

153839

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS İZOLASYONUNDA POLİMERAZ ZİNCİR
REAKSİYONU VE KÜLTÜR YÖNTEMİNİN (MGIT)
KARŞILAŞTIRILMASI**

Ebru ÖKSÜN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ YÖNETİCİSİ
Prof. Dr. Akgün YAMAN

ADANA /OCAK-2007

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fonu, TS2006YLO4 nolu proje olarak desteklenmiştir.

KABUL VE ONAY FORMU

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan **Klinik örneklerden Mycobacterium tuberculosis izolasyonunda polimeraz zincir reaksiyonu ve kültür yönteminin (MGIT) karşılaştırılması** adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 12/01/2007

İmza
Prof.Dr.Akgün YAMAN
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi
Jüri Başkanı

İmza
Prof.Dr.Fatih KÖKSAL
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi
Raportör

İmza
Doç.Dr.Gönül ASLAN
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Yukarıdaki tez, Yönetim Kurulunun 18.01.07 tarih ve 2.18.5 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. F. KASAP
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Eğitim sürem boyunca bilimsel desteklerini esirgemeyen, her zaman hoşgörölü davranan, her konuda rahatlıkla ulaşırp danıştığım, büyük desteklerini gördüğüm ve engin tecrübelerinden faydalandığım danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Akgün Yaman'a ve Çukurova Üniversitesi Tıp Faköltesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında ki diğer tüm hocalarıma, çalışma arkadaşlarıma ve bölüm personeline en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ebru ÖKSÜN



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
KABUL VE ONAY	I
TEŞEKKÜR	II
İÇİNDEKİLER	III-IV
TABLO LİSTESİ	V
KISALTMALAR	VI
ÖZET	VII-VIII
SUMMARY	IX-X
1.Giriş	1-2
2.Genel Bilgiler	3
2.1.Tarihçe	3-4
2.2.Epidemiyoloji	4-5
2.3.Patogenez ve Patoloji	5-6
2.3.1.Mikobakteriler	6
2.3.1.1.Taksonomi	6-8
2.3.1.2. Genel Özellikleri	8-9
2.3.1.3. Hücre yapısı	9-10
2.3.1.4. Antijenik yapı	10-11
2.3.1.5. Genom	11-12
2.3.1.5.1.Mikobakteriyofajlar	12-13
2.3.1.5.2.Mikobakteri plazmidleri	13
2.3.1.5.3.Transpozonlar ve katılım dizileri	13-15
2.4.Laboratuvar Tanısı	15
2.4.1.Mikroskopik inceleme	15-16
2.4.2.Kültür	16-18
2.4.2.1.Örneklerin İşlenmesi	19
2.4.2.2.Besiyerine Ekim ve İnkübasyonu	19-20
2.4.2.3.Kültürlerin Değerlendirilmesi	20
2.4.3.Tüberküloz Basillerinin İdentifikasyonunda ve Tiplendirilmesinde Kullanılan Yöntemler	21

2.4.3.1.Klasik Yöntemler	21
2.4.3.2.Moleküler Yöntemleri	22
2.4.3.2.1.DNA probları	22-24
2.4.3.2.2.İmmünolojik tanı	24
3.Materyal ve Yöntem	25
3.1.Materyal	25
3.2.Yöntem	25
3.2.1. Ehrlich- Ziehl- Neelsen Boyama Yöntemi	25
3.2.1.1.Boyaların hazırlanması	25
3.2.1.1.1. Asit- Alkol eriyiği	25
3.2.1.1.2. Ehrlich- Ziehl- Neelsen	25-26
3.2.2.Kültür	26
3.2.2.1.Kullanılan Yöntem	26
3.2.2.2.Yöntemin esası	26
3.2.2.3.Kullanılan kimyasal solüsyon	27
3.2.2.4.İçindekiler	27
3.2.2.5.Uygulama	27-28
3.2.3. PCR Cobas Amplicor MTB Assay	28
3.2.3.1.PCR Çalışmasında Kullanılan Cihaz ve Gereçler	29
3.2.3.2. PCR Çalışmasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	29
3.2.3.3.PCR Yöntemi	29-30
4. Bulgular	31-32
5. Tartışma	33-38
6. Sonuç ve Öneriler	39
7. Kaynaklar	40-45
8.Özgeçmiş	46

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo I. İnsanlarda patojen olan Mikobakteri türlerinin sınıflandırılması	7
Tablo II. Mikobakterilerdeki katılım dizileri (insertion sequences)	14
Tablo III. Mikobakteri İzolasyonunda Yaygın Kullanılan Besi yerleri	16
Tablo IV. Mikobakterilerin izolasyonunda örnek işleme akış şeması	19
Tablo V. MGIT Tüplerinin İçeriği	28
Tablo VI. Olguların yaş ve cinslerine göre dağılımı	31
Tablo VII. Çeşitli klinik örneklerde ARB, PCR, Kültür sonuçları	32
Tablo VIII. Kültür altın standart alındığında ARB ve PCR'ın değerlendirilmesi	32

KISALTMALAR

ARB	: Asido rezistan boyama yöntemi
dATP	: Deoksi adenin trifosfat
dCTP	: Deoksi sitozin trifosfat
dGTP	: Deoksi guanin trifosfat
dNTP	: Deoksi nükleotid trifosfat
dTTP	: Deoksi timin trifosfat
LAM	: Lipoarabinomannan
LM	: Lipomannan
L-J	:Löwenstein-Jensen besiyeri
MGIT	: Mikobakteri Üreme İndikatör Tüpü
NALJ	: N-Acetyl-L-Cystein
OADC	: Oleik asit Albumin, Dekstroz ve Katalaz karışımı
PANTA	:Polimiksin B, Amfoterisin B,Nalidiksik asit , Trimetoprim, Azlosilin
karışımı	
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Taq	:Thermus aquaticus
BOS	:Beyin Omurilik Sıvısı
IFN	:İnterferon
DNA	:Deoksi ribo nükleik asit

ÖZET

KLİNİK ÖRNEKLERDEN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS İZOLASYONUNDA POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU ve KÜLTÜR YÖNTEMİNİN (MGIT) KARŞILAŞTIRILMASI

Tüberküloz tanısında kullanılmaya başlanan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR); materyalde bulunan *M.tuberculosis* DNA'sının çoğaltılmasına dayalı hızlı, duyarlı ve özgül bir testtir. Aynı gün içinde tüberküloz tanısının konması ve aynı zamanda tedaviye geçilmesini sağlar. Bundan dolayı çalışmamızda tüberküloz tanısı için MGIT kültür ile Ehrlich Ziehl-Neelsen yöntemi ve PCR yönteminin rutin tanıdaki yerinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Bu amaçla Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarına tüberküloz şüphesiyle gelen yaşları bir ile seksensekiz arasında değişen elli hastaya ait balgam, otuz hastaya ait BOS, on hastaya ait plevra ve on hastaya ait asit örnekleri olmak üzere toplam yüz örnek değerlendirildi.

Çalışmaya alınan elli balgam örneğinin otuzdördü Ehrlich Ziehl-Neelsen boyama yönteminde pozitif, otuz'u hem kültür hem PCR'da pozitif bulundu. Çalışılan BOS örneklerinin hepsi Ehrlich Ziehl-Neelsen boyama yönteminde negatif bulunurken beşi kültürde pozitif, onu PCR'da pozitif bulundu. On hastaya ait plevra örneğinde örneklerinin hepsi Ehrlich Ziehl-Neelsen boyama yönteminde negatif bulundu bunların ikisi kültürde pozitif, üçü PCR'da pozitif bulundu. Asit örneklerinde BOS ve plevrada olduğu gibi örneklerinin hepsi Ehrlich Ziehl-Neelsen boyama yönteminde negatif bulunurken, kültürde bir örnekte pozitif, PCR'da iki örnek pozitif bulundu.

Tüberküloz tanısında kesin tanı metodu olan kültür sonuçları PCR ile karşılaştırıldığında, PCR'nin sensitivitesi %100, spesifitesi %86.9, pozitif prediktif değeri %88.2 negatif prediktif değeri %100 olarak bulundu. Kültür sonuçları ile direkt mikroskopinin karşılaştırılmasında ise sensitivite %78.9 spesifitite %93.4, pozitif prediktif %88.2, negatif prediktif %87.7 olarak bulundu.

Steril vücut sıvılarında (BOS, plevra, asit mayi) çok az sayıda tüberküloz basilinin bulunması nedeniyle, boyama yöntemleri yetersiz kalmakta. Bu nedenle daha ileri tanı metotlarına gereksinim vardır.

Kültürün uzun süre sonuç verdiği düşünülecek olursa PCR'nın kültür metodları ile birlikte kullanılmasının erken tanı ve tedavi açısından faydalı olacağı tespit edilmiştir.

**Anahtar sözcük: PCR, kültür, M.tuberculosis, Ehrlich Ziehl-Neelsen
MGIT**



SUMMARY

COMPRASION OF PCR and CULTURE METHODS ISOLATION MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS FROM THE CLINICAL SAMPLES

Polymerase chain reaction (PCR) that has begun to utilize at the diagnosis of tuberculosis is a rapid, sensitive and specific test, which is based on amplification of *M.tuberculosis* DNA in clinical samples. This method provides an opportunity to diagnose and begin the specific treatment within same day. However the primary objective of this study was to compare amplification techniques of their ability to detect *M.tuberculosis* in specimens.

A total of 100 specimens, 50 sputum, 30 cerebral spinal fluid, ten pleura and sterile body fluid samples have been evaluated.

The specimens of one 100 patients have been examined in Central Laboratory of Balcalı Hospital. Out of 100, 38 specimens were MGIT culture positive for *M.tuberculosis* 34 specimens were microscopy positive and 47 specimens were PCR positive.

The clinical data were resulted in the following outcomes when culture results were compared to PCR. The sensitivity of PCR was 100 %, specificities of each system were 86.9 % and positive predictive value was 88.2 % and negative predictive value was 100 %. When culture results were compared to direct microscopy; the outcomes were found as 78.9 % sensitivity, 93.4 % specificities of each system, 88.2 % positive predictive and 87.7 % negative predictive.

Since there are too few numbers of tuberculous bacilli in the Sterile body fluids (cerebral spinal fluid, pleura) bacteriological methods are unreliable for early diagnosis of tuberculosis. Because of this reason, there are some requirement to use new rapid diagnostic methods.

The data presented represent a considerable number of specimens evaluated within a considerable number of patients. Since culture results take a

considerable length of time, the study was thought to be conducted together with PCR culture methods.

Key words: PCR, culture, M.tuberculosis, Ehrlich Ziehl-Neelsen, MGIT



1.GİRİŞ

Tüberküloz insanoğlunun en eski hastalıklarından biridir ve dünyada halen yaygın durumdadır. Tüberküloz, önlenabilir ve tedavi edilebilir bir enfeksiyon hastalığı olmasına rağmen gerek basilin yapısından gerekse organizma ile olan ilişkisinden kaynaklanan sorunlar sebebiyle güncelliğini korumaktadır.

Ülkemiz için de tüberküloz önemli bir halk sağlığı problemi olmaya devam etmektedir. Özellikle son yıllarda tüberkülozlu hasta sayısı bütün yaş gruplarında hissedilir oranda artmaktadır. Yurdumuzda bu duruma yol açan faktörler; hastaların yeterli olarak izlenememesi, düzenli bir tedavinin uygulanamaması, erken tanı yöntemlerinin yetersiz olması, hasta yakınlarının yeterli düzeyde takip edilememesi, koruyucu aşılarda düzenli yapılamaması sosyo-ekonomik olumsuz koşullar ve hekimlerin konuya yeterli ilgi göstermemesi şeklinde özetlenebilir

Tüberküloz tanısının güç olmasının nedenleri; tüberküloz enfeksiyonu sinsi başlar, yavaş bir klinik seyir gösterir organizmada uzun yıllar sesiz kalıp vücut drenajı düştüğü anda aktif hale geçebilir. Tüberküloz tanısında enfeksiyona spesifik laboratuvar ve radyolojik bulgular bulunmayabilir. Kültürde *M.tuberculosis* 45 gün gibi uzun süre de ürerler. Tüm buna benzer nedenler bilim dünyasını tüberküloz tanısında daha spesifik ve daha hızlı tanı yöntemlerini aramaya zorlamıştır.

Mikroskopik smearde aside dirençli bakterilerin Ziehl-Nelsen boyaması ile gösterimin en hızlı yöntem olarak bilinmekte ise de, bu yöntem duyarlı değildir. Diğer bir tanı yöntemi olan Bactec MGIT 960 sisteminde, oksijenin kullanılması sonucu gönderilen UV ışını kompleksindeki değişiklik nedeniyle floresans vermekte ve oluşan floresans miktarı üreme indeksi olarak değerlendirilmektedir. Tanı zamanının kısaltılması açısından büyük ilerlenmeler sağlanmışsa da hala sonuçların elde edilebilmesi için ortalama 10-15 güne ihtiyaç vardır.

İşte son yıllarda tüberküloz tanısına hız kazandırmak ve mycobacterium basillerini çoğaltarak gösterilmesi için PCR tekniğine başvurulmuştur.

Ancak PCR testlerinde, yalancı pozitiflik ve yalancı negatifliklerin oluşması bir dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Fakat son zamanlarda geliştirilen test yöntemleri bu yalancı pozitiflik ve yalancı negatiflikleri de çok aza indirmeye başlamıştır.

Bu yöntemlerle tanı klasik kültür yöntemleri örn: L-J'ne oranla önemli ölçüde kısalmış 10-15 güne kadar inmiştir. Ancak invajiv tüberküloz enfeksiyonlarında bu süre bile uzundur ve tedavinin gecikmesi mortaliteyi artırmaktadır.

Tüm bu nedenlerle biz de Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarı olarak laboratuvarımıza şüpheli gelen klinik örneklerde *M.tuberculosis*'in ortaya çıkarılmasında kullanılan ARB, MGIT 960 PCR yöntemlerini karşılaştırılarak erken ve kesin tanı değerlerini ölçmeye çalıştık.



2.GENEL BİLGİLER

2.1.Tarihçe

Tüberküloz insanlık tarihi boyunca toplumların gündeminde kalmış araştırmacıların ilgi odağı olmuş başlıca sağlık problemlerinden birisidir. Bazı neolitik ve erken dönem Mısır buluntularında, insan iskeletlerinde ve duvar resimlerindeki insan figürlerinde spinal pott hastalığının yol açtığı deformiteleri andıran değişikliklerin saptanması, tüberkülozun ilk çağlarda da var olduğuna yönelik önemli göstergelerdir⁽¹⁻³⁾.

İnsanların yerleşik yaşam düzenine henüz geçmediği dönemlerde olasılıkla sporadik olgular şeklinde görülen tüberküloz, nüfusun artması ve toplumsal birimlerinin oluşmasıyla, yavaş bir hızda da olsa, yayılmaya başlamıştır. Mcgrath, bir toplumda tüberkülozun endemik olabilmesi için, konak patojen ilişkisinin 180–440 bireylik bir sosyal ortamda sabit olarak devam etmesinin gerektiğini ileri sürmüştür⁽¹⁾.

Tüberküloz, endüstri devrimine kadar, sporadik görülen önemsiz bir hastalık olarak sürmüştür. onaltıncı yüzyıl sonları ve onyedinci yüzyılda İngiltere’de büyük bir patlama yapmıştır. Büyük beyaz veba olarak tanımlanan hastalık, o dönemdeki ölümlerin dörtte birinden sorumlu tutulmuştur^(1,2). Onsekizinci yüzyılda Avrupa’nın diğer kısımlarında da pandemik yayılım gerçekleşmiştir. Bu dönem dünyada tüberkülozdan ölümlerin en yüksek düzeyde yaşandığı bir dönemdir. Avrupalı göçmenlerle “Yeni Dünya”ya taşınan hastalık, onsekizinci yüzyılın ikinci yarısında kuzey Amerika’yı vurmuş, Rusya ve Hindistan 1880’lerde, Afrika 1910’larda, Yeni Gine de 1920’lerde tüberküloz ile tanışmışlardır⁽¹⁾. Avrupalılarının siyasi ve ticari amaçlı gezileri tüberkülozun dünyanın dört bir yanına yayılmasıyla sonlanmıştır. Ondokuzuncu yüzyılın ortalarından itibaren Osmanlı imparatorluğunu etkilemeye başlayan tüberküloz salgını bu yüzyılın sonlarında birçok padişahın ölümüne neden olacak yaygınlığa ulaşmıştır⁽⁴⁾.

Frederick Chopin’den şair John Keats’e, tüberkülozun bütün formları ve anatomik tutumlarıyla tek bir hastalık olduğunu ilk kez tanımlayan Theophile Laennec’den gençliğini Koch’un araştırmalarını sürdürmeye adayıp, bugün

adına tüberküloz immünolojisi araştırma enstitüsü olan Edward Livingston Trudeau'ya kadar yüzlerce seçkin insanın da tüberküloz'dan öldüğünü belirtmek gerekir⁽¹⁾. Tüberkülozlu hastanın tipik solgun, yorgun, bitkin görünümünü ondokuzuncu yüzyılın romantik sanat eserlerine yansıyan bir özellik olmuştur. İngiliz edebiyatının temel taşı olarak kabul edilen çok sayıdaki eseri oluşturan ve hepsi tüberkülozdan ölen Brönte ailesinin yedi üyesi, tüberküloza ailesel yatkınlık ve aile içi bulaş ile ilgili güzel bir örnektir⁽¹⁾.

Ondokuzuncu yüzyıl tüberküloz ile ilgili çok sayıda araştırmanın ve buluşun gerçekleştiği bir dönemdir. Pek çok önemli soru yanıt bulmuş, hastalık önemli oranda kontrol altına alınmıştır. Başta Amerika ve İngiltere olmak üzere çok sayıda gelişmiş ülke, hastalığının sabit bir hızda azaldığını bildirmiştir^(1,2). Ancak 1980'li yılların ortalarında, bu düşüş eğilimi tersine dönerek, yine aynı ülkelerde yıllık % 2-3 'lük artışlara yol açmıştır^(3,6-8). HIV ile enfeksiyon tüberküloz prevelansının yüksek olduğu bölgelerden göç, sosyoekonomik koşulları kötü olan, alkol ve uyuşturucu kullanan insanların çoğalması tüberkülozda gözlenen bu artışın nedenleri olarak sayılabilir. Bugün dünya tüberküloz insidansındaki artış yanı sıra, çoklu ilaç direnci gösteren basillerin etken olduğu enfeksiyonların da sık görülmesi ile ilgilenmektedir⁽⁵⁻⁹⁾. Dolayısıyla, tüberkülozun erken tanısı ve sağaltılması konularındaki araştırmalar oldukça hız kazanmıştır⁽¹⁾.

2.2.Epidemiyoloji

Tüberküloz çok önemli bir halk sağlığı sorunudur ve boyutları giderek artmaktadır. Dünyada yaklaşık 1,7 milyar kişi tüberküloz basili ile enfekte durumdadır. Bu dünya nüfusunun yaklaşık üçte birine eşittir. Enfekte popülasyonun 20 milyonu aktif hastalıklı kişilerdir. Ve her yıl yaklaşık 3 milyon kişi tüberküloz nedeniyle ölmektedir. Ölümlerin % 95'i az gelişmiş ülkelerde olmaktadır. Ayrıca dünyadaki enfekte popülasyonundan her yıl 8 milyon yeni vaka çıkmaktadır. Olguların yarısından biraz fazlası akciğer diğerleri de akciğer dışı tüberküloz olgularıdır. Akciğer tüberkülozu bulaşıcı olduğu için epidemiyolojik yönden çok büyük önem taşıyan ve diğer organ tüberkülozlarında bulunmayan bir yayılım potansiyeli yaratmaktadır⁽¹¹⁾.

Sonuç olarak akciğer tüberkülozu diğer organ tüberkülozlarının öncülüğünü temsil etmektedir.^(2,10) Ülkemizde hastalığın yaygınlığının, etkin tüberküloz mücadelesinin başladığı 1960'ların başından beri giderek azalma gösterdiği söylenebilir. 1960 yılındaki prevalans 2100–3000 / 100.000 oranında bulunmuş ve ülkedeki toplam tüberkülozlu sayısı 600.000–800.000 civarında tahmin edilmişken, 1982 yaygınlık çalışmasında prevalans 358 / 100.000 bulunmuş ve toplam 150.000–200.000 civarında hasta varlığının tahmin edildiği bildirilmiştir⁽¹¹⁾.

2.3.Patogenez ve Patoloji

Bakterilerin salgıladığı özel bir toksini yoktur, virülansında birden fazla faktör etkilidir. Konağın direnci bakterinin giriş yeri ve miktarı, kord faktör ve sulfatidler patogenezde rol oynayan önemli faktörlerdir⁽¹²⁾.

Tüberküloz basilli genellikle solunum yoluyla bulaşmakla birlikte duyarlı kişilere genito-üriner sistem, deri ve gastrointestinal yollarda da bulaşabilmektedir. Aktif tüberkülozlu kişinin konuşma, öksürme, aksırma ve balgamı ile etrafa saçılan basiller 1–10 mm. damlacıklar içinde solunum yoluna girer ve çok küçük olduğundan alveollere kadar ulaşırlar. Alveoller makrofajlar tarafından tutulan mutant inokulum 1–3 organizmadan fazla değildir^(13,14,15).

Solunan bakterilerin hastalık oluşturmaları hem basilin virulansına hemde makrofajların öldürme kapasitelerine bağlıdır. Eğer bakteriler bu safhada öldürülmez ise lenf-hematojen yolla yayılma meydana gelerek birçok doku ve organı tutarlar ve lezyonlar oluşur. Bunların birçoğu iyileşir, bununla birlikte reaktivasyon meydana gelirse milier tüberküloz ortaya çıkar, tüberkülin testi pozitifleşir⁽¹⁵⁾. Aktif tüberküloz geçiren bireylerde primer enfeksiyonun iyileşmesinden sonra immun supresyon sonucu reaktivasyon gelişebilir. Bu genellikle basile karışmadan sonraki 3 yıl içinde immun yetmezliği olan hastalarda görülür. Hastalığın ilerlemesini sağlayan faktörler immun sistemin zayıflaması ile ilgili faktörlerdir. Bunlar içinde; tekrarlayan hastalıklar özellikle Diabetes mellitus, primer immun yetmezliğe neden olan malign hastalıklar kemotorepi veya steroid tedavisi gerektiren hastalıklar, astım, kollojen vasküler

hastalıklar, kötü beslenme, alkol ve ilaç bağımlılığı, ileri yaş, sigara içme ve HIV enfeksiyonları sayılabilir^(13,14,15).

Tüberkülozun klinik belirtilerinin ortaya çıkmasındaki en önemli faktör tutunma yeridir. Akciğerlerde primer enfeksiyon oluşursa, ateş, halsizlik, iştahsızlık, kilo kaybı, gece terlemeleri, öksürük, balgam çıkarma ve göğüs ağrısı sıklıkla görülen semptomlardır. ABD’de yapılan bir çalışmada HIV enfeksiyonun epidemisinden önce, yeni tespit edilen tüberküloz olgularının %85 inde Pulmoner tutulum, kalan % 15’inde ise ekstrapulmoner tutulum veya her iki yerde de görülürken, HIV ile enfekte kişilerde yapılan çalışmada Pulmoner tutulum %70 oranında bulunmuştur^(13,14,15).

2.3.1.Mikobakteriler

2.3.1.1.Taksonomi

Tüberküloza neden olan Mycobacterium; Actinomycetales takımının Mycobacteriaceae familyasında bulunan tek cinstir. Mycobacterium adı, sıvı besiyerlerinin üzerinde üredikleri zaman küf benzeri ince bir zar oluşturlar⁽¹⁶⁾.

Günümüzde insanlarda hastalığa neden olan 23’ü yavaş üreyen, 5’i hızlı üreyen olmak üzere, toplam 74 mikobakteri türü tanımlanmıştır. Tablo 1’de insanlarda patojen olan belli başlı türler ve özellikleri görülmektedir^(17,18).

Klinik açıdan bakıldığında; hastalık yapma potansiyeli ve halk sağlığı ile yakın ilişkisi nedeni ile *M.tuberculosis*, cinsinin en önemli üyesidir. %1–3’ü *M.bovis* ve *M.africanum* tarafından oluşturulur⁽¹⁹⁾.

Mycobacterium tuberculosis, *M.bovis* ve *M.africanum* benzer klinik özellikler gösterirler ve bu üç türün homolog oldukları, ribotipleme ile doğrulanmıştır. Bu nedenle ayrı türler olarak değil, *M.tuberculosis*’ın varyantları olarak düşünüldüklerinden; tüberküloz terimi ile *M.tuberculosis* eş anlamda kullanılmaktadır^(16,20,21).

Tablo I: İnsanlarda patojen olan Mikobakteri türlerinin sınıflandırılması

TUR	PATOJENİTE
<i>M.tuberculosis</i> Complex	
<i>M.tuberculosis</i>	Bazen patojen
<i>M.leprae</i>	Bazen patojen
<i>M.africanum</i>	Bazen patojen
<i>M.bovis</i>	Bazen patojen
<i>M.ulcerans</i>	Bazen patojen
Runyon Grup I (Yavaş üreyen fotokromojenler)	
<i>M.kansasii</i>	Kesin patojen
<i>M.marinum</i>	Kesin patojen
<i>M.simiae</i>	Kesin patojen
<i>M.asiacitum</i>	Kesin patojen
<i>M.intermedium</i>	Kesin patojen
Runyon Grup II (Yavaş üreyen skotokromojenler)	
<i>M.szulgai</i>	Genellikle patojen
<i>M.scrofulaceum</i>	Bazen patojen
<i>M.xenopi</i>	Bazen patojen
<i>M.lentiflavum</i>	Bazen patojen
<i>M.interjectum</i>	Bilinmiyor
Runyon Grup III (Yavaş üreyen non-kromojenler)	
<i>M.avium</i>	Kesin patojen
<i>M.intracellulare</i>	Kesin patojen
<i>M.genavense</i>	Kesin patojen
<i>M.haemophilum</i>	Genellikle patojen
<i>M.malmoense</i>	Genellikle patojen
<i>M.shimoidei</i>	Bazen patojen
<i>M.celatum</i>	Bazen patojen
<i>M.branderi</i>	Bazen patojen
Runyon Grup IV (Hızlı üreyenler)	
<i>M.fortuitum</i>	Bazen patojen
<i>M.chelonae</i>	Bazen patojen
<i>M.abscessus</i>	Bazen patojen
<i>M.mucogenicum</i>	Bazen patojen
<i>M.peregrinum</i>	Bazen patojen

Türlerin keskin idendifikasyonu için üreme ısıları, pigmentasyon özellikleri, bazı kimyasal maddelere direnç durumu, değişik biyokimyasal aktiviteleri mikolik asit a, mikolik asit pirolizis esterleri, spesifik DNA problemleri ile hibridizasyon çalışmalarına gerek vardır⁽²²⁾. Bununla birlikte üreme hızı, koloni morfolojisi ve pigmentasyonun esas alındığı; 1959'daki Runyon sınıflaması günümüzde de kullanılmakta ve kısmen de olsa güncelliğini korumaktadır⁽²²⁾.

M.tuberculosis kompleks ve *M.leprae* dışındaki mikobakteriler, önceleri "sınıflandırılmamış", "atipik", "anonim" gibi isimlerle anıldıktan sonra, 1990'da Amerikan Toraks Topluluğu tarafından "tüberküloz dışı mikobakteriler=Non

tuberculosis Mycobacteria=NTM" veya tüberküloz basili dışındaki mikobakteriler=*Mycobacteria Other Than tuberculosis bacilli*=MOTT" olarak adlandırılmışlardır⁽²²⁾.

2.3.1.2.Genel Özellikler

Mikobakteriler 0,2–0,6 µm en, 1–10 µm boyda, hareketsiz, sporsuz kapsülsüz, ekzo endotoksinleri bulunmayan ince, aerobik çomakçıklardır. Türlerin çoğunluğu toprak ve sularda serbest yaşarlar. *M.tuberculosis* ve *M.leprae* gibi türlerin esas yaşam alanları, insanlar ve sıcakkanlı hayvanların enfekte dokularıdır⁽²³⁾.

Bu cinsin temel özelliği yavaş üremeleri, aside dirençli olmaları %61–71 gibi yüksek oranda G+C içermeleri ve hücre duvarında bol miktarda lipit bulundurmalarıdır. Lipit hücre yüzeyinde hidrofobik özellik kazandırır. Bu da mikobakterin birçok dezenfektana dirençli olmalarını sağlar ve ayrıca bu nedenle Gram ve Giemsa gibi rutin bakteriyolojik boyalarla çok güç boyanırlar. Uzun süreli ısı uygulaması olmazsa anilin boyaları ile de zor boyanırlar. Fakat bir kere boyandıktan sonra %5 HCl, %95 etanoldan oluşan asit-alkol karışımı ile dekolore edilemezler. Bu nedenle asido rezistans bakteriler =ARB veya asido alkolo rezistans bakteriler=AARB olarak isimlendirilirler. Bu özellikleri kullanarak geliştirilen Ehrlich-Ziel Neelsen (ARB) metodu veya metodun modifiye şekilleri ile boyanarak, diğer bakterilerden ayırt edilebilirler. Bu metot ile boyandıklarında, mavi zemin üzerine parlak pembe-kırmızı renkli, tek tek veya ikili, üçlü gruplar halinde ve birbirlerine paralel ya da uçlarında birbirlerine yaklaşarak açılı ya da X,V,L harfleri oluşturacak şekilde görülebilirler^(24,25).

M.tuberculosis bazı özellikleri ile de diğer bakterilerden farklıdır. 0,2–0,5 Mm eninde, 1–4 Mm boyundadır. Tek tek küçük zincirler veya küçük demetler halinde bulunur. Basiller yapılarında; vakuol, polimetafosfat ve glikojen granülleri içerdiği için, balgam ve benzer örneklerden hazırlanan preparatlarda irregüler olarak boyanabilirler. Kültürden hazırlanan preparatlarda kokoid veya filamentöz biçimlerde görülebilirler^(26,27).

M.tuberculosis, diğer mikobakterilerden birkaç basit test kullanarak ayırt edilebilirler. Bunları özetlersek: üremesi yavaştır, pigment oluşturmaz, niasin

üretir, nitratları indirger, az miktarda ısıya duyarlı katalaz üretir. Katalaz bu aktiviteyi pH 7'de ve 68°C'de 20 dakikada kaybeder. Bakteri genellikle izoniazide duyarlıdır. İzoniazide dirençli suşlar katalaz üretmezler⁽²⁸⁾.

M.tuberculosis, klinik örneklerden ilk izolasyonu için zenginleştirilmiş veya kompleks besiyerlerine ihtiyaç duyar. 37°C'de ürer. İkiye bölünmesi 15–20 saat sürdüğü için, üremesi yavaştır. %5–10 CO₂ ilavesi üremesini hızlandırır. % 60 homojenize yumurta içeren Löwenstein-Jensen besiyerinde ürettiğinde koloniler 3–6 hafta sonra görünür hale gelir. Kolonileri devetüyü renginde karnıbahar görünümlüdür, yüksek lipit içerikleri nedeni ile besiyerinin yüzeyine sıkıca tutunurlar. Bu nedenle öze ile zor alınırlar ve süspansiyon haline getirilmeleri zordur⁽²⁹⁾.

M.tuberculosis ısıya, güneş ışığına ve ultraviyole ışığına çok duyarlıdır. 60° de 20 dakikada, 70 °C 5 dakikada ölür. Fakat +4°C de haftalarca, -70°C de ısıya canlılığını korur, kuruluğa dirençlidir^(28,30).

2.3.1.3. Hücre yapısı

Mikobakteriler, bir plazma zarı ile sınırlanan sitoplazma ve bunu çevreleyen kompleks bir hücre duvarına sahip, prokaryotik hücrelerdir. Sitoplazmalarında çift sarmallı DNA içeren, membran bağlı olmayan sıkı sıkıya paketlenmiş tek bir kromozom, yirmiden fazla vakuol vardır. Ayrıca bazı plazmidlerde sahiptirler^(30,31).

Elektron mikroskopi ile yapılan çalışmalar, sitoplazmik zarın asimetric, iki tabakalı bir yapıya sahip olduğunu göstermiştir. Yapısında karbonhidratlar fosfatidil inozitol mannozidler, lipoarabinomannan (LAM) ve kardiyolipin fosfatidiletanolamin, açillenmiş monofosfoinositoller ve bunun gibi yoğun miktarda lipit bulunur⁽³¹⁾.

Mikobakterilerin hücre duvarı, hem morfolojisi hem de içeriği açısından özgül yapısı ile diğer bakterilerin hücre duvarından oldukça farklıdır. Bu özgülüğün önemli kısmı, duvarın kuru ağırlığının yaklaşık % 60'ını oluşturan lipit nedeniyledir. Duvar, esasen üç tabaka halinde kabul edilebilir. Hücre duvarının iç tabakasını, sitoplazmik zarı örten petidoglikan tabaka oluşturur. Bunun çevresinde arabinogalaktan-mikolik asit tabakası, en dışta da serbest

yağlardan mikozitler, kord faktör, balmumu yapısındaki maddeler ve polipeptitler yer alır^(28,31).

Hücre duvarının ana iskeleti, peptidoglikan ve arabinogalaktan moleküllerinin fosfodiester bağları ile bağlanması ile meydana gelir. Ayrıca LAM ve fenolik glikolipidler duvar yapısının önemli bir bölümünü oluşturur. Mikozitler gibi yağlar, mikobakterilerin hidrofobik olma özelliğinden sorumludurlar. kord faktörü adı verilen trehaloz dimikolat, virulanstan sorumlu majör komponentlerden biridir. Basillerin klinik örneklerde birbirine paralel yerleşmesine neden olup; Virulan *M.tuberculosis* suşları için tipiktir. LAM, hücre zarı fosfolipidine bağlıdır ve hücre duvarının yüzeyine kadar ulaşır. Patojen türlerde baskın bir mikobakteri antijeni olan LAM, T hücre proliferasyonunu baskılayıp, interferon (IFN) yapımını engelleyerek ve IFN-gamaya bağlı makrofaj aktivasyonunu önleyerek, bakterinin makrofaj içindeki yaşamını sürdürmesine yardımcı olur. Konağın immün cevabı üzerinde oldukça önemli etkilere sahiptir. Polipeptitler, hücre duvarı kuru ağırlığının %15'ini oluştururlar ve tüberkülozda hastanın immün yanıtının gelişmesine neden olurlar. Bu protein ekstraksiyonu ve pürifikasyonu ile elde edilen maddeler deri testlerinde (PPD) kullanılırlar^(28,31).

2.3.1.4.Antijenik yapı

Mikobakteriler Antijenik yapı olarak pek çok protein ve şeker içerirler. Monoklonal antikor ve problemleri kullanılarak *M.tuberculosis*'te yaklaşık 90 adet antijenik yapı belirlenmiştir. Antijenler sitoplazmada solubl veya hücre duvarında lipitlere bağlı olarak insolubl halde bulunabilirler. Sitoplazmik antijenler ya da otoliz veya mekanik hasar sonucu dışarı salınana kadar sitoplazmada bulunurlar ya da yaşayan hücreler olarak aktif olarak sekrete edilirler^(16,30).

Koch'un bakteriyi tanımlamasından (1891) dokuz yıl sonra en meşhur antijen olan tüberkülini tanımlamış ve tedavide kullanımı amaçlamıştır. Ancak daha sonra bu maddenin sadece tanı amacı ile kullanılabileceği anlaşılmış karışık bir yapıya sahip olan ürün, Seibert ve Munday (1932) tarafından kültür filtratının, amonyum sülfat presipitatu şeklinde pürifiye edilmiş ve PPD olarak adlandırılmıştır; ileri standardizasyonu ile de PPD-S kullanıma girmiştir⁽³¹⁾.

Antijenik protein yapıları; ısı şoku proteinleri, salınan proteinler lipoproteinler ve süperoksit dismutaz olarak sıralanabilir⁽³⁰⁾.

Isı şoku proteinleri: ısı artışı veya çevresel stres ile sentezlerinde artış olur. Koruyucu refakatçi, proteinler oldukları, polipeptid zincir bağlayabildikleri ve immünodominat işlev gördükleri belirlenmiştir. Molekül ağırlığı 65kD olan GroEL ve 12 kD olan GroES, mikobakteriyel ısı şoku proteinleri içinde en iyi bilinenlerdendir^(16,28,30).

Aktif olarak sekrete edilen proteinler: Ağırlıkları 23–30 kD kadardır. Enfeksiyonu takiben tanınan ilk proteinler oldukları için lipoproteinler ve ısı şoku proteinleri ile birlikte araştırmacıların ilgi odağı olmuşlardır. Grubun en önemli elemanı antijen 85 kompleksidir; bu kompleksin ayrı genler tarafından kodlanan ancak çapraz reaksiyon veren 85A, 85B ve 85C komponentlerinden oluştuğu gösterilmiştir. Hücresel ve humoral immün cevap uyarıcısıdır, koruyucu immünite gelişmesinde ve komplikasyonlarda rolleri olduğu ileri sürülmüştür. Fibronektine bağlanma yetenekleri sayesinde, patojen ile konak organizma arasında iletişim sağladıkları düşünülmektedir^(28,30).

Lipoproteinler: *M.tuberculosis* solubl ekstraktlarının bol miktarda protein içerdiği saptanmış olup; bunlardan 38 Kd'luk antijenin *M.tuberculosis* için oldukça spesifik bir antijen olduğu kabul edilmiştir. Lipoproteinlerin, beslenme ve besin taşıma, fosfat taşıma, immün cevapta hedef oluşturma gibi işlevler gördükleri tespit edilmiştir^(28,30).

Süperoksit dismutaz: 23 kD ağırlığındadır. Bakteriyi, toksik reaktif oksijen ürünlerinden koruyarak, fagozomda veya hücre dışında oksidatif strese karşı koyma yeteneği sağlar^(28,30).

2.3.1.5. Genom

M.tuberculosis'in genom yapısının tamamı, Dünya Sağlık Örgütü'nün desteklediği bir proje ile çözülmüş bulunmaktadır. Toplam 4.411.527 baz çift nükleotidden oluşan genomun G+C içeriği % 65,6 olarak hesaplanmıştır⁽³²⁾.

Moleküler klonlama yöntemlerinin gelişmesi ile mikobakteri genleri *E.coli* veya hızlı üreyen mikobakteriler gibi başka bakterilere aktarılmış ve bu bakterilerin düzenlediği proteinler elde edilmiştir. Bu deneyler sonucunda, diğer

mikroorganizmalarda bulunan birçok genetik yapı ve işlevin mikobakteriler de özgül bakteriyofajlar, plazmidler, katılma dizileri ve transpozonlar tanımlanmıştır⁽³²⁾.

2.3.1.5.1.Mikobakteriyofajlar

Gardner ve Weiser tarafından (1947) ilk mikobakteriyofajın tanımlanmasından sonra, günümüze dek 250'yi aşkın mikobakteriyofaj saptanmıştır. Başlangıçta mikobakteriyofajlar, mikobakterilerin, özellikle tüberküloz basilinin tiplendirilmesi amacı ile kullanılmışlardır. Son yıllarda bakteriyofaj tiplendirilmesinin yerini, teknik olarak daha kolay ve çok daha ince farkları ayırt edebilen bir teknik olan restriction fragment length polymorphism (RFLP) tekniği almıştır^(16,32).

Mikobakterilerin hücre çeperleri, diğer bakterilerle kıyaslandığında çok kalın ve aşılması güç olduğu için, DNA gibi büyük moleküllerin hücre içine sokulması oldukça güçtür. Bu nedenle mikobakteriyofajlar, moleküler klonlamada kullanılan önemli araçlar haline gelmişlerdir. Bu amaçla geliştirilen fajların çift zincirli DNA içermesi, kendi genomunun mikobakteri genomuna eklenerek lizojenik bir şekilde kalabilmesi, geniş bir konak çeşidinin bulunması ve genomunda kendisi için yaşamsal değeri olmayan bölgelerin bulunması özellikleri aranmış; bu özellikleri içeren birkaç mikobakteriyofaj üzerinde çalışıldıktan sonra, L5 isimli fajın, bu amaçla kullanılabilecek en uygun fajlardan biri olduğu kanısına varılmış ve moleküler klonlama amacı ile geliştirilmiştir^(29,32).

L5 genomunda kodlanan bir integras, faj genomunun konak hücre genomuna özgül bir bölgeden katılabilmesini sağlar. Bu mekanizma öğrenildikten sonra, katılımda rol oynayan DNA bölgesi ve integras geninin eklendiği plazmid klonlama vektörleri yapılmış ve bunların BCG ve M. Smegmatis'i başarıyla transforme ettiği ve plazmidin bakteri genomuna eklendiği belirlenmiştir^(29,32).

Mikobakteriyofajlar klonlanan genlerden birisi olan lusiferaz geni, önemli oranda kullanım alanı bulmuştur. Bu genin klonlandığı mikobakteriyofaj mikobakterileri enfekte ettiğinde, hücre içinde lusiferaz enziminin yapılmasını sağlar. Ortama lusiferin konduğunda, ortamda ATP varsa, bundan ışık üretilir.

Işıldayan bakterinin ATP ürettiği, yani canlı olduğu anlaşılır. Bu yöntem kullanılarak, mikobakterilerin anti tüberküloz ilaçlara duyarlılıkları iki saat gibi kısa bir sürede gösterilebilmektedir⁽³²⁾.

2.3.1.5.2.Mikobakteri plazmidleri

Birçok mikobakteri türü, bir veya daha fazla sayıda, değişik büyüklüklerde plazmid adı verilen ekstra kromozomal elementler içerir. Ancak *M.tuberculosis*'te plazmid varlığı gösterilmemiştir^(29,32). Sadece Zainuddin ve Dale (1990), bu türün, tek iplikli DNA yapısında bir ekstrakromozomal element içerebileceğini belirtmişlerdir⁽¹⁶⁾.

Mikobakteriler de bulunan plazmidler ya çok büyük ya çok küçüktür. Ara boy plazmidlere seyrek olarak rastlanabilir⁽³²⁾.

Plazmidlerin bazılarının, *M.scrofulaceum*'da olduğu gibi, çevredeki ağır metal tuzlarına veya başka toksik ürünlere karşı dirençten sorumlu oldukları; *M.avium*'un ise sadece plazmid içeren suşlarının, 43°C ve oleik asit yokluğunda üreyebildiği gösterilmiştir^(16,29).

Klonlama amacı ile de kullanılabilen Pal5000 plazmidi, üzerinde en çok çalışılmış olan plazmidir. *M.fortuitum*'dan izole edilen bu plazmidin işlevi tam olarak bilinmemekle beraber, 5 kb. büyüklüğünde olan plazmidin 2.6 kb'lık kısmının çoğalma için yeterli olduğu belirlenmiştir. Bu ve benzeri küçük plazmidler kolonlama amacı ile yaygın olarak kullanılmaktadır. Sözü edilen plazmidlerin, *E.coli* kökenli plazmidlerle birleştirilmesi sonucunda, hem *E.coli* hem de Mikobakteriler de çoğalabilen plazmid vektörler elde edilmiştir. L5 mikobakteriyofajın, integras geni ve katılma dizileri kodlanarak elde edilen plazmidlerin, BCG ve *M.tuberculosis* içinde sokulduklarında, onların genomuna eklendikleri gösterilmiştir^(29,32).

2.3.1.5.3.Transpozonlar ve katılım dizileri

Birçok hücre, genomu içinde pozisyon değiştirebilen, kısa DNA dizilerine sahiptir. Bazılarının genomunda tek bir mobil element veya "atlayan gen" bulunurken, diğerlerinin genomunda farklı yerlerde birçok kopyalar bulunur. Bunların en basit olanı, insertion sequences=IS=katılma dizileri adı verilen

sadece hareket ve katılımdan sorumlu olan genleri içerenleridir. Genellikle 800–2500 baz çift= base pairs (bp) bu dizilerin uçlarında, ters yönde yerleşmiş tekrarlayan diziler ve bunların arasında en az bir tane polipeptide çevrilebilir dizi (open reading frame) bulunur^(16,29,33).

Mikobakteri cinsi içinde IS (katılma dizileri) çok yaygındır; beş IS (katılma dizileri) familyasına ait 16'dan fazla farklı IS bulunduğu rapor edilmiştir⁽³³⁾. Bunların bazıları türe özgü, bazıları bir tür içinde özellik gösteren bir gruba özgüdür; bazıları sadece bir tür için çok özeldir. Bir kısmı ise birçok mikobakteri türünde bulunabilir. Tablo II'de mikobakteriler de bulunan katılma dizilerine örnekler verilmiştir.

Tablo II. Mikobakterilerdeki katılma dizileri (insertion sequences)⁽³³⁾.

DİZİ SEKANS	TÜR	KOPYA SAYISI
IS6110(IS986)	<i>M.tuberculosis complex</i>	0->20
IS1081	<i>M.tuberculosis complex</i>	5-6
IS1245	<i>M.avium</i>	2-27
IS901	<i>M.avium</i> (sadece kuş patojenlerinde)	2-8
IS900	<i>M.paratuberculosis</i>	15-20
IS6100	<i>M.fortuitum</i> (tek suşta)	4

Üzerinde en fazla çalışılmış olan; 1358 baz çift uzunlukta olup, 30 baz çiftlik polipeptide çevrilebilir dizi içeren, IS3 familyasından IS6110, sadece *M.tuberculosis complex grubu* içinde yer alan türlerde bulunmuştur; bu nedenle tüberkülozun moleküler yöntemlerle tanımlanmasında, saptanmasına uygun bir gen haline gelmiştir ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR-Polimeraz Chain Reaction) gibi DNA amplifikasyon yöntemlerinde başarı ile kullanılmıştır. Bu dizinin *M.tuberculosis* genomunda suşlara göre 5–20 kopya halinde bulunduğu belirlenmiş; sadece Vietnam'da izole edilen 4 suşta hiç kopyasının bulunmadığı görülmüştür. BCG' de ise bu dizi tek kopya halinde bulunmaktadır⁽³³⁾. İngiltere'den McHugh ve arkadaşları ise PCR metodu ile saptayıp, hibridizasyon ile teyit ettikleri çalışmalarında, IS6110'un 181 bazçiftlik bir parçasına *M.avium*, *M.intracellulare*, *M.fortium*, *M.kansasii*, *M.xenopi* ve *M.malmoense* türlerinde rastladıklarını bildirmişlerdir⁽³³⁾.

Transpozonlar daha uzun dizilerdir ve içlerinde antibiyotik direncini belirleyen ya da virülans faktörleri gibi öğeleri dizgeleyen ek genler bulundurulur. Bazı ılımlı bakteriyofajlar da transpozonlar gibi hareket ederler. *M.fortuitum*'da bulunan Tn610 transpozonu, sülfonamid direncini kodlamakta olan Tn21 "integrin" ailesinin bir üyesi olup; IS6110 katılım dizisinin iki kopyası ile takviye edilir. Transpozonlar çeşitli genlerin, mikobakteri genomuna katılmasında önemli görevler üstlenebilirler. Özellikle bir genin hücre içinde çok sayıda kopyasının bulunmasının istendiği durumlarda, yabancı genlerin hücre içine katılmasında kullanılmışlardır. Transpozonların hücre genomuna katıldığı noktalarda mutasyonlar meydana gelebilmekte ve böylece bu bölgelerdeki genlerin işlevi ortaya çıkartılarak, genetik analizler yapılabilmektedir. Transpozonlarla aktarılan genler, rekombinant aşılının geliştirilmesinde kullanılabilmektedir^(16,29,30,31).

2.4.Laboratuvar Tanısı

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarları, tüberkülozun kontrolünde, etkenin izolasyonu, idendifikasyonu ve ilaç duyarlılığının belirlenmesi çalışmalarıyla büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmalar, rutin tanı amaçlı olduğu kadar özellikle yeni moleküler tekniklerin kullanıldığı, araştırma amaçlı da olabilmektedir. Burada rutin kullanıma giren başlıca yöntemler tartışılacaktır.

2.4.1.Mikroskobik inceleme

Tüberküloz basilinin en hızlı ve en ucuz tanı yöntemidir. Alınan materyalden doğrudan veya tercihen homojenizasyon işleminden sonra hazırlanan preparat, Ziehl-Neelsen yöntemi ile boyanarak incelenir. Çabuk sonuç alınması nedeniyle laboratuvarlarda sıklıkla uygulanmaktadır ve tanı değeri yüksektir. Ayrıca pratikte fazla kullanılmamakla birlikte, fluorezan boya ile boyanarak, U.V. mikroskobunda veya özel diyafram takılarak normal ışık mikroskobunda preparatlar incelenebilir⁽³⁴⁾. Mikobakterilerin boyanması oldukça zordur. Hücre duvarındaki uzun zincirli yağ asitlerinin (mikolik asitler) oluşturduğu yoğun lipid içerik, bakteriyolojide yaygın kullanılan Gram boyalara karşı geçirgenliği sınırlar⁽³⁴⁾. Hücre duvarındaki mikolik asit rezidüleri, fuksin

veya auramine O gibi arilmetan boyalarla stabil bileşikler yaparlar veya güçlü mineral asitler ile karşılaştıktan sonra bile boyayı bırakmazlar. Dekolorizasyon direnci şeklinde açıklanan bu özellikleri nedeniyle mikobakteriler "aside dirençli bakteriler" olarak tanımlanmaktadır^(36,37).

2.4.2.Kültür

M.tuberculosis basil'i temelde, üreme ve büyüme faktörü olarak spesifik bir organik bileşiğe gereksinim göstermez. Ancak, klinik örneklerden izolasyonu için zengin besiyeri ortamlarının kullanılması gerekmektedir. Besiyeri ortamındaki karbon kaynakları genelde, gliserol pirüvat ve glikozdur. Azot ise asparajin, aspartik asit, glutamin, glutamik asit veya amonyum tuzları ile karşılanır. Zorunlu aerob bir bakteri olduğundan *M.tuberculosis*'is basilin üremesi için kesinlikle oksijen gereklidir CO₂ üremeyi stimüle ettiğinden kültürlerin %5–7 karbondioksit ile inkübasyonu izolasyon şansını artırır^(38,39,41,42). Besiyerindeki yumurta sarısı veya oleik asit ile sağlanan yağ asitleri de üremeyi stimüle eder. Oleik asit yüksek konsantrasyonunda (>%1) toksik olduğundan albümin ile nötralize edilmelidir. Sülfür, fosfor, sodyum, potasyum, magnezyum ve diğer iz elementler (çinko manganez, bakır) genellikle besi yerlerinde ek zenginleştiricilerdir. Mikobakteriler de sideroforlar demir depolarıdır. Besi yeri içeriğindeki ferik amonyum sülfat, demir sağlayan temel yapıdır. Çoğu besi yerinde bu temel yapılar dışında, piridoksin, biotin, sodyum sitrat, katalaz da bulunabilir⁽⁴²⁾.

Tablo III. Mikobakteri İzolasyonunda Yaygın Kullanılan Besiyerleri

KATI BESİYERLERİ	
Yumurta bazlı besiyerleri	Löwenstein-Jensen(L-J) Pirüvik asitli L-J RNA'lı L-J (Gruft modifikasyonu) Petragnani American Thoracic Society Medium
Agar bazlı besiyerleri	Middlebrook 7H10 Middlebrook 7H11 Mitchison'un Selektif agarı
Sıvı besiyerleri	BACTEC 12 B Middlebrook 7H9 MGIT Septi-Chek AFM

Agar bazlı besiyerlerinin yumurtalı besiyerlerine göre bazı üstünlükleri vardır. Öncelikle, transparan yapıda olmalarından dolayı mikroskopik boyuttaki koloniler bile saptanarak oldukça erken dönemde, ortalama 10–12 günde tanı konulabilir⁽⁴³⁾. Bunun içinde besi yerinin Agar plaklarına oldukça ince şekilde dökülmesi ve mikroskopta x40 büyütme ile incelenmesi önerilmektedir⁽⁴³⁻⁴⁵⁾.

En yaygın kullanılanlar Middlebrook 7H10 VE 7H11 besiyerleridir. Bunların içine besiyerini zenginleştirici olarak oleik asit, albümin, dekstroze ve katalaz karışımı konularak kullanılır. Katalaz, işlemi sırasında hasar gören Mikobakterilerin hızla canlanmasına yardımcı olur. Oleik asit ve diğer bileşiklerden açığa çıkan toksik ürünler de albümin tarafından bağlanır. Middlebrook 7H10 agar izolasyonda, Middlebrook 7H11 agar ise antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılır. Antibiyotikler agar katılaşmadan önce besiyerine katıldıkları için inaktivasyonları söz konusu değildir. Middlebrook 7H11'de 7H10'dan farklı olarak kazein vardır. Kazein, izoniazide dirençli Mikobakterilerin izolasyonunu artırır⁽⁴⁶⁾. Agar bazlı besiyerlerinin bazı dezavantajları da vardır. Bunlar arasında raf ömrünün oldukça sınırlı olması ve hazırlanırken içine besi yerini zenginleştirici oleik asit ve diğer bileşiklerden açığa çıkan toksik ürünler konulduğundan maliyetinin yüksek olması sayılabilir^(47,48). Bu tip besiyerlerinin yüksek ısı ve ışık alması veya buzdolabında dört haftadan uzun süre bekletilmesi sonucunda bozulduğu ve ortama mikobakterilerin üremesini engelleyici bir madde olan formaldehitin açığa çıktığı bildirilmektedir. L-J Middlebrook 7H10, 7H11 besiyerlerine eklenen çeşitli antibiyotiklerle selektif besiyerleri elde edilir. Bu besiyerleri istenmeyen bakteriyel ve fungal kontaminantların üremesini engellerler. Günümüzde Gruft tarafından tanımlanmış olan, penisilin, nalidik asit ve RNA içeren L-J'nin yaygın olarak kullanıldığı belirtilmektedir⁽⁴⁷⁾. Mikobakterilerin üretilmesinde selektif ve non selektif besiyerleri birlikte kullanılmalıdır.

Sıvı besiyerleri primer izolasyon veya pasaj yapılması amacıyla kullanılır. Middlebrook 7H9 en sık kullanılan bazal sıvı besiyeridir. Bunun yanı sıra septi-check, BACTEC, 460 TB gibi kullanıma hazır sıvı besiyerleri ortamı ve bunların kullanıldığı ticari manuel veya otomatik sistemler de bulunmaktadır. Septi-check 20 ml modifiye Middlebrook 7H9 besiyerinin, inokülasyondan sonra son

konsantrasyonu %5–8 olacak şekilde CO₂ doldurulduğu kapaklı bir tüp ile modifiye Löwenstein-Jensen, Middlebrook 7H11 ve çikolata agarın birlikte yer aldığı ayrı bir plastik tüpten oluşan bifazik bir sistemdir. İşlemlenen örnek, sıvı besi yeri tüpüne ekilir ve katı besi yeri üzerine vidalanır. 24 saat sonra tüp ters çevrilerek katı besiyerine subkültürü yapılmış olur. Geleneksel yöntemlerden daha kısa sürede, ortalama 10–14 günde izolasyonun gerçekleştiği kabul edilmektedir^(47,48). MGIT, middlebrook 7H9 buyyon, kazein pepton ve gliserol içeren hazır besiyeri ortamıdır. Besiyeri zenginleştirici sıvı (oleik asit ve diğer bileşiklerden açığa çıkan toksik ürünler) ve polimiksin B amfoterisin B, nalidik asit, trimetoprim ve azlosilinden oluşan, kontaminant bakterilerin üremesini engelleyen antibiyotik sıvısı (PANTA) ile birlikte satılmaktadır. Tüpün dibinde bulunan oksijene duyarlı floresans indikatörü ile üremenin erken döneminde saptanabildiği ileri sürülmektedir^(47,48).

BACTEC 460 TB radyometrik sisteminde karbon kaynağı olarak ortamda bulunan ¹⁴C işaretli palmitik asitin mikobakteriler tarafından metabolizma edilmesi üzerine açığa çıkan ¹⁴CO₂ bulunarak üreme gösterilir. Sistemde BACTEC 12B besiyeri ile PANTA solüsyonu olarak anılan ve kontaminant bakterilerin supresyonunu sağlayan antibiyotik karışımı kullanılmaktadır. İzolasyonun 7–10 gün gibi kısa süre içerisinde gerçekleştiği bildirilmektedir^(47,48,51).

BACTEC MGIT 960 sisteminde kullanılan tüplerde, Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri ve dip kısımlarında oksijene duyarlı rutenyum metal kompleksi içeren silikon bulunur. Klinik örnekler ekilmeden önce besiyerlerine OADC (Oleik asit ve diğer bileşiklerden açığa çıkan toksik ürünler) ve PANTA ilave edilir. Kullanılan besiyerlerinde herhangi bir üreme olmadığında oksijen varlığına bağlı olarak silikon tabakaya gönderilen UV ışınına karşı floresans oluşmazken mikobakteri veya diğer mikroorganizmalar ürettiğinde oksijenin kullanılması sonucunda UV ışınına karşı floresans oluşmakta ve oluşan floresans miktarı üreme indeksi olarak değerlendirilmektedir. Tam otomatize bir sistem olmakla birlikte, UV ışığı altında makroskobik olarak da değerlendirme yapılabilirdiğinden manuel olarak kullanılmaya da uygundur. Kan dışındaki diğer tüm klinik örnekler için kullanılabilir⁽⁵¹⁾.

2.4.2.1.Örneklerin İşlenmesi

Tüberküloz laboratuvarına gönderilen çeşitli örnekler arasında solunum sistemi örnekleri, steril vücut sıvıları, beyin omurilik sıvısı, doku, idrar, gastrik aspirat sayılabilir. Akciger tüberküloz açısından en sık gönderilen örnek balgamdır. Spontan veya indüklenmeyle çıkarılan balgam dışında, bronko alveolar lavaj sıvıları, bronş yıkama sıvıları, trans trakeal aspiratlar ve balgamını çıkartmayıp yutandan alınan gastrik aspiratlar da incelenebilir.

Örnekler, steril veya kontamine olmalarına göre, farklı ön işlemler yapılarak kültüre hazırlanırlar. Steril vücut sıvılarında 3500 g'de 30 dakika sürede santrifügasyon sonucunda elde edilen çökelti doğrudan kullanılabilir⁽⁵²⁾. İşlemlerinin akış şeması aşağıdaki gibi bulunur.

Tablo IV. Mikobakterilerin izolasyonunda örnek işleme akış şeması

STERİL ÖRNEK	NONSTERİL ÖRNEK
↓↓ Santrifügasyon Homojenizasyon+dekontaminasyon (>3500xg,30')	↓↓ (NALC+NAOH+) Nötralizasyon (Fosfat Tamponu veya distile su) ↓↓ Santrifügasyon (>3500xg 15')

2.4.2.2.Besiyerine Ekim ve İnkübasyonu

Santrifüjleme işleminden sonra elde edilen sediment, 0.1 ml miktarlarda seçilen katı besiyerlerinin yüzeyine veya sıvı besiyerlerine bırakılır ve homojen yayılımı sağlanır. Primer izolasyon için genel eğilim, bir yumurta bazlı besiyerine, bir agar bazlı besiyerine olmak üzere iki katı besiyerine, ya da yumurtalı besiyerine ek olarak bir sıvı besiyerine olmak üzere en az iki besiyerine ekim yapılması önerilmektedir⁽⁵²⁾.

Farklı mikobakteri türleri farklı inkübasyon ısını sever. Örneğin hızlı üreyen türlerden *M.fortuitum*, *M.chelonae*, *M.ulcerans*, *M.haemophilum* 30–32 °C'de ürerken, MTB kompleksi en iyi 35–37 °C'de ürer⁽⁵²⁾.

Plak veya tüplere ekim yapıldıktan sonra, ekim yüzeyinin yukarı gelecek şekilde bir süre bekletilmesi ve bu süreçte örneğin besiyerine absorbe olmasının beklenmesi gereklidir. Tüplerin vidalı kapaklarının üremenin log fazı olan ilk 7–10 gün boyunca gevşek şekilde kapatılarak yeterince oksijen girişinin sağlanması, bu süre sonunda ise sıkıca kapatılarak besiyerinin kurummasının önlenmesi önemlidir^(50,53). İnkübasyonun %3–11 CO₂ içeren ortamda yapılması mikobakterilerin kolay üremelerini, ayrıca çok sayıda ve daha büyük koloniler oluşturmalarını stimüle eder. Özellikle Middlebrook agarlara yapılan ekimlerin CO₂'li ortamda tutulmasının gerekli olduğu, L-J ekimlerinin ise ilk 7–10 gün için CO₂ 'li ortamda tutulmasının yeterli olduğu bildirilmiştir⁽⁵¹⁾.

2.4.2.3.Kültürlerin Değerlendirilmesi

Kültürler ilk 3–5 gün içinde bakteri kontaminasyonu veya hızla üreyen mikobakteriler açısından, sonrasında ise haftada iki gün üremenin kontrolü açısından değerlendirilmelidir. Rutin olarak kültürlerin olumsuz olarak değerlendirilip atılması için ortalama 6–8 haftalık inkübasyon önerilmektedir⁽⁵¹⁻⁵³⁾. ARB olumlu örnekte genellikle 2–4 hafta içinde üreme gözlenir. Ancak mikroskopik incelemede ARB olumlu örneklerin kültürlerinde bu süre içinde üreme gözlenmez ise ek olarak dört hafta daha bekletilmesi uygundur. Kültürlerin değerlendirilmesinde üreme hızı, pigmentasyon, koloni morfolojisi ve koloni sayısı üzerinde durulmalıdır. Besiyerinde üreyen kolonilerden yapılan preparatlar ARB ile boyanmalı ve mikroskopik olarak mikobakterilerin üremesi doğrulanmalıdır. Kolonilerden yapılacak çeşitli biyokimyasal ve fenotipik testler yardımıyla da tür ayrımı yapılabilir. *M.tuberculosis* basilinin kolonisi 'siğil' şeklinde diye tanımlanır. Bunlar kuru, mat, yüzeyi pürüklü, küçük ve pigmentsiz kolonilerdir. Buna karşın fotokromojenler olarak sınıflandırılan mikobakteriler ışık altında stotokromojenler ise karanlıkta pigment yaparak renkli koloniler oluştururlar^(47,48,51-53).

2.4.3.Tüberküloz Basillerinin İdentifikasyonunda ve Tiplendirilmesinde Kullanılan Yöntemler

2.4.3.1.Klasik Yöntemler

Klasik yöntemlerle tiplendirmenin temelinde bakterinin biyokimyasal özelliklerinin araştırılması yatmaktadır.

Bu yöntemler;

- 1.Üreme ısı
- 2.Pigment oluşumu
- 3.Katalaz deneyi
- 4.Mac Conkey agarda üreme
- 5.Niasin deneyi
- 6.Pyrazinamidase deneyi
- 7.% 5'lik NaCl₂ ortamda üreme
- 8.Tellürit redüksiyonu
- 9.Tween 80 hidrolizi
- 10.Üreaz deneyi
- 11.Nitrat redüksiyon deneyi
- 12.Aryl sülfataz deneyi
- 13.Antimikobakteriyal ilaç duyarlılığın saptanması olarak sıralayabiliriz ⁽⁵⁸⁾.

Yukarıda sözü edilen deneylerin bir çoğunluğunda sekonder kültürler kullanıldığından sonuçların alınması uzun sürmektedir. Serotip, biotip bakteriyofaj duyarlılığı ve antimikrobial ajanlara karşı duyarlılık gibi fenotipik özelliklere dayanan tiplendirme yöntemlerinin tüberküloz basilline uygulanmasında engeller vardır. *M.tuberculosis* suşları arasında biyokimyasal olarak birçok benzer özelliklerin olması ve fenotipik bulgularının kültür şartlarına bağlı olarak değişkenlik gösterilebilmesi nedeniyle bu yöntemler Mikobakterilerin tiplendirilmesinde yetersiz kalmaktadır. Bu tarz güçlüklerin üstesinden gelebilmek için tiplendirmede genetik yapının incelenmesi gündeme gelmiştir^(59,60).

2.4.3.2.Moleküler Yöntemler

- 1.DNA probları
- 2.Restriction Fragment Length Polymorphisme(RFLP)
- 3.Baz dizi analizi
- 4.Diğer yöntemler

2.4.3.2.1.DNA probları

Prob; spesifik DNA baz çiftlerine bağlanmak için kullanılan genel olarak 6–18 baz çifti uzunluğunda küçük bir (oligonükleotid) DNA parçasıdır. Oligonükleotidler, radyoaktif izotop veya bir boya ile etiketlenerek direkt olarak spesifik baz dizilerinin tespit edilmesinde kullanılmaktadır. DNA probları ile özellikle klasik teknikler kullanılarak üretilen mikroorganizmaların hızlı tanımlanması ve nükleik asit çoğaltma metotlarıyla birlikte kullanıldığında tiplendirilmede yapılabilmektedir^(39,40).

Nükleik Asit Çoğaltma Metotları

- 1.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)
- 2.Strand Displacement Amplification (SDA)
- 3.Ligase Chain Reaction (LCR)

Nükleik asit çoğaltma metotları arasında en çok kullanılan Polimeraz zincir reaksiyonudur (PCR).

Nükleik asit dizilerinin invitro çoğaltılması, moleküler biyolojinin önemli kilometre taşlarından biri olmuştur. Nükleik asitlerin invitro çoğaltılması ya da saptanmalar için kullanılan teknikler, kullanılan çoğaltma yöntemine göre hedef prob ve sinyal çoğaltma yöntemleri olarak üç ana grupta sınıflandırılabilir. Bunların tümünde, hedef Nükleik asit dizisi ile bu diziye özgül oligonükleotitlerin hibridizasyonu söz konusudur. Hedef çoğaltma yöntemleri, patojen mikroorganizmaların varlığının gösterilmesi ve gen dizilerine ilişkin bilgi verebilmeleri açısından yararlıdır⁽³⁸⁾. PCR bu yöntemlerin ilki olması ve bu çalışmada kullanılan yöntem olması nedeniyle ayrıntılarıyla ele alınacaktır.

Mullis K tarafından 1985 yılında geliştirilen PCR ile ilk çoğaltılan DNA dizisi insan β -globülin geni oluşmuştur ve bununla ilgili arka arkaya çalışmalar yayınlanmıştır⁽³⁸⁻⁴⁰⁾.

PCR, invitro Nükleik asit amplifikasyon yöntemi olup hücre içi doğal DNA replikasyonun benzeridir. Bu yöntemle çoğaltılması istenen DNA dizisi (kalıp DNA), DNA replikasyonu için gereken maddelerle birlikte, üç farklı ısı döngüsünde tutulur. Ortamda, kalıp DNA dışında olması gereken maddeler ve miktarları amplifikasyon yönteminin basamakları aşağıda açıklanmaktadır.

PCR İçin Gerekli Maddeler

1.DNA Polimeraz: *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polimerazı, ısıya dayanıklı bir enzim olup DNA'yı 74°C'de replike eder. Taq DNA polimeraz enziminin önerilen konsantrasyonu, diğer koşulların da tümüyle sağlanması durumunda, her 100 μ L için 1–2,5 ünitidir. Enzim konsantrasyonu çok fazla olursa non spesifik ürünler de arka planda görülür. Buna karşın konsantrasyonun 1 ünitenin altında olması, yetersiz ürün eldesi ile sonlanan bir durumdur⁽⁴⁰⁾.

2.Magnezyum: Magnezyum konsantrasyonu PCR' da oldukça kritik bir faktördür. Öncülerin birleşmesini, hem kalıp DNA hem de PCR ürünündeki iplikçiklerin ayrılma ısılarını, özgün olmayan ürünlerin (primer-dimer) oluşmasını ve DNA polimerazın tam ve doğru çalışmasını etkileyebilir. Kalıp DNA, öncüler ve deoksinükleotit trifosfatlar (dNTP) tarafından bağlanmış magnezyum dışında, DNA polimeraz için serbest magnezyum gereklidir. Total dNTP miktarına ek olarak, ortamda 0,5–2,5 mM. serbest magnezyum olmalıdır. Ortamda EDTA veya başka şelatlayıcı maddelerin bulunması magnezyum miktarını etkiler⁽⁴⁰⁾.

3.DNA Polimeraz Tamponu: PCR reaksiyonu için önerilen tampon içinde 10 mM. Tris-HCL (pH 8,4) ve 50 mM. den fazla KCl bulunmasının ise DNA polimerazın etkinliği inhibe ettiği bildirilmiştir. Tampon içinde jelâtin veya siğir serum albümini 100 μ g /ml düzeyinde, Tween 20 gibi noniyonik deterjanların %0.05–0,1 oranında bulunması, enzimi stabilize eder⁽⁴⁰⁾.

4.Deoksinükleotit Trifosfatlar (dNTP) : Ortamda deoksi adenin trifosfat (dATP), deoksi sitozin trifosfat (dCTP), deoksi guanin trifosfat (dGTP) ve deoksi timin trifosfat (dTTP)'ın her biri eşit miktarlarda bulunmalıdır. Genellikle her birisinden 50–250 μ M. miktarlarda kullanılır. Hedef dizisinin uzunluğu ve kompozisyonu göz önünde tutularak, en az dNTP'nin kullanılması, hedef bölgelerindeki yanlış bağlanmaları azaltır ve uzamaları engeller. 100 μ L. için her dNTP'den 20 μ M. kullanıldığında 2,6 μ g. DNA veya baz çiftlik diziden 10 pmol elde edileceği teorik olarak kabul edilmektedir⁽⁴⁰⁾.

2.4.3.2.2.İmmünolojik tanı

a)Serolojik tanı: Bakterilerin çeşitli antijenlere karşı (özellikle A60 proteini ve Antijen 85 kompleksine) oluşan antikorların kompleman fiksasyonu hemaglutinasyon ve Enzim Linkend İmmünosorbent Assay (ELISA) yöntemleriyle araştırılmasıyla yapılır. Çapraz reaksiyon vermeleri ve antijenik yapılarının değişkenlik göstermesi nedeniyle tanı değeri olmamakla birlikte, hastadan inceleme materyallerinin alınamadığı durumlarda nadiren kullanılmaktadır(36,37).

b)Tüberkülin testi: Bakteriye karşı oluşan geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonu göstermeye yönelik bir deri testidir. Mantoux metodu ve Pürifiye protein devresi (PPD) antijeni kullanılarak uygulanır(36,37).

3.MATERYAL ve YÖNTEM

3.1.Materyal

Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarına çeşitli klinik ve polikliniklerden tüberküloz şüphesiyle gönderilen 100 klinik örnekler çalışmamıza dahil edilmiştir.

3.2.Yöntem

Bütün örneklerle Ziehl-Neelsen boyama ile mikroskopik inceleme, MGIT kültürü ve *M.tuberculosis complex*'i için Cobas Amplicor PCR'da test edildi.

3.2.1. Ehrlich- Ziehl- Neelsen Boyama Yöntemi

3.2.1.1.Boyaların hazırlanması

3.2.1.1.1. Asit- alkol eriyiği

HCL	3 ml.
%95'lik etil alkol	97 ml.
Karıştırılarak elde edildi.	

3.2.1.1.2. Ehrlich- Ziehl- Neelsen

Bazik fuksin	1 gr.
Fenol kristalize	5 gr.
Saf etil alkol	10 ml.
Saf su	100 ml.

Elde edilen eriyik 24 saat oda derecesinde bekletildikten sonra kâğıt süzgeçten süzüldü. Şişelerde saklandı.

Ehrlich- Ziehl- Neelsen Boyama Yöntemi

a)Preparat hazırlanır, kurutulur ve tespit edilir.

b)Lam üzerine lamı kaplayacak tarzda karbol fuksin solüsyonu konur.

- c) Preparat alttan 4–5 dakika ve aralıklı olarak hafifçe ısıtılır. Preparatın yanmamasına ve kabarcıkların çıkmamasına dikkat edilir.(preparat üzerinden hafif buharlar çıkabilir).
- d).Boya dökülür ve preparat asit-alkolde (% 95 alkol + % 3 HCl asit) dekolore edilir.
- e) Su ile yıkanır.
- f) Preparat üzerine metilen mavisi solüsyonu konur ve boyanır.
- g) Boya dökülür ve su ile yıkanır.
- h) Kurutulur ve immersiyon objektifinde muayene edilir. *M.tuberculosis* pembe kırmızı renkte görülürler.

Preparatların Değerlendirilmesi

Preparatlar, immersiyon objektifiyle, x 100 büyütme de değerlendirilir. Aside dirençli basilin varlığı için, her yayma zaman önemsenmeksizin tamamen incelendi. Yaymayı negatif olarak raporlamadan önce karbolfuksin boyama ile minimum 300 alan, incelendi. Yaymanın uzun kenarı boyunca 3, kısa kenarı boyunca 9 paralel tarama yapıldı.

3.2.2.Kültür

Dekontaminasyon-Homojenizasyon

3.2.2.1.Kullanılan Yöntem

NaOH-NALC yöntemi

3.2.2.2.Yöntemin esası

NaOH, oldukça etkili bir dekontaminantır. Ayrıca emulsifiye edici etkisi olduğundan mukolitik sağlar. NALC de mukolitik etkilidir, balgamı hızla eritir. NaOH ile birlikte kullanılması, örneğin karşılaştığı NaOH konsantrasyonu ve bu karşılaşma süresini azaltarak, basillerin NaOH'in toksik etkisinden zarar görme riskini azaltılmış olur. Sodyum sitrat, örnekte bulunabilen ağır metal iyonlarını şelatlayarak hem NaOH'i stabilize eder, hem de NALC'nin bu iyonlar nedeniyle inaktive olmasını engeller.,

3.2.2.3.Kullanılan kimyasal solüsyon

NaOH-NALC solüsyonu

3.2.2.4.İçindekiler

1 N (%4) NaOH, N-Asetil-L-Sistein

3.2.2.5.Uygulama

İncelenecek klinik örneğin bulunduğu 50 ml'lik steril burgulu kapaklı tüplere klinik örnekle eşit hacimde NALC-NaOH solüsyonu ilave edilerek oda ısısında 15 dakika bekletildi. Bekleme süresinin başlangıcında tüpler 30 saniyeyi geçmeyecek şekilde vortekslendi. Süre tamamlandığında tüpün 50 ml işaretine kadar 0.067 M fosfat tamponu (pH 6,8) ilave edilerek nötralizasyon sağlandı ve dekontaminasyon işlemi durduruldu. Kullanılan fosfat tamponunun sterilitésinin koruması önemlidir. Fosfat tamponu ilaveli tüpler bakteri yoğunluğunu artırmak için $\geq 3000 \times g$ de 15–20 dakika santrifüjde çevrildi, sonra üst sıvı içinde dezenfektan (%0.1–1 sodyum hipoklorit %70 alkol, % fenol v.s) bulunan bir kaba boşaltıldı ve sedimente 1–2 ml steril fosfat tamponu ilave edildi. Bu işlem uygulandıktan sonra uygun olarak klinik örnekler besiyerine ekildi.

Steril olduğu düşünölen BOS, vücut sıvıları'nda dekontaminasyon işlemi uygulanmadı ve bu örnekler direkt olarak veya santrifüjde çevrildikten sonra sedimentten besiyerlerine ekildiler. Bactec MGIT 960 sistemine yerleştirildi.

Bactec MGIT 960 sistemine de kullanılan tüplerde, Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri ve dip kısımlarında oksijene duyarlı rutenyum metal kompleksi içeren silikon içermektedir. Klinik örnekler ekilmeden önce besiyerlerine oleik asit albümin-dekstrozu ve kontaminant mikroorganizmalara karşı PANTA ilave edilir. Kullanılan besiyerlerinde herhangi bir üreme olmadığında oksijen varlığına bağı olarak silikon tabakaya gönderilen UV ışınına karşı floresans oluşmazken mikobakteri ve diğér mikroorganizmalar ürettiğinde oksijenin kullanılması sonucunda gönderilen UV ışını ruthenium kompleksindeki değışiklik nedeniyle floresans vermekte ve oluşan floresans miktarı üreme indeksi olarak

değerlendirilmektedir. Floresans görülen tüplerden preparat hazırlanıp Ziehl – Neelsen Boyama ile boyanarak üreyen bakteri ARB açısından doğrulandı.

Tablo V. MGIT Tüplerinin İçeriği

MGIT BESİYERİ Middlebrook 7H9 Kazein pepton Gliserol	
Zenginleştirmek İçin	Kontaminasyonu Önlemek İçin
OADC Sodyum Klorid Oleik Asit Sığır serum Albümini Dekstroz Katalaz	PANTA Polimiksin B Amfoterisin B Nalidiksik Asit Trimetoprim Azlosilin

3.2.3. PCR Cobas Amplicor MTB Assay

(Roche Diagnostic Systems, Inc., Branchburg, N.J.)

Amplicor, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temeline dayanan bir sistemdir. Bakterinin 16SrRNA geni biyotinlenmiş primerler kullanılarak amplifiye edilir, oluşan amplikonlar manyetik partiküllerin yüzeyine kaplanmış *M.tuberculosis complex*'ine özgül oligonükleotit proplarla hibridize edilir. Daha sonra avidinle bağlı yaban turpu peroksidazı (Av-HRP) biyotinle işaretli amplikona bağlanır. Bağlanmış konjugat hidrojen peroksit varlığında 3,3', 5,5' tetrametil benzidin (TMB) ile reaksiyona girerek renkli bir kompleks oluşturur sonuçlar fotometreyle ölçülerek saptanır. Amplicor'da kontaminasyonu önlemek için urasil-N glikozilaz (UNG) enzimi kullanılır. Bu sistemde ayrıca örneklerdeki inhibitör madde varlığında Internal amplifikasyon kontrol (IAC) ile monitörize edilir. Cobas Amplicor yaklaşık 6–7 saat içinde sonuçlanmaktadır.

3.2.3.1.PCR Çalışmasında Kullanılan Cihaz ve Gereçler

- 1-Laminar air Flow Clası
- 2-Aluminyum folyo
- 3-Buzdolabı (+4 °C)
- 4-Derin dondurucu (-20 °C)
- 5-Isısal döngü cihazı
- 6-Mikrosantrifüj
- 7-Mikro santrifüj Tüpler
- 8-Otomatik mikro pipet:
1.0- 10.0 µL.
10.0 - 100.0 µL.
100.0 -1000.0 µL.
- 9-Santrifüj
- 10-U.V kaynağı
- 11-Vorteks
- 12-Cobas Amplicor cihazı

3.2.3.2. PCR Çalışmasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması (DNA eldesinde kullanılan Çözeltiler)

- 1-Respiratory Specimen Wash Solution
- 2- Respiratory Specimen Lysis Reagent
- 3- Mycobacterium (+) kontrol
- 4- Mycobacterium (-) kontrol
- 5- Respiratory Specimen Neutralization Reagent

3.2.3.3. PCR Yöntemi

- Her bir numune ve iki kontrol için 1,5 ml'lik test tüpleri hazırlandı ve işaretlendi.
- Numune tüplerine 500 µL. Respiratory Specimen Wash Solution eklendi.
- Numune tüplerine 100 µL. kontamine olmamış konsantre numuneleri eklendi.

- Tüpler yukardan aşağıya doğru çizilmiş bir çizgi ile işaretlendi. Tüpleri mikrosantrifüje bu çizgiler dışarı bakacak şekilde yerleştirildi. Minimum 12,500 x g'de 10 dakika santrifüjlendi.

- Süpernatant çıkarıldı ve tüplere 100 µL. Respiratory Specimen Lysis eklendi

- Tüpler vortekslendi.

- Isısal döngü cihazında bekletildi.

- Tüplerin 5 saniye pulse santrifüjü gerçekleştirildi.

- Tüplere 100 µL. Respiratory Specimen Neutralization Reagent eklenip 5 saniye vortekslendi.

- Hazırlanan numune ve kontrollerden A- tüplerine 50 µL. ilave edildi ve Cobas -Amplikor cihazına yerleştirildi.



4. BULGULAR

Çukurova Üniversitesi Merkez Laboratuvarına tüberküloz şüphesiyle gönderilen klinik örneklerden yüz hasta çalışma kapsamına alındı. Bu çalışmada toplam elli hastaya ait balgam örneği, otuz hastaya ait BOS örneği, on hastaya ait plevra örneği, on hastaya ait asit mayi örneği çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastaların yaşları bir ile seksen sekiz yaş grubu arasındadır.

Çalışılan materyallerin ellisi balgam idi ve bunların otuz dört'ünde ARB pozitif bulunurken, on altı örnekte ise negatif bulundu. Kültürde ise otuzu pozitifken, yirmi balgam örneği negatif bulundu. PCR'da bu örneklerin otuzu pozitif, yirmisi negatif bulundu. BOS örneklerinin hiçbirisinde ARB pozitif değildi. Kültürde beş örnek pozitif, yirmi beşi negatif olarak bulundu. Bu örnekler PCR'da on örnek pozitif bulunurken yirmi örnek negatif olarak bulundu. Plevra ve asit mayi örneklerinde de ARB pozitif bulunmadı. Plevra örneklerinde ikisi kültüre pozitif bulunurken, üç Plevra örneği PCR'da pozitif bulundu. Asit mayi örneklerinde kültürde bir pozitif bulunurken PCR'da iki pozitif bulundu. Özgüllük, duyarlılık, negatif prediktif değer, pozitif prediktif değerleri sırasıyla ARB için %93.4, %78.9, %87.7, %88.2. PCR için %86.9, %100, %100, %82.6 bulundu. Çalışmamız da 100 olgunun kırk yedisi erkek, elli üçü kadındı. Yaş ortalaması 32.13 olarak bulundu.

Tablo VI. Olguların cinsiyete göre dağılımı ve yaş ortalaması

CİNSİYET	SAYI	%	YAŞ ORTALAMASI
ERKEK	47	47	30,53
KADIN	53	53	33,5
TOPLAM	100	100	32,13 ±22

Tablo VII. Çeşitli klinik örnekler de ARB, PCR, Kültür sonuçları

ÖRNEK CİNSİ	ARB POZİTİF	ARB NEGATİF	KÜLTÜR POZİTİF	KÜLTÜR NEGATİF	PCR POZİTİF	PCR NEGATİF
BALGAM	34	16	30	20	30	20
BOS	-	30	5	25	10	20
PLEVRA	-	10	2	8	3	7
ASİT MAYI	-	10	1	9	2	8
TOPLAM	34	66	38	62	47	53

Tablo VIII. Kültür altın standart alındığında ARB ve PCR'ın değerlerinin karşılaştırılması

YÖNTEM	SPESİFİVİTE	SENSİTİVİTE	NEGATİF PREDİKTİVE	POZİTİF PREDİKTİVE
ARB	% 93.4	%78.9	% 87.7	% 88.2
PCR	% 86.9	% 100	%100	%82.6

5.TARTIŞMA

Günümüzde Tüberküloz insidansında gözlenen artış ilgili birimlerin bu konudaki araştırmalarını yoğunlaştırmasına neden olmuştur. Tüberkülozun tanısında hastanın öyküsü, kliniği ve radyolojik bulguları önemli göstergeler olmasına karşın kesin tanı için etkenin izolasyonu ve identifikasyonu gereklidir. Bu amaçla tüberküloz şüpheli örneklerin ARB ile hızla değerlendirilmesi izolasyon identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık testlerinin bir an önce yapılması önemlidir. Bu basamak tüberkülozun yayılmasının önlenmesi açısından önemlidir. Son yıllarda en kısa sürede doğru sonuca ulaşmanın yolları araştırılıyor ve geliştirilmeye devam ediyor. Tanı yöntemleri arasında geleneksel yöntemler arasında kültüre dayalı hızlı sistemler ve moleküler yöntemler denenmektedir. Geleneksel yöntemler asido rezistan boyama ile direkt mikroskopik inceleme ve kültüredir.

Çoğu merkezde ARB ile yapılan mikroskopik inceleme izole edilecek inaktif hastaların belirlenmesinde kullanılan ilk testir⁽⁴⁴⁾. Mikobakteriler için bilinen en kolay en hızlı ve en ucuz tanı yöntemi olmakla birlikte duyarlılığı düşüktür⁽⁷⁾. Çeşitli yayınlarda % 22 ve % 80 arasında değişen duyarlılık düzeyleri bildirilmiştir⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾. Duyarlılık düzeyine etkili olan faktörler arasında incelenen örnek tipi, santrifüj edilme hızı, kullanılan boyama ve kültür yöntemleri, çalışılan hasta popülasyonun özelliği sayılabilir⁽⁷⁾.

Solunum yolu örneklerinin ARB ile yüksek düzeyde pozitiflik verdiği bildirilmiştir^(7,46). Örneğin işlenmesi esnasında özellikle yoğunlaştırma aşamasının duyarlılığı etkileyen bir basamak olduğu bilinmektedir. Lipsky BA ve arkadaşları bir grup araştırmacının santrifüjleme hızını 1250 x g'den 3800 x g'e çıkartarak yaymanın duyarlılığını %25,2'den %82,4'e yükselttiklerini bildirmişlerdir⁽⁴⁵⁾.

Biz çalışmamızda 3500 x g'de santrifüjleme yaptık. Smithwitch ve arkadaşları örnekleri polikarbonat membran filtreden geçirerek ve santrifüjleme yöntemi kullanarak preparat yaptıklarında membran filtre ile daha yüksek düzeyde pozitiflik saptamışlardır. Hazırlanan yaymanın kalınlığı preparatı

renksizleştirme basamağı ve kullanılan zıt boyama tekniği direkt mikroskopinin duyarlılığını etkileyen diğer bir faktördür⁽⁴⁷⁾.

ARB ile boyanmış preparatların mikroskopik değerlendirilmesinin spesifikliğı yüksektir. Ancak MTB'in diğer mikobakterilerden ayrılması bu yöntemle olası değildir. ARB pozitif yaymanın spesifikliğı araştırılırken öncelikle yanlış-negatif kültür ve yanlış-pozitif yayma arasındaki ayırım yapılmalıdır. Yanlış-pozitif yaymalar yani gerçekte ARB içermeyen örnekte saptanan ARB pozitif olmasının çoğu sağaltım uygulanan kültür örneklerinde görüldüğü bildirilmiştir^(45,48). Bizim çalışmamızda ARB boyama yönteminin duyarlılığı % 78,9 seçiciliğı %93,4 olarak bulunmuştur. Levy H. ve arkadaşları yıkama suyundan kontaminasyonu engellemek için filtre edilmiş su kullandıklarını bildirmişlerdir⁽⁵¹⁾. Biz çalışmamızda kontaminasyonu engellemek için bu hususlara dikkat ettik. Murray PR ve arkadaşları ARB yöntemiyle yaptıkları mikroskopik değerlendirmelerin duyarlılık ve seçicilik oranları sırasıyla %39, %99.9⁽⁴⁶⁾ Smithwich RW ve arkadaşları %55.0, %99.8⁽⁴⁷⁾, Rickman TW ve arkadaşları %25, %99.9⁽⁴⁸⁾, Eyigor M ve arkadaşları ARB boyama yönteminin duyarlılığı %86.9, özgüllüğü %96.5 bulunmuştur⁽⁴⁹⁾. Aslan G ve arkadaşları 437 hastaya ait 1004 idrar örneğinde ARB boyama yönteminin kültür yöntemine göre duyarlılığını (%70.8) ve pozitif prediktif değerini (%77,2) düşük olarak bildirilmişlerdir⁽⁵⁰⁾.

Prediktif değerleri hem yaymanın duyarlılık ve seçiciliğı ile ilişkilidir. Hem de popülasyondaki tüberküloz basilinin prevalansına bağlıdır. Pozitif ve negatif prediktif değerler incelendiğinde çeşitli araştırmacıların bulguları %98-%100 arasında ve %70-%90 arasında bildirilmiştir⁽⁵¹⁾. Bizim çalışmamızda bu değer %88.2-%87.7 olarak bulundu ve yapılan çalışmalarla uyumlu olduğu gözlemlendi.

Tüberküloz'un kesin tanısı için basilin izolasyonun gerektiğı bilinmektedir. *M.tuberculosis*'in bakteriyolojik tanısında "altın standart" olarak da değerlendirilen kültür işlemi 3–6 hafta gibi uzun süre gerektirmektedir⁽⁵²⁾. Özellikle klinik olarak kuşku ve ARB olumsuz olgularda sağaltım zorluklarına yol açan bu durum "daha hızlı" gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle uzun yıllar Tüberküloz

da yeni tanı yöntemi arayışları yoğun şekilde sürmektedir. Geliştirilen kültüre dayalı hızlı tanı yöntemlerinden birisi de MGIT'dir. MGIT'in üretme tekniği süresi ve çeşitli çalışmalarda diğer kültür yöntemleri ile karşılaştırılmalı olarak araştırılmıştır⁽⁵³⁾.

M. Cruciani ve arkadaşları on merkezli bir çalışmada 14.745 örnekte tanımlamasını BACTEC MGIT 960/BACTEC 460,sisteminde *M.tuberculosis*'i tanımlamaya çalışmışlar. Sensifivite ve spesifivite BACTEC MGIT 960 için %81,5, %99,6 ve %85,8 ve %99,9 bulmuşlardır⁽⁵⁴⁾.

PCR yöntemin kullanarak özgün nükleik asit dizilerinin çoğaltılması, günümüzde çeşitli enfeksiyon etkenlerinin tanısında yaygın şekilde uygulanmaktadır. Tüberkülozun tanısında da gerek klinik örneklerden gerekse üremiş kültürlerden yola çıkarak farklı protokollerin kullanıldığı çeşitli çalışmalar yayınlanmıştır. Uygulanan protokollerde mikobakterilerin farklı yapılarına karşı geliştirilen farklı öncüllerin kullanıldığı bildirilmektedir.

Biz çalışmamızda 16SrRNA'ya yönelik Cobas Amplicor PCR sistemini kullandık. Yapılan bazı çalışmalarda PCR yönteminin ticari olarak üretilmiş şekli (COBAS AMPLICOR PCR) solunum yolu örnekleri için önerilmektedir. Genel olarak duyarlılık %66,7–85,2, özgüllük %98,8–99,7 olarak bulunmuş mikroskopi pozitif olan örneklerde duyarlılık %92,6–96,1'e çıkmış, negatif olanlarda ise %48–71,7'ye düştüğü belirtilmiştir^(60–61).

Marja-Leena Katila ve arkadaşları *M.tuberculosis*'de L-J, MGIT 960 ve COBAS Amplicor sistemlerini karşılaştırmışlar. 2015 örnekten pozitif bulunan 152 tanesi değerlendirilmeye alınmış, bu örneklerin 139'u(%91) MGIT sisteminde 127'si (%84) L-J besiyerinde tanımlanmış, 68 izolatın *M.tuberculosis* 84 izolatında *M.tuberculosis* dışı mikobakteri olduğu gösterilmiş MGIT'te üreme 12 gün L-J'de üreme 20 gün olduğu belirtilmiştir. Kontaminasyon oranlarının benzer olduğu belirtilmiş ve MGIT'de tanımlanan 363 örneğin (*M.tuberculosis*, *M.avium* ve *M.intracellulare*) hızlı ve doğru sonuç için doğrulanması Cobas Amplicor sistemi ile yapılmış ve örneklerin %96'sı doğrulanmıştır. Hızlı ve doğru tanı için mikobakterilerde ve MOTT'larda MGIT ile Amplicor PCR yönteminin kullanımını uygun bulmuşlardır⁽⁵⁵⁾.

Silvia Ortu ve arkadaşları tüberküloz hızlı tanı ve ayrımında 513 örneği Real Time PCR ile Bactec 960 MIGT ile çalışmış sensitivite ve spesifiteyi %10 ve %100 bulmuşlardır⁽⁵⁷⁾.

Noordhoek GT. ve arkadaşları yedi farklı laboratuvar da gerçekleştirdikleri bir kör çalışmada PCR ile *M. tuberculosis*'in saptanması yönteminde duyarlılık ve seçicilik değerlerini karşılaştırmışlardır. Laboratuvarlardan aldıkları sonuçları birbirinden çok farklı olması sonucunda araştırmacılar PCR'ın tüberküloz tanısında güvenli şekilde kullanılabilmesini tartışmışlar ve etkili bir kontrol sisteminin oluşturulması gerekliliğinin önemini vurgulamışlardır⁽⁶²⁾.

Kwok S.ve arkadaşları'nın da belirttikleri gibi PCR'da yanlış pozitiflik örneğin, kendisinden çok çevreden kaynaklanan kontaminasyona bağlı olarak gerçekleşmektedir⁽⁶³⁾.

Özcan M ve arkadaşları 796 balgam, 309 BAL, 114 AMS, 228 Mai: plevra, periton, perikard, batin içi mai, 58 BOS, 25 apse, 74 biyopsi materyali, 366'tı idrar örneği ARB yöntemiyle 71 örnekte (3,5) ARB pozitif bulmuş, örneklerin 82'si (%4,1) BACTEC 960 MGIT'de, 39'u (1,9) LJ besiyerinde üremiş. PCR ile çalışılan 250 örneğin 11'inde (%4,4) *M.tuberculosis* belirlenmiş, ancak iki örnek kültür pozitifliği olmasına karşın PCR ile desteklenmemiştir⁽⁶⁴⁾.

Günal S ve arkadaşları 420 solunum yolu örneği, 172 AMS, 88 idrar, 458 diğer klinik örnekler çalışılmış. Genel mikroskopi ve Kültür pozitifliğini sırasıyla %2.3 ve %7.4 olarak bulmuşlardır. MGIT kültür sisteminin pozitifliği %7.2 L-J besiyerinden %4,8 yüksek bulunmuşlardır⁽⁶⁵⁾.

Gürsoy N ve arkadaşları 199 solunum yolu, 78 BOS, 178 idrar ve 266 diğer klinik örnekler olmak üzere 721 örnek Cobas Amplicor sistemiyle incelenmişlerdir. Örneklerin %4.2'si kültür de %9.7'si PCR pozitif bulunmuş. PCR duyarlılığı %76.7 olduğu belirtilmiştir⁽⁶⁶⁾.

Reischl U. ve arkadaşlarının Cobas Amplicor sistemiyle yaptıkları çalışmada beyin omurilik sıvısında duyarlılığı %60 olarak bulmuşlardır⁽⁶⁰⁾. Bonington A. ve arkadaşları Cobas Amplicor sistemiyle yaptıkları çalışmada solunum yolu dışındaki diğer örneklerde duyarlılığı %61–100 olarak bulmuşlardır⁽⁶⁷⁾.

Durmaz R. ve arkadaşları "Cobas Amplicor PCR" sistemi kullanılarak incelenen 928 örnekte pozitifliği %12.5, kültürle incelenen 1179 örnekte pozitifliği %8.7 mikroskopla incelenen 1932 örnekte pozitifliği %4.6, mikroskopi ve kültür pozitif solunum yolu örnekleri için duyarlılık %75.4, BOS ve idrar örneklerindeki duyarlılık ise %50 olarak bulmuşlardır⁽⁶⁸⁾.

Dewit D. ve arkadaşları plevra sıvısında PCR sensitivitesini %81, kültür spesifitesini %52.8 bulmuşlardır⁽⁶⁹⁾. De Lassence ve arkadaşları Tüberküloz plevral effüzyonlu 15 olguluk çalışmada 9 olguda (%60) PCR pozitifliği bulmuşlardır⁽⁷⁰⁾.

Nguyen ve arkadaşları tüberküloz menenjitin tanısında serebrospinal sıvıda PCR'in en iyi metod olduğu sonucuna varmışlardır⁽⁷¹⁾.

Takagi ve arkadaşları plevra biyopsi ve örneklerinde yaptıkları çalışmada PCR'in sensitifitesini %89, spesifitesini ise %100 olarak bulmuşlardır⁽⁷³⁾.

Brisson Noel ve arkadaşları 514 klinik örnekte balgam, gastrik aspirasyon, plevral sıvı kullanarak yaptıkları çalışmada PCR pozitif olup kültür negatif oranını %12.3 olarak bulmuşlardır⁽⁷⁴⁾.

Sanjay ve arkadaşları 1032 olgudan elde edilen değişik doku ve vücut sıvı örneklerinde yaptıkları çalışmada PCR'in sensitivite, spesifite, pozitif ve negatif prediktif değeri sırasıyla %76,4, %99,8, %92,8 ve %99,2 olarak bulmuşlardır⁽⁷⁵⁾.

Afghani B. ve Stutman HR, farklı araştırmacıların uyguladıkları PCR yöntemlerinin duyarlılık düzeyleri arasında büyük değişkenlik olmasının bir nedeni olarak, test edilen klinik örnekteki mikroorganizma sayısını göstermişlerdir. Referans yöntem olarak kültürü aldıklarında kültürde pozitif saptanan örnekler içinde, ARB ile boyanmış preparatlarında ARB olumsuz 12 örneğin altısı, tüm preparatta 10'dan az basil olan 10 örneğin altısı, 10–90 basil olan 12 örneğin dokuzu, her alanda 1–9 basil olan dokuz örneğin hepsi ve her alanda 9'dan fazla basil olan 21 örneğin hepsi PCR ile pozitif saptanmıştır. PCR'in duyarlılığının ARB sayısına göre sırayla %50, %60, %75, %100, %100 olarak bulunduğu bildirmiştir⁽⁷⁶⁾.

Aslan G. ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada 68 tüberküloz şüpheli hastanın BOS örneğinde ARB boyama yöntemi ile aside rezistans basil saptanmamış, 7'si PCR, 5'i kültür yöntemi ile pozitif bulunmuştur. Bu çalışmada

PCR'in duyarlılığı %83, özgüllüğü %96 pozitif prediktif değeri %71 ve negatif prediktif değeri %98 olarak belirlenmiştir⁽⁷⁷⁾.

Cobas Amplicor'un performansının klinik tanıya göre değerlendirildiği çalışmalarda duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %76.4-91.9 ve %99.8-100 olarak bulunmuştur. Solunum örnekleri ile yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde kültür sonuçlarına göre Cobas Amplicor'un duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla %78.3 - 96.1 , % 99.7-100 , % 90.9 - 100% ve % 97.5– 99.8 arasında bulunmuştur. Direkt bakı pozitif örneklerde bu değerler sırasıyla %96.9, %100, %100 ve %99.2 olarak saptanırken direkt bakı negatif örnekler için sırasıyla %68.0-91.7, %89.4-100, %100 ve %99.3 olarak değerlendirilmiştir. Sistemin direkt bakı ve kültür pozitif solunum örneklerinde performansı %96.9 iken direkt bakı negatif, kültür pozitif örneklerde %83.3 ve direkt bakı negatif, kültür negatif örneklerde %3.8 'dir. Ekstrapulmoner tüberkülozlu hastalarda *M.tuberculosis* complex'in örneklerden direkt tanısında sistemin duyarlılık ve özgüllüğü genel olarak sırasıyla % 60-85 ve %93.1-100 olup duyarlılık, direkt bakı pozitif örneklerde artış gösterirken (%90-100) direkt bakı negatif örneklerde düşüktür (%53-75). Cobas Amplicorun özgüllüğü oldukça iyi olmasına rağmen direkt bakısı negatif hasta örneklerinde duyarlılığının düşük olması bu örneklerde kullanımını sınırlandırmaktadır⁽⁷⁸⁾.

Biz çalışmamızda Cobas Amplicor sisteminin spesifivite, sensitivite, negatif prediktif, pozitif prediktif değerlerini %86.9, %100, %100, %82.6 olarak bulduk.

Şonuç olarak hastalığın tedavisi açısından hızlı tanı koymaya yardımcı Cobas Amplicor sisteminin solunum yolu örnekleri ve solunum dışı örneklerde de kültür yöntemleriyle beraber çalışılmasının yararlı olacağı görüşüne vardık.

6.SONUÇ ve ÖNERİLER

M.tuberculosis insanlık tarihinin en eski ve en çok korkulan hastalıklarından biri olmuştur.

M.tuberculosis enfeksiyonlarının tanısında klasik kültür ve ticari kültür sistemlerine ilave olarak son yıllarda moleküler testler çok sık olarak kullanılmaktadır.

Polimeraz zincir reaksiyonu testi hem in-house hem de hazır ticari sistemlerde çalışılabilmektedir. Ancak tüberküloz laboratuvarların da fazla sayıda değişik moleküler tanı yöntemleri denenmiş olmakla birlikte, bu yöntemlerin hiç biri henüz mikroskopi ve kültür gibi konvensiyonel yöntemlerin yerini alamamışlardır.

ARB boyama yöntemi her basamak laboratuvar koşulunda uygulanabilecek ve kurallara uygun çalışıldığında oldukça değerli bir yöntemdir. ARB boyama yönteminin sensitivitesinin düşük olması BACTEC MGIT 960'da kültür'ün 3–6 hafta gibi uzun sürelerde sonuçlanması nedeniyle hızlı ve doğru tanı için PCR önemli yer tutmaktadır. PCR yüksek oranda hassasiyet gerektirir, kontaminasyona dikkat edilmelidir. Yaymada ve kültürde olumsuz sonuç alınan örnekler için PCR bakteriyolojik tanı için önemli bir seçenektir.

Tüberküloz tanısı açısından değerlendirildiğinde yaymada ARB saptanan olguların hepsi için PCR yapılması anlamlı değildir tanı maliyetini artırır. Klinik ön tanı açısından hastalık riskinin yüksek olduğu olgular laboratuvara bildirilerek, PCR hızlı tanı konması açısından faydalı olur.

Tüberküloz açısından sağaltım alan hastaların kültür negatif, PCR pozitif olmaları, kültür olumsuzlaştıktan birkaç ay gibi bir süreyle basil çıkarmaya devam ettiklerini göstermektedir. Dolayısıyla PCR ile amplifikasyon, in vitro üretilmeyen basilin gösterebilmesi avantajını getirmektedir.

7. KAYNAKLAR

- 1- **Daniel TM, Bates JH, Downes KA.** History of tubeculosis. In Bloom BR, Editor: Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control, Washington, DC, ASM Pres 1994; 13–24.
- 2- **Davies PDO.** Tuberculosis and Migration. In Wilson R, Editor: European Respiratory Monograph Tuberculosis, UK, European Respiratory Society Journals Ltd 1997; 68–87.
- 3- **Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM.** Mycobacreia. In Shanahan JF, Editor: Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, 9th Ed., St. Louis, Missouri, Mosby-Year Book, Inc. 1994; 590–633.
- 4- **Kocabaş A.** Akciğer Tüberkülozu. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, Editör: Enfeksiyon Hastalıkları, Nobel Tıp Kitapevleri 1996:396–454.
- 5- **Snider DE, Raviglione M, Kochi A.** Global Burden of Tuberculosis. In Bloom BR, Editor: Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control, Washington, DC, ASM Pres 1994; 3–11.
- 6- **Connolly MA, Chaulet P, Raviglione M.** Epidemiology of Tuberculosis. In Wilson R, Editor: European Respiratory Monograph Tuberculosis, UK, European Respiratory Sociaty Journals Ltd 1997; 51–67.
- 7- **Nolte FS and Metchock B.** Mycobacterium. In Murra PC, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yoken RH, Editors; Manual of Clinical Microbiology, 6.Ed..Washington, DC ASM Pres 1995; 400-437.
- 8- **Kochi A.** The Global Tuberculosis Situation and the New Control Strategy of the World Health Organization. Tubercle 1991;72,1–6.
- 9- **Raviglioe MC, Snider DE, Koci A.** Global Epidemiology of Tuberculosis JAMA 1995;273(3):220–226.
- 10- **Smith PG and Moss AR.** Epidemiology of Tuberculosis. In Bloom BR, Editor: Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control, Washington, DC, ASM Pres 1994; 47–60.
- 11- **Çöplü L.** Tüberküloz. Editör: Barış Yİ. Solunum Hastalıkları. Ankara: Kent Matbaa, 1995; 147–168.
- 12- **Çelenk M.** Tüberküloz Epidemiyolojisi. Editör: Numanoğlu N. Türk Klin Tıp Bil Derg Özel Sayısı. Ankara: Özkan Matbaacılık, 1994; 14 (6): 391–404.
- 13- **Stead WW, Dutt AK.** Epidemiyoloji ve Konak Faktörleri. Editör: Schlossberg D. Tüberküloz. 3. Baskı, İstanbul: Bilimsel ve Teknik Yayınları Çeviri Vakfı Basım ve cilttevi, 1995; 1–13.
- 14- **Jawetz, E., Melnick, J.L. and Adelberg's** Medical Microbiology. 1995. Mycobacteria p. 263–272. 20 th. ed. Prentice-Hall International Inc. Printed in the United States of America.
- 15- **Bilgehan, H.** 1996. Klinik Mikrobiyoloji. Sayfa: 330–358 Barış yayınları İzmir.

- 16- **Kocabaş, A. 1996.** Akciğer tüberkülozu Topçu, A.W., Doğanay, M. Enfeksiyon Hastalıkları Kitabında sayfa: 396-428 Nobel Tıp Kitabevi Bursa.
- 17- **Kılıçturgay, K. 1994.** Klinik Mikrobiyoloji. Sayfa: 65-75 Güneş yayınları Bursa.
- 18- **GRANGE, JM.:** The genus Mycobacterium, Mycobacteria and Human Disease Oxford University Pres, New York, Second Ed. 1996, 11-40.
- 19- **MURRAY, P.R., ROSENTHAL, K.S., KOBAYASHI, G.S., PFALLER, M.A:** Mycobacterium, Medical Microbiology, Third Ed. Mosby-Year Book, Missouri, **1998**, 319-330.
- 20- **KOCABAŞ, A.:** Akciğer tüberkülozu, Enfeksiyon Hastalıkları Ed. WILLKE TOPÇU, A., SÖYLETİR, G., DOĞANAY, M., Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, **1996**,396-442.
- 21- **HAAS, D.W., DES PREZ, R.M.:** Mycobacterium tuberculosis, MANDEL, G.L., BENNETT, J.E., DOLIN, R., Principles and Practice of Infectious Diseases, Fourth Ed. Churchill Livingstone, New York, **1995**, 2213-2243.
- 22- **JEAGER, H.:** Klinik Sendromlar ve Tüberküloz olmayan Mikobakterium Enfeksiyonun Tanısı, Tüberküloz, Ed. SCHLOSSBERG D, Çeviri Ed. TETİKKURT C., Bilimsel ve Teknik Yayınları Çeviri Vakfı Yay:23 İstanbul, **1995**,225-234.
- 23- **PLORDE, J.J.:** Mycobacteria. Sherris Medical Microbiology, An introduction to infectious diseases, Ed. RYAN, K.J., Third Ed, Prentice-Hall International, New Jersey, **1994**,401-416.
- 24- **GEDİKOĞLU, S.:** Mycobacterium, Klinik Mikrobiyoloji, Ed. KILIÇTURGAY, K., Güneş&Nobel Tıp Kitabevleri, bursa, **1994**, 65-82
- 25- **METİNTAŞ, M.:** Tüberküloz basilinin yapısı ve özellikleri, Tüberküloz, Ed. ÖZDEMİR, N.,Anadolu solunum Derneği Yay. No: 1, Eskişehir, **1997**,17-31.
- 26- **GEDİKOĞLU, S.:** Mycobacterium tuberculosis'in hücre yapısı, Enfeksiyon Derg., (Suppl 11): 13-18, **1998**
- 27- **KOCAGÖZ, T.:** Mikobakteri genetiği araştırmalarının, hastalık biyolojisi, tanı ve tedavine getirmekte olduğu önemli gelişmeler, 2. Ulusal Mikobakteri Sempozyum Kitabı, Ankara, **1998**,20-25.
- 28- **MCFADDEN, J., STOKER, N.:**Mycobacteria, Ed: MEYERS, R.A.: Molecular Biology and Biotechnology : a comprehensive desk reference, VCH Publishers, New York, **1995**,582-585
- 29- **MCHUGH, T.T., NEWPORT, L.E., GILLESPIE, S.H.:** IS6110 HOMOLOGS ARE PRESENT IN MULTIPLE COPIES IN Mycobacteria other than tuberculosis-causing Mycobacteria, J Clin Microbiol., 35: 1769-1771, **1997**.
- 30- **Bilgehan. H. 1992.** Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Sayfa: 525-531 Barış Yayınları İzmir
- 31- **Wayne LG.** Cultivation of Mycobacterium tuberculosis for Research Purposes. In Bloom BR, Ed.: Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control Washington, DC, ASM Pres **1994**;73-83.
- 32- **Heifets LB and GOOD RC.** Current Laboratory Methods for the Diagnostic of Tuberculosis In Bloom BR, Editor: Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control Washington, DC, ASM Pres **1994**; 85-109.

- 33- **Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckendberg PC, Winn WC.** Mycobacteria. In Koneman WE, Editor: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th Ed., NewYork, Lippincott **1997**: 893-952.
- 34- **Brender, E., Jantzen A., Huttunen, R.** 1992. Characterization of a distinct group of lowly growing Mycobacteria by biochemical test and lipid analyses. J.Clin Microbiol. **30**: **1972-1975**.
- 35- **Eisenstein, I.B.** 1990. The polymerase chain reaction. N. Engl J. Med. **322**: 178-182.
- 36- **Lovannisci, DM., Winn-Deen, E.S.** 1993. Ligation amplification and fluorescence detection of M. Tuberculosis DNA. Mol Cell Probes; **31**: 729-731.
- 37- **Persing DH.** In Vitro Nucleic Acid Amplification Techniques. In Persing DH, Smith TM, Tenover FC, WhiteTM , Editors: Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications, Washington, DC, ASM Pres **1993**; part: 51-87.
- 38- **Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharp SJ, Higuchi R et al.** Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thrmostabe DNA Polymerase. Since **1988**;239: 487-491.
- 39- **Mullis KB and Faloona FA.** Specific Synthesis of DNA IN Vitro VIA A Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. Methods Enzymol **1987**; **155**:335-350.
- 40- **Innis MA and Gelfand DH.** Optimization of PCRs. In Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, Editors: PCR Protocols. A Guide,
- 41- **Marshall BG and Shaw RJ.** Dignostic Techniques: Old and New. In Wilson R, Editor: European Respiratory Monograph Tuberculosis, UK, European RespiratorySociety Journals Ltd **1997**; 31-50.,
- 42- **Body JC and Marr JJ.** Decreasing Reliability ofAcid-Fast Smear Techniques for DEtection of Tuberculosis. Annals Intern Med **1975**;82 (4):489-492.,
- 43- **Stottmeier KD.**Acid-Fast Smears and Tuberculosis. Annals Intern Med **1975**;85(3):429-430.
- 44- **Kim TC, Blackman RS, Heatwole KM, Kim T, Rochester DF.** Acid-Fast Bacilli in Sputum Smears of Patiens whit Pulmonary Tuberculosis. Am REV respir Dis **1984**;129:264-268.
- 45- **Lipsky BA, Gates J, Tenover FC, Plorde JJ.** Factors Affecting Clinical Value of Miroscopy for Acid-Fast Bacilli. Rew Infect Dis. **1984**;6(2):214-222.
- 46- **Murray PR, Elmore C, Krogstad DJ.** The Acid-Fast Stain: A Spesific and Predictive Test for Mycobacterial Disease. Annals Intern Med **1980**;92:512-513.
- 47- **Smitwhic RW, Stratigos CB.** Acid-Fast Microscopy on Polycarbonate Membran Fitler SputumSediments. J Clin Microbiol **1981**;13:1109-1113.
- 48- **Rikman TW, Moyer NP.** Increased Sensitivity of Acid-Fast Smears. J Clin Microbiol **1980**;11(6):618-620.
- 49- **Eyigör M, Gültekin B, Aydın N** Klinik Örneklerden izole edilen mikobakterilerin tanımlanması 6. Ulusal mikobakteri sempozyum kitabı 23-25 kasım **2006** sf.217
- 50- **Aslan G, Doruk E, Emekdaş G, Serin MS, Direktel Ş, Bayram G, Durmaz R.** İdrar örneklerinden Mycobacterium Tuberculosis İzolasyon ve İdentifikasyonunda

ARB, Kültür ve PCR-RFLP yöntemlerinin kullanılması 6. Ulusal mikobakteri sempozyum kitabı 23-25 kasım 2006 sf.220,

- 51- **Levy H, Feldman C, Sacho H, Meeulen H, Kallenbach J, Koornhof H. A** Reevaluation of Sputum Microscopy and Culture in the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis. *Chest* **1989**;95(6):1193-1197
- 52- **Van der Kuyp F.** The microbiology of the mycobacteria. In: Fishman ped. Pulmonary Diseases and Disorders. International ed. United States:McGraww Hill Company; **1998** p.2441-5.
- 53- **GABY E. PFYFFER, HANS-MARTIN WELSCHER, PASCALE KISSLING, CORNELIA CIESLAK, MANUEL J. CASAL, JUAN GUTIERREZ,AND SABINE RUSCH-GERDES** Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with Radiometric and Solid Culture for Recovery of Acid-Fast Bacilli *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 0095-Feb. **1997**, p. 364-368,
- 54- **M. Cruciani, C. Scarparo, M. Malena, O. Bosco, G. Serpelloni, and C. Mengoli.** Meta-Analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without Solid Media, for Detection of Mycobacteria *Journal of Clinical Microbiology*, May **2004**, p. 2321-2325, Vol. 42, No.
- 55- **Marja-Leena Katila, Päivi Katila, and Riitta Erkinjuntti-Pekkanen** Accelerated Detection and Identification of Mycobacteria with MGIT 960 and COBAS AMPLICOR Systems *Journal of Clinical Microbiology*, March **2000**, p. 960-964, Vol. 38, No. 3
- 56- **Iria Jesús de la Calle, María Antonia Jesús de la Calle and Manuel Rodríguez-Iglesias** Evaluation of the BDProbeTec ET system as screening tool in the direct detection of *mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* December **2003**, Pages 573-578,
- 57- **Silvia Ortu, Paola Molicotti, Leonardo Antonio Sechi, Pierp Pirina1, Franca Saba, Cono Vertuccio, Antonella Deriu, Ivana Maida, Maria Stella Mura, Stefania Zanetti.** Rapid detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by Real Time PCR and Bactec 960 MIGT *THE NEW MICROBIOLOGICA*, 29, 75-80, **2006**
- 58- **Lee J-J.;Suo J.;Lin C-B.;Wang J-D.;Lin T-Y.;Tsai Y-C.** Comparative evaluation of the BACTEC MGIT 960 system with solid medium for isolation of mycobacteria *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* Volume 7, Number 6, June **2003**, pp. 569-574(6).
- 59- **1-Bogard M, Vincelette J, Antinozzi R, et al.** Muticenter study of a commerical, automated poymerase chain reaction system for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respirator specimens in routine clinical practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2001**; 20: 724-731.
- 60- **Reischl U, Lehn N, Wolf H, Naumann L.** Clinical evaluation of the automated COBAS AMPLICOR MTB assay for testing respiratory and nonrespiratory specimens. *J Clin Microbiol* **1998**; 36: 2853-2860.
- 61- **D'amato RF, Wallman AA, Hochstein LH, et al.** Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis by using Roche AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* PCR test. *J Clin Microbiol* **1995**; 33: 1832-1834.

- 62- Noordhoek GT, Kolk AH, Bjune G, Catty D, Dale JW. Sensivity and Specifitiy of Detection of Mycobacterium tuberculosis: a Blind comparasion Study among Seven Laboratories. J Clin Microbiol 1994;32(2):227-284
- 63- Kwok S and Higuchi R. Avoiding False Positives whit PCR. Nature 1989;339: 237-238.
- 64- Özcan M, Yağmur G, Özbal Y, Gökahmetoğlu S, Akkaya Z, Çökük A Tüberküloz ön tanılı klinik örneklerin ARB boyama, PCR ve kültür yöntemleriyle değerlendirilmesi. 6. Ulusal mikobakteri sempozyum kitabı 23-25 kasım 2006 sf.233,
- 65- Günal S, Durmaz R, Otlı B Bir Üniversite Hastanesi Mikobakteriyoloji laboratuvarında Yapılan Geleneksel Tanı Yöntemlerinin Değerlendirilmesi 6. Ulusal mikobakteri sempozyum kitabı 23-25 kasım 2006 sf.234
- 66- Gürsoy N, Durmaz R, Günal S, Otlı B, Çalışkan A Tüberkülozun tanısında Cobas Amplicor ve iki Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyon sistemlerinin değerlendirilmesi 6. Ulusal mikobakteri sempozyum kitabı 23-25 kasım 2006 sf.223
- 67- Bonington A, Strang G, Klapper PE et al. Use of Roche AMPLICOR Mycobacterium tuberculosis PCR in early diagnosis of tuberculosis meningitidis. J Clin Microbiol 1998; 36:1251-125,
- 68- Durmaz R. Tüberküloz Laboratuvarında Moleküler yöntemler 2006 www.verem.org.tr/pdf/tuberkuloz_molekul.pdf
- 69- de Wit D, Maartens G, Steyn L. A comparative study of the polymerase chain reaction and conventional procedures for the diagnosis of tuberculous pleural effusion. Tuber Lung Dis 1992; 73(5): 262-7.
- 70- de Lassence A, Lecossier D, Pierre C, Cadranel J, Stern M, Hance AJ. Detection of mycobacterial DNA in pleural fluid from patients with tuberculous pleurisy by means of the polymerase chain reaction: comparison of two protocols. Thorax 1992; 47(4): 265-9.
- 71- Nguyen LN, Kox LF, Pham LD, Kuijper S, Kolk AH. The potential contribution of the polimerase chain reaction to the diagnosis of tuberculosis menengitis. Arc Neurol, 1996; 53:8,771-6
- 72- Bonington A, George S.J, Klapper P, Hood S.V. Use of Roche Amplicor Mycobacterium Tuberculosis PCR in Early Diagnosis of Tuberculous Meningitis. Journal of Clinical Microbiology 1998;36:1251-54
- 73- Bahadır A, Tuncay E, Çağlar E, Çetin M, Sayhan N, Tolun A. Evalution of polymerase chain reaction (PCR) technique in diagnosis of tuberculous pleural effusion. 1st Mediterranean Congress on Interventional Diagnosis for Thorax Diseases. Rhodes, Greece 25-29 May 1996,
- 74- Brisson-Noel A, Aznar C, Chureau C, Nguyen S, Pierre C, Bartoli M, Bonete R, Pialoux G, Gicquel B, Garrigue G. Diagnosis of Tuberculosis by DNA Amplification in Clinical Practice Evaluation. Lancet 1991; 338(8763): 364-6.
- 75- Sanjay S, Albert M, Anthony M, Kyungme K. Rapid Diagnosis of Tuberculosisin Various Biopsy and Body Fluid Specimens by the Amplicor Mycobacterium Tuberculosis Polymerase Chain Reaction Test. Chest 1998; 113:1190-94.

- 76- **Afghani B and Stutman HR.** Diagnosis of tuberculosis: Can the Polymerase Chain Reaction Replace Acid-Fast Bacilli Smear and Culture? JID;172:903-904
- 77- **Aslan G, Emekdaş G, Ülger M, Tezcan S Kaya A, Doğu O,Kuyucu:**Tüberküloz Menenjit tanısında Polimeraz Zincirleme Reaksiyonun kullanılması 6. Ulusal Mikobakteri Sempozyum Kitabı 23–25 Kasım 2006 sf 221
- 78- **Udo R., Norbert L, Hans W., Ludmila N.;** Clinical evaluation of the automated COBAS AMPLICOR MTB Assay for testing respiratory and nonrespiratory specimens. Journal of Clinical Microbiology 1998, Oct.36(10):2853-60



8.ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Erzurum'da doğdum. İlköğrenimimi Adana Semiha Yücel Akdeğirmen İlkokulunda, Orta öğrenimimi Adana Ziyapaşa Ortaokulunda ve lise öğrenimimi Adana Paksoy Kız Lisesinde tamamladım. 1997 yılında Niğde Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesine Biyoloji bölümüne başladım. 2001–2002 yılında mezun oldum. 2002 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans'a başladım.

