. The microbiology of tuberculosis. İn: Editor PDO Davies. Clinical tuberculosis. London, UK 1998; p: 69-81.
40. Johnson MD, Decker CF. Tuberculosis and HIV infection. *Dis Mon* 2006; 52: 420-427.
41. Kevin P, Ellner F, Ellner JJ. *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. İn: Gorchbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR editors. Lippincott Willams & Wilkins, Philadelphia 2004. pp.2184-90.
42. Kocabaş A. Akciğer Tüberkülozu. İçinde Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, editörler. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002. s. 358-391.
43. Kurutepe M, Yurderi G, Tümer O, Çağşayan B, Kazgöl N, Arman B. HIV seropositivity among patients with pulmoner tuberculosis. *Tuberg Lung Dis* 1994; 75 (1): 3.
44. Lakshmi V, Patil MA, Subhadha K, Himabindu V. Isolation of mycobacteria Bactec 460 TB system from clinical specimens. *Ind J of Med Microbiol* 2006; 24(2):124-126.

45. Laverdiere M, Poirier L, Weiss K, Beliveau C, Bedard L, Desnoyers D. Comparative Evaluation of the MB/BacT and BACTEC 460 TB systems for the detection of mycobacteria from clinical specimens: clinical relevance of higher recovery rates from broth-based detection systems. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 36: 1-5.
46. Leao SC, Portaels F. History. In: Palomino JC, Leao SC, Ritacco V, editors. *Tuberculosis 2007 Brazil*; 2007. pp.25-52
47. Lee JJ, Suo J, Lin CB, Wang JD, Lin TY, Tsai YC. Comparative evaluation of the BACTEC MGIT 960 system with solid medium for isolation of mycobacteria. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; 7 (6): 569-674 .
48. Levidiotou S, Papamichael D, Gessouli E et al. Detection of mycobacteria in clinical specimen using the mycobacteria growth indicator tube (MGIT) and the Löwestein Jensen medium. *Microbiol Res* 1999; 154 (2): 151-155.
49. Levinson W. Mycobacteria. In Malley J, Pancotti R, Davis K. Editors. *Review of Medical Microbiology and Immunology USA*; McGraw-Hill Companies; 2004. pp.161-168.
50. Maartens G, Wilkinson R. Tuberculosis. *Lancet* 2007; 370: 2030-2043.
51. Macondo EA, Ba F, Toure-Kane NC et al. Improvement of tuberculosis diagnosis by the mycobacteria growth indicator tube (MGIT) in a developing country laboratory. *Bull Soc Pathol Exot* 2000; 93 (2): 97-100.
52. Mejia GI, Castrillon L, Trujillo H, Robledo JA. Microcolony detection in 7H11 thin layer culture is an alternative for rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 1999; 3(2): 138-142.
53. Mejia GI, Guzman A, Agudelo CA et al. Five year experience with thin layer agar medium for rapid diagnosis of tuberculosis. *Biomedica* 2004; 24 (1): 52-59.
54. Miller N, Hernandez SG, Clearly TJ. Evaluation of Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test and PCR for direct detection of

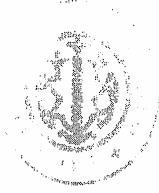
- Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 393-397.
55. Montoro E, Rodriguez R. Global Burden of *Tuberculosis*. In: Palomino JC, Leao SC, Ritacco V, editors. *Tuberculosis 2007 Brazil*; 2007. pp. 263-282.
56. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. Fifth edition. US 2005. pp: 297-310.
57. Neonakis IK, Gitti Z, Petinaki E et al. Evaluation of the GenoType MTBC assay for differentiating 120 clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26: 151-152.
58. Palmero DJ. Tuberculosis and HIV/AIDS. In: Palomino JC, Leao SC, Ritacco V, editors. *Tuberculosis 2007 Brazil*; 2007. pp. 559-591.
59. Pfyffer GE. Mycobacterium: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures. In Murray PR, editor. *Manuel of Clinical Microbiology*. Washington,DC; 2007. pp.543-572.
60. Piersimoni C, Scarparo C, Piccoli P et al. Comparison of MB/BacT ALERT 3D system with radiometric BACTEC system and Löwenstein-Jensen medium for recovery and identification of mycobacteria from clinical specimens: a multicenter study. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 651-657.
61. Prodingler WM, Eigentler A, Allerberger F et al. Infection of red deer, cattle, and humans with *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in western Austria. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2270-2272.
62. Richter E, Weizenegger M, Fahr AM, Röch-Gerdes S. Usefulness of the GenoType MTBC assay for differentiating species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in cultures obtained from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2004; 42 (9): 4303-4306.
63. Richter E, Weizenegger M, Röch-Gerdes S, Niemann S. Evaluation of Genotype MTBC assay for clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol* 2003; 41 (6): 2672-2675.

64. Rishi S, Sinha P, Malhotra B, Pal N. A comparative study for the detection of mycobacteria by BACTEC MGIT 960, lowenstein jensen media and direct AFB smear examination. *Ind J Med Microbiol* 2007; 25(4): 383-386.
65. Rivera AB, Tupasi TE, Grmaldo ER et al. Rapid and improved recovery rate of *Mycobacterium tuberculosis* in Mycobacteria Growth Indicator Tube combined with solid Löwenstein Jensen medium. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997; 1 (5): 454-549.
66. Robledo JA, Mejía GI, Morcillo N, Chacon L, Camacho M, Luna J et al. Evaluation of a rapid culture method for tuberculosis diagnosis: a Latin American multi-center study. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006 Jun;10 (6): 613-619.
67. Rodrigues CS, Shenai SV, Almeida DVG, Sadani MA, Goyal N, Vadher C et al. Use of bactec 460 TB system in the diagnosis of tuberculosis. *Ind J of Med Microbiol* 2007; 25 (1):32-36.
68. Saltini C. Chemoterapy and diagnosis of tuberculosis. *Respiratory Medicine* 2006; 100: 2085-2097.
69. Singh S, Sankar M, Gopinath K. High rate of extensively drug-resistant tuberculosis in Indian AIDS patients. *AIDS* 2007; 21 (17): 2345-2347
70. Smithwick RW. (1976). Laboratory manuel for acid-fast microscopy. 2nd edition, Atlanta, Georgia.
71. Somoskovi A, Kodmon C, Lantos A et al. Comparison of recoveries of *Mycobacterium tuberculosis* using the automated BACTEC MGIT 960 system, the BACTEC 460 TB system and Löwenstein-Jensen medium. *J Clin Microbiol* 2000; 38 (6): 2395-2397.
72. Somoskovi A, Magyar P. Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube with MB Redox, Löwenstein-Jensen and Middlebrook 7H11 media for recovery of mycobacteria in clinical specimens. *J Clin. Microbiol.* 1999; 37(5): 1366-1369.
73. Srisuwanvilai L et al. Performans of the BACTEC MGIT 960 compared with solid media for detection of *Mycobacterium* in Bangkok, Thailand. *Diagn Microbiol and Infect Dis* 2008. pp: 1-6

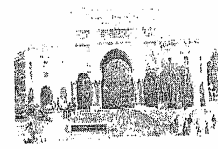
74. Starke JR. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* to and from children and adolescents. *Seminars in pediatric infectious diseases* 2001; 12 (2): 115-123.
75. Steingard KR, Henry M, Ng V, et al. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2006; 6: 570-581.
76. Steingard KR, Ng V, Henry M, et al. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2006; 6: 664-674.
77. Strohl WA, Rouse H, Fisher BD. Mycobacteria and Actinomycetes. In Harvey RA, Champe PC, editors. *Lippincott's Illustrated Reviews Microbiology*. USA; 2001. pp.245-258
78. Strong BE, Kubica GP. Isolation and identification of *Mycobacterium tuberculosis*. A guide for the level 2 laboratory. Center for Disease Control. Atlanta, HHS Publication no. (CDC): 81-8390.
79. Togneri AM, Cimalando L. Analysis of the MGIT (mycobacteria growth indicator tube) system in the primary isolation of mycobacteria. *Rev Argent Microbiol* 2000; 32 (4): 173-178.
80. Tortoli E, Cichero P, Chirillo MG et al. Multicenter comparison of ESP Culture System II with BACTEC 460TB and Lowenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from different clinical specimens, including blood. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1378-1381.
81. Tortoli E, Cichero P, Piersimoni C et al. Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of Mycobacteria from clinical specimens: multicenter study. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (11): 3578-3582.
82. Tortoli E. The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol med microbiol* 2006; 48: 159-178.
83. Tortoli E, Palomino JC. New diagnostic methods. In: Palomino JC, Leao SC, Ritacco V, editors. *Tuberculosis 2007 Brazil*; 2007. pp.441-486.

84. Uzun M. Tüberküloz tanısında Erlich-Ziehl- Neelsen, fluorokrom boyama yöntemleri ile BACTEC ve Löwenstein –Jensen kültür yöntemlerinin sonuçlarının değerlendirilmesi. Doktora tezi, İdtanbul Tıp Fakültesi 1994.
85. Vincent V, Gutierrez MC. Mycobacterium: Laboratory characteristics of slowly growing Mycobacteria. İn: Murray PR, editor. *Manuel of Clinical Microbiology*. Washington, DC; 2007. pp.573-588.
86. Waard JH, Robledo J. Conventional diagnostic methods. İn: Palomino JC, Leao SC, Ritacco V, editors. *Tuberculosis 2007 Brazil*; 2007. pp.401-424.
87. Walls T, Shingadia D. The epidemiology of tuberculosis in Europe. *Arch Dis Child* 2007; 92: 726-729.
88. Washington CW, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GV, Schreckenberger PC, Woods G. *Koneman's Color Atlas and textbook of diagnostic*, 6th edition, USA, Lippincott's Williams & Wilkins 2006, pp: 1065-1124.
89. Welch DF, Guruswamy AP, Sides SJ, Shaw CH, Gilchrist MJ. Timely culture for mycobacteria which utilizes a microcolony method. 1993; 31 (8): 2178-84.
90. Weyer K, Lancaster J, Brand J, Van der Walt M, Levin J. Survey of tuberculous drug resistance in South Africa, 2001-2002: technical report to the Department of Health. Pretoria, South Africa: Medical Research Council of South Africa, 2003.
91. WHO Repor 2008. Global Tuberculosis Control – Surveillance, Planning, Financing – Communicabl Diseases 2008 World Cenevre. Erişim: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2008/en/index.html 23 nisan 2008.
92. Williams-Bouyer N, Yorke N, Lee HI, Woods GL, Comparison of the BACTEC MGIT 960 and ESP Culture System II for growth and detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4167-4170.
93. Woods GL, Fish G, Plaunt M, Murphy M. Clinical evaluation of Difco ESP Culture System II for growth and detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1997; 37: 25-30.

94. Yenen OŞ, Ekinci E, Aydilek R, Baydar I. HIV infection and tuberculosis in Turkey. *Chest* 1988; 94.
95. Yew WW, Leung CC. Update in tuberculosis 2007. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 479-485.
96. Yücesoy Y, Yece A, Çalışkan E, Bahar IH, Yuluğ E. Tüberkülozlu olgularda HIV enfeksiyonu araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 1994; 24: 262-265.

ETİK KURUL KARARI

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI
Yerel Etik Kurulu



Sayı : 2172

Tarih : 25/09/2007

Konu : Prof.Dr.Meltem Uzun hk.

Sayın Prof.Dr.Meltem UZUN
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi
İlgi : 04.07.2007 tarihli,533 sayılı yazınız.

Sorumlu araştırıcılığını üstlendiğiniz ve Yüksek Lisans Öğrencisi Tıbbi Biyolog Feriha BAŞOĞLU'nun yürüteceği 2007/1753 dosya no'lu "Thin layer 7H11 agarın mikrobakterilerin izolasyon ve identifikasyonundaki değerinin araştırılması" başlıklı tez çalışması araştırma fonundan desteklendiği takdirde kurulumuzun 12.09.2007 tarihli,08 sayılı toplantısında onaylandığına ilişkin tutanağımız ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize saygılarımla rica ederim.

Prof.Dr. Zafer ARI
İstanbul Tıp Fakóltesi
Etik Kurul Başkanı

Eki: Tutanak



İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI

Toplantı Tarihi : 12/09/2007

Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi'Etik Kurul Toplantı Salonu

Toplantı Sayısı : 8

Sorumlu araştırmacılığını Fakültemiz Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji t3 Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Meltem UZUN'un, üstlendiği Tıbbi Bio.Feriha BAŞOĞLU'nun, yürüteceği 2007/1753 dosya no'lu "Thin layer 7H11 agarın mikrobakterilerin izolasyon ve identifikasyonundaki değerinin araştırılması" başlıklı tez çalışması araştırma fonundan desteklendiği takdirde kurulumuzda incelendi etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, uygulamaya konulabileceğine karar verildi.

Prof.Dr. Zafer ARI
Etik Kurul Başkanı (Dekan Yardımcısı)

Prof.Dr. A.Yağız ÜRESİN (Katılmadı)
Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Prof.Dr. Ahmet GÜL
İç Hast. A.D, Romatoloji Bilim Dalı

Prof.Dr. Berrin UMMAN
Kardiyoloji A.D.

Prof.Dr. Cahide GÖKKUŞU (Katılmadı)
Biokimya A.D

Prof.Dr. Kamil PEMBEÇİ (Katılmadı)
Anesteziyoloji A.D.

Prof.Dr. Sevinç EMRE
Çocuk Sağ. Ve Hast. A.D

Prof.Dr. Nuran YILDIRIM (Katılmadı)
Deontoloji ve Tıp Tarihi A.D.

Prof.Dr. Oğuzhan ÇOBAN
Nöroloji A.D.

Prof.Dr. Pınar SAİP
İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr. Ümit TÜRKOĞLU
Biokimya A.D

Prof.Dr. Çiçek BAYINDIR (Katılmadı)
Patoloji A.D., Nöropatolojik B.D

Prof.Dr. Yeşim ERBİL (Katılmadı)
Genel Cerrahi A.D.

Prof.Dr. Neşe ÇOLAK
İç Hast.A.D. End. Ve Metabolizma Hast. B.D.

Prof.Dr. Nurhan ENGİNAR
Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Fatma Ceyda DÖNMEZER
Sivil Toplum Örgütü Üyesi

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

| | | | |
|-----------------|--|------------------|-------------|
| Adı | Feriha | Soyadı | Başoğlu |
| Doğ.Yeri | KKTC | Doğ.Tar. | 06.01.1985 |
| Uyruğu | KKTC/TC | TC Kim No | 10066052134 |
| Email | Feriha_85@yahoo.com | Tel | 05057008501 |

Eğitim Düzeyi

| | Mezun Olduğu Kurumun Adı | Mez. Yılı |
|-----------------|--|-----------|
| Doktora | | |
| Yük.Lis. | | |
| Lisans | İÜ Cerrahpaşa Tıp Fak. Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü | 2006 |
| Lise | Lefke Gazi Lisesi | 2002 |

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

| | Görevi | Kurum | Süre (Yıl - Yıl) |
|----|--------|-------|------------------|
| 1. | | | - |
| 2. | | | - |
| 3. | | | - |

| Yabancı Dilleri | Okuduğunu Anlama* | Konuşma* | Yazma* | KPDS/ÜDS Puanı | (Diğer) Puanı |
|-----------------|-------------------|----------|--------|----------------|---------------|
| İngilizce | Çok İyi | İyi | İyi | 55 | |
| | | | | | |

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

| | Sayısal | Eşit Ağırlık | Sözel |
|----------------------|---------|--------------|--------|
| ALES Puanı | 72,452 | 74,928 | 74,246 |
| (Diğer) Puanı | | | |

Bilgisayar Bilgisi

| Program | Kullanma becerisi |
|------------------------|-------------------|
| Word, Exel, powerPoint | Çok iyi |

Yayımları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Sertifikalar

İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu ile Deney Hayvanları Araştırma ve Üretim Laboratuvarı tarafından düzenlenen “Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu” katılım sertifikası (24, 25 Mayıs 2005)

1.Ulusal Tıp Kongresi kapsamında düzenlenen “İnfeksiyon Hastalıklarında Moleküler Teknikler Kursu” katılım sertifikası (16-19 Nisan 2005)

Katıldığı kongreler

1.Ulusal Moleküler Tıp Kongresi (16-19 Nisan 2005)

I.Tıbbi Biyolojik Bilimler Kongresi IV. Tıbbi Biyolojik Bilimler Öğrenci Sempozyumu (4-5 Ocak 2005)

II. Tıbbi Biyolojik Bilimler Kongresi V. Tıbbi Biyolojik Bilimler Öğrenci Sempozyumu (26-27 Mayıs 2006)

8.Antimikrobik Kemoterapi Günleri (2008)