

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
İstanbul İli (Fatih) Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği
Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi

ALTMİŞ BİR EKSTRAPULMONER ÖRNEKTE
ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇ DUYARLILIK SONUÇLARININ
MGIT YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

Dr. SEVTAP GÜRSOY

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANLARI

Doç. Dr. GÖNÜL ŞENGÖZ

Doç. Dr. FİLİZ PEHLİVANOĞLU

ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ KLİNİĞİ

İSTANBUL 2013

TEŞEKKÜR

Asistanlığım süresince ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyiminden, disiplinli çalışmalarından faydalandığım ve bugüne gelmemde emeği büyük hocamız, kliniğimiz Eğitim ve İdari sorumlusu Doç. Dr. Gönül Şengöz'e;

Kliniğimiz eski şefi Dr. Özcan Nazlıcan'a uzmanlık eğitimimdeki katkılarından dolayı;

Asistanlığım boyunca bilgisi ve tecrübesiyle yanımda olan kliniğimiz Eğitim Görevlisi Doç. Dr. Filiz Pehlivanoglu'na;

Asistanlığımın son dönemlerine kadar birlikte çalıştığımız, bilgisini ve her konudaki tecrübesini benimle paylaşan Doç. Dr. Kadriye Kart Yaşar'a;

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum uzmanlarım Dr. Özcan Nazlıcan, Dr. Servet Alan, Dr. Özlem Altuntaş Aydın'a ve Dr. Hayat Kumbasar Karaosmanoğlu'na;

Kliniğinde çalışmaktan mutluluk duyduğum, kendilerinden çok şey öğrendiğim 1. Dahiliye Kliniği Eğitim Sorumlusu Dr. Taner Alioğlu ve Doç. Dr. Zeynep Karaali ve tüm 1. Dahiliye kliniği uzman, asistan doktor ve personeline;

Çocuk Hastalıkları rotasyonum sırasında bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım hocalarım Prof. Dr. Murat Elevli, Doç. Dr. Mahmut Çivilibal, Dr. Nilgün Selçuk Duru'ya;

Göğüs Hastalıkları rotasyonumda bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Doç. Dr. Filiz Koşar'a;

Birlikte dostluk ve beraberlik içinde çalıştığım Dr. Hülya Özdemir, Dr. Mehtap Şimşek ve diğer asistan arkadaşlarıma, servis ve Mikrobiyoloji laboratuvarında birlikte çalıştığım tüm mesai arkadaşlarıma;

Varlıklarıyla gurur duyduğum, hayatımın en büyük destekçileri annem, babam ve canım kardeşlerime;

En büyük dostum, arkadaşım, desteğim eşim Mete ve hayatımın anlamı çocuklarım Duru ve Deniz Ali'ye ;

Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ.....	V
ŞEKİLLER/RESİMLER /TABLOLAR LİSTESİ.....	VI
ÖZET	
ABSTRACT	
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	2
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Tarihçe.....	4
2.2. Taksonomi.....	5
2.3. Morfoloji.....	5
2.4. Sınıflandırma.....	6
2.4.1. <i>M. tuberculosis</i> complex.....	9
2.4.2. Nontuberculous mycobacteria.....	9
2.5. Antijenik yapı, Virulans ve Patojenite.....	12
2.6. Patogenez, Patoloji ve Klinik Tablo.....	14
2.6.1. Patogenez.....	14
2.6.2. Klinik Tablo.....	15
2.6.2.1. Primer Tüberküloz.....	15
2.6.2.2. Miliyer Tüberküloz.....	16
2.6.2.3. Sekonder Tüberküloz.....	16
2.6.2.4. Ekstrapulmoner Tüberküloz.....	16
2.7. Laboratuvar Tanı.....	17
2.7.1. Örneklerin Toplanması ve İşlenmesi.....	17
2.7.2. Aside Dirençli Boyama Yöntemleri.....	18
2.7.3. Kültür.....	19
2.7.4. Moleküler Tanı.....	21
2.7.5. İdentifikasyon.....	22
2.7.5.1. Konvansiyonel Biyokimyasal Yöntemler.....	22
2.7.5.2. BACTEC NAP.....	23
2.7.5.3. Moleküler Yöntemler.....	24
2.7.5.4. Kromatografik Analiz.....	24
2.7.5.5. İmmunkromatografik Analiz.....	24

2.8. Antitüberküloz İlaçlar ve Duyarlılık testleri.....	24
2.9. Antimikobakteriyel İlaçlara Direnç Mekanizmaları.....	27
3.MATERYAL VE METOD.....	30
3.1. Bakteri İzolatları.....	30
3.2. Homojenizasyon-Dekontaminasyon-Konsantrasyon İşlemi.....	30
3.3.Aside Dirençli Boyama.....	30
3.4. Kültür.....	31
3.5.İdentifikasyon.....	32
3.6. Antibiyotik Duyarlılık Deneyleri.....	32
4. BULGULAR.....	37
5. TARTIŞMA.....	42
6. KAYNAKLAR.....	49

SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ARB: Aside Dirençli Basil
BAL: Bronkoalveolar Lavaj
BCG: Bacille Calmette-Guerin
BOS: Beyin omurilik sıvısı
CDC: Center for Disease Control and Prevention (Hastalık Kontrol Merkezi)
ÇİD TB: Çok İlaça Dirençli Tüberküloz
EMB: Etambutol
E-test: Epsylometer test
EPTB: Ekstrapulmoner tüberküloz
EZN: Ehrlich-Ziehl-Neelsen
FDA: Food and Drug Administration
GI: Üreme indeksi
GLC: Gas-liquid chromatography (Gaz-sıvı Kromatografisi)
HIV: Human İmmunodeficiency Virus
HPLC: High-Performance Liquid Chromatography(Yüksek performanslı sıvı kromatografisi)
INH: İzoniazid
L-J: Löwenstein-Jensen besiyeri
MDR-TB: Multidrug resistant tuberculosis
MGIT: Mycobacterium Growth Indicator Tube
MOTT: Mycobacterium Other Than Tuberculosis
NALC: N-asetil-L-sistein
NAP: p-nitro-asetilamino-hidroksi propiyofenon
NTM: Nontuberculous mycobacteria
CLSI : Clinical and Laboratory Standard Institute
OT: Old Tüberkülin
PANTA: Polimiksin B, Amfoterisin B, Nalidiksik asit, Trimetoprim, Azlosilin
PCR: Polymerase Chain Reaction
PPD: Purified Protein Derivative
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
RIF: Rifampin
SM: Streptomisin
TB: Tüberküloz
TCH: Tiyofen-2-karboksilik asid hidrazid
WHO: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
XDR-TB: Extensively Drug-Resistant Tuberculosis

ŞEKİLLER, RESİMLER VE TABLOLAR LİSTESİ

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Mikobakterilerin hücre duvar yapısı.....	6
Şekil 4.1: İzole edilen suşların pulmoner/ekstrapulmoner oranı.....	37
Şekil 4.2: Mikobakteri kültür çalışılması istenen toplam materyal sayısı.....	37
Şekil 4.3: Hasta yaş dağılımı.....	38
Şekil 4.4: Örneklerin cinsiyet dağılımı.....	38
Şekil 4.5: 61 ekstrapulmoner örneğin dağılımı	

RESİMLER LİSTESİ

Resim 3.1: BD MGIT TBc Identification Test ile pozitif sonuç.....	34
Resim 3.2: MGIT antibiyotik duyarlılık testi uygulama şekli.....	34
Resim 3.3: MGIT cihazı içinde AST Set Carrier ve çalışılan antiyogram tüpleri.....	35
Resim 3.4: EMB dirençli sonuçlanmış test.....	35
Resim 3.5: Direnç negatif sonuçlanmış test.....	36

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1: Woods ve Washington Sınıflaması.....	8
Tablo 2.2: EZN boyama ile mikroskopik incelemede kantitatif ARB sonuçlar.....	19
Tablo 2.3. Klinik örneklerden izole edilen mikobakterilerin biyokimyasal özellikleri.....	23
Tablo 3.1: Kritik ilaç konsantrasyonları ve MGIT tüplerindeki konsantrasyonları.....	33
Tablo 4.1: Suşların antitüberküloz direnç oranları.....	39
Tablo 4.2: Materyallere göre antitüberküloz direnç sayı ve oranları.....	40
Tablo 4.3: Örneklerle göre dirençli suş sayıları ve dirençli ilaç sayıları.....	41
Tablo 4.4: BOS suşlarının özellikleri.....	42
Tablo 5.1: Türkiye’deki çeşitli çalışmalarda saptanan direnç yüzdeleri (%).....	45

ÖZET

ALTMİŞ BİR EKSTRAPULMONER ÖRNEKTE ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇ DUYARLILIK SONUÇLARININ MGIT YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Ocak 2008-Eylül 2013 tarihleri arasında, izole edilen 61 ekstrapulmoner *M. tuberculosis* complex suşunun izoniazid (INH), rifampin (RIF), streptomisin (SM) ve etambutole (EMB) duyarlılığı Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) yöntemi ile araştırılmıştır.

Mikobakteri kültürü yapılması istenen 6018 hastanın klinik örnekleri L-J ve/veya MGIT besiyerlerine ekilmiş ve 275 hastadan mikobakteri üretilmiştir. İzole edilen ve antiMPT-64 antijeni bakılarak *M. tuberculosis* complex identifiye edilen 275 suşun 160'ı ekstrapulmoner örneklerle aittir. Bu örneklerden 61 suş çalışmaya alınmıştır.

İzole edilen 61 *M. tuberculosis* complex kökeninin 40'ında (%65.5) herhangi bir ilaç direncine rastlanmamıştır. İki ilaca dirençli 7 (%11,5), üç ilaca dirençli 4 (%6,5) suş saptanmış olup, çoklu ilaç direncine sahip suş sayısı 2 (%3.2) olarak tespit edilmiştir. INH direnci %27.8, RIF direnci %3.2, EMB direnci %14.7, SM direnci %11.5 olarak saptanmıştır.

Direnç oranları göz önüne alındığında özellikle ekstrapulmoner suşlarda, MGIT yönteminin, hızlı sonuç vermesi nedeniyle tedavi öncesi antitüberküloz duyarlılık sonuçlarının bilinmesi bakımından, önemli olduğu görülmektedir. Ekstrapulmoner tüberküloz (EPTB); nedeni bilinmeyen ateş vakalarında sık karşılaşılan ve tanısında güçlükler olan bir tablodur. EPTB olgularında amaç direnç testleri yapılması gerekliliği bakımından etkenin üretilmesi olmalıdır. Çalışmamızda ekstrapulmoner tüberküloz vakalarının sıklığı ve direnç paternine dikkat çekilmek istenmiştir.

Anahtar kelimeler: Antitüberküloz duyarlılık, *M. tuberculosis* complex, MGIT

ABSTRACT

Investigation of Anti-tuberculous Drug Sensitivity Results in Sixty-one Extrapulmonary Samples Using the MGIT Method

Sensitivity of 61 extrapulmonary *M.tuberculosis complex* strains isolated in Haseki Training and Research Hospital Infectious Diseases and Clinical Microbiology Laboratory between January 2008 and September 2013 to isoniazid (INH), rifampin (RIF), streptomycin (SM) and ethambutol (EMB). It was investigated by Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) method.

Clinical samples of 6018 patients who were requested to culture mycobacteria were inoculated on L-J and / or MGIT media and mycobacteria were grown from 275 patients. 160 of the 275 strains isolated and identified in the *M. tuberculosis complex* by examining the antiMPT-64 antigen belong to extrapulmonary specimens. 61 strains from these samples were included in the study.

No drug resistance was found in 40 (65.5%) of 61 *M. tuberculosis complex* strains isolated. 7 (11.5%) strains resistant to two drugs and 4 (6.5%) strains resistant to three drugs were determined, and the number of strains with multiple drug resistance was determined as 2 (3.2%). INH resistance was 27.8%, RIF resistance 3.2%, EMB resistance 14.7%, SM resistance 11.5%.

Considering the resistance rates, especially in extrapulmonary strains, it is seen that the MGIT method is important in terms of knowing the pre-treatment antituberculosis susceptibility results due to its rapid results. Extrapulmonary tuberculosis (EPTB); It is a picture that is frequently encountered in cases of fever of unknown cause and has difficulties in its diagnosis. In EPTB cases, the aim should be to produce the agent in terms of the necessity of resistance tests. In our study, we wanted to draw attention to the frequency and resistance pattern of extrapulmonary tuberculosis cases.

Keywords: Anti-tuberculous susceptibility, *M. tuberculosis complex*, MGIT, Turkey

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Tüberküloz (TB) *Mycobacterium tuberculosis* basili tarafından oluşturulan bir enfeksiyon hastalığıdır. Günümüzde insanlarda, en fazla hastalandıran ve ölüme neden olan hastalık olma özelliğini korumaktadır. Bu haliyle önemli bir toplum sağlığı sorunudur (1,2,3,4,5,6,7). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 1993 yılında tüberkülozu global toplum sağlığı sorunu olarak deklare etmiştir. Tüm dünyada görülen tüberküloz olgularının %40'ı Asya ve Afrika'da görülmektedir. Afrika bölgesi tek başına dünyadaki vakaların %24'ünü oluşturmaktadır ve en çok vaka oluşum ve nüfusa göre ölüm hızına sahiptir. Yeni vakaların %3.7'sinde ve önceden tedavi edilenlerin %20'sinde çok ilaca dirençli TB saptanmaktadır (Multi Drug Resistant MDR-TB). İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü (Human Immunodeficiency Virus Virus-HIV) ile enfekte kişilerde tüberküloz gelişimi çok daha sıktır. Afrika'da HIV/AIDS ile yaşayan hastaların %80'i aynı zamanda tüberküloz ile de enfektedir. Tüm dünyada 2011'de 8.7 milyon yeni vaka tespit edilmiş (%13'ü HIV ile koinfekte) ve 1.4 milyon insan da tüberkülozdan ölmüştür (4). Dünya Sağlık Örgütü Küresel Tüberküloz Kontrolü 2010 Raporu verilerine göre ülkemizin de içinde yer aldığı WHO Avrupa Bölgesi'nde tüberküloz insidansı ortalama yüzbinde 47 iken, Türkiye'nin tüberküloz insidansı yüzbinde 29'dur. Dünya genelinde ise TB insidansı yüzbinde 137'dir (5). Tüberküloz hastalarının erken tanısı ve uygun tedavisi bu hastalıktan toplumun korunmasında en etkili yoldur. Ulusal tüberküloz kontrol programları çerçevesinde mikobakteriyoloji laboratuvarlarının birincil amacı, insidansı düşürmek için infeksiyöz akciğer tüberküloz olgularını en kısa sürede saptamak, etkeni tanımlamak, antibiyotik duyarlılık testlerini yapmak ve tedaviyi takip oluşturmaktadır (8,9,10). Antitüberküloz ilaç direnci sorunu tüberküloz kontrol programları başarısını değerlendirmede önemli bir yöntemdir. Antitüberküloz ilaçlara direnç önemli bir sorundur. Antibiyotik duyarlılık sonuçları olmaksızın verilen TB tedavisi, hem başarısızlık hem de direnç gelişim riskini arttırmaktadır (8,11).

CDC (Center of Disease Control and Prevention), kültüründe *Mycobacterium tuberculosis* izole edilen her hastaya, üç aylık tedavi sonrası hala yayma ve kültür pozitif ise veya klinik yanıtsızlık varsa direnç testi yapılmasını ve sonuçların da ortalama 28-30 günde tamamlanmasını önermektedir (12).

Tüberküloz en sık akciğerleri tutmakla birlikte tüm organ ve dokularda tutulumu yaygınlaşabilmektedir. Ekstrapulmoner tüberküloz (EPTB) plevra, lenf nodları, abdomen, genitoüriner trakt, cilt, kemik, eklem, meninksler gibi birçok lokalizasyonda görülebilir. EPTB'de tutulan organa göre belirti ve bulguların değişmesi, klinik belirtilerin çok geniş bir

dağılım göstermesine, bu durum da tanıda gecikmelere neden olabilir. Tanı için kültür pozitifliği, histolojik kanıt veya güçlü klinik delile ihtiyaç vardır. Bu doğrultuda antitüberküloz tedaviye başlanmalıdır (1,2,4,7,13,14).

Bu çalışmada MGIT yöntemi ve Löwenstein Jensen kültürü ile *Mycobacterium tuberculosis* complex üretilen ve MGIT yöntemi ile antibiyotik duyarlılık testi yapılan 61 ekstrapulmoner örneğin duyarlılık sonuçların değerlendirilmesi amaçlanmıştır.



2.GENEL BİLGİLER

2.1.TARİHÇE: Tüberküloz, insanlık tarihinin en eski hastalıklarından biridir. Yaşının 300 milyon yıl olduğu bilinmektedir. Milattan önce 3000 ve 1000 yıllarına ait mumyaların vertebralarında Pott hastalığına benzer lezyonlar olup, *M. tuberculosis* DNA'sının izlerine rastlanması bu hastalığın insanları çok uzun zamandır hastalık yaptığını göstermektedir. 1400 yıl öncesine ait kalsifiye bir plevrada da PCR yöntemi ile *Mycobacterium tuberculosis* DNA'sı izole edilmiştir. Tüberküloz hastalığı Dr. Robert Koch'un onu ortaya çıkarılmasına kadar kalıtsal bir hastalık olarak biliniyordu. Önceleri Phystisis (Balgamlı öksürük ve hırıltı) olarak bilinen Tüberküloz Batı dünyasında, Beyaz Ölüm (White Death), Beyaz Veba (White Pleque), bizde ise İnce Hastalık, Teverrüm, Zaafiyet, Duman olarak da anılıyordu. Tüberküloz üzerinde en değerli çalışmalar, 1781-1826 yılları arasında yaşamış olan Rene Theophhile Hyanchinthe Laenec tarafından yapılmıştır. Solunum sisteminin muayenesinde kullandığımız perküsyon yöntemi, 1722-1804 seneleri arasında Avusturya'da yaşamış olan Leopold Auenbrugger; oskültasyon bulgularını da Rene Laenec'ten öğrenilmiştir. *Mycobacterium tuberculosis*'in verem hastalığının sebebi olduğunu 1843-1910 yıllarında yaşamış olan Dr.Robert Koch göstermiştir. Robert Koch 1882'de tüberküloz bakterisini tanımlamış ve mikroskopta ilk olarak göstermiştir. 1884 yılında klinik örneklerden mikroorganizmanın saf kültürünü elde eden araştırmacı deneysel olarak saptadığı bakteri ile hayvanda hastalık oluşturmayı başarmıştır. 1921'de Calmette ve Guerin BCG aşısını (Bacillus Calmette-Guerin), Seibert ve Glenn 1939'da PPD'yi (Purified Protein Derivative) bulmuştur (1,2,6,15,16).

Antitüberküloz tedavilerinde dönüm noktası 1944 yılında streptomisinin bulunması ile yaşanmış ve bu ilacın keşfi araştırmacılarına Nobel ödülü kazandırmıştır. 1952 yılında izoniazid keşfini, pirazinamid, tiasetazon, etionamid, protionamid ve etambutol izlemiştir. Bu keşifler senatoryumların sonunu getirmiş ve tedaviler ayaktan yapılmaya başlanmıştır. 1966 yılında kullanıma giren rifampin, kemoterapideki son devrim olmuştur. Rifampinin tedaviye eklenmesinden sonra rutin kullanıma giren yeni tüberküloz ilacı olmamıştır. 20. Yüzyılın ikinci yarısında gelişmiş ülkelerde hastalığın sürekli gerileme dönemine girmesi sağlanmış; ancak HIV enfeksiyonu ile birlikte yeniden, üstelik çok ilaca dirençli tüberküloz olguları ile önemini tekrar kazanmıştır (1,2).

2.2.TAKSONOMİ: Mycobacteriaceae ailesine mensup olan mikobakteriler; sporsuz, hareketsiz, aside dirençli, bölünme süreleri 12-18 saat olup yavaş üreyen, pleomorfik çomaklardır. Ailenin tek genusu *Mycobacterium*'lardır.

Alem : Prokaryot (Bakteri)

Bölüm : Firmicutes

Sınıf : Actinobacteria

Takım : Actinomycetales

Aile : Mycobacteriaceae

Genus : *Mycobacterium*

Tür : *M. tuberculosis*'tir (2,17)

Mycobacterium cinsi içinde yer alan türler DNA'larındaki yüksek G+C içeriği ile diğer mikolik asit üreten *Nocardia*, *Rhodococcus* ve *Corynebacterium* cinslerine benzer (1,2,6,7). Bakteriyolojik özellikler ve DNA benzerlikleri yönünden birbirleri ile yakından ilişkili olan türler 'kompleks' başlığı altında gruplandırılır ve tanımlanırlar (*M. tuberculosis* complex, *M. avium* complex vb.). *M. tuberculosis* complex içinde yer alan türler *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis*'in alttürü olan *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*'dir. Bu türler dışında kalan mikobakteriler ise Nontuberculosis mycobacteri (NTM) olarak adlandırılmıştır (3,6,7,17,18,19).

2.3. MORFOLOJİ: Mikobakteriler, aerop, hareketsiz, sporsuz, Gram pozitif, pleomorfik düz veya hafif kıvrık basil yapısındadır. Boyları 0,6- 2 µm ile 1-10 µm arasında değişir. İpliksi yapılar oluştururlar. *M. tuberculosis* tek tek durma eğilimindedir.

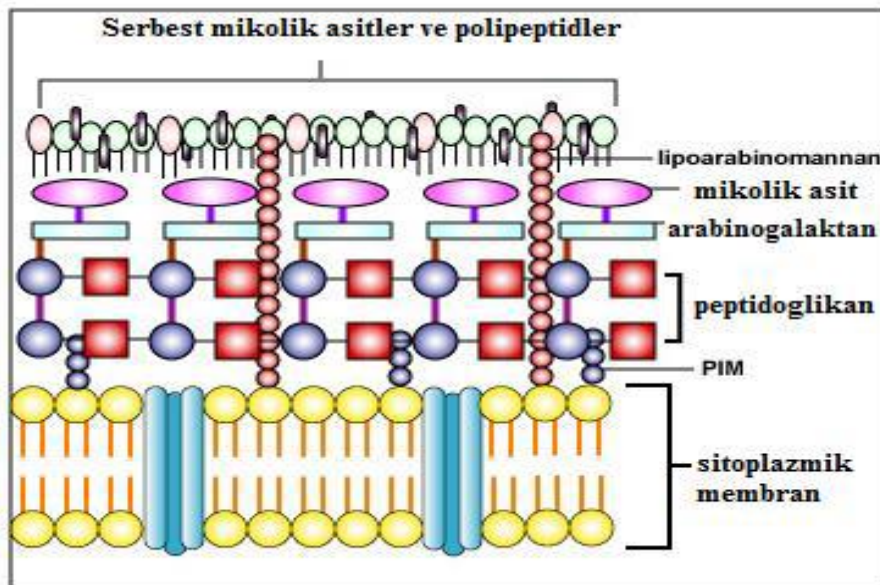
Mikobakterilerin hücre duvarı, dallanmış ve uzun zincirli mikolik asitlerin varlığına bağlı olarak bol miktarda lipit içerir. Lipidden zengin hücre duvarları diğer bakterileri boyamada kullanılan anilin boya'nın geçişine izin vermediğinden Gram yöntemi ile boyanmazlar. Anilin boya'nın hücre duvarından geçebilmesi için fenol veya ısı ile birlikte fenol uygulanır. Hücre duvarına nüfuz eden boyanın uzaklaştırılmasında ise sadece alkol kullanımı yetersiz olup, asit-alkol ile yapılan dekolorizasyona da direnç gösterirler. Bu güçlü aside dirençlilik özelliklerinden dolayı aside dirençli basil (ARB) olarak da adlandırılırlar (1,2,3,7).

Mikobakterileri diğer bakterilerden ayıran en önemli özellik kompleks yapıdaki hücre duvarlarıdır. Diğer bakterilere göre çok kalındır ve üç tabakalı gözlenirler. Plazma zarının üzerinde bulunan en iç tabaka peptidoglikandan (mürein) oluşmuştur. Bu tabaka kısa peptid

zincirleri, çapraz bağlarla sıkıca bağlanan uzun polisakkarit zincirleri içerir ve hücrenin sert yapısını sağlar. Peptidoglikan tabakasının üzerinde bulunan ikinci tabaka arabinogalaktan tabakası olup, peptidoglikan tabakasına fosfodiester köprüleriyle bağlıdır. Arabinogalaktanların yan zincirindeki uç arabinaz birimlerine mikolik asit diye adlandırılan, uzun zincirli bir grup yağ asiti kovalent olarak bağlanır. Bu peptidoglikolipid tabaka (Wax D) bağışık yanıtı uyarmada önemlidir. Mikolik asitler, trehaloz gibi bir şekere bağlanarak kord faktörü oluşturabilirler. Bu asitler hücre duvarı kalınlığından ve büyük oranda da hücrenin aside dirençli olmasından sorumludur.

En dış tabaka ise bir grup heterojen peptidoglikolipidler ve/veya fenolik glikolipidden oluşan mikolik asitler bulunur ve mikozidler olarak adlandırılırlar. Bu yağ asitleri 60-90 karbondan oluşur. Hücre duvarında bulunan ve duvar ağırlığının %60'ını yapan lipidlerin çoğu uzun zincirli yağ asitlerinden oluşmaktadır. Bu lipidler tüberkülostearik asit, mikoserik asit ve mikolik asitleri içerirler (1,2,3,6,7,17,20). Mikobakterilerin hücre duvar yapısı şekil 2.1'de gösterilmiştir.

Şekil 2.1: Mikobakterilerin hücre duvar yapısı



2.4. SINIFLANDIRMA: *M. tuberculosis* complex içinde yer alan türler *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. microti*'dir. Bu türler dışında kalan mikobakteriler ise Nontuberculosis mycobacteri (NTM) olarak adlandırılmıştır. NTM'nin enfeksiyon hastalıklarındaki rolü 1950'li yıllarda Runyon ve Timpe tarafından kanıtlanmıştır. *M.*

tuberculosis' in üremesi yavaş olup replikasyon süresi yaklaşık 24 saattir. Mikobakteriler üreme hızlarına göre kabaca hızlı ve yavaş üreyenler olarak ikiye ayrılabilirler. Yavaş üreyenler ideal ortamlarda görünebilir koloni oluşturabilmesi için yedi günden fazla süreye gereksinim duyarlar. Hızlı üreyenler için bu süre yedi günden kısadır. Yavaş üreyenler grubuna dahil olan türler, katı besiyerinde pigment oluşturma özellikleri değerlendirilerek üç alt gruba ayrılır; pigment oluşturmayanlar (nonfotokromojenler), hem karanlıkta hem de aydınlıkta pigment oluşturanlar (skotokromojenler), karanlıkta üredikleri sürece pigment oluşturmayıp, sadece ışığa maruz kaldığında pigment oluşturanlar (fotokromojenler). İlk kez Ernest Runyon, *M. tuberculosis* ve *M. bovis* dışındaki mikobakterileri gruplamak için bir şema oluşturmuştur. Bu şema tüberküloz dışı mikobakterileri pigment yapımına, koloni morfolojisine ve üreme hızına göre bir gruplandırır (1,2,3,7,18,19).

- 1.Fotokromojenler (Runyon Grup I)
- 2.Skotokromojenler (Runyon Grup II)
- 3.Nonfotokromojenler (Runyon Grup III)
- 4.Hızlı üreyenler (Runyon Grup IV)

Wolinski tarafından yapılan, Woods ve Washington Sınıflaması da klinik mikrobiyoloji yönünden önem taşımaktadır. Sınıflandırma tablo 2.1'de gösterilmektedir (3).

Tablo 2.1: Woods ve Washington Sınıflaması

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

Kompleks içerisinde yer alan türlerden *M. tuberculosis*, *M. canettii* ve *M. africanum* insanlarda, *M. microti* kemiricilerde patojen iken, *M. caprae* ve *M. bovis* geniş bir konak spektrumu göstermektedir. Son yıllarda özellikle AIDS'in ortaya çıkışıyla birlikte, diğer bazı mikobakteri türlerinin, *M.tuberculosis* kompleks dışı mikobakterilerin (Mycobacterium Other Than Tuberculosis-MOTT) (*M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. smegmatis* ve *M. avium* complex....) klinik öneminin anlaşılması, ilginin bu türler üzerinde yoğunlaşmasına neden olmuştur (1,2,3,19,21,22).

2.4.1. *M. tuberculosis* complex: Bu kompleks içinde; *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. caprae* ve *M. microti* türleri yer alır. Genotipik özelliklerinin birbirlerine çok yakın olması (> %95 DNA-DNA homolojisi) , insandan izole edildiklerinde her zaman patojen kabul edilip, tedavi gerektirmeleri bu türlerin aynı kompleks içine dahil edilmelerinin sebebidir (1,2,3,6). *M. tuberculosis* sıvı besiyerinde kord faktör oluşturan, niasin pozitif, nitratları nitritlere indirgeyebilen, tiyofen-2-karboksilik asid hidrazid (TCH)'de üreyebilen, katalaz testi pozitif (INH dirençli türler dışında) ve 68 °C'de bu özelliğini yitiren, mikobakteri türüdür (1,2,3). *M. bovis* nitratları nitritlere indirgeyemeyen, çoğu niasin negatif olan, pirazinamidaz üretemeyen, TCH'de üremesi inhibe olan, yumurta ve gliserin içerikli katı besiyerlerinde üremeleri güçleşen bir türdür. Enfeksiyonun bulaşmasında sıklıkla süt ürünleri rol oynar ve bu nedenle başlangıç lezyonları akciğerden çok servikal ve intestinal lenf nodüllerinde oluşur (2). *Mycobacterium tuberculosis* zorunlu aerobik bakteri olduğundan iyi havalandırılan, akciğerleri en fazla tutmakla birlikte tüm ekstrapulmoner organ ve dokularda da enfeksiyona neden olur. Seröz zarlar (plevra, meninks, periton), böbrek, eklem-kemikler, lenf bezleri, larenks, genital sistem (testis, epididim, ovaryum, uterus), barsak ve diğer organlarda sık tutulum olurken ülkemizde ensik plevra ve ekstrapulmoner lenf nodlarını tutmaktadır. Parsiyel oksijen basıncı düşük olan karaciğer, dalak, mide ve pankreas gibi organlarda enfeksiyona (disseminasyon dışında) seyrek rastlanır (1,2,3,4,14).

2.4.2. NTM(Nontuberculous mycobacteria)

***M. avium-intracellulare* kompleks (MAC):** Yavaş üreyen, nonfotokromojen grupta bulunan MAC, birbirinden biyokimyasal ve antijenik olarak ayrılamayan, *M. avium* ve *M. intracellulare* türlerini ihtiva eder. MAC suşları doğada sular, toprak başta olmak üzere diğer çevresel kaynaklarda bol miktarda bulunmaktadır. *M. avium* ve *M. intracellulare* türleri biyokimyasal deneylerde nispeten nonreaktif davranırlar; niasin, semikantitatif katalaz, nitrat redüktaz, Tween 80 hidrolizi, %5 NaCl toleransı ve üreaz deneyleri negatif olup ısıya dirençli katalaz deneyi ise pozitifdir. Dissemine MAC enfeksiyonları immun sistem yetmezlikli kişilerde özellikle AIDS hastalarında görülmektedir. HIV ile enfekte olan hastalarda %20-25 oranında MAC bakteriyemisi ve dissemine enfeksiyonlar görülür. AIDS olmayan hastalarda MAC izole edilmesinin bir enfeksiyondan çok kolonizasyon olarak değerlendirilir (7,18,19,23,24,25,26,27).

***M. haemophilum*:** Yavaş üreyen, nonfotokromojen gruba dahildir. Biyokimyasal deneylerde nonreaktif özellik gösterir, sadece pirazinamidaz deneyi pozitif sonuç verir. Üremek için demire ihtiyacı olan tek türdür. 32 °C altında, 1-10 hafta arasında ürerler. Transplant, lenfoma,

AIDS hastaları gibi immün sistemi baskı altında olan kişilerde *M. haemophilum* infeksiyonları gelişebilir. En fazla görülen klinik form deri ve yumuşak doku infeksiyonlarıdır (7,18,19,23,25).

***M. ulcerans*:** *M. ulcerans* yavaş üreyen, pigment oluşturmeyen, biyokimyasal özellikleri kısmen nonreaktif olmakla beraber sadece ısıya dirençli katalaz deneyi pozitif olan bir türdür. Kord oluşturur, 33°C'de 4-6 haftada ürerler. *M. ulcerans*, genellikle alt ekstremitelerde ülseröz infeksiyonlara neden olurlar (7,18,19,23).

***M. malmoense*:** İlk vaka Malmö'de tespit edildiği için *M. malmoense* ismi verilmiştir. L-J besiyerinde zayıf bir üreme gösterir, 8-12 hafta kadar inkübasyon süresine gereksinim duyar. S tipi koloni yaparlar. Tween 80 hidrolizi ve pirazinamidaz deneyleri pozitifdir. *M. malmoense* infeksiyonları genellikle, daha önceden akciğer hastalığı olan veya immün yetmezliği olan kişilerde görülür. Akciğer tutulumu en sık rastlanılan formudur (7,19,26).

***M. conspicuum*:** Yavaş üreyen, nonfotokromojen gruba dahil edilmiştir. İmmün yetmezlikli hastalarda yaygın infeksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir. L-J besiyerinde 22 °C ve 31 °C'de ürer, ancak 37 °C'de üremez. Tween 80 hidrolizi, ısıya dirençli katalaz, 14 günlük arilsülfataz deneyleri ile hidroksilamin hidroklorür ve TCH varlığında üreme pozitifdir (26,28).

***M. kansasii*:** Yavaş üreyen, fotokromojen bir türdür. Bazen sularda izole edilebilmekle beraber doğal rezervuarı tam olarak bilinmemektedir. Katı besiyerinde 3 haftada ürer. *M. kansasii* nitrat redüktaz, ısıya dirençli katalaz aktivitesi yanında 3 günde Tween 80 hidroliz deneyi pozitif sonuç veren bir bakteridir. Antijenik olarak *M. tuberculosis*'e benzediğinden PPD-S ile çapraz reaksiyon verir. Ona karşı gelişen bağışıklık *M. tuberculosis*'e de karşı korur. *M. kansasii* çoğunlukla kaviter akciğer infeksiyonuna yol açmakla beraber, nadiren cilt, yumuşak doku, kas ve kemik dokusu infeksiyonlarına neden olabilir. AIDS'li hastalarda nadiren yaygın infeksiyonlara yol açabilir (3,18,19,23,25,26).

***M. marinum*:** Yavaş üreyen ve fotokromojen bir türdür. *M. marinum*'un ilk izolasyonda optimal üreme sıcaklığı 30-32 °C'dir. Bazı suşları niasin üretebilir. Nitratları nitritlere indirgeyemez, Tween 80 hidrolizi, üreaz, pirazinamidaz deneyleri ise pozitifdir. *M. marinum*, zedelenen deri bölgesinin kontamine tuzlu veya tatlı su ile teması sonucu deri infeksiyonlarına yol açar. Yüzme havuzu granülomasına neden olurlar. İmmünkompromize kişilerde disseminasyon, sinoviyit ve osteomyelit saptanabilir (3,7,18,19,23).

***M. simiae*:** Yavaş üreyen, fotokromojen gruba dahildir. Semikantitatif katalaz, ısıya dirençli, katalaz, üreaz, pirazinamidaz, tellürit redüktaz deneyleri pozitifdir. Ayrıca suşların % 63-85'i niasin pozitif sonuç vermektedir. *M. simiae*'nin daha önce akciğer hastalığı geçirmiş insanların

akciğerlerinde geçici veya uzun süreli kolonize kalmaktadırlar. Nadiren dissemine enfeksiyona yol açarlar (3,18,19,23).

***M. asiaticum*:** Fotokromojen ve 22 °C'de üreyebilen bir türdür. Katalaz, Tween 80 hidroliz deneyleri pozitifdir. *M. asiaticum* nadir görülmekle beraber, görüldüğünde çoğunlukla hastalık etkenidir. *M. asiaticum*'un özellikle, kronik akciğer hastalığı zemininde akciğer enfeksiyonu yaptığı ve ekstrapulmoner tutulumlara da neden olduğu bilinmektedir (7,26,29).

***M. intermedium*:** Yavaş üreyen, fotokromojen gruba dahildir. Filogenetik olarak yavaş üreyen ve hızlı üreyen mikobakteriler arasında bir yerde bulunduğundan *M. intermedium* ismi verilmiştir. İzole edildiğinde sıklıkla patojeniktir ve akciğer enfeksiyonuna neden olur (7,30).

***M. scrofulaceum*:** *M. scrofulaceum* ismi servikal lenf bezlerinin mikobakteriyel enfeksiyonu anlamına gelen scrofula'dan kaynaklanmaktadır. Yavaş üreyen, skotokromojen gruba dahildir. Tween 80 hidrolizi negatif, nitratları nitritlere indirgeyemezken, semikantitatif ve ısıya dirençli katalaz deneyleri pozitifdir. Genellikle 18 ay-7 yaş çocuklarda lenfadenit etkeni olarak izole edilen mikobakteridir. Cilt, pulmoner enfeksiyon ve bakteremiye neden olur (3,7,18,19).

***M. szulgai*:** *M. szulgai*'nin 25 °C'de fotokromojen, 37 °C'de skotokromojen olması tipik bir özelliğidir. Diğer önemli bir özelliği çok kuvvetli nitrat redüktaz pozitifliğidir. *M. szulgai* klinik olarak akciğer tüberkülozundan ayırt edilemeyen kronik bir tablo oluşturur. Ayrıca *M. szulgai*'ye bağlı bursit, tenosinovit, osteomyelit, lenfadenit olguları ve deri lezyonları bildirilmiştir (3,7,18,19,23).

***M. xenopi*:** Yavaş üreyen, skotokromojen gruba dahildir. Besiyerlerinde optimal üreme sıcaklığı 42°C olmakla beraber 37 °C'de uzun inkübasyonla ürer. Bulaş kaynağı genellikle su kaynaklarıdır. Kuşlar doğal rezervuarlarıdır. İlerleyici pulmoner enfeksiyonlarla neden olur. Nadiren de disseminasyon ve eklem tutulumu yapabilirler (3,7,18,19,23).

***M. interjectum*:** Filogenetik ağaçta hızlı ve yavaş üreyen mikobakteriler arasında bir yerde bulunduklarından bu türe *M. interjectum* ismi verilmiştir. *M. interjectum* L-J besiyerinde 3-4 haftada skotokromojenik, 1-2 mm çapında koloniler oluşturur. Sadece 31-37 °C'de ürer, 22 °C ve 41 °C'de üreyemez. Niasin, nitrat redüktaz, Tween 80 hidrolizi, β-esteraz negatifdir. Pirazinamidaz, üreaz, semikantitatif ve ısıya dirençli katalaz deneyleri ise pozitifdir. *M. interjectum*'un çocukta lenfadenitle birlikteliği gösterilmiştir. Pulmoner enfeksiyonlara neden olabilir (7,19,31).

***M. fortuitum-chelonae complex*:** Hızlı üreyen mikobakterilerdir. Bu kompleks iki gruptan oluşmaktadır:

a.*M. fortuitum* spp. grup

b.*M. chelonae* spp. grup

Bu bakteriler 7 günden daha kısa sürede ürerler. Her iki grupta yer alan suşlar cilt, ciltaltı, kemik dokusu enfeksiyonlarına yol açmakta ancak tedavide kullanılabilecek antibiyotiklere duyarlılıkları farklılık göstermektedir. *M. fortuitum* grubunda yer alan türler siprofloksasin ve amikasine duyarlı iken *M. chelonae* grubu dirençlidir. Ayrıca iki grup içinde yer alan türlerin de antibiyotiklere duyarlılıkları birbirinden farklıdır (3,18,19,23,25).

***M. abscessus*:** Hızlı üreyen mikobakterilerdendir. Pulmoner enfeksiyonu tipik olarak yaşlı, sigara içmeyen altta yatan zemin hazırlayıcı akciğer hastalığı olup olmadığı bilinmeyen kadınlarda görülür. Klinik ve radyolojik olarak kavitesiz pulmoner MAC hastalığına benzer. Bazı hastalardan *M. abscessus* ve MAC birlikte ya da ardı sıra izole edilebilir. İmmünkompromize kişilerde dissemine hastalık, cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları ve pulmoner enfeksiyonlara neden olabilirler (7,18,19,25).

2.5. ANTİJENİK YAPI VE VİRULANS, PATOJENİTE : Kord faktör ve sulfatidler gibi bazı immünoreaktif komponentlerin virülanstan sorumlu olabileceği gibi, hücre duvar yapısı ve sekresyonları, metabolik enzimlerin de virülansa katkısı olduğu düşünülmektedir (18,20,32).

Old Tüberkülin (OT): İlk kez Koch tarafından elde edilen OT'nin infekte bireylerde, basille karşılaşmamış olanlara göre daha çabuk ve belirgin reaksiyon oluşturduğu görülmüş ve tüberküloz enfeksiyonu tanısında intradermal olarak kullanılmaya başlanmıştır. Tüberküloz basilinin kaynatılmış kültür ekstraktıdır. Önceleri intradermal cilt testinde kullanılmış ancak sadece mikobakteriyel proteinler içermemesi nedeniyle saflaştırılmasına gerek duyulmuştur (2).

Saflaştırılmış Protein Türevi (PPD): İlk kez Seibert ve Glenn tarafından (1941) tanımlanmıştır. Sentetik besiyerlerinde hazırlanmış old tüberkülinin kollodyan membranlardan süzülmesi ve amonyum sülfatla çöktürülmesi sonucu elde edilmiştir. Tam saflaştırılamamıştır ve diğer mikobakterilerle enfeksiyonda çapraz reaksiyon verebilir. PPD deneyi kişinin tüberküloz etkeni bakteriler ile karşılaşmış karşılaşmadığını gösterir, aktif tüberkülozu göstermez (2).

ESAT-6 (Early secretory antigenic target) ve CFP-10 (Culture filtrat protein): *M. tuberculosis*'in RD1 gen lokusundan kodlanmaktadır ve bu proteinlere karşı oluşan interferon cevabını T hücre sayısını göstererek in vitro ölçen kitler geliştirilmiştir. Bu yöntem yardımıyla aktif ve latent

tüberküloz tanısı konabilmekte, tedaviye yanıt takip edilebilmekte ve *M. tuberculosis* enfeksiyonunun BCG aşılmasıyla ayrımı yapılabilmektedir (2,20).

Trehaloz-6,6 Dimikolat (Kord Faktör): Tüberküloz basilinin küme oluşturmaya neden olur. Adjuvan etkiye sahiptir ve komplemanı alternatif yolla aktive eder. Önemli bir virulans faktörüdür. Granülom oluşumunda rol oynar. PNL göçünü inhibe eder. Konak hücre mitokondri membranına tutunarak solunum ve oksidatif fosforilasyonda hasar yapar (2,17,20).

Sülfolipidler (Sülfatidler): Sülfür içeren glikolipidlerdir. Kord faktöre sinerjik etki yaparlar. Makrofaj içinde fagozom-lizozom füzyonunu engelleyerek, basili lizozomal enzimlerin etkisinden korur ve makrofajlara karşı direnci artırır (2,17,20).

WaxD: Peptidoglikolipid yapısındadır. Freud adjuvanının etkisini arttırıcı özelliğe sahiptir. Tümör geriletilici özelliğe sahip olup, BCG aşısının bazı tümörlerde gerilemeye neden olan immünoterapötik etkisinde rolü vardır (2,20).

Lipoarabinomannan (LAM): *M. tuberculosis*'in major hücre duvarı glikolipidlerinden olan lipoarabinomannan moleküllerinden bazıları, taşıdıkları arabinozil yan zincirlerinin mannoz içeriklerine göre ManLAM olarak adlandırılırlar. ManLAM, monositleri inaktive edici ve lenfositleri baskılayıcı bir sitokin olan TGF- β 'nin ekspresyonunu indükler ve monositleri inaktive edici TNF- α 'nın daha az üretilmesine neden olur. Ayrıca manLAM'ın insan periferik kan T hücre kemotaksisini indükleyerek granümatöz yanıtta rolü olduğu düşünülmektedir (2,17,20,32)

Hücre metabolizması ile ilişkili proteinler: *M.tuberculosis*'de yağ asidi metabolizmasında, aminoasit ve pürin biyosentezinde, metal alımında, anaerobik solunum ve oksidatif stres koşullarında etkin olan çok sayıda protein ve antioksidan enzimler mevcuttur. Mutasyon çalışmaları bu enzimlerin enfeksiyonun sürekliliği ve virulans için gerekliliğini ortaya koymuştur. Bu enzimlerden en önemlileri; izositrat liyaz (Icl), lipaz/esteraz (LipF), açıl- CoA sentaz (FadD33) ve fosfolipaz C gibi lipid metabolizması ile ilişkili enzimler, isopropilmalat izomeraz (LeuD), antranilat fosforibozil transferaz (TrpD), pyrolin-5-karboksilat redüktaz (ProC) ve 1-fosforibozil aminoimidazol-süksinokarboksamid sentaz (PurC) gibi aminoasit ve pirolin sentezinde rol oynayan enzimler, Nitrat redüktaz (NarG), katalaz-peroksidaz (KatG), alkil hidroperoksid redüktaz (AhpC), demir ile güçlendirilmiş süperoksit dismutaz (SodA) ve Cu,

Zn ile güçlendirilmiş süperoksit dismutaz (SodC) gibi solunum enzimleri ile metal transferazlardır (2)

Konağa Ait Faktörler: Yüksek mortalite ve morbidite ile seyreden birçok bulaşıcı hastalıkta olduğu gibi akciğer tüberkülozunda da kime hastalık bulaşacağı ve kimin hasta olacağı, hastalığın prognozunu etkileyen çevre şartları dışında insana ait genetik yatkınlığın varlığı ilk yıllardan beri sorgulanmıştır. İnsanda verem hastalığına duyarlılığı arttıran genlerin tespitine yönelik çalışmalar yapılmış ancak sonuçlar çok açıklayıcı olmamıştır. Hastalığın mikrobik bir hastalık olduğu ancak konağa ait bazı gen polimorfizminin immun cevabın modifikasyonuna ve dolayısı ile immunopatogeneze katkı sağladığı kanaatine varılmıştır (33).

2.6. Patogenez, Patoloji ve Klinik Tablo

2.6.1. Patogenez: Akciğer tüberkülozunda inhalasyon yolu ile alınan basil alveollerde nötrofiller, makrofajlar, mast hücreleri, tip II pnömositlerin ve dentritik hücrelerin yüzeylerinde bulunan reseptörlere tutunarak kolonize olurlar. Alveoler epitel hücre üzerinde ortamdaki kompleman veya spesifik antikorlar gibi opsonize edici proteinler tarafından işaretlenen basil, fagositik hücreler tarafından fagosit edilir ve fagolizozomal füzyon içerisinde sindirilerek yok edilir. Ancak tüberküloz basiline, opsonize edebilecek proteinler yerine farklı işlevleri olan proteinlerle birleşmesi sonucu immun sistem mediatörleri tarafından yanlış ve yetersiz algılanması sonucu veya opsonizasyona rağmen fagositik hücrelerin çeşitli genetik faktörlerin etkisi altında yetersizliği veya basil mediatörleri tarafından fagolizozomal faaliyetlerinin modifiye edilmesi sonucu basil yok edilemez ve fagositik hücre içerisinde çoğalmaya devam eder. *M. tuberculosis* tarafından sentezlenen süperoksit dismutaz ve katalaz enzimleri endozom içerisindeki reaktif oksijen radikallerinin etkisinden korunmasını sağlar. Yine basile ait sülfatidler, LAM ve fenolik glikolipid-I (PGL-I) oksijen radikallerinden korunmada önemlidir. Fagositik hücrede endozomlarda çoğalmaya devam eden basiller, ESAT-6 ve CFP-10 ile oluşturdukları kararlı kompleksi, membrandaki lipid bariyerlere saplayarak por formasyonu oluşturup hücrelerin lizisine sebep olurlar. Por formasyonu sonucu parçalanan hücreden alveoler boşluğa düşer ya da fagositik hücre endozom içerisinde latent fazda çoğalmadan, sessiz (dormant) olarak yaşamaya devam eder. Parçalanan fagositik hücrelerin sekrete ettiği kemotaktik faktörler, monositlerin ve diğer inflamatuvar hücrelerin infeksiyon bölgesine gelmesini sağlar ve granülom oluşumu başlar. Alveoler boşluğa geçen basiller, yeni makrofajlarca fagosit edilseler bile çoğalmaya devam ederler. Lenfohematojen yolla tüm vücuda yayılır ve yeni granülomlar oluşturur (1,2,6,32).

2.6.2. Klinik Tablolar: Dünyada en çok karşılaşılan *M. tuberculosis* enfeksiyonu akciğer tüberkülozudur. Bakteri hastanın öksürmesi ve aksırması sonucu 5 µm çapındaki damlacıklar içinde dışarı çıkar. Bu damlacıklar içerisindeki basiller birkaç saat asılı halde havada dolaşırlar. Duyarlı bir kişi tarafından solunum yolu ile alınan enfekte damlacıklar akciğer alveollerine ulaşır. Her lokalizasyon hastalıkla sonlanmaz, enfekte olan kişilerin ancak % 5-10' unda hastalık ortaya çıkar. Kolonize kişilerin büyük bir kısmında hastalık hiç gelişmez. Mikroorganizma vücut içinde uzun bir zaman dorman (aktif olmayan) halde kalabilir. Tek belirti kişinin PPD'sinin pozitif olmasıdır. Böyle kişiler hayatlarının geri kalan kısmında hastalık riski taşıyarak yaşarlar (1,2,6,32).

2.6.2.1. Primer Tüberküloz: *M. tuberculosis* ile daha önceden karşılaşmamış veya BCG ile aşılanmamış PPD negatif bireyde inhalasyon yolu ile basilin alınmasından 2-6 hafta sonra genellikle asemptomatik veya hafif ateş, kuru öksürük, kilo kaybı, gece terlemesi gibi belirtilerle seyreden bir tablodur. Basiller ilk olarak pulmoner alveolar makrofajlar içinde, daha sonra inflamasyon bölgesine gelen makrofajlar içinde çoğalırlar. Basil taşıyan makrofajlar lenfatiklerle hiler lenf nodlarına göç eder ve hücrel immünite yanıt burada gerçekleşir. Basil taşıyan hücreler lenfatiklerle kan dolaşımına sonrasında da tüm vücuda yayılır. Vücuda yayılan basiller özellikle akciğerlerin üst zonları, böbrek parankiması, uzun kemiklerin epifizleri, beyin korteksi ve periferik lenf bezlerinde yerleşerek üremelerini sürdürürler ve granülomalar oluştururlar. Akciğer apekslerinde gelişen küçük granülom odakları 'Simon odağı' olarak da tanımlanır. Dokularda, özellikle lenf nodlarında tüberkül denilen granülomların içinde bulunurlar. Zamanla tüberküllerin merkezi nekroze olup ve kazeöz bir nekroz gelişir. Akciğer parankiminde pnömoni odağı (Ghon odağı), komşu hiler lenf bezinde granümatöz inflamasyon ve bu iki oluşum arasındaki lenfanjit ile karakterize primer kompleksin (Ranke kompleksi-parankimal ve mediastinal kalsifik odak) meydana gelmesine neden olur. Gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonunun gelişmesi üzerine 3-9 hafta sonra tüberkülin deri testi pozitifleşir. Primer enfeksiyon da denilen bu süreç hücrel immün yanıt gelişimiyle durdurulur ise, hastalık oluşmadan olay sonlanır. Eğer konağın immün yanıtı yetersiz kalırsa primer odak ve ilgili lenf bezindeki inflamasyon ilerler, primer tüberküloz meydana gelir. Bakteriler immün sistem hücreleri tarafından tamamen yok edilemeyip yıllarca canlılığını koruyarak sessiz (dormant) kalabilirler (1,2,6,32).

2.6.2.2. Miliyer Tüberküloz: Enfeksiyon sırasında kazeöz bir odağın damara açılması veya erken hematojen yayılım esnasında büyük damar intimasına yerleşen basillerin kana karışması ile

milier tüberküloz gelişir. Daha çok 0-4 yaş arası çocuklarda, primer infeksiyonun erken komplikasyonu şeklinde ortaya çıkar. Milier tüberkülozu, bir kaç hafta içinde gelişen tüberküloz menenjit izleyebilir. Milier tüberküloz, ileri yaşlarda da ortaya çıkabilir. Eski bir tüberküloz lezyonunun aktive olup kan damarına açılması, lezyon bulunan bir organa yapılan cerrahi girişime bağlı olarak inaktif haldeki basillerin kana karışması gibi çok değişik nedenlerle milier tüberküloz gelişebilir. Ancak çocuklara göre erişkinlerde milier tüberküloz daha az görülür (1,2,32).

2.6.2.3. Sekonder tüberküloz (reinfeksiyon tüberküloz): Reinfeksiyon tüberkülozu, endojen reinfeksiyon ve ekzojen reinfeksiyon olmak üzere iki şekilde görülür. Endojen reinfeksiyon tüberkülozu, sıklıkla primer infeksiyon sırasında lenfohematojen yolla akciğerin apikal-subapikal bölgelerine yerleşen ve çoğalmadan burada canlılığını sürdüren dorman basillerin, hayatın herhangi bir döneminde hücrel immun yanıtın baskılanması ile aktif hale geçmesi sonucu meydana gelir. Ekzojen reinfeksiyon ise önceden primer infeksiyon geçirmiş kişinin, basil yayan aktif tüberkülozlu bir hastadan çok sayıda virülen basil alması ile meydana gelir (1,2,32).

2.6.2.4. Ekstrapulmoner tüberküloz: Sıklıkla akciğerleri tutan TB, lenfojen, hematojen ve direkt yayılım yollarıyla tüm doku ve organlarda hastalık oluşturabilir. Ekstrapulmoner tüberküloz (EPTB), birincil infeksiyondan yıllar sonra ortaya çıkabildiği gibi, hızla ilerleyerek akut bir klinik tablo da oluşturabilir. Ekstrapulmoner tüberküloz olarak isimlendirilen bu form plevra, lenfatik sistem, genitoüriner sistem, kemik, eklem, deri, larinks, meme, santral sinir sistemi ve kardiyovasküler sistemi tutarak çeşitli klinik belirtilere yol açar. Tanı örneklerden kültür pozitifliği, histopatolojik veya klinik olarak koyulur ve tedavi başlanır. Tüberkülozda tutulan organa göre belirti ve bulguların değişmesi, klinik belirtilerin geniş bir dağılım göstermesine neden olmaktadır. Akciğer tüberkülozunda sıkça saptanan ateş, gece terlemesi, halsizlik, kilo kaybı gibi özgül olmayan belirtiler, EPTB’de daha az sıklıkta görülmektedir. Bu uzun ve sessiz gidiş, geniş klinik dağılım tanının gecikmesine neden olabilmektedir. Sessiz seyreden EPTB olgularında yakınmaların başlaması ile tanı arasında geçen süre çoğu olguda uzundur. Bundan ötürü tedavide gecikmeler olabilmektedir. WHO’ya göre hasta aynı anda hem pulmoner hem de ekstrapulmoner tüberküloz tanısı aldığı anda pulmoner vaka olarak klasifiye edilmelidir (1,2,4,6,13,34).

2.7. LABORATUVAR TANI: Tüberkülozda laboratuvar tanı yöntemlerinin amacı klinik örneklerde etkenin varlığını göstermek, izole etmek ve patojen olan türleri patojen olmayanlardan ayırt etmektir. Duyarlılığın belirlenmesi de tedavinin belirlenmesi açısından oldukça önemlidir. Tüberkülozu tanısı için klinik örneklerin doğru hastadan doğru şekilde alınması, laboratuvara gönderilmesi ve işlenmesinde belirli kurallar vardır (1,2,6,8,35,36).

2.7.1. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI VE İŞLENMESİ: Pulmoner örneklerde yayma mikroskopisi, TB tanı testleri içinde 100 yıldır en önemli test olarak yerini korumaktadır(4). Tüberkülozun laboratuvar tanısındaki başarı, klinik örneğin uygunluğuna bağlıdır. Hastalık çok çeşitli organ ve dokuları tutabildiğinden örnek seçimine özen gösterilmelidir. Pulmoner örnekler (balgam, açlık mide suyu, bronkoalveolar lavaj (BAL), bronşial yıkantı suyu, bronşial biopsiler) ve ekstrapulmoner örnekler (idrar, gaita, kan, BOS (beyin omurilik sıvısı), doku biyopsileri, plevra, periton mayi ve abse gibi aspiratlar) gibi çeşitli klinik materyallerden mikobakteriler elde edilebilir. Normal flora içeren klinik örneklerle ve alınmaları ya da transport işlemleri sırasında sterilizasyon kurallarına uyulmadığı düşünülen klinik örneklerle; organik kalıntıları sindirmek, kontaminasyona neden olan bakteri ve mantarları elimine etmek amacıyla dekontaminasyon işlemi ve bakteri yoğunluğunu arttırmak içinde homojenizasyon işlemi uygulanır. Homojenizasyon-dekontaminasyon işlemi için;

- NALC (N-asetil-L-sistein)-NaOH (Sodyum hidroksit) yöntemi
- %4'lük NaOH yöntemi
- Zefiran-trisodyum-fosfat yöntemi
- Oksalik asit yöntemi
- Setilpridinyum klorid-sodyum klorid yöntemi
- Sülfirik asit yöntemleri kullanılır.

Bu yöntemler arasında en yaygın kullanılan NALC-NaOH ve %4'lük NaOH yöntemleridir (1,2,6,7,8,35,37).

2.7.2. Aside Dirençli Boyama Yöntemleri: Mikroskopik inceleme en kolay, en ucuz, en sık kullanılan ve tanısal değeri oldukça yüksek bir yöntemdir. Pulmoner örneklerde yayma mikroskopisi, TB tanı testleri içinde 100 yıldır en önemli test olarak yerini korumaktadır (1,2,4,7,36,37). Boyanmış yayma preparatların mikroskop ile incelenmesi, aside dirençli basil (ARB) aranmasında ilk aşamadır. Yaymada ARB saptanması, klinik örnekte mikobakteri varlığını gösteren ilk bakteriyolojik kanıttır. Günümüzde halen balgam ve diğer klinik örneklerden yayma ile ARB aranması ve bunun kültür ile doğrulanması tüberküloz teşhisinde altın

standarttır. En yaygın boyama tekniği EZN boyamadır (1,2,7,35,37). Mikroskopik incelemede, aside dirençli bakteri görülmesi için örnekte 5000-10000 basil/ml bulunması gerekirken, kültürde üremesi için örnekte 10-100 basil/ml bulunması yeterlidir. Direk mikroskopik incelemenin duyarlılığı %22-80 aralığında değişir (1,2,6,7,8,9,35,36,38,39). Mikobakteriler, bakteriyolojik boyalarla kolay boyanmazlar. Gerçekte Gram pozitif olmalarına rağmen Gram boyaları ile çok güç boyanırlar. Hücre çeperleri yüksek oranda lipid içerdiğinden hidrofobik özellikte olup suda eriyen boyalarla boyanmazlar. Mikobakterilerin boyanabilmeleri için kullanılan boyanın, fenol gibi suda erir bir organik madde içerisinde eritilmesi, preparat üzerinde uzun süre tutulması ve ısıtılarak uygulanması gerekir. Bu bakteriler %3'lük asit alkolle renk giderme işlemi sırasında aldıkları boyayı bırakmazlar. Mikobakteriler için başlıca iki boyama tekniği geliştirilmiştir.

1.Karbolfuksin boyama:

-Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN)

-Kinyoun (soğuk boyama)

Karbol fuksin ve metillen mavisi ile boyanan preparatta zemin mavi, basiller pembe olarak görülür. İnceleme 100'lük immersiyon objektifi ile olur.

2.Florokrom boyama:

-Auramine O,

-Auramine-Rhodamine

Aside dirençli basiller florasan mikroskopta siyah zeminde, sarımsı-turuncu renkte floresan verirler. Yapılan yaymalar en az 15 dakika süre ile incelenir. Yaymayı negatif raporlamadan önce en az 300 alan incelenmiş olmalıdır. Pozitif sonuç durumunda ise 1-10 µm uzunluğunda, kırmızı, ince, tekli veya demetler halinde basiller görülmüş olmalıdır. Sonuçlar tablo 2.2'de görüldüğü gibi kantitatif olarak bildirilir (1,2,3,8,35,38).

Tablo 2.2: EZN boyama ile mikroskopik incelemede kantitatif ARB sonuçları

SONUÇ	Görülen ARB miktarı
1(+)	1-9/100 alan
2(+)	1-9/10 alan
3(+)	1-9/1 alan
4(+)	>10/1 alan

2.7.3. KÜLTÜR: Mikobakteri türlerine bağlı infeksiyonların mikrobiyolojik tanısında kültür köşetaşlarından ve altın standarttır (1,2,3,4,6,9). *M. tuberculosis* zorunlu aeroptur. %5-10 oranında CO₂'nin üremeyi arttırıcı özelliği vardır. Optimal üreme sıcaklığı 35-37°C, pH ise 7'dir. *M. tuberculosis* türünün bir üreme siklusu için 18 saate gereksinimi vardır. Ortalama katı besiyerinde 7-21 gün sonra üreme saptanabilir. Katı besiyerlerinde kuru, kirli beyaz renkte, yüzeyi ve çevresi girintili çıkıntılı koloniler oluştururlar. Zorunlu aerop olmalarından dolayı, içerisinde gliserin ihtiva eden sıvı besiyerlerinde yüzeyde zar oluşturarak ürerler. Mikobakterilerin üremeleri için özel besiyerlere gereksinimleri vardır. Bu besiyerleri kompleks yapıda olup, katı besiyerleri ve mikobakterilerin daha kısa sürede üremelerine imkan sağlayan sıvı besiyerlerinden oluşur (1,2,3,8,35,37).

I. Katı besiyerleri: Katı besiyerleri yumurta ve agar temelli olmak üzere iki çeşittir. Bakteri veya mantar kontaminasyonunun önüne geçilebilmesi amacıyla bu besiyerlerine antimikrobiyellerin katıldığı selektif besiyerleri de kullanılmaktadır

a) Yumurta bazlı: Löwenstein-Jensen besiyeri, Petragnani besiyeri ve American Trudeau Society besiyeri,

b) Agar bazlı: Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11 (1,2,3,6,7,8,35,37).

II. Sıvı besiyerleri: Sıvı besiyerleri içinde yer alan Middlebrook 7H9 ve Dubos tween albumin, mikobakterilerin stok suşlarının subkültürlerinin yapılmasında, duyarlılık deneylerinde inokulum hazırlanması amacıyla da kullanılırlar. Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri genellikle hızlı kültür sistemlerinde temel besiyeri olarak kullanılır (1,2,3,6,7,8,35,37).

III. Özel besiyerlerine inokülasyon ve inkübasyon

1. BACTEC 460TB (Becton Dickinson, Biosciences): Yarı otomatize radyometrik bir sistemdir. BACTEC 12B besiyeri 14C işaretli palmitik asit içerir. Mikobakterilerin 14C işaretli palmitik asit kullanımı sonucu 14CO₂ oluşur ve bunun sonucunda 0-999 sayısal değerleri arasında ölçülen üreme indeksi (GI) ile mikobakterilerin varlığı tespit edilir. *M. tuberculosis* complex için ortalama sonuç alma süresi 4-15 gün iken MOTT için 7 günden kısadır. Koloni morfolojisinin gözlenememesi, kontaminasyonun fazla olması, pahalı olması, radyoizotop atıklar sistemin dezavantajlarıdır (3,7,37).

2.MGIT 960 (Becton Dickinson, Biosciences): Tam otomatize ve radyometrik olmayan bir sistemdir. Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içeren MGIT tüplerinin dibinde içine floresan madde gömülü silikonlar mevcuttur. Floresan madde, sıvı besiyerindeki oksijen varlığında maskelenmektedir. Üreyen mikobakteriler ve diğer mikroorganizmalarca oksijenin tüketilmesi

sonucu açığa çıkan floresans, mikobakterilerin varlığını gösterir. Oluşan floresan miktarı üreme indeksi olarak değerlendirilir. MGIT 960 duyarlılığı, BACTEC 460TB'ye benzer. Ancak kontaminasyon oranları daha yüksektir. MGIT 960'ın BACTEC 460TB'den en önemli avantajları; çapraz kontaminasyon olanağının düşük olması, enjektör ile inokulasyona ihtiyaç duyulmaması ve radyoizotop içermemesidir. Yüksek kontaminasyon oranları ve kan ile floresanın maskelenmesi, MGIT 960'ın dezavantajlarıdır (3,7,37).

3.BACTEC 9000 MB (Becton Dickinson, Biosciences): Tam otomatize bir sistemdir. Oksijene duyarlı floresan temelini kullanarak mikobakterileri tespit eder (7,37).

4.ESP II, VersaTREK (Trek Diagnostics): Tam otomatize bir sistemdir. Selüloz sünger ve Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içeren bir sistemdir. Sistemde mikroorganizmaların üremesi ile açığa çıkan gaz basıncındaki değişiklikler ölçülerek, grafiksel olarak bilgisayar sistemine aktarılır. Sistem tüm klinik örnekler için uygundur (7,37).

5. MB/BacT (bioMerieux): Besiyerinin dip kısmında kolorimetrik bir sensör içeren ve oluşan CO₂ düzeyini ölçerek üremeyi değerlendiren bir sistemdir. Bilgisayar desteklidir ve kan hariç tüm materyal çalışılabilir (3,7,37).

6-7. MGIT/MG Redox: Daha düşük kapasiteli yerler için önerilen manuel sistemlerdir (37).

2.7.4. Moleküler Tanı: Tanıda altın standart olarak kabul edilen kültür yönteminin sonuçlanması zaman almakta ve bu nedenle hızlı, duyarlı ve özgül testlere gereksinim duyulmaktadır. ARB boyama duyarlılığı düşük olup, yeni TB olgularının ortalama %44'ünü saptayabilmektedir. ARB boyama yöntemleri ile 24 saatte sonuç alınabilmesi ve ucuz bir tetkik olmasına karşın, yayma preparatını değerlendiren kişinin tecrübesi ve buna bağlı gelişen düşük duyarlılık, tüberküloz dışı mikobakterileri dışlayamaması, düşük prediktif pozitif değere (%50-80) sahip olması nedeniyle direk incelemenin tek başına tanısal değeri yetersizdir. Kültür ise, klinik örnekte ≥ 10 canlı tüberküloz basili olduğunda mümkün, duyarlılığı %80-85 olan en değerli tanı yöntemi olmakla birlikte, kültür ortamında etkenin tanımlanabilmesi için 2-8 haftaya gereksinim duyulması ve her ortamda çalışamaması nedeniyle tüberküloz kontrolü açısından en etkin ve hızlı yöntem değildir. Son yıllarda hasta örneklerinden ve/veya kültür ortamından mikobakterilerin saptanması, tür düzeyinde nükleik asit amplifikasyon (NAA) esaslı moleküler testler kullanıma sunulmuştur (1,2,6,7,8,9,39,40).

Klinik örneklerden direkt olarak *M. tuberculosis* complex varlığını araştırmak amacıyla çeşitli ticari moleküler tanı sistemleri geliştirilmiştir. Solunum örneklerinde kullanımına FDA tarafından onay verilen nükleik asit amplifikasyon temeline dayanan ticari moleküler

sistemler; Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test (AMTD, Gen-Probe) ve Cobas AMPLICOR MTB Assay (Roche Diagnostic System)'dir. FDA onayı olmamakla birlikte izotermal yer değiştirme amplifikasyonu (SDA) esaslı BD ProbeTec TMET MTB Direct Detection Test (Becton Dickinson, Sparks, Md) gibi testlerde kullanıma girmiştir (8,9,40).

2010'da da Xpert MTB/RIF (GeneXpert, Cefebid) WHO tarafından bir dönüm noktası olarak kabul edilmiş ve hasta örneklerinde *M. tuberculosis* ve rifampisin direnci birlikte saptanabilmiştir. Otomatize, "semi-nested" gerçek zamanlı PCR yöntemiyle çalışan ve amplifiye ürünü "molecular beacon assay" prensibi ile hiçbir müdahaleye gerek kalmaksızın saptayabilen bir sistemdir. Xpert MTB/RIF (Cefebid, Sunnyvale, ABD) hem kültür hem mikroskopi pozitif hastaların %98.2'sinde, kültür pozitif mikroskopi negatif hastaların %75.2'sinde tek testle tanı konduğu bildirilmektedir (4,8,9,40).

Kültürde üretilen mikobakterilerin identifikasyonu ve TB ilaç direnci ile ilgili mutasyonların saptanmasına yönelik ise günümüzde klasik PCR ve RFLP yöntemleri ve DNA prop hibridizasyon esaslı ürünler, DNA dizi analiz kitleri kullanılmaktadır. "GenoType® Mycobacteria Direct Test (Hain Lifescience, Almanya)" ve "Inno-LIPA Mycobacteria (Innogenetics NV, Belçika)" şeritleri, nükleik asit dizi bazlı amplifikasyon (NASBA) tekniği esasına dayalı olarak, günümüz mikobakteri laboratuvarlarında hasta örnekleri ve sıvı kültür ortamlarından *M.tuberculosis*'in hızlı tanısında kullanılabilmektedir (6,8,39,40).

2.7.5. İdentifikasyon: Kültür işlemleri sonucunda izole edilen mikobakterilerin tür düzeyine kadar tanımlanabilmesi doğru antimikobakteriyel tedavi için gerekli olmaktadır. Mikobakterilerin tanımlanması konvansiyonel biyokimyasal yöntemler, BACTEC NAP (p-nitro-asetilamino-hidroksi propiyofenon) testi, moleküler yöntemler veya kromatografik analiz yöntemleri ile yapılabilir (1,2,6,7,35,41,42).

2.7.5.1. Konvansiyonel biyokimyasal yöntemler: Mikobakteriler öncelikle üreme süreleri, üreme sıcaklıkları, koloni morfolojileri ve pigment oluşturma özelliklerine göre gruplandırılır. Bu gruplama sonucunda identifiye edilecek mikobakteri için uygulanacak olan anahtar biyokimyasal testler belirlenir. Mikobakterilerin tanımlanmasında kullanılan biyokimyasal testler aşağıda gösterilmiştir:

- Niasin testi
- Nitrat redüksiyon testi
- Katalaz testi
- PNB (p-nitro benzoik asit) içeren besiyerinde üreme

- TCH ile üremenin inhibe edilmesi
- Pirazinamidaz testi
- Tween 80 hidroliz testi
- Arilsülfataz testi
- Tellurit redüksiyonu
- Üreaz testi
- NaCl tolerans deneyi
- Demir uptake'i
- Kristal viyoletsiz MacConkey agarda üreme (1,2,3,7,35,41). Klinik örneklerden elde edilen mikobakterilerin bazı biyokimyasal özellikleri tablo 2.3'de görülmektedir.

Tablo 2.3. Klinik örneklerden izole edilen mikobakterilerin biyokimyasal özellikleri

	Niasin yapımı	Nitrat redüksiyonu	Tween hidrolizi	Üreaz	Aril sülfataz	Katalaz
Fotoromojenler						
<i>M. kansasii</i>	Yok	Var	Var	Var	Var	Var
<i>M. marinum</i>	Yok	Yok	Var	Var	Var	Var
<i>M. simiae</i>	Var	Yok	Yok	Var	Var	Var
Skotokromojenler						
<i>M. scrofulaceum</i>	Yok	Yok	Yok	Var	Yok	Var
<i>M. parascrofulaceum</i>	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Değişik
<i>M. xenopi</i>	Yok	Yok	Yok	Yok	Var	Var
<i>M. szulgai</i>	Yok	Var	Değişken	Var	Değişken	Var
<i>M. gordonae</i>	Yok	Yok	Yok	Yok	Değişken	Var
<i>M. flavescens</i>	Yok	Var	Var	Var	Değişken	Var
<i>M. chimaera</i>	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
<i>M. arupense</i>	Yok	Yok	Var	Yok	Yok	Yok
Non-kromojenler						
<i>M. avium</i> complex	Yok	Yok	Yok	Yok	Değişken	Var
<i>M. malmoense</i>	Yok	Yok	Var	Değişken	Değişken	Belirsiz

<i>M. haemophilum</i>	Yok	Değişken	Yok	Yok	Değişken	Belirsiz
<i>M. ulcerans</i>	Değişken	Yok	Yok	Yok	Değişken	Var
Hızlı üreyenler						
<i>M. fortuitum</i>	Var	Var	Değişken	Var	Var	Var
<i>M. chelonae</i>	Yok	Yok	Değişken	Var	Var	Var

2.7.5.2.BACTEC NAP testi: *M. tuberculosis* complex suşlarını inhibe eden, ancak NTM türlerini inhibe etmeyen, böylelikle sınırlı bir identifikasyon sağlayan bazı kimyasal maddeler kullanılmaktadır; p-nitrobenzoat, hidroksilamin hidroklorür, 8-azaguanin, nitroksolin ve NAP bunlardan bazılarıdır. NAP, kloramfenikol sentezinde bir ara üründür ve kloramfenikole göre *M. tuberculosis* kökenine dört kat daha etkilidir. BACTEC 460TB sisteminde kullanılan bu yöntem ile identifikasyon 3-5 gün içinde sağlanmaktadır (35,42).

2.7.5.3.Moleküler yöntemler: Kültürde üreyen mikobakterilerin kısa sürede tür düzeyinde tanımlanmasını sağlamak amacıyla çeşitli moleküler tanı sistemleri geliştirilmiştir. 16S rRNA, 23S rRNA, hsp65, 16S-23S rRNA ara bölgesi, IS 6110 gibi gen bölgeleri amplifikasyon yöntemleri ile çoğaltıldıktan sonra; prob hibridizasyon, DNA dizi analizi, DNA Microarray, RFLP, spoligotyping yöntemleri ile mikobakteriler cins ve tür düzeyinde tanımlanabilmektedir. Ayrıca bazı ticari moleküler sistemler ile tür düzeyinde tanımlama ile birlikte antimikobakteriyel ilaç direnci de saptanabilmektedir (1,2,3,7).

2.7.5.4.Kromatografik Analiz: Kromatografik çalışmalar en çok gaz-sıvı kromatografi (GLC) ve yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) olarak uygulanmaktadır. GLC yönteminde uzun zincirli mikolik asitler ayrıştırılarak gaz kromatografisinde incelenir. Ortaya çıkan profil, bilinen tür spesifik patern ile karşılaştırılarak değerlendirilir. Bu çalışma iki saatten daha kısa sürede tamamlanır. HPLC yönteminde ise bir gaz kromatografi ve ellinin üzerinde mikobakteri datasına sahip bir bilgisayar kullanılır. HPLC, mikobakterilerin hücre duvarında bulunan mikolik asit esterlerinin kromatografik yöntemle belirlenmesine dayanan hızlı ve tekrarlanabilir yöntemdir. Kromatografik yöntemler teknik açıdan kompleks olup, pahalı ekipman ve yüksek maliyet gerektirdiğinden yalnızca referans laboratuvarlarının kullanımı için önerilmektedir (7,24).

2.7.5.5. İmmunokromatografik Analiz: *Mycobacterium tuberculosis* complex suşlarına özgül MPT64 proteininin, monoklonal MPT64 antikorları kullanılarak saptanmasına dayanır. MPT64, *M.tuberculosis*, *Mycobacterium africanum* ve *Mycobacterium bovis*'i içine alan MTC üyelerine ait 23 kDa ağırlığında bir membran protein olup, kültür filtratları ve biyopsi materyallerinde yüksek düzeyde bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar, TB Ag MPT64 testinin, *Mycobacterium tuberculosis* complex ve tüberküloz dışı mikobakteriler (NTM)'in ayırımında kullanılabilecek başarılı ve hızlı bir yöntem olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla bu yöntem, kültürde üretilen *Mycobacterium tuberculosis* complex suşlarının erken tanımlanmasına ve tedavinin gecikmemesine olanak sağlamaktadır (42,43).

2.8. Antitüberküloz ilaçlar ve duyarlılık testleri: Tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlar başlıca iki grupta incelenebilir. Primer ilaçlar; izoniazid (INH), rifampisin (RİF), pirazinamid (PZA), etambutol (EMB), streptomisin (SM)'dir. Rifabutin, rifapentin, sikloserin, etiyonamid, amikasin, kanamisin, kapreomisin, paraaminosalisilik asit, tiasetazon ve florokinolonlar ise sekonder ilaçlar grubunda yer alır (1,2,7,44,45,46).

Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) ve WHO tarafından tüberkülozun başlangıç tedavisinde primer ilaçların kombine kullanımı önerilmektedir (4). Bununla birlikte antitüberküloz ilaç direnci önemli bir sorun oluşturmaktadır. Primer antitüberküloz ilaçlardan en azından INH ve RIF direnci gösteren izolatlar "Çok İlaça Dirençli (ÇİD) – Multidrug Resistant TB (MDR-TB) " olarak tanımlanmaktadır. Yaygın ilaca dirençli TB (YİD-TB)- Extensively Drug Resistant TB (XDR-TB) ise birinci seçenek anti-TB ilaçlardan izoniazid ve rifampisine ek olarak herhangi bir kinolona ve parenteral verilen ikinci seçenek anti-TB ilaçlardan en az birisine direnç gelişmesidir (2,4,44,47). Mikobakterilerin ilaç duyarlılıklarının araştırılması için çok sayıda duyarlılık yöntemi tanımlanmıştır. Bunlardan agar proporsiyon ve BACTEC sistemleri CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) tarafından altın standart olarak kabul edilmiştir (48,49).

Mikobakterilerin antitüberküloz ilaçlara duyarlılığını belirlemek amacıyla uygulanan deneylerde direkt ve indirekt olmak üzere iki yöntem kullanılır. Direkt yöntemde; preparasyonunda aside dirençli bakteri görülen klinik örneklerde, mililitredeki ortalama bakteri sayısı hesaplanarak, homojenizasyon-dekontaminasyon-konsantrasyon işlemleri sonrasında ilaçlı ve ilaçsız besiyerlerine ekim yapılır. İndirekt yöntemde ise; klinik örneklerden

saf kültür halinde aside dirençli bakteri izole edilir, uygun inokulum hazırlanarak ilaçlı ve ilaçsız besiyerlerine ekim yapılır (7,50,51).

Mutlak Konsantrasyon Yöntemi: Antibiyotikli ve antibiyotiksiz besiyerlerine, 2×10^3 - 1×10^4 cfu / ml mikobakteri içeren inokulum ekilir. İnokulum miktarı olarak 100.000 basili geçmemelidir. İlaçlı besiyerinde 20 koloniden fazla olması o ilaca bakterinin dirençli olduğunu gösterir (50,51).

Direnç Oranı Yöntemi: İlaçlı besiyeri içeren tüplerin bir sırasına da antitüberküloz ilaçların hepsine duyarlı olduğu bilinen *M. tuberculosis* H37Rv ile inokule edilir. Bu yöntemde 10^5 cfu/ml'lik inokulum kullanılır. Farklı dilüsyonlarda ilaç içeren besiyerlerine ekilen bakteriler için ilaçların minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) saptanabilmektedir. Test edilen suşun MİK değeri, *M. tuberculosis* H37Rv'nin MİK değerinden 8 kat veya daha fazla yüksekse o ilaca dirençli olduğu kabul edilir. Değerlendirilmesi zordur, hata oranı yüksektir (50,51).

Proporsiyon Yöntemi: Belirli ilaç konsantrasyonuna dirençli olan mikroorganizmaların oranının belirlenmesini sağlar. Test edilecek bakteri suşu birkaç farklı dilüsyonda standardize edilerek, ilaç içeren ve içermeyen agar temelli besiyerine ekilmesi şeklinde uygulanan ve üç haftalık inkübasyon süresi olan bir yöntemdir. Direnç oranı, ilaç içeren besiyerindeki koloni sayısı ile ilaç içermeyen kontrol besiyerindeki koloni sayıları karşılaştırılarak belirlenir. Bu oran %1'e eşit veya daha yüksek ise test edilen suş o ilaca dirençli olarak kabul edilir. Proporsiyon yönteminde sıklıkla Middlebrook 7H10 ve L-J besiyerleri kullanılmaktadır (7,50,51).

Hızlı Duyarlılık Testleri

1- Radyometrik Kültür Sistemi (BACTEC 460- Becton Dickinson): Homojenizasyon ve dekontaminasyon işlemlerinden geçirilen klinik örneklerden, zenginleştirilmiş 14C işaretli palmitik asit içeren Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri bulunan şişelere (Middlebrook 7H12) ekim yapılır. Yağ asiti kullanılınc 14 CO₂ ortaya çıkar ve şişeler periyodik olarak BACTEC 460 cihazına yerleştirilerek 14 CO₂ saptanmaya çalışılır. Oluşan 14 CO₂ miktarı üreme indeksi (GI) olarak cihaz tarafından saptanır. GI: 500 olunca duyarlılık testi yapılır. Bir antitüberküloz ilaç besiyerine eklendiğinde organizma duyarlı ise üreme baskı altına alınır. Bu kontrole kıyasla günlük üreme indeksinde azalma veya çok küçük artış şeklinde saptanabilir. Organizma dirençliyse çok az veya hiç baskılanma görülmez. Primer antitüberküloz ilaçların yanı sıra bazı

sekonder antitüberküloz ilaçların duyarlılık testleri de yapılabilmektedir. Günlük iş yükü fazlalığı ve radyoaktivite içeren atıklarının olması dezavantajdır. Geleneksel yöntemlerle ortalama 21 günde sonuç alınırken, bu sistemde sonuçlar 5-7 günde çıkmaktadır (50,51).

2- Floresan Kültür Sistemi (BACTEC MGIT 960- Becton Dickinson): Middlebrook 7H9 içeren dip kısmı ruthenium kompleksi bulunan silikon bir tabaka ile kaplı tüpler kullanılmaktadır. Tüp içinde bulunan oksijen yoğunluğunun fazla olması nedeniyle tüp dibine gönderilen UV ışınına karşı floresan ışıma oluşmazken, oksijenin mikobakteri veya kontaminan mikroorganizmalar tarafından kullanılarak tüketilmesi ve CO₂ birikmesi sonrası tüp dibine gönderilen UV ışını ruthenium kompleksindeki değişiklik nedeniyle floresan vermektedir. Saptanan floresan miktarı üreme indeksi olarak ele alınmakta ve kültür pozitifliği açısından değerlendirilmektedir. Duyarlılık testi için ilaçsız ve ilaçlı tüplere eşit miktarda bakteri ekimi yapıp bu tüplerdeki üreme karşılaştırılır. İlaçsız tüpte üreme saptandıktan sonra 48 saat içerisinde ilaçlı bir tüpte üreme olursa, bakterinin o ilaca dirençli olduğu kabul edilir. Üreme oranı ve saptama zamanı BACTEC 460 ile aynıdır. Rayoizotop kullanılmaması avantajdır. Sürekli monitörizasyon ile 960 tüpün aynı anda takibini sağlaması ve bilgisayar verileri vermesi nedeniyle iş yükü daha azdır. Kontaminasyon oranları yüksektir (50,51).

3- Kolorimetrik Kültür Sistemi :

MB /BacT /ALERT MB (Organon Teknika): Kolorimetrik olarak besiyerinde oluşan CO₂ düzeyini ölçerek mikobakteri üremesini değerlendirir. Radyoizotop içermez. Tam otomatiktir, bilgisayar desteği mevcuttur. Duyarlılık testi yapılabilmektedir. Testlerin sonuçlanma süresi BACTEC 460'dan daha uzundur. Etambutol için duyarlılığı düşüktür (50).

4-Karbondioksit Oluşumunu Saptayan Sistem; ESP Culture System II: Mikobakterilerin oluşturduğu gaz ve oluşan basıncı ölçerek üreme değerlendirmesi yapan, tam otomatik, radyoaktif olmayan, bilgisayar destekli bir sistemdir. Primer antitüberküloz ilaçlar test edilebilmektedir (50).

5. E Test (AB BIODISK): Mikobakteri türünün ekildiği bir Middlebrook 7H10 plak besiyerine farklı konsantrasyonda gradient oluşturacak şekilde ilaç emdirilmiş şeridin yerleştirilmesi ve inkübe edilmesi sonrası oluşan elips şeklindeki inhibisyon zonunun şeridi kestiği noktadaki sayısal değer denenen ilaç için suşun MİK değerini verdiği bir yöntemdir. E-test aynı zamanda hızlı üreyen mikobakterilerin direnç testleri için de kullanılabilir. Primer antitüberküloz

ilaçlara karşı MİK değerlerini belirlemek için kolay bir yöntemdir. Açık sistem olduğundan uygulama ve okunması sırasında dikkatli olunması gerekmektedir (50).

2.9. Antimikobakteriyel İlaçlara Direnç Mekanizmaları: Günümüzde *Mycobacterium tuberculosis*'in etken olduğu tüberküloz hastalığının tedavisi birinci seçenek ve ikinci seçenek antitüberküloz ilaçlarla yapılmaktadır. Birinci seçenek ilaçlar isoniazid, rifampisin, pirazinamid, streptomisin ve etambutoldur. İkinci seçenek grubu ise sikloserin, ethionamid, tiasetazon, kanamisin, kapreomisin, amikasin, para-aminosalisilik asit, florokinolonlar, rifabutin, klofazimin gibi ilaçlardır (44). *M. tuberculosis* için bilinen bütün direnç mekanizmaları kromozomaldır ve bağımsız bir gende meydana gelen mutasyona bağlıdır. Genetik çalışmalar antitüberküloz ilaçlara direncin; ilacın hedef bölgesini yada aktivasyonunda rol alan enzimleri kodlayan genlerdeki mutasyonlarla oluştuğunu göstermiştir.

Primer direnç, daha önce hiç tüberküloz ilacı kullanmamış bir hastada gelişen dirençtir. Bu durum kişinin enfeksiyonu, ilaçlara dirençli basillere sahip bir hastadan aldığını gösterir. Sekonder direnç ise hatalı tedavi protokollerinin kullanılması veya tedaviye uyumsuzluk gibi nedenlerle tedavi sırasında gelişen dirençtir (1,2,44,45,52,53).

İsoniazid: Isoniazid, sentetik yapıda ve çoğalan basiller üzerine bakterisid etkili bir ilaçtır. Isoniazid bir ön ilaçtır, katalaz-peroksidaz enzimiyle aktive olur. Katalaz-peroksidaz enzimini kodlayan katG genindeki mutasyonlar %60-70 oranında isoniazide karşı yüksek MİK değerli dirençten sorumludur. *M. tuberculosis* de aktive olan INH inhA geni tarafından kodlanan enoil redüktaz enzimine bağlanır ve redüktaz aktivitesi inhibe olur. Enoil redüktazda mikolik asit sentezinde rol oynayan bir enzimdir. Bu nedenle inhA bölgesindeki mutasyonlarda INH'a dirençte rol oynarlar. Klinik izolatların yaklaşık %25'inde inhA geninde mutasyonlar saptanmıştır. KatG katalaz- peroksidaz aktivitesini ortadan kaldıran mutasyonlar INH aktivasyonunu engellemekte ve bu ilaca dirençte major mekanizma olarak görülmektedir. *M. tuberculosis* de alkil hidroperoksidaz redüktazı kodlayan ahpC geni bulunmuştur. INH'ın aktif ara ürününü detoksifiye ettiği düşünülmektedir. KatG'nin veya alkilhidroperoksidaz ahpC nin ekspresyonu basili organik peroksidlerin toksik etkilerine karşı korumaya yeterlidir. Enfeksiyon süresinde yaşayabilmek için INH'a dirençli katG mutanlarının kat G katalazperoksidaz kayıplarını ikinci bir mutasyonla ahpC nin fazla yapımı ile kompanse ettiği düşünülmektedir (45,52,53).

Rifampisin: *Streptomyces mediterranei*'nin kültür filtratlarından elde edilen rifamisin sentetik bir derivativesidir. Rifampisin hidrofobik hücre zarından hızla diffüze olur. Bakterinin

DNA'ya bağımlı RNA polimerazın potent inhibitörüdür. Rifampisin RNA polimerazı rpoB geni tarafından kodlanan b alt ünitesine bağlanarak inhibe eder. Dirençli suşlarda mikobakteri RNA polimerazının beta alt ünitesini kodlayan geni rpoB'de 27 amino asitlik bir bölgede anlamsız mutasyonlar saptanmıştır. Rifampisin direnci isoniazid direnci ile birlikte sıklıkla görülmektedir. Mutasyonların büyük bir kısmının 526 ve 531 aminoasid pozisyonları arasında olduğu kabul edilmektedir. Bu mutasyonlar çeşitli coğrafik bölgelerden elde edilen izolatlarda bulunmuş fakat direncin derecesi ile ilişkisi bulunamamıştır (45,52,53).

Streptomisin: Streptomisin diğer aminoglikozid grubu antibiyotikler gibi protein yapımını inhibe ederek bakterilerde etki gösterirler. Bu etkisi bilhassa ribozomal S12 proteini ve 16SrRNA üzerindendir. Diğer bakterilerde aminoglikozidlere direnç asetilasyon şeklinde ilacın inaktive edilmesi yoluyla olur. *M.tuberculosis*'de bu direnç şekline rastlanmıştır. *M.tuberculosis*'de streptomisine direncin %80 ninde iki tür mutasyon saptanmıştır.

1. Ribozomal S12 proteinini kodlayan rpsL geninde nokta mutasyonu olmakta bu da tek amino asid değişimine neden olmaktadır. Aminoasid değişimi 88. kodonda lizinin arjinine, 43. kodonda ise lizinin arjinin veya treonine değişimi olarak gerçekleşmektedir.

2. Diğer mutasyon ise 16 S RNA yı kodlayan rrs geninde olmaktadır. Burada 530 kıvrımı ve 904 bölgesinde mutasyonlar olmaktadır. Muhtemelen ribozomlardaki bu değişiklik ilacın bakteriye bağlanmasını azaltmaktadır. Geri kalan %20 dirençli suşta üçüncü birmekanizma söz konusu olabilir. Bazı dirençli suşlarda rpsL veya rrs'de mutasyon yoktur. Burada muhtemel mekanizma ilacın alınmasında bir engel oluşmasıdır, bu da hücre duvar geçirgenliğindeki değişikliğe bağlıdır. Sonuçta düşük veya orta derecede direnç oluşur. Diğer aminoglikozidlerle (kanamisin, amikasin) veya kapreomisin gibi siklik peptik protein ile çapraz direnç gözlenmemiştir (45,52).

Etambutol: İlaçın hedefi bakteri dış duvarıdır. Mikolik asitlerin hücre duvarına transferi inhibe edilir. Mikoloik asitler hücre duvarındaki arabinogalakton polimerinin terminal D arabinoz artıklarının 5' hidroksil grublarına spesifik olarak bağlanmaktadır. Etambutolün etkisi aktif mikolil gruplarının arabinogalaktona taşınmasını engellemek veya arabinogalakton sentez aşamalarında inhibisyon yapmaktır. Son zamanlarda etambutolün hedefinin arabinozil transferaz veya arabinoz akseptörü sentezi ile ilgili herhangi bir enzim olabileceği de düşünülmüştür. Bir gen bölgesi EmbCAB operonu idendifiye edilmiştir. Arabinozil transferazı kodlamaktadır. Etambutole direnç emb proteinlerinin fazla yapımı ve embB de mutasyonlar sonucu gelişmektedir. Etambutol, duvar sentezini bozması yanında duvarın permeabilitesini arttırarak diğer ilaçların bakteri içine girmesini kolaylaştırır (45,52).

Pirazinamid: İlaç in vivo olarak sterilizan etkisini asidik hücre içi bölümlerde gösterir. Makrofaj fagolizozomlarındaki semidorman *M. tuberculosis*'e göstermektedir. Mikobakterilerin pirazinamide duyarlılığı spesifik amidazin varlığına bağlıdır. Bu amidaz pirazinamid ve nikotinamidi hidrolize eder. Bu nedenlerden dolayı pirazinamidde INH gibi bir öncü ilaçtır. Mikobakteri hücre duvarından diffüze olur ve pirazonoik aside çevrilir. Bu ilağın aktif formudur (45,52,53).

3.MATERYAL-METOD

3.1. Bakteri İzolatları: Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında Ocak 2008-Eylül 2013 tarihleri arasında üretilen 61 adet ekstrapulmoner *Mycobacterium tuberculosis* suşunun, MGIT 960 (Becton Dickinson, USA) yöntemi ile primer ilaçlara karşı antitüberküloz duyarlılık testleri yapılmıştır. BACTEC MGIT 960 ve/veya L-J besiyerinde üretilen *M. tuberculosis* complex izolatları MGIT 7 ml tüpüne pasajlanarak antibiyotik duyarlılıkları çalışılmıştır. Her hasta için birden fazla gönderilen klinik örnekler arasında sadece tek örnekten izole edilen suş çalışmaya dahil edilmiştir. Hastanemizde Ocak 2008- Mayıs 2012 yılları arasında kültür işlemi L-J besiyerine ekilerek, Mayıs 2012-Eylül 2013 yılları arasında da hem BACTEC-MGIT 960 hem L-J besiyerine ekilerek gerçekleştirilmiştir.

Kalite kontrol amacı ile primer antimikobakteriyel ilaçların her birine tamamen hassas H37Rv referans suş (ATCC 27294) çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaların tüm aşamaları sınıf II biyolojik emniyet kabini içerisinde yapılmıştır.

3.2. Homojenizasyon-Dekontaminasyon-Konsantrasyon işlemi: Tüberküloz şüphesi ile laboratuvarımıza gönderilen örneklerden steril olmayan mukoid materyaller % 4 NaOH– Sodyum sitrat – NALC çözeltisi ile 1:1 oranında karıştırılmış ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda nötralizasyon amacı ile tüpün ağzına kadar (50 ml) fosfat tamponu ilave edilip dekontaminasyon işlemi durdurulmuş ve bakteri yoğunluğunu arttırmak için 15-20 dakika 3000 xg'de santrifüj edilmiştir. Üst sıvı dökülüp sedimentin üzerine 1:1 oranında fosfat tamponu ilave edilerek, vortex ile iyice çalkalanmıştır. Steril olduğu düşünülen vücut sıvıları, BOS örnekleri NaOH ile dekontaminasyon işlemine tabi tutulmadan direkt ekim aşamasına geçilmiştir. İdrar örnekleri ile miktarı fazla olan vücut sıvıları santrifüj edildikten sonra dekontaminasyon işlemine alınmıştır.

3.3.Aside Dirençli Boyama: Laboratuvara kabul edilen materyallerden işlem öncesi iki adet direk mikroskopik inceleme için materyal hazırlandı. Yoğun materyaller iki lam arasında bastırılarak hazırlandı. Mukoid olmayan diğer örneklerse vortekslenip öze veya pipet kullanılarak lam üzerine yayıldı. Preparatlar güvenlik kabininde hazırlanıp kurutuldu. Kültür için dekontamine edilen örnekten de teksif aşamasında mikroskopik inceleme için her hastaya 2 adet lam hazırlandı ve örnek lam üzerine 1x2 cm'lik bir alana yayılarak oda sıcaklığında güvenlik kabini içinde kurumaya bırakıldı. Lamlar alevde fiske edilerek EZN boyama için hazırlandı.

EZN boyama: Lam karbolfuksin ile kaplanıp alttan yavaşça 3-5 dakika boyunca (buharlaştırma) duman çıkması sağlanana kadar ısıtma işlemi uygulanmış ve soğuduktan sonra su ile yıkanmıştır. % 3 asit alkolle renk giderilinceye kadar muamele edilip su ile yıkanmıştır. Lam üzerine zıt boyama için metilen mavisi kaplanmış ve 1 dakika sonra su ile yıkanmıştır. Lam havada kurutulduktan sonra boyanan preparatlar x1000'lik büyütmede ışık mikroskopunda incelenmiştir. EZN boyama sonuçları kantitatif olarak rapor edilmiştir

3.4. Kültür: 2008-2012 yılları arasında L-J besiyerine ekilip üremesi olup EZN boyama yapılarak ARB basiller saptanan ve buzdolabında saklanan suşlardan kontamine olmayan ve yeterli koloniye sahip olanlar MGIT tüpüne ekildi. Ekim için L-J besiyerinden pamuklu swap yardımı ile birkaç koloni alınarak içinde steril 4 ml serum fizyolojik olan tüp içerisinde homojen hale getirildi. Tüpün kapağı kapatılarak 2-3 dakika vortekslendi. Vorteks sonrası tüp içinden 1 ml süspansiyon alınarak McFarland 0,5-0,6 olacak şekilde ayarlandı. 15 dakika bekletildi. Numaralandırılan MGIT tüpüne 0.8 ml Growth Supplement/MGIT PANTA Antibiyotik karışımı ilave edildi. Hazırlanılan süspansiyonun üst kısmından yeni MGIT tüpüne 0,1 ml ekim yapılarak cihaza konuldu.

Mayıs 2012 ve Eylül 2013 yılları arasında laboratuvara kabul edilen materyaller, homojenizasyon-dekontaminasyon-konsantrasyon işlemleri tamamlandıktan sonra ekimi MGIT ve L-J besiyerlerine yapılmıştır. L-J besiyerine, hazırlanan örnekten 0,5 ml ekilmiştir. 37 °C'de etüvde bir gece boyunca yatık pozisyonda inkübe edildikten sonra dik pozisyona getirilip 6 hafta süreyle inkübasyona devam edilmiştir. L-J besiyerleri haftada bir kez üreme kontrolüne tabi tutulmuştur. Üreyen kolonilerin morfolojileri makroskopik olarak ve kolonilerden hazırlanan preparatlar EZN ile boyanarak mikroskopik olarak incelenmiştir. MGIT tüp besiyerine 0,8 ml MGIT Growth Supplement/PANTA (polimiksin B, amfoterisin B, nalidiksik asit, trimetoprim, azlosilin) ilave edilmiştir. Dekontamine edilmiş örnekten 0,5 ml besiyerine

eklendikten sonra tüpün kapağı kapatılarak karıştırılmış ve cihaza konulmuştur. Pozitif üreme saptanan MGIT tüplerinden kanlı besiyerine pasaj alınmış ve aynı zamanda aside dirençli basil açısından EZN boyama yapılmıştır. Kanlı besiyerinde üreme olmayan ve EZN boyamada ARB pozitif basiller görülen tüpten identifikasyon ve antibiyogram yapıldı. Tüpler 1-2. günlerinde ise direk işlemlerde kullanıldı. 4-5. günlerinde ise 1 ml MGIT tüpünden alınan materyal, 4 ml serum fizyolojik ile karıştırılarak elde edilen tüp pozitif MGIT tüpü olarak kullanıldı. Dokuzuncu günü aşan pozitif tüpler ise 1/10 oranında serum fizyolojikle sulandırılıp üstünden 0,1 ml alınarak, içine 0,8 ml Growth Supplement/MGIT PANTA Antibiyotik karışımı ilave edilmiş yeni MGIT tüpüne ekilip tekrar cihaza konuldu.

3.5.İdentifikasyon: MGIT ve L-J besiyerlerinde üreyen aside dirençli basillerin tanımlanması amacı ile BD MGIT TBc Identification Test ((TBc ID) kullanılmıştır. Test *Mycobacterium tuberculosis* complex tarafından salınan MPT64 protein fraksiyonunu saptamaktadır. Pozitif MGIT tüpü 10 güne kadar test amaçlı kullanılabilir. Oda sıcaklığında bulunan MGIT tüpü vortekslenip 100 µl pipetle alınıp örnek kutucuğna konuldu. 15 dakika beklenip test okundu. Test üzerinde bulunan kontrol ve test çizgilerinden her ikisinde de pembe renk oluştu ise test pozitif olarak değerlendirildi ve suş *Mycobacterium tuberculosis* complex olarak kabul edildi. Pozitif test resim 3.1’de görülmektedir. Sadece kontrol kısmında pembe renk oluştu ise suş NTM olarak kabul edildi. *Mycobacterium tuberculosis* complex suşlarına antibiyogram duyarlılık testi yapıldı.

3.6.Antimikobakteriyel Duyarlılık Deneyleri

MGIT Duyarlılık: *M. tuberculosis* kompleks olarak tanımlanmış mikobakterilere, sıvı besiyerinde pozitif üreme saptanması anından itibaren beş gün içinde duyarlılık deneyi uygulanmıştır. Antibiyotik duyarlılık testi, ilk 1-2 günde yapıldıysa pozitif MGIT tüpünden, 3-5. günlerde yapıldıysa pozitif MGIT tüpünden 1 ml sıvı alınıp, 4 ml steril serum fizyolojik içeren tüpe aktararak 1/5 oranında dilüe edilerek elde edilen tüp pozitif MGIT tüpü kabul edilerek yapılmıştır. Steril bir tüpe 10 cc steril serum fizyolojik konulup, pozitif MGIT tüpünden 100 µl alınarak sulandırılmıştır. Beş adet MGIT tüp besiyeri alınarak birinci tüp kontrol(growth control-GC), diğer tüpler test edilecek antibiyotikler olmak üzeri işaretlenmiştir. Aseptik şartlarda 0,8 ml MGIT Growth Supplement çözeltisi/MGIT 960 SIRE desteği her tüpe ve her antibiyotik çözeltisinden 100’er µl ait oldukları tüplere eklenirken, kontrol tüpüne hiçbir antibiyotik eklenmemiştir. Eklenen ilaç miktarları ve MGIT tüplerindeki konsantrasyonları tablo 3.1’de görülmektedir. Hazırlanmış bakteri süspansiyonundan 0,5 ml kontrol tüpüne ilave

edilmiştir. Ayrıca organizma içeren süspansiyon kontaminasyon kontrolü için 0,5 ml %5 koyun kanı içeren TSA (tripticase soy agar)'a ekilmiştir. İçine antibiyotikler eklenen tüplere ise pozitif MGIT tüpünden 0,5 ml eklenmiş ve kapakları kapatılmıştır. MGIT antibiyotik duyarlılık testi yapılış tekniği resim 3.2'de görülmektedir.

Tüpler AST Set Carrier'a solda GC tüpü sonrasında SIRE tüpleri olmak üzere yerleştirilip barkodu okunup cihaza konulmuştur. Cihaz içine AST Set Carrier ve MGIT tüpleri resim 3.3'de görülmektedir. Kanlı agarda 48 saatte üreme yoksa işleme devam edilmiş, üreme varsa AST atılıp tekrar saf kültürden yeniden yapılmıştır. 37 °C'de cihazda inoküle olan test, cihaz tarafından artan floresan bakımından sürekli izlenmiş ve GC tüpüyle kıyaslayıp, duyarlılık sonuçlarını belirlemiştir. Pozitif sinyal veren cihazdan AST seti çıkarılıp barkodu okutulmuş ve yazıcıdan duyarlılık testi sonucu basılmıştır. Cihazın testle ilgili hata vermesi veya beklenmeyen direnç durumunda işlemler ilk basamaktan itibaren yeniden yapılmış, test ikinci kez tekrarlanmıştır. EMB'ye dirençli sonuçlanmış test örneği resim 3.4'te görülmektedir. Direnç saptanmayarak sonuçlanmış test resim 3.5'te görülmektedir.

Tablo 3.1: Kritik ilaç konsantrasyonları ve MGIT tüplerindeki konsantrasyonları

İlaç	Rekonstitüsyondan sonraki ilaç konsantrasyonu**	Tüplere eklenen miktar	MGIT tüplerindeki son konsantrasyon*
MGIT SM	83 µg/mL	100 µL	1,0 µg/mL
MGIT INH	8,3 µg/mL	100 µL	0,1 µg/mL
MGIT RIF	83 µg/mL	100 µL	1,0 µg/mL
MGIT EMB	415 µg/mL	100 µL	5,0 µg/mL

* CDC'nin önerdiği ilaç konsantrasyonlarına eşdeğerdir.

**Bu konsantrasyonlar için ilaçlar 4 ml steril/deiyonize su kullanılarak rekonstitüe edilmelidir.

Resim 3.1: BD MGIT TBc Identification Test ile pozitif sonuç



Resim 3.2: MGIT antibiyotik duyarlılık testi uygulama şekli



Resim 3.3: MGIT cihazı içinde AST Set Carrier ve çalışılan antiyogram tüpleri



Resim 3.4: EMB'e dirençli sonuçlanmış test (Ok: EMB içeren tüpteki partikülleri göstermektedir)



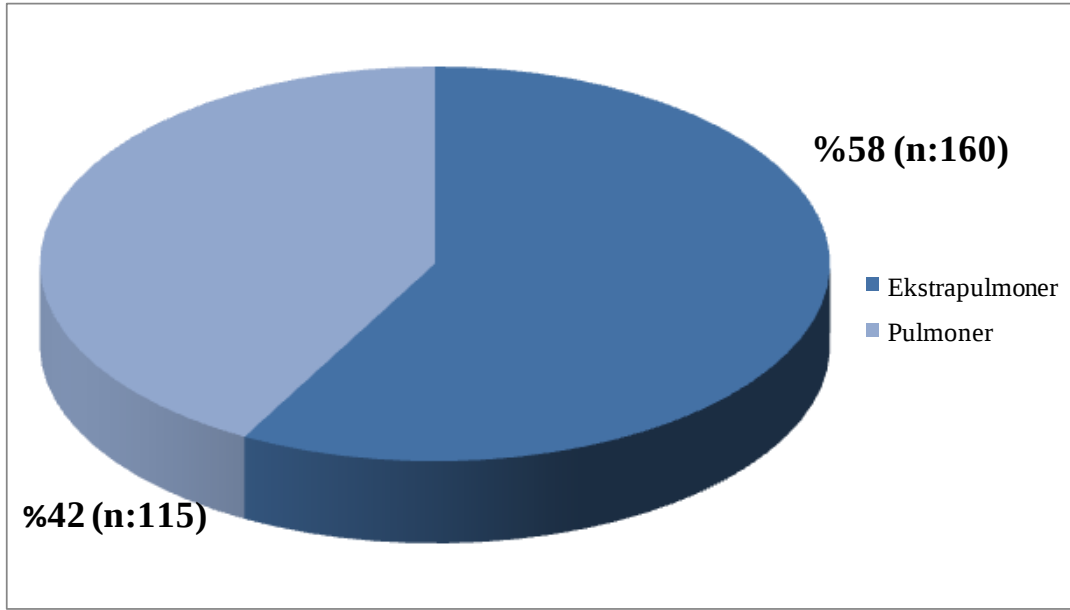
Resim 3.5: Direnç negatif sonuçlanmış test (Sadece kontrol tüpte partiküller görülmektedir)



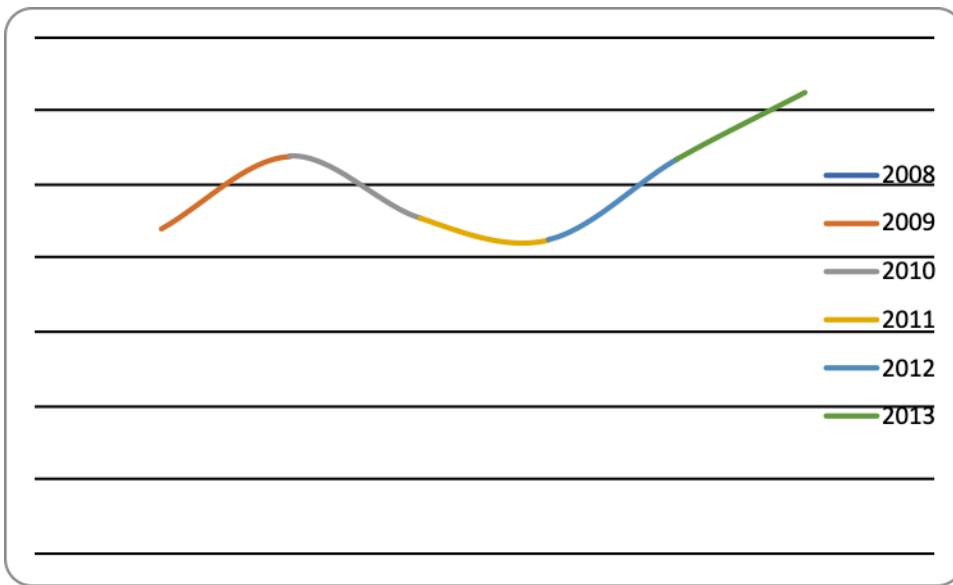
4. BULGULAR

Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında Ocak 2008- Eylül 2013 tarihleri arasında mikobakteri kültürü yapılması istenen 6018 örnekten 275'inde (%4,6) *M. tuberculosis* complex üretildi. *Mycobacterium tuberculosis* complex üremesi olan materyallerin pulmoner, ekstrapulmoner dağılımı şekil 4.1'de görülmektedir. Yıllara göre materyal sayısı dağılımı da şekil 4.2'de görülmektedir.

Şekil 4.1: İzole edilen suşların pulmoner/ekstrapulmoner sayı ve oranları

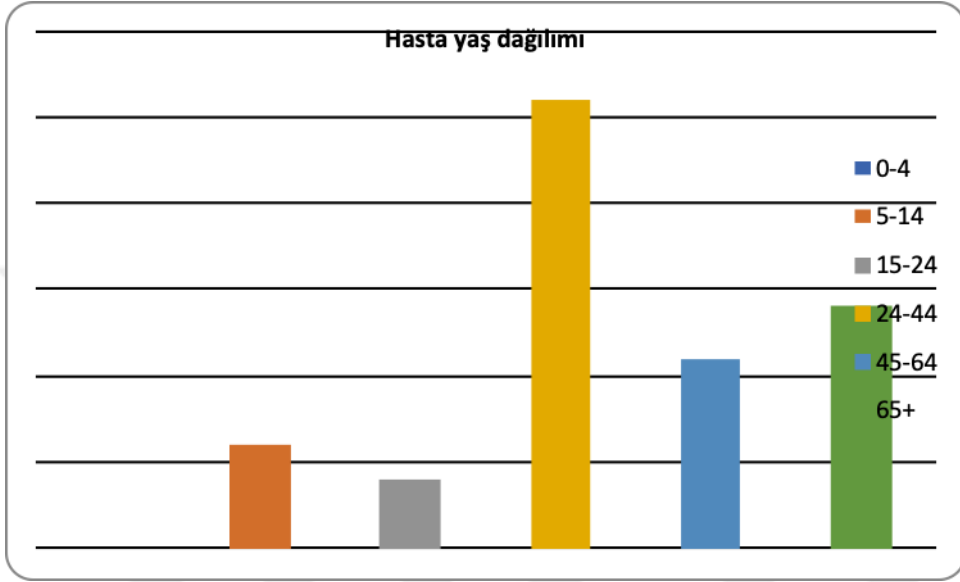


Şekil 4.2: Mikobakteri kültür çalışılması istenen toplam materyal sayısı



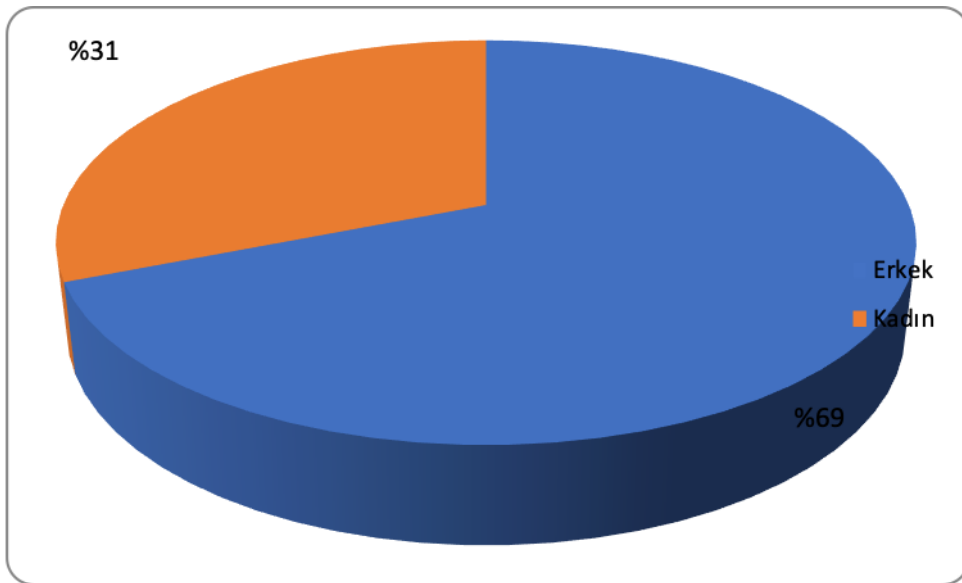
İzole edilen 160 ekstrapulmoner örneğin 61'ine antitüberküloz duyarlılık bakılmıştır. Bu 61 örneğin ait olduğu hastaların yaş dağılımı 10-83 yıl, ortalama yaş 43,9 olarak tespit edildi. 15 yaş altı hasta sayısı 6 ve 15-64 yaş arası hasta sayısı 41 (%67)'di. Hastaların yaş dağılımı şekil 4.3'de görülmektedir.

Şekil 4.3: Hasta yaş dağılımı



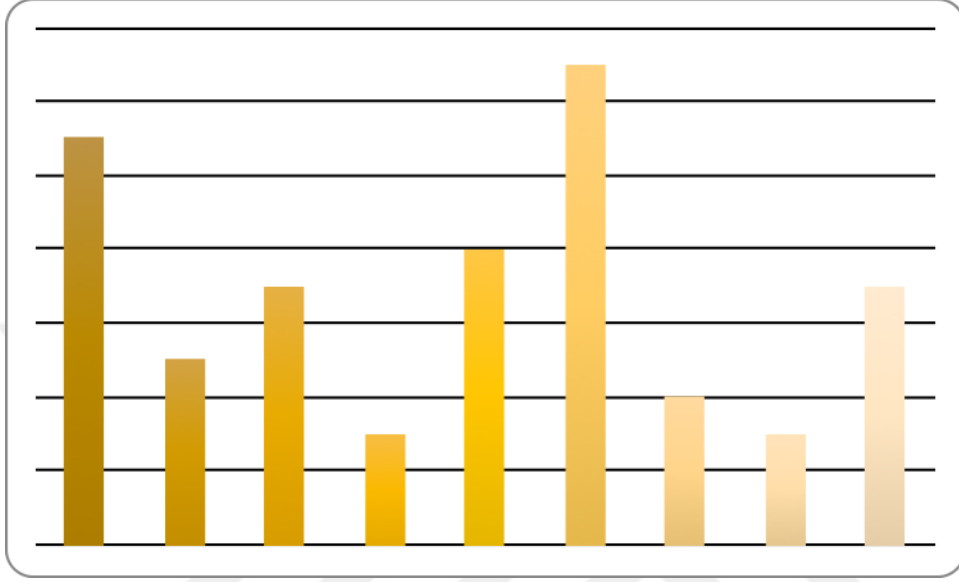
61 ekstrapulmoner materyale ait *Mycobacterium tuberculosis* complex suşunun 37'si erkek, 24'ü kadın hastalara aitti. Cinsiyet dağılımı şekil 4.4'de görülmektedir.

Şekil 4.4: Örneklerin cinsiyet dağılımı



61 kültür pozitif ekstrapulmoner örnek içinde %21 oran ile en fazla servikal lenfadenopati materyali bulunup onu %18 ile BOS materyali izlemektedir. Ekstrapulmoner materyallerin dağılımı şekil 4.5’de görülmektedir.

Şekil 4.5: 61 ekstrapulmoner örneğin dağılımı



Diğer: Ekstremitelerde abseler materyalleri, meme absesi

BACTEC MGIT 960 ile yapılan antibiyotik duyarlılık testleri sonucu 61 *Mycobacterium tuberculosis* complex suşunun antitüberküloz ilaç direnç sayı ve oranları tablo 4.1’de görülmektedir.

Tablo 4.1: Suşların antitüberküloz direnç oranları

Antimikobakteriyel	Duyarlı (n)	Dirençli (n)	Oran (%)
Streptomisin (SM)	54	7	11.5
İsoniazid (INH)	44	17	27.8
Rifampisin (RIF)	59	2	3.2
Etambutol (EMB)	52	9	14.7

61 suşun 2’sinde (%3.2) INH ve RIF’e birlikte direnç olup MDR-TB olarak saptandı. 61 suşun 20’si (%32.8) en az bir antibiyotiğe dirençli bulundu. 7 suşta (%11.5) iki ilaca direnç, 4 suşta (%6,5) 3 ilaca direnç saptanmıştır.

Materyallere göre direnç oranlarına bakıldığında plevral sıvı, Pott/psoas absesi ve BOS'ta en yüksek direnç oranları görülmüştür.

Materyallere göre antibiyotik direnç oranları tablo 4.2'de görülmektedir. MDR dirençli suşların saptandığı materyaller plevra sıvısı ve Pott absesine aittir.

Tablo 4.2: Materyallere göre antitüberküloz direnç sayı ve oranları

Materyal (n)	SM		INH		RIF		EMB	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
BOS (n: 11)	1	%9	3	%27	0		1	%9
Biyopsi (n: 4)	0		1	%25	0		2	%50
Diz sıvısı (n: 3)	0		1	%33	0		0	
İdrar (n: 5)	0		1	%20	0		2	%40
Periton (n: 3)	0		1	%33	0		1	%33
Plevra (n: 7)	2	%28	2	%28	1	%14	1	%14
Pott/psoas absesi (n: 8)	3	%37	5	%62	1	%12	2	%25
Servikal LAP (n: 13)	1	%7	2	%15	0		0	
Diğer (n: 7)	0		1	%14	0		0	

Diğer: Ekstremitte abse materyalleri, meme absesi

Altmış bir örnek, materyallerin cinsine göre ilaç direnci olan suş sayısı ve kaç ilaca dirençli olduklarına göre değerlendirilmiş ve sonuçları yorumlanmıştır. Buna göre toplamda 20 suşta herhangi bir veya birden fazla ilaca karşı direnç görülmüştür. Toplamda dirençli olunan ilaç sayısı ise 35'tir. En fazla ilaç direnci Pott/psoas absesinde (%34.3) görülmüştür. BOS örneklerinde ise ilaç direnci %11.3 olarak saptanmıştır. Örnekler içinde en fazla izole edilen servikal LAP örneklerinde ilaç direnci %7'dir. Örneklerle göre dirençli suş sayıları ve dirençli ilaç sayıları tablo 4.3'de görülmektedir.

Tablo 4.3: Örneklerle göre dirençli suş sayıları ve dirençli ilaç sayıları

Materyal (n)	İlaç direnci olan suş sayısı (n: 20)	Dirençli ilaç sayısı	%
--------------	--------------------------------------	----------------------	---

BOS (11)	4	5	11.3
Biyopsi (4)	2	3	1.7
Diz sıvısı (3)	1	1	8.3
İdrar (5)	2	3	15
Periton (3)	1	2	16.6
Plevra (7)	2	6	21.4
Pott/psoas absesi (8)	5	11	34.3
Servikal LAP (13)	2	3	7
Diğer (7)	1	1	3.5
Toplam (61)	20	35	

Diğer: Ekstremitel abses materyali, meme absesi

BOS suşlarına bakıldığında 2 suшта toplam 3 ilaca direnç saptanmıştır. Bir suшта sadece INH, bir suшта da SM ve INH direnci mevcuttur. Diğer dokuz suшта ilaç direnci görülmezken, MDR-TB saptanmamıştır. BOS suşlarının özellikler tablo 4.4’de görölmektedir.

Tablo 4.4: BOS suşlarının özellikleri

Suşlar	Yaş	Cinsiyet	SM	INH	RIF	ETM
1	14	K	S	S	S	S
2	16	K	S	R	S	S
3	24	K	S	S	S	S
4	25	K	S	S	S	S
5	35	E	S	S	S	S
6	41	K	S	S	S	S
7	57	E	R	R	S	S
8	58	E	S	S	S	S
9	66	K	S	S	S	S
10	74	K	S	S	S	S
11	74	K	S	S	S	S

S: Sensitif R: Resistant

5.TARTIŞMA

Tüberküloz uzun yıllardır tedavi edilebilen bir hastalık olmasına rağmen halen insanlığı tehdit eden sağlık problemleri arasında ön sıralarda yer almaktadır. Son yıllarda, immün sistemi baskılayan HIV enfeksiyonu ile malignitelerin oranındaki artış ve sosyoekonomik sorunların sonucu olarak tüberküloz enfeksiyonu ile enfekte birey sayısında artış görölmektedir

(4,5). Hem tüberküloz insidansında hem de dirençli suşlarla enfeksiyonda artış dikkat çekmektedir. Bu yüzden standart tedavi protokolü yerine her hastaya antibiyotik test duyarlılık sonuçlarına göre tedavi başlanması önerilmektedir. Testin; klinik gereklilik ve üçüncü ayda tedaviye yanıtızsızlık durumunda tekrarlanması ve CDC'ye göre test sonuçlarının en geç 28-30 günde bildirilmesi, dirençle savaşta ve doğru tedavide önemlidir (12).

Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Dairesi Başkanlığı'nın 2011 yılı raporunda, Türkiye'de 2009 yılında 17.402 yeni tüberküloz hastası bildirilmiştir. Hastaların %63'ü (10.906) akciğer tutulumu, %34'ü (5.848) akciğer dışı organ tutulumu, %3,7'si (648) hem akciğer hem de akciğer dışı tutulum göstermiştir. Genel Türkiye verilerine göre hastaların %60'ı erkek, %40'ı kadındır. Erkek/kadın oranı 1,5'tir. Dünya genelinde ise oran 1,7'dir (4,5). EPTB olgularının ise %45'i erkek, %55'i kadındır. Bizim çalışmamızda ise vakaların %69'u erkek %31'i kadın olup EPTB Türkiye verilerine göre erkek olgu sayısı daha fazladır. 5414 tane pulmoner ve pulmoner+ekstrapulmoner TB hastası üzerinde yapılan bir çalışmada erkek oranı %66 olarak saptanmıştır. Bu çalışmada sadece PTB+EPTB birlikteliği olan 434 vakaya bakıldığında da %60 erkek, %40 kadın olgu olduğu görülmüştür (54). Dünya verilerine göre vakaların %88'i 15-64 yaş arasındadır. 2011 yılı Verem Savaş Dairesi Başkanlığı raporuna göre 15-64 yaş arası vaka sayısı tüm vakalarda %83, EPTB olgularında %81 iken çalışmamızda bu oran %67'dir. Dünya verilerine göre 15 yaş altı çocuk oranı %6 civarındadır (4,5). 2009 verilerine göre Türkiye'de 15 yaş altı çocuk vaka oranı tüm hastalarda %5.5, EPTB olgularında 7.1 iken çalışmamızda %9.8'dir.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda EPTB görülme oranı plevranın çalışmalara dahil edilip edilmemesine göre %3.2 ile %46 arasında değişmektedir (13,14). Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Dairesi Başkanlığı'nın 2011 yılı raporunda, Türkiye'de 2009 yılında tüm olgularda ve yeni olgularda akciğer TB oranı %66 iken, EPTB oranı %34 olarak bildirilmiştir. WHO'nun Global Tuberculosis Report 2012'e göre ise ekstrapulmoner tüberküloz oranı %14'tür (4,5). Son yıllarda tanı ve bildirimde artış nedeniyle EPTB sıklığında artış görülmektedir. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Dairesi Başkanlığı'nın 2011 yılı raporunda akciğer dışı organ tüberkülozlarının en sık plevra (%32,6) ve ekstratorasik lenf bezlerinde (%31,4) görüldüğü tespit edilmiştir (5). Bizim çalışmamızda en yüksek oran servikal LAP materyalinde (%21.3) görülmüş olup onu %18 ile BOS materyali izlemiştir. Sonra sırasıyla Pott/psoas absesi, plevra, ekstremitelerdeki abseler, idrar, diz sıvısı ve biyopsi materyalleri izlemektedir. Bizim olgularımızda EPTB oranının yüksek

olması, bölgemiz için ekstrapulmoner tüberkülozun önemli bir sağlık sorunu olduğunu göstermekte ve ekstrapulmoner tüberkülozun klinik prezantasyonu hakkında dikkatli olunması, tanı ve tedavide hassas davranılması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Ayrıca hastanemizin özellikle spesifik bir Göğüs Hastalıkları Hastanesi ile aynı bölgede olması ve Merkezimizin özellikle EPTB konusunda yıllardır var olan geleneği nedeniyle daha çok vakaya hizmet verdiği de unutulmamalıdır.

Tüberküloz hastalığının kontrol altına alınması ve hastaların etkili bir şekilde tedavi edilebilmeleri için, erken tanı ve antimikobakteriyel ilaçlara duyarlılık önem taşımaktadır. Standart antitüberküloz ilaçlara karşı olan mikobakteriyel direnç, bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır ve tüberküloz tanısı ve duyarlılık deneyi sonuçlarının gecikmesi tüberküloz direncinin gelişmesine katkıda bulunan önemli bir faktördür. Bu nedenle izolasyon, identifikasyon ve duyarlılık deneyi sonuçlarının en kısa süre içerisinde elde edilmesi önem kazanmıştır (11,12).

Tüberkülozun kesin tanısında etkenin kültürde üretilmesi altın standart olarak kabul edilmektedir (1,2,6,9). Birçok laboratuvarın, kültür yöntemi olarak L-J gibi katı besiyerlerini kullanmaları nedeniyle, sonuçların alınması 6-8 hafta gibi uzun bir süreyi gerektirmektedir. Sıvı besiyerleri sonuç süresinin kısalmasına neden olmuşlardır (35). Mikobakterilerin ilaç duyarlılıklarının araştırılması için çok sayıda duyarlılık yöntemi tanımlanmakla birlikte agar proporsiyon ve BACTEC, CLSI tarafından altın standart olarak kabul edilmiştir (48,49).

Çalışmamızdaki 61 antibiyotik duyarlılık sonucu, MGIT 960 test prosedürü izlenerek elde edilmiştir. Dünya genelinde yapılmış pekçok çalışmada en sık direncin INH'e karşı olduğu bildirilmektedir. Türkiye'de ise yapılan çalışmalarda INH ve SM direnci ilk sıralarda yer almaktadır (55). Bu durumun INH ve SM'nin tedavi ve profilakside en fazla kullanılan ilaçlar olmalarına bağlı olabileceği düşünülmektedir (56). Türkiye'de yapılan bazı çalışmalarda direnç oranları INH için %2.9-24.6 arasında, RIF için % 0-15.8, SM için % 2.1-19.2, EMB için %2-18.8 arasında bildirilmektedir. Değişik merkezlerin sonuçları tablo 5.1'de gösterilmektedir. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Dairesi Başkanlığı'nın 2011 yılı raporuna göre 2009 verilerinde yeni vakalarda INH direnci %10,2, RIF direnci %3.8, EMB direnci %3,5, SM direnci %2,7 iken tüm hastalardaki direnç sırasıyla %13,1, %6,5, %4,7 ve %8,5'dir. Vakaların %19'unda en az bir ilaca direnç saptanmıştır (4). Bizim çalışmamızda ise INH %27.8, RIF %3.2, EMB %14.7, SM %11.5 oranlarında dirençli bulunmuştur. İlaçlardan en az birine direnç %32.8 oranında görüldü.

MDR-TB, en az izoniazid ve rifampine birlikte direnç görülmesi durumudur. XDR-TB ise primer ilaçlardan en az izoniazid ve rifampine direnç görülmesi ile birlikte sekonder ilaçlardan florokinolonlar ve üç paranteral ilaçtan (amikasin, kanamisin veya kapreomisin) en az birine direnç görülmesi durumudur (4,5,47). Çalışmamızda MDR-TB %3.2 oranında saptanmıştır. Tüm dünyada yeni vakaların %3.7'si, önceden tedavi alanların ise %20'sinin MDR-TB olduğu tahmin edilmektedir. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Dairesi Başkanlığı'nın 2011 yılı raporuna göre 2009 verilerinde MDR-TB oranı %5.1 oranında bildirilmiştir (5). Türkiye çalışmalarında MDR-TB oranları tablo 5.1'de görülmektedir.

Tablo 5.1: Türkiye'deki çeşitli çalışmalarda saptanan direnç yüzdeleri (%)

Kaynak	İl	Yöntem	Örnek sayısı	EPTB örnek sayısı	SM	INH	RIF	ETM	İkili direnç	Üçlü direnç	Dörtlü direnç	MDR-TB
Aydın ve ark. (55)	Zonguldak	BACTEC	125	16	19.2	23.2	8	4	8	3.2	3.2	*
Öz ve ark. (56)	Eskişehir	BACTEC+ Mycolor TK	284	45	2.1	14.4	7	2.8	3.9	2.4	0.7	4.6

Saral ve ark.(57)	Trabzon	BACTEC	442	69	9.9	24.6	15.8	18.8	*	*	*	14.7
Dünder ve ark. (58)	İzmit	BACTEC	157	24	4	13	0	3	8	1	0	5
Tuncer ve ark.(59)	Konya	BACTEC	905	*	5.2	11.7	5.7	4.9	5.4	2.6	0.6	4
Aydın ve ark.(60)	Trabzon	BACTEC	212	60	5.2	6.1	0.5	2.4	8	2.8	0.9	4.8
Gönlügür ve ark. (61)	Sivas	BACTEC	158	20	11.4	17.7	4.4	5.1	7.6	1.2	0.6	3.8
Karadağ ve ark. (62)	Samsun	BACTEC	50	16	4	8	4	2	6	2	*	4
Alışkan ve ark.(63)	Adana	BACTEC	373	80	2.1	2.9	0.5	3.2	3.5	1.3	0.3	2.1
Çalışmamızda	İstanbul	BACTEC	61	61	11.5	27.8	3.2	14.7	12	6.5	0	3.2

*belirtilmemiş

Hindistan’da 2012 yılında Maurya ve ark. yaptığı bir çalışmada MGIT kültür yöntemi ile izole edilen 165 ekstrapulmoner *M. tuberculosis* complex suşunda yapılan antibiyotik duyarlılık testleri sonucu primer direnç INH %27.6, RIF %14.6, ETM %14.6, SM %13.8 olarak saptanırken, sekonder direnç INH %38.1, RIF %21.4, ETM %19.1 ve SM %23.8 oranında saptanmıştır. MDR-TB yeni olgularda %11.4, önceden tedavi almışlarda %19.1 oranında saptanmıştır (64). Bu rakamlar bizim bulgularımıza göre yüksektir.

TB menenjit ve direnç durumunu gözden geçirecek olursak, sadece bu klinik tablo ile ilişkili veriler kısıtlıdır. Thwaites ve ark.nın 180 Vietnam'lı erişkin menenjitli hastadan elde ettikleri BOS izolatlarını inceledikleri ve en az bir ilaca direnci % 40 olarak saptadıkları çalışmalarında % 5.6 olguda INH ve RIF direnci birlikte bulunmuştur. Menenjitli olguların %22’sinde Anti HIV testi pozitif olarak tespit edilmiştir. MDR-TB olarak saptanan 10 hastanın hepsi ortalama 12 günde kaybedilmiştir. HIV enfeksiyonunun TB menenjitli olgularda ölüm için risk faktörü olduğu bildirilmiştir (65).

Şengöz ve ark. yaptığı bir çalışmada, L-J besiyerine ekilerek *M. tuberculosis* complex üretilen 45 adet BOS izolatu değerlendirilmiş ve E-test yöntemi ile antitüberküloz duyarlılık sonuçları

alışılmıştır. İzolatlardan sadece birinde çok ilaca direnç saptanmıştır. Özellikle primer direncin yüksek olduğu ülkelerde duyarlılık testleri sonucu ile tedavi verilmesinin önemi vurgulanmıştır (11). Yine aynı grubun 229 *M. tuberculosis* suşunu inceledikleri çalışmalarında; konvansiyonel biyokimyasal yöntemlerle *M. tuberculosis* complex olarak identifiye edilen ve E-test yöntemi ile antitüberküloz duyarlılıkları belirlenen 117 ekstrapulmoner suşun 47'si abse, 30'u BOS, 9'u LAP biyopsi materyallerine aittir. 59 suşa E-test yanında L-J proporsiyon yöntemi de uygulanmıştır. Pulmoner rneklerde INH ve RIF direnci %7, SM direnci %3 iken EMB direnci %0'dır. Ekstrapulmoner rneklerde INH, RIF, SM direnci %1 oranında saptanırken EMB'e direnç saptanmamıştır. İnceleme yapılan 30 BOS suşunda EMB, INH, RIF ve SM'e birer örnekten direnç saptanmıştır. Yapılan çalışmada ekstrapulmoner örneklerde pulmoner örneklerle göre direncin düşüklüğüne dikkat çekilmiştir (66). Sadece ekstrapulmoner örneklerle yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında direnç oranlarında yıllar içinde artış olduğu görülmektedir. Ülkemizden ve dünyadan veriler genel olarak akciğer TB ya da tüm suşlar için verilmektedir. Oysa EPTB oranları tüm dünyada giderek artmaktadır. Bunun nedenleri arasında yaşlı nüfusun giderek artması ve bu hastalarda yapılan girişimler ve verilen tedaviler sonucu ortaya çıkan immün yetmezlik sayılabilir. Ayrıca çok sayıda hastada tedavi amacı ile kullanılan TNF alfa inhibitörleri gibi immün sistemin belli bölümlerini baskılayan tedaviler de bu duruma katkıda bulunmaktadır. Dünya nüfusunun giderek yaşlanıyor olması kadar HIV/AIDS varlığı da hala büyük bir tehdit olarak algılanmaktadır. Özellikle son on yılda geliştirilen HIV/AIDS'e yönelik tedaviler büyük bir umut oluşursa da hastalarda Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome'a (IRIS) neden olarak EPTB tablolarının daha çok ortaya çıkışına sebep olmaktadır. TB ve Diyabetes mellitus birlikteliğinin günümüze yansıması olan Metabolik Sendrom ve TB birlikteliği ve toplumun 50 yıl içinde ulaşacağı nokta endişe ile beklenmektedir (1,13,14).

EPTB tanısındaki zorluklar ve tedavisindeki güçlükler; menenjit gibi sekellere neden olabilen ve mortalitesi yüksek tabloları için son derece önemlidir. Hastalığın mortalitesi kadar kalıcı sekelleri de topluma olan yükünün önemini ortaya koymaktadır. EPTB suşlarında yapılacak direnç çalışmaları son derece önemlidir. Ve karşılaştırmalar bu suşlar arasında yapılmalıdır (11). Dünyadan ya da ülkemizden sadece EPTB rnekleri ile yapılan ulaşılabilen yayın sayısı çok azdır. Bizim alışmamızda 61 EPTB suşunun 20'sinde bir ya da daha fazla sayıda ilaca direnç saptanmıştır. Özellikle menenjitli hastalar için MDR varlığının saptanması son derece önemlidir.

Sonuç olarak, ülkemizde hala nedeni bilinmeyen ateş vakalarında en sık karşılaşılan klinik tablo olan EPTB; her branştan hekimin karşılaştığı bir klinik tablodur ve tanısında güçlükler vardır. Hastalığın düşünülmesi ve tanı için çaba harcanmasının gerekliliği konusunda tüm hekimlerde farkındalık oluşturulmalıdır. Ayrıca EPTB olgularında amacımız tanı kadar etkenin eldesi de olmalıdır. Etyolojik tanıya ulaşmak; riskli bir tedavinin uzun süre kullanımının önlenmesi kadar etkenin eldesi ile direnç testlerinin de yapılabilirliği anlamını taşımaktadır. Bu nedenle gerekirse örneklemeler tekrarlanmalı ve etyolojik tanı için çaba harcanmalıdır.



6. KAYNAKLAR

1. Fitzgerald DW, Timothy RS, Haas DW . Mycobacterium tuberculosis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th ed. Philadelphia, Pa.: Churchill Livingstone; 2009: 3129-3163.
2. Babacan F, Hasdemir U. Mycobacterium tuberculosis complex. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. (editörler) Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3.Baskı. Nobel Tıp Kitapevleri, 2008: 2283-2302.
3. Bilgehan H. Mycobacteriumlar. Bilgehan H, Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları, İzmir. 4.Baskı, 2004; 36:571-593.
4. Global Tuberculosis Report 2012 (World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2012, WHO Report , Geneva 2012.

5. Türkiye Verem Savaş Raporu 2011 (T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaşı Dairesi Başkanlığı. Türkiye’de Verem Savaşı 2011 Raporu. Sağlık Bakanlığı Yayın No: 845, 2011. Fersa Ofset, Ankara.
6. Gillespie SH, *Mycobacterium tuberculosis*. Gillespie SH, Hawkey PM. Principle and Practice of Clinical Bacteriology Second Edition 2005,10:159-169.
7. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Mycobacteria*. Bailey&Scott’s Diagnostic Microbiology, 12 th Edition, Mosby Elsevier St. Louis Missouri, 2007: 45: 478-509
8. Mikrobiyolojik ve moleküler tanı yaklaşımı ve dirençte son durum. Oğuz VA. EKMUD 20-24 Mart 2013. Antalya, Türkiye. syf.108-112.
9. Özyurt M. Akciğer ve akciğer dışı tüberküloz tanısında moleküler yöntemlerin kullanımı. Mikrobiyol Bul 2012; 46(2): 319-331.
10. Updated guidelines for the use nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. MMWR Mortal Morbid Weekly Rep 2009; 58(01); 7-10.
11. Şengöz G, Yıldırım F, Yaşar KK, Berzeg D, Bakar M, Nazlıcan Ö. Beyinomurilik sıvısından izole edilen 45 *Mycobacterium tuberculosis* suşunun E-test yöntemi ile antitüberküloz ilaçlara duyarlılıkları. ANKEM Derg 2006; 20: 69-72.
12. Initial therapy for tuberculosis in the era of multidrug resistance recommendations of the advisory council for the elimination of tuberculosis of the Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Mortal Morbid Weekly Rep 1993;42:1-8.
13. İnönü H, Köseoğlu D, Pazarlı C ve ark. Bir üniversite hastanesinde takip edilen ekstrapulmoner tüberkülozlu olguların özellikleri. Tur Toraks Der 2010; 11: 167-72.
14. Tavusbay N, Mertoğlu A, Aksel N, Özsöz A. Ekstrapulmoner tüberkülozlu olguların epidemiyolojik, klinik ve laboratuvar özellikleri. İzmir Göğüs Hastanesi Dergisi. 2008; 22(2): 027-034.
15. Barış İ. Çağlar boyu tüberküloz. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu Kitabı, 11-12 Haziran 2003. Samsun, Türkiye. syf.1-7.
16. Donoghue HD, Spigelman M, Zias J, Gernaey-Child AM, Minnikin DE. *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA in calcified pleura from remains 1400 years old. Letters in Applied Microbiology 1998;27:265–269.

17. Köksal F, Yaman A. Farklı bir bakteri topluluğu mikobakterilerde hücre duvarı yapısı. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu Kitabı, 11-12 Haziran 2003. Samsun, Türkiye. syf. 34-47.
18. Rota S. Tüberküloz Dışı Mikobakteriler ve *Mycobacterium leprae*. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. (editörler) Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3.Baskı. Nobel Tıp Kitapevleri, 2008: 2302-2311.
19. Brown-Elliott BA, JR Wallace RJ, Infections Due to Nontuberculous Mycobacteria Other than *Mycobacterium avium-intracellulare*, . In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th ed. Philadelphia, Pa.: Churchill Livingstone; 2009:3191-3198.
20. Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. Elsevier, Tuberculosis. 2003; 83: 91–97.
21. Brisse S, Supply P, Brosch R, Vincent V, Gutierrez MC (2006) “A re-evaluation of *M. prototuberculosis*”: continuing the debate. PLoS Pathog 2: e95.
22. Biçmen C, Coşkun M, Gündüz AT, Şenol G. Klinik örneklerden izole edilen atipik mikobakterilerin “Line Probe Assay” (Lipa) yöntemiyle tanımlanması. Mikrobiyol Bül 2007; 41; 503-510.
23. Ersöz G. Nontüberküloz mikobakteri enfeksiyonlarında tedavi. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu Kitabı, 11-12 Haziran 2003. Samsun, Türkiye. syf. 187-194.
24. Alpaslan A. Non-tüberküloz mikobakteri enfeksiyonlarında laboratuvar tanı ve duyarlılık testleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu Kitabı, 11-12 Haziran 2003. Samsun, Türkiye. syf. 388-396.
25. Yüce A. Nontüberküloz mikobakteri enfeksiyonlarının klinik önemi. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu Kitabı, 11-12 Haziran 2003. Samsun, Türkiye. syf.173-177.
26. Springer B, Tortoli E, Richter I et al. *Mycobacterium conspicuum* sp. nov. A new species isolated from patients with disseminated infections. J. Clin. Microbiol.;1995;33(11): 2805-2811.
27. *Mycobacterium avium* Complex. Gordin FM, JR Horsburgh CR, . . In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th ed. Philadelphia, Pa.: Churchill Livingstone; 2009: 3177-3189.

28. Van Ingen J, Boeree MJ, Stals FS et al. Clinical *Mycobacterium conspicuum* Isolation from Two Immunocompetent Patients in The Netherlands. J Clin Microbiol. 2007; 45(12): 4075–4076.
29. Grech M, Carter R, Thomson R. Clinical significance of *Mycobacterium asiaticum* isolates in Queensland, Australia. J. Clin. Microbiol.; 48(1): 162–167.
30. Ito A, Kishi F, Saito N, Kazumi Y, Mitarai S. Pulmonary *Mycobacterium intermedium* disease in an elderly man with healed pulmonary tuberculosis. Journal Of Clinical Microbiology, 2005 Mar.:1473–1474.
31. Springer B, Kirschner P, Meyer GR, Schroder KH. *Mycobacterium interjectum*, a new species isolated from a patient with chronic lymphadenitis. Journal Of Clinical Microbiology. 1993 Dec.: 3083-3089.
32. Özbal Y. Tüberküloz immünolojisi. Erciyes Tıp Dergisi, 2006; 28 (1): 25-34.
33. Rachman H, Strong M, Schaible U ve ark. Mycobacterium tuberculosis gene expression profiling within the context of protein networks. Microbes Infect. 2006; 8(3):747-57.
34. Özsoy G, Göktaş HP, Erdem İ, Özyürek SÇ, Yüksel S. Erişkinde 67 akciğer dışı tüberküloz olgusunun değerlendirilmesi. İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection) 2005; 19 (4): 407-413.
35. Özakin C, Gedikoğlu S. Tüberküloz tanısında tüberküloz laboratuvarının rolü: tanı ve ilaç duyarlılık testlerinde rutin laboratuvar yöntemlerinin değeri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu Kitabı, 11-12 Haziran 2003. Samsun, Türkiye. syf. 397-401.
36. Köksalan OK. Günümüzde tüberküloz tanısı / güçlükleri. ANKEM Derg 2010;24(Ek 2):61-63.
37. Meltem Uzun, Örneklerin İşlenmesi ve Kültür Yöntemleri, VII. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kursu Kitabı, 17-19 Ekim 2008. Bursa, Türkiye.syf.12-24.
38. Sar NS. Direk Mikroskopi Teknikleri ve Değerlendirilmesi. VII. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kursu Kitabı, 17-19 Ekim 2008. Bursa, Türkiye.syf.25-37.
39. Saniç. Tüberküloz tanısında moleküler yöntemlerin yeri. ANKEM Derg 2007;21(Ek 2):81-85.
40. Özyurt M. Tüberkülozun laboratuvar tanısında kullanılan moleküler ticari tanı sistemleri, VII. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kursu Kitabı, 17-19 Ekim 2008. Bursa, Türkiye. syf. 88-111.

41. Sürücüoğlu S. Tüberküloz basilinin klasik yöntemlerle identifikasyonu, VII. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kursu Kitabı, 17-19 Ekim 2008. Bursa, Türkiye. syf. 37-49.
42. Kurtoglu MG, Özdemir M, Keşli R, Özkalp B, Baysal B. tüberküloz şüpheli hastalardan *Mycobacterium tuberculosis* complex izolasyon oranı ve suşların BACTEC™ NAP ve İmmünokromatografik TB Ag MPT64 Rapid™ testleri ile tanımlanması. Mikrobiyol Bul 2011; 45(2): 266-273.
43. Abe C, Hirano K, Tomiyama T. Simple and rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by immunochromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal antibodies. J Clin Microbiol 1999; 37(11): 3693-7.
44. Wallace RJ JR, Griffith DE, Antimycobacterial Agents . In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th ed. Philadelphia, Pa.: Churchill Livingstone; 2009: 533-548.
45. Rattan A, Kalia A, and Ahmad N. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: molecular perspectives. Emerging Infectious Diseases 1998; Vol. 4(2): 195-208.
46. Jnawali JN and Ryoo S. First– and second–line drugs and drug resistance. Tuberculosis - Current Issues in Diagnosis and Management 2013, Chapter 10: 163-180.
47. Bektore B, Haznedaroğlu T, Baylan O ve ark. çok ilaca dirençli Tüberküloz izolatlarında yaygın ilaç direncinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2013; 47(1): 59-70.
48. Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Insitute. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes. Approved Standard. CLSI Document M24-A2. 2011, 2nd ed. CLSI.
49. Yurtsever SG, Biçmen C, Gündüz AT, Özkütük N, Salman S, Demirci M. *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarının antitüberküloz ilaçlara duyarlılığının saptanmasında antibiyotikli Löwenstein-Jensen Besiyerinde proporsiyon yönteminin BACTEC 460 tb sistemi ile karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul 2011; 45(4): 623-631.
50. Tansel Ö. Klasik antibiyotik duyarlılık test yöntemleri, 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu Kitabı, 11-12 Haziran 2003. Samsun, Türkiye. syf. 347-351.
51. Özkütük N. Antibiyotik Duyarlılık Test Yöntemleri, VII. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kursu Kitabı, 19 Ekim 2008. Bursa, Türkiye. Syf. 50-75.

52. Kiraz N. Antitüberküloz ilaçlara direnç mekanizmaları ve yeni ilaçlar, 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu Kitabı, 11-12 Haziran 2003. Samsun, Türkiye. syf. 173-177.
53. Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Respir Res 2001, 2:164–168.
54. Lin CY, Chen TC, Lu PL ve ark. Effects of gender and age on development of concurrent extrapulmonary tuberculosis in patients with pulmonary tuberculosis: a population based study. PLoS One. 2013 May 22;8(5):e63936.
55. Osman A, Cömert FB, Külâh C, Aktaşlı E, Sümbüloğlu V, Zonguldak ilinde izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılığının BACTEC MGIT 960 sistemi ile belirlenmesi. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2008;38 (2) : 61-70.
56. Öz Y, Aslan M, Akşit, Durmaz F, Kiraz N. *Mycobacterium tuberculosis* complex izolatlarının primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılığının değerlendirilmesi. ANKEM Derg 2012;26(1):20-24.
57. Saral ÖB, Sucu N, Boz GA, Erdem M, Köksal İ. 442 *Mycobacterium tuberculosis* Suşunda BACTEC yöntemi ile kombine ilaç direncinin araştırılması. Toraks Dergisi 2007; 8(3):174-178.
58. DüNDAR D, Tamer GS. *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi izolatlarının primer antitüberküloz ilaçlara direnç oranları. Klimik Dergisi 2009;22(2):52-54.
59. Tuncer İ, Dağı HT, Solgun G ve ark. Konya bölge Tüberküloz Laboratuvarı'nda 2001-2008 yılları arasınca soyutlanan mikobakteri suşlarının birinci seçenek anti-tüberküloz ilaçlara direnci. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2012;42(1):27-31.
60. Aydın F, Kakıkkaya N, Bayramoğlu G ve ark. Klinik örneklerden izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* kompleks suşlarının antibiyotiklere direnç oranları. Mikrobiyol Bul 2011;45(1):36-42.
61. Gönügür U, Bakıcı MZ, Gönügür TE, Hasbek M. Kısa Bildiri: Sivas ilinde antitüberküloz ilaçlara direnç oranları. Mikrobiyol Bul 2007;41:459-463.
62. Karadağ A, Tokaç M, Güvenli A, Sünbül M, Günaydın M, Saniç A. Klinik örneklerden izole edilen tüberküloz basili kompleksinin majör antitüberküloz ilaçlara direnç oranları. ANKEM Derg 2004;18(4):189-192.

63. Alışkan HE, Bostanoğlu E, Turunç T ve ark. Retrospektif olarak tüberküloz Laboratuvarının altı yıllık sonuçları ve antimikobakteriyel ilaçlara direnç oranları. . Tur Toraks Der 2013;14:53-58.
64. Maurya AK, Kant S, Nag VL, Kushwaha R, Dhole TN. Trends of anti-tuberculosis drug resistance pattern in new cases and previously treated cases of extrapulmonary tuberculosis cases in referral hospitals in northern India. J Postgrad Med 2012;58:185-189.
65. Thwaites GE, Lan NT, Dung NH et al: Effect of antituberculosis drug resistance on response to treatment and outcome in adults with tuberculosis meningitis, J Infect Dis 2005;192(1):79-88.
66. Yaşar KK, Şengöz G, Pehlivanoğlu F ve ark., Akciğer ve Akciğer Dışı Kaynaklı 229 Mycobacterium tuberculosis İzolatının Majör Antitüberküloz İlaçlara Duyarlılık Oranları ve E Test ile Standart Proporsiyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması, Türkiye Klinikleri J Med SCI 2011;31(5):1132-8