



T.C.

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
KÖKENLERİNDE İLAÇ DİRENCİNİN
GENOTİPİK VE FENOTİPİK YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

DR. METİN GÖRENEKLİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mete EYİGÖR

AYDIN-2011

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
KÖKENLERİNDE İLAÇ DİRENCİNİN
GENOTİPİK VE FENOTİPİK YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

DR. METİN GÖRENEKLİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Mete EYİĞÖR

AYDIN-2011

Bu araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TPF-10009 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Mikrobiyoloji alanında yetişmemde katkıda bulunan, uzmanlık eğitimim boyunca sundukları bilimsel, verimli ve destekleyici ortam için başta Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Neriman AYDIN'a, tezimin fikir aşamasından sonuçlanmasına kadar ki süreçte değerli vaktini ve bilimsel desteğini sunan, tez çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübeleri ile beni yönlendiren, değerli danışman hocam, Sayın Doç. Dr. Mete EYİĞÖR'e, çalışma sırasında bilimsel katkıları ile bana yardımcı olan, eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen, değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Berna GÜLTEKİN, Doç. Dr. Sevin KIRDAR, Doç. Dr. Bülent BOZDOĞAN, Prof. Dr. Hatice ERTABAKLAR, Yrd. Doç. Dr. Murat TELLİ, Prof. Dr. Sema ERTUĞ'a ve tezimin örnek toplama aşamasında yardımlarını esirgemeyen Aydın ili Verem Savaş Dispanseri Başhekimini Dr. Hayrettin AMASYA'ya teşekkür ederim.

Ayrıca yetişmemde emeği geçen ve tez çalışmalarım süresince benden her konuda ilgi ve desteğini esirgemeyen, birlikte çalıştığım isimlerini saymadığım Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nın tüm çalışanlarına, özellikle değerli arkadaşım Dr. Yasin TİRYAKİ'ye teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım. Bu zor çalışmanın her aşamasında maddi ve manevi hiç bir fedakarlıktan kaçınmayan sevgili aileme sonsuz teşekkürler.

Dr. Metin GÖRENEKLİ

Aydın, 2011

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TABLolar DİZİNİ	
RESİMLER DİZİNİ	
ŞEKİLLER DİZİNİ	
EKLER DİZİNİ	
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	
BÖLÜM I	
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
Tüberküloz Hastalığının Tarihçesi	3
Tüberküloz Tedavisindeki Tarihsel Gelişim	3
Epidemiyoloji	5
Mikobakterilerin Genel Özellikleri	7
<i>Görünüm, boyanma ve kültür özellikleri</i>	7
<i>Direnç</i>	14
Patogenez ve İmmünite	15
Tüberküloz Hastalığının Tanısı	18
Mikrobiyolojik Tanı	18
<i>Örneklerin toplanması</i>	19
Tüberküloz Tanısında Kültüre Dayalı Yöntemler	21
<i>Klasik katı besiyerleri</i>	22
<i>Hızlı kültür sistemleri</i>	22
Mikobakterilerin Tanımlanmasında Kullanılan Biyokimyasal Testler	23
Tanıda Moleküler Testler	25
Serolojik Tanı	26
Tanıda Klinik Yaklaşım	27
PPD (Purified protein derivative) cilt testi	27
Radyolojik Tanı	28
Latent Tüberküloz Enfeksiyonu Tanısı	28
Ayrıcı Tanı	28
Tedavi	28
<i>Tüberküloz tedavisine yaklaşım</i>	28
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>'de İlaç Direnci	33
<i>Antitüberküloz ilaçlar</i>	33
<i>İsoniazid</i>	33
<i>Rifampisin</i>	34
<i>Pirazinamid</i>	35
<i>Etambutol</i>	35
<i>Streptomisin</i>	36
<i>Florokinolonlar</i>	36
Antitüberküloz İlaçların Etki Mekanizmaları ve Bunlara Karşı Dirence	
Yol Açan Mutasyonlar	38
<i>Hücre duvarı yapımını bozan antitüberkülozlara karşı direnç</i>	38
<i>İsoniazid ve Etionamid direnci</i>	38
<i>Etambutol direnci</i>	38

Protein yapım inhibitörlerine karşı direnç	39
<i>Streptomisin ve diğer aminoglikozidlere karşı direnç</i>	39
Nükleik asit sentezini bozan ilaçlara karşı direnç	40
<i>Rifampisin direnci</i>	40
<i>Florokinolon direnci</i>	40
<i>Pirazinamid direnci</i>	40
Diğerler bazı tüberküloz ilaçlarıyla ilgili direnç mekanizmaları	41
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>'in Antitüberküloz İlaçlara Duyarlılığının Saptanmasında Fenotipik ve Genotipik Yöntemler	42
Fenotipik Duyarlılık Testleri	42
<i>Klasik kültür besiyerleri ile yapılan duyarlılık testleri</i>	42
<i>Orantı (proportion) yöntemi</i>	43
<i>Direnç oranı (ratio) yöntemi</i>	44
<i>Mutlak konsantrasyon (absolute concentration) yöntemi</i>	45
<i>Hızlı kültür sistemleri ile yapılan duyarlılık testleri</i>	45
<i>Radyometrik kültür sistemi (BACTEC 460 TB)</i>	45
<i>Floresan kültür sistemi (MGIT)</i>	46
<i>Kolorimetrik kültür sistemi (TK Kültür Sistemi)</i>	46
Bakteriyofailara Dayalı Hızlı Duyarlılık Yöntemleri	47
<i>Lusiferaz bildirici genli bakteriyofaj sistemleri</i>	47
<i>Faj çoğaltma sistemi</i>	47
<i>Akım hücreölçerinde (flow cytometry) duyarlılık belirleme</i>	47
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>'te İlaç Direncine Neden Olan Mutasyonların Saptanması	48
<i>Ters hibridizasyon yöntemi</i>	48
<i>DNA dizi analizi</i>	48
<i>Tek zincir biçim çeşitliliği (single strand conformation polymorphism-SSCP)</i>	48
<i>Heterodubleks analizi</i>	49
<i>Anında İzlenebilen (Real Time) PZR</i>	49
<i>DNA Yongaları (DNA Chip)</i>	50
<i>PZR- Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)</i>	51
Tanımlamalar	51
BÖLÜM II	
GEREÇ VE YÖNTEM	54
BÖLÜM III	
BULGULAR	69
BÖLÜM IV	
TARTIŞMA	82
SONUÇLAR	97
ÖZET	100
İNGİLİZCE ÖZET	102
KAYNAKLAR	104
EKLER	120

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo I. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> için seçici besiyerleri	14
Tablo II. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ve <i>Mycobacterium bovis</i> ayırımında kullanılan testler	24
Tablo III. Tüberküloz tedavisinde kullanılan birinci seçenek ilaçlar ve tedavi süreleri	30
Tablo IV. Tedavi şeması	30
Tablo V. <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i> 'de ilaç direncinin mekanizmaları	37
Tablo VI. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ' de direnç gelişme mekanizmalarının özeti	41
Tablo VII. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 'de ilaç direnci gelişimine yol açan mutasyonların olduğu genler	42
Tablo VIII. Löwenstein-Jensen besiyeri ve Middlebrook besiyerleri için direnci belirleyecek kritik ilaç konsantrasyonları ve kritik dirençli bakteri oranları	44
Tablo IX. Boyalı preparatta aside dirençli basillerin raporlanması	58
Tablo X. BACTEC 460 TB duyarlılık testinde liyofilize antibiyotiklerden stok solüsyon hazırlama ve BACTEC 12B besiyerindeki son antibiyotik konsantrasyonları	61
Tablo XI. PZR-RFLP ile mikobakterilerin identifikasyonu	66
Tablo XII. Hastaların cinsiyete göre dağılımı	69
Tablo XIII. Tüberküloz olgularının yaş gruplarına ve cinsiyete göre dağılımı	70
Tablo XIV. Hastaların öğrenim durumuna göre dağılımı	70
Tablo XV. Hastaların gelir durumuna göre dağılımı	71
Tablo XVI. Hastaların daha önce aldıkları tedavi durumuna (yeni olgu/eski olgu) göre dağılımı	71
Tablo XVII. Hastaların temas öyküsüne göre dağılımı	72
Tablo XVIII. Alınan örneklerin dağılımı	72
Tablo XIX. ARB ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması	72
Tablo XX. Kültür pozitif hastalarda ARB sonuçları	73
Tablo XXI. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 'in BACTEC 12B ve Löwenstein-Jensen'de üreme süreleri (gün)	75
Tablo XXII. ARB sonuçları ile <i>M. tuberculosis</i> 'in kültürde üreme süreleri (gün) arasındaki ilişki	75
Tablo XXIII. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kökenlerinde BACTEC 460 TB ile antitüberküloz ilaçlara direnç paternlerinin dağılımı	77
Tablo XXIV. Tüberküloz Direnç Kiti ile antibiyotik direncine sebep olan mutasyonların dağılımı	79
Tablo XXV. Tüberküloz Direnç Kiti ile tüberküloz hastalarında saptanan antitüberküloz ilaçlara karşı direnç mutasyon oranları	81
Tablo XXVI. Akciğer tüberkülozu hastalarında 2005-2008 yılları arasında mikroskopi ve kültür sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi	88
Tablo XXVII. İlaç duyarlılık testi (İDT) çalışılan hastalarda olgu tanımına göre her bir tüberküloz ilacı için toplam direnç sonuçları, 2005-2008	93
Tablo XXVIII. Türkiye'deki çeşitli çalışmalarda antitüberküloz ilaçlara karşı saptanan direnç oranları (%)	96

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa No
Resim 1. Ehrlich-Ziehl-Neelsen boyama ile <i>M. tuberculosis</i> (100X büyütmeli objektif, ışık mikroskobu)	12
Resim 2. Auramine-Rhodamine boyama ile siyah zeminde parlak sarı renkte görülen aside dirençli basiller (40X büyütmeli objektif, floresan mikroskobu)	12
Resim 3. Löwenstein-Jensen besiyerinde <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kolonileri	13
Resim 4. Çalışmamızda Ehrlich-Ziehl-Neelsen boyama yöntemi ile boyanan asidorezistan bakteriler (100X büyütmeli objektif, ışık mikroskobu)	73
Resim 5. Çalışmamızda Auramine-Rhodamine boyama yöntemi ile boyanan asidorezistan bakteriler (40X büyütmeli objektif, floresan mikroskobu)	74
Resim 6. Çalışmamızda Löwenstein-Jensen besiyerinde üreyen <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kolonileri	74
Resim 7. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> PZR IS6110 sonuçlarının % 2'lik agarozdaki görüntüsü	76
Resim 8. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>Bst</i> EII enzimi: 240/120/85 bç, <i>Hae</i> III enzimi: 150/130/70 bç)'de ısı şok proteinini kodlayan gen bölgesinin ampifikasyon ürününün <i>Hae</i> III ve <i>Bst</i> EII enzimleri ile kesilmesi sonucu elde edilen bant paternlerinin % 3'lük agarozdaki görüntüleri	76
Resim 9. Tüberküloz Direnç Kiti stripleri ile <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kökenlerinde direnç mutasyonlarının saptanması	77

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1. Mikobakterilerin taksonomik sınıflaması	8
Şekil 2. Mikobakteri hücre duvarı	10
Şekil 3. Akciğer tüberkülozunda tedavi akış şeması	31
Şekil 4. Kültür negatif ve inaktif tüberküloz tedavi akış şeması	32
Şekil 5. Tüberküloz Direnç Kiti ile antibiyotik direncine sebep olan mutasyonların dağılımı	80

EKLER DİZİNİ

Sayfa No

Ek-1: Bilgilendirilmiş olur metni

122

Ek-2: Tüberküloz hastalarında *Mycobacterium tuberculosis* ilaç direncinin araştırılması anket formu

124

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	:	Amerika Birleşik Devletleri
AC	:	Akciğer
ACP	:	Açıl taşıyıcı protein
ARB	:	Aside Rezistan Basil
AG	:	Arabinogalaktan
AMS	:	Açlık mide suyu
BAL	:	Bronkoalveolar lavaj
BCG	:	Bacille Calmette-Guerin
C	:	Sitozin
CDC	:	Centers for Disease Control and Prevention
ÇİD TB	:	Çok İlaça Dirençli Tüberküloz
CLSI	:	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
DSÖ	:	Dünya Sağlık Örgütü
DGTS	:	Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi
ELISA	:	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMB/E	:	Etambutol
ESAT	:	Early Secretory Antigen Target
EZN	:	Ehrlich- Ziehl-Neelsen
FMI	:	Fosfatidil-myo-inozitol
FRET	:	Floresan rezonans enerji transferi
G	:	Guanin
GLC	:	Gas Liquid Chromatography
GTH	:	Gecikmiş tip hipersensitivite
HIV	:	Human Immunodeficiency Virus
HPLC	:	High performance liquid chromatography
INH/H	:	İsoniazid
İDT	:	İlaç Duyarlılık Testi
LAM	:	Lipoarabinomannan
LJ	:	Löwenstein-Jensen
MA	:	Mikolik asit
MB	:	Middlebrook
MDR TB	:	Multidrug-resistant tuberculosis
MGIT	:	Mycobacterium Growth İndicator Tube
MİK	:	Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
MTBC	:	<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>
MOTT	:	<i>Mycobacterium Other Than M. tuberculosis complex</i>
NAP	:	p-nitro- α -acetilamino- β -hidroxypropiofenone
NK	:	Natural killer
NRAMP-I	:	Natural resistance-associated macrophage protein I
NTM	:	Non-tuberculous mycobacteria
PZA/Z	:	Pirazinamid
PAS	:	Para-amino salisilik asit
PG	:	Peptidoglikan
PMNL	:	Polimorf nüveli lökosit

PPD	:	Purified Protein Derivative
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
QRDR	:	Quinolone resistance determining region
RIF/R	:	Rifampisin
RBT/RFB	:	Rifabutin
RFLP	:	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	:	Ribonükleik asit
RRDR	:	Rifampicin resistance determining region
SSCP	:	Single strand conformation polymorphism
SL	:	Serbest lipid
SM/S	:	Streptomisin
SZ	:	Sitoplazmik zar
TB	:	Tüberküloz
Th 1	:	T-helper hücreler
TZH	:	Thiophene-2-carboxylic acid hydrazide
XDR TB	:	Extensive drug resistant tuberculosis
VSD	:	Verem Savaş Dispanseri
YİD TB	:	Yaygın ilaç dirençli tüberküloz

GİRİŞ VE AMAÇ

İnsanlık tarihinin en eski hastalıklarından biri olan tüberküloz (TB) halen dünyanın en önemli sağlık sorunlarından biri olmaya devam etmektedir. Dünyada Human Immunodeficiency Virus (HIV) infeksiyonundan sonra tek infeksiyöz etkene bağlı ölüme neden olan ikinci etkindir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 1993 yılında global tehlike olarak ilan edilmiştir (1-3).

Günümüzde dünya nüfusunun üçte biri *Mycobacterium tuberculosis* ile infektidir. Dünya Sağlık Örgütü'nün tahminlerine göre her yıl yaklaşık sekiz milyon insan tüberküloza yakalanmakta ve bunların iki-üç milyonu ölmektedir. Tüberküloz hastalığının insidansı gelişmekte olan ülkelerde yüksektir. Bunun nedenleri arasında kötü sosyoekonomik düzey, kalabalık yaşam ve HIV ile infekte kişilerin çok olması yer almaktadır. Tüberküloz kontrolünde en önemli konu, balgamında TB basili bulunan hastaları erken saptamak ve başkalarına bulaştırmadan etkili ilaçlarla en kısa sürede tedavi etmektir (3-6).

Tüberkülozun tanısı; hastalığın semptomları, balgamın mikroskopik incelemesi, lezyonların radyolojik görüntüleri ve altın standart olarak *M. tuberculosis*'in kültürde üremesine göre konulmaktadır. *Mycobacterium tuberculosis*, bölünme süresi en uzun bakteridir. Bu özellikleri nedeni ile mikobakterilerin klasik yöntemler ile üretilmesi, tür düzeyinde tanımlanması ve duyarlılık testlerinin sonuçlandırılması için üç-altı haftalık süreye gereksinim duyulur (7). Genellikle üç haftalık inkübasyondan sonra koloniler besiyerinde görülebildiği için en sık kullanılan konvensiyonel yöntemlerle [Löwenstein-Jensen (LJ) ve Middlebrook (MB) 7H12 (BACTEC 12B)] uzun sürede sonuç alınmaktadır. Bu nedenle TB basilinin üretilerek antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılığının saptanması haftalar aldığından, özellikle çok ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD TB) olgularının erken tedavi edilmesi ve dirençli kökenlerin yayılmasının önlenmesi zorlaştırmaktadır (5,6,8).

Tüberküloz kontrolünde en önemli sorun birinci seçenek antitüberküloz ilaçlara direncin artmasıdır. Bu nedenle ÇİD TB hastalarının artışı, TB ile mücadeleyi zorlaştırmaktadır (2,8). Bugün kötü kontrol programı, özellikle rifampisinin (RIF) denetimsiz kullanımıyla izoniazid (INH) ve RIF'e karşı birlikte direnç oluşumuna neden olarak, sorunu çözümü çok zor bir noktaya getirmiştir. En az INH ve RIF dirençli basillerin neden olduğu TB, "ÇİD TB" olarak adlandırılmıştır (9).

Aktif tüberkülozun tanısında *M. tuberculosis*'in kültürde üretilmesi altın standarttır. Günümüzde halen birçok merkezde TB tanısı amacıyla mikroskopik inceleme ve kültür kombinasyonu kullanılmaktadır. Özellikle dirençli olgu sayısındaki artış nedeniyle, tedaviye en kısa sürede başlayabilmek ve yeni bulaşları önleyebilmek amacıyla, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, hızlı sonuç veren, uygulaması kolay ve pahalı olmayan laboratuvar yöntemlerinin günlük kullanıma girmesi önemli bir gereksinim haline gelmiştir (10,11). Bu nedenle son yıllarda *M. tuberculosis*'in ilaç direncinin moleküler mekanizmalarının anlaşılmasından sonra hızlı ilaç direnci saptamaya yönelik özellikle RIF ve INH direncini saptayan moleküler yöntemler geliştirilmiştir (5).

Bu çalışmada; Aydın il merkezinde çalışmaya dahil edilen TB olgularından izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* kökenlerinde, BACTEC 460 TB (Becton Dickinson, ABD) ve TB Direnç Kiti (Autoimmun Diagnostika GmbH, Almanya) yöntemleri ile antitüberküloz ilaçlara karşı direnç oranlarının ve TB Direnç Kiti ile dirence yol açan mutasyonların saptanması amaçlanmıştır. Prospektif olarak 1 Ocak 2009- 1 Haziran 2010 tarihleri arasında Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi ve Aydın ili Verem Savaş Dispanseri'ne (VSD) başvuran TB olgularında, *M. tuberculosis*'in izolasyonu ve antitüberküloz ilaç direncinin saptanmasında; fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılmıştır. Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Aydın il merkezinde antitüberküloz ilaç direncini saptayan tek sağlık merkezidir. Ayrıca bu çalışma; Aydın il merkezinde yapılmış ilk moleküler çalışmadır. Bu çalışma ile Aydın ilindeki antitüberküloz ilaç direnci hakkında önemli verilere ulaşılması ve böylece bu veriler doğrultusunda tedavinin yönlendirilmesinde kliniğe katkıda bulunulması amaçlanmıştır. Bu çalışma ile antibiyotik duyarlılık testleri zamanında çalışılıp sonuçlar en kısa sürede Aydın ili VSD'ne bildirilerek hastaların tedavisine önemli katkıda bulunulmuştur.

GENEL BİLGİLER

Tüberküloz Hastalığının Tarihçesi

Tüberküloz yüzyıllardan beri bilinen bir hastalıktır. Almanya’da bulunan ve M.Ö. 8000 yılına kadar uzanan tarih öncesi insana ait iskelet kalıntılarının hastalık izi taşıdığı bulunmuştur. Eski Mısır uygarlığına ait iskeletlerde ve İnka dönemi insanlarında Pott hastalığına bağlı kesin bulgular saptanmıştır (12).

Hastalığın bulaşıcı karakterde olabileceği ilk kez Fracastorius tarafından ileri sürülmüş, Willemin 1865 yılında tüberkülozdan ölen kişilerin akciğer (AC) kavite örneklerini tavşanlara inoküle ederek hayvanlarda hastalık oluşturmayı başarmıştır. Robert Koch 1882 yılında bakteriyi mikroskopta göstermiş, 1884 yılında klinik örneklerde izole ettikten sonra saf kültürünü yapmış, deneysel olarak hayvanlarda hastalık oluşturmuş ve infekte hayvanlardan bakteriyi tekrar üreterek Koch Postulası’nı tarif etmiştir. Ayrıca Koch 1890 yılında “old tüberkülin” ile hastalığın özel immünite ve allerjisini ortaya koymuştur. Başlangıçta *Bacterium tuberculosis* adıyla anılan bakteri, koloni morfolojisi ve yavaş üreme özelliği nedeniyle mantara benzetildiğinden Lehmann ve Neumann tarafından 1886 yılında *M. tuberculosis* olarak isimlendirilmiştir. Calmette ve Guérin 1921 yılında BCG aşısını (Bacillus Calmette-Guérin), Seibert ve Glenn 1939 yılında PPD (Purified Protein Derivative)’yi bulmuşlardır (1,13,14).

On dokuzuncu yüzyılın sonlarına doğru TB salgını, Osmanlı İmparatorluğu’nda büyük bir halk sağlığı sorunu olmuş, Balkan Savaşları ve Birinci Dünya Savaşı’ndaki ağır yoksulluk koşullarında Anadolu’ya yayılmaya başlayan hastalık, 1940’ların sonunda en yüksek düzeyine ulaşmış ve bu dönemde en sık görülen ölüm nedeni olmuştur (14). Ülkemizde TB ile etkin mücadele 1950’li yıllarda başlatılmıştır. Çıkarılan bir yasa ile 1960 yılında VSD’leri kurulmuştur. Doksanlı yıllarla birlikte “Göğüs Hastalıkları ve Tüberküloz” alanında bilimsel dernek örgütlenmeleri gerçekleşmiş ve düzenli, disiplinli bir şekilde bilimsel çalışmalar, mezuniyet sonrası mesleki eğitimler yapılmaya başlanmıştır (15).

Tüberküloz Tedavisindeki Tarihsel Gelişim

Tüberkülozun tedavisinde 18. yüzyıla kadar fazla değişiklik olmamış, bu yüzyılda kır havası, hafif egzersiz, antimonlu ve vazokonstriktör ilaçlar, öksürük şurupları, opiatlar, flebotomi gibi yöntemler kullanılmıştır. İlk sanatoryumlar 19. yüzyılın sonlarında dağlarda

açılmış ve 20. yüzyılının ilk yarısında alabildiğince çoğalmış ve giderek TB araştırmalarının merkezi haline gelmiştir. Kemoterapi döneminden önceki bu tedavi girişimlerine bakıldığında, açık bir şekilde faydası olan tek tedavinin, hastalıklı ve kaviteli apikal segmentlerin kollabe edilerek kavitelerin kapatılmasının amaçlandığı, kollaps tedavisi olduğu gözlenmektedir (14). Tüberküloz tedavisinde klinik etki sağlayan ilk antibiyotik olan streptomisin (SM), 1944’de New Jersey’de bir toprak mikrobiyoloğu olan Selman Abraham Waksman tarafından keşfedilmiştir. Bu keşif ile TB tedavisinde kemoterapi dönemi başlamıştır. Aynı yıl İsveçli bilim adamı Jorgen Lehman salisilik asidin para-amino tuzunu sentezleyerek para-amino salisilik asit (PAS)’in TB tedavisinde kullanımını sağlamış ve bu iki ilacın kullanıma girmesiyle TB tedavisinde iyi sonuçlar alınmaya başlanmıştır (16). İngiliz Tıbbi Araştırma Konseyi (British Medikal Research Council) 1950 yılında PAS ve SM’i tek tek ve kombine kullanarak ilk karşılaştırmalı, randomize klinik çalışmayı yapmışlar ve kombine tedavinin daha etkili olduğunu ve bu şekilde ilaç direnci gelişiminin engellendiğini açıklamıştır (17). İzonikotinik asit hidrazid’in 1952 yılında antitüberküloz aktivitesinin bulunmasıyla INH, PAS ve SM’den oluşan üçlü tedavi dönemi başlamış ve hastaların % 90-95’i bu üç ilacın 24 ay süreyle devamlı olarak kullanılması ile tedavi edilebilir hale gelmiştir (18). Daha sonra 1960’lı yıllarda PAS’in yerini etambutol (EMB)’un almasıyla iki önemli yarar elde edilmiştir; EMB hem hastalar tarafından PAS’ten daha iyi tolere edilebilmiş hem de tedavi süresini 18 aya indirebilmiştir (19). Rifampisin’in 1970’lerde tedaviye eklenmesi ve bu ilacın kazeöz odaklarda bulunan yarı dormant basillere etkili olduğunun bulunmasıyla tedavi süresi daha da kısalmıştır (20). İngiliz Tıbbi Araştırma Konseyi’ nin bu yıllarda Batı Afrika ve Hong Kong’ta yaptığı çalışmalarda INH, SM, EMB ve RIF kombinasyonu ile sekiz-dokuz aylık tedavi süresi ile % 95’in üzerinde kür elde edildiği bildirilmiştir (21,22). Son olarak pirazinamid (PZA)’in tedaviye eklenmesiyle kültür negatifliğine ulaşma süresi daha da kısalmış ve altı ayda % 95’in üzerinde kür oranları elde edilmiştir (23). Antitüberküloz ilaç olarak ilk kez 1940’lı yıllarda SM bulunmuş; TB tedavisinde direnç sorunu da SM’nin tek başına kullanılması ile birlikte daha o yıllarda gündeme gelmiştir. Daha sonra INH, EMB ve PZA ilaçları bulunmuş ve TB tedavisinde kombine ilaç kullanımı kuralı yaygın kabul görmüştür. En son RIF 1960’lı yılların sonuna doğru tedaviye eklenmesinden sonra rutin kullanıma giren yeni TB ilacı olmamıştır. Tüberküloz, bu beş majör ilacın uygun kombinasyonları ile % 100’e yakın oranlarda tedavi edilebilmesine karşın bir veya birkaç majör ilaca (özellikle rifampisine) direnç varlığında tedavi başarısı azalmaktadır (24-28).

Epidemiyoloji

Tüberküloz primatlarda ve kobay gibi laboratuvar hayvanlarında tespit edilmiş olmasına rağmen, tek doğal rezervuarı insanlardır. Hastalık, insanlar arasında yakın temas ile infeksiyöz aerosollerin solunması yoluyla yayılır. Büyük partiküller mukozal yüzeyler tarafından tutulur ve solunum ağacının silier hareketleri ile uzaklaştırılır. Ancak bir ile üç kadar TB basili içeren küçük partiküller alveolar boşluklara ulaşır infeksiyon oluşturabilirler (29-31).

Dünya Sağlık Örgütü, dünya nüfusunun üçte birinin *M. tuberculosis* ile infekte olduğunu tahmin etmektedir. Günümüzde DSÖ, *M. tuberculosis* her yıl yaklaşık olarak dokuz milyon yeni vakaya ve iki milyon ölüme sebep olmaktadır. Hastalık insidansının en yüksek olduğu bölgeler Güneydoğu Asya, Afrika'da Sahra Çölü'nün güneyi ve Doğu Avrupa'dır (31). Yüksek olgu yükü olan ülkeler, dünyadaki TB olgularının % 80'ini bulunduran ülkelerdir. Toplam 22 ülke bulunmaktadır. Bunlar; Hindistan, Çin, Endonezya, Nijerya, Bangladeş, Pakistan, Etopya, Güney Afrika, Filipinler, Kenya, Kongo, Rusya, Viyetnam, Tanzanya, Brezilya, Uganda, Tayland, Mozambik, Zimbabve, Myanmar, Afganistan, Tanzanya'dır (4). Milenyum Gelişme Hedefleri çerçevesinde, TB kontrolünün global hedefleri ve göstergeleri; 1990 yılı rakamları baz alındığında 2015 yılına kadar ölüm oranlarının ve prevalansın da yarıya indirilmesidir. İlave olarak, yeni yayma pozitif vakaların en az % 70'inin saptanması ve bunların Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi (DGTS) programları ile % 85'inin tedavi edilmesidir. (32).

Tüberküloz tüm dünyada, özellikle Asya ve Afrika'da önemli bir hastalık ve ölüm nedenidir. Global olarak, 2006 yılında 9,2 milyon yeni vaka (139/100.000) ve yaklaşık olarak 1,7 milyon kişinin TB'dan öldüğü saptanmıştır. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre 4,1 milyon kişi yeni yayma pozitif (toplam vakaların % 44'ü, 62/100.000) ve 700.000 kişi HIV pozitif (toplam vakaların % 8'i) bulunurken, HIV pozitiflerin 200.000 kişi de TB nedeniyle ölmüştür. Afrika bölgesi en yüksek insidansa sahiptir (363/100.000). Hindistan, Çin, Endonezya, Güney Afrika ve Nijerya sırasıyla TB'un en çok görüldüğü ilk beş ülkedir. Toplam olguların % 86'sından Afrika (% 31), Güney Doğu Asya ve Batı Pasifik bölgeleri (% 55) sorumludur (32).

İki bin altı yılında, dünyanın bütün bölgelerinden global toplum sağlığını, özellikle HIV prevalansının yüksek olduğu bölgeleri tehdit eden YİD TB (Yaygın ilaç dirençli tüberküloz) bildirilmiştir. Yaygın ilaç dirençli tüberküloz, ÇİD TB'ye ilave olarak herhangi bir kinolona ve parenteral ilaçlardan herhangi birisine (amikasin, kapreomisin veya kanamisin) direnç olması durumudur. Dünya Sağlık Örgütü ÇİD ve YİD TB 2008 raporuna göre her yıl

tahmini olarak 40,000 YİD TB vakası görülmektedir. Bu veriler 35 ülkeden elde edilmiştir. Bu konuda ülkemiz dahil sağlıklı veriler henüz toplanmamıştır. En yüksek ÇİD TB'ler arasında YİD TB oranları eski Sovyetler Birliği'nden ayrılan ülkelerde en yüksek olarak göze çarpmaktadır; örneğin, Ermenistan'da % 4, Estonya'da % 24'tür. Güney Afrika'da 2004-2007 yılları arasında 17.615 ÇİD TB'nin 996'sı (% 5,6) YİD TB olarak tanımlanmıştır. Japonya'da YİD TB oranı yüksek olup, ÇİD TB'ler arasında % 30 kadardır. Genel olarak Orta ve Batı Avrupa'da, Amerika'da bu oran düşüktür. 2007 ve 2008 yıllarında tedavi altına alınan kayıtlı ÇİD TB'li hasta sayısı 160.000'dir. Aynı yıllarda tedavi altına alınan YİD TB'li hasta sayısı 16.000'dir. Hayatı kurtulan hasta sayısı toplam 134,000 olarak belirlenmiştir. Bu hastaların toplam maliyetleri ise 2.155.000 dolar civarındadır. Tüberkülozun tedavisinde ÇİD TB başlı başına önemli bir problem olarak gözükmürken, YİD TB'nin de ortaya çıkması ve yüzdelerinin artması nedeniyle gerekli tedbirler zamanında alınmaz ise tüberkülozun kontrolünde ve ortadan kaldırılmasında saptanan hedeflere belirlenen zamanda ulaşmak olası olmayabilir. (33-35).

Yirminci yüzyıla kadar yapılan çalışmalara rağmen gelişmiş ülkelerde tüberkülozun eradikasyonu, HIV epidemileri nedeniyle hala başarısızdır (9). Daha önce *M. tuberculosis* ile karşılaşmış HIV pozitif bir insanda TB gelişme riski HIV negatiflere göre yaklaşık 10 kat artmış olup % 50 kadardır (36). Dünyada HIV epidemisi yayıldıkça ilaçlara dirençli tüberküloz sorunu da artmaya başlamıştır. Her iki enfeksiyona sahip kişilerde ÇİD TB gelişme riski HIV negatiflere göre 100 kat artmıştır (37).

Türkiye'de veremle savaş Prof. Dr. Besim Ömer Paşa tarafından 1918 yılında başlatılmıştır. Geniş çaplı kitle taraması ve aşı çalışmaları 1953-1956 yılları arasında yapılmış ve bu dönemde taranan kişilerin % 56'sının TB basilleri ile infekte olduğu saptanmış ve ölüm nedenleri arasında TB ilk sırayı almıştır. Aynı oran 1980'li yıllarda % 0,36'ya düşmüştür (13).

Günümüz sanayileşmiş dünyasında, yeterince tıbbi yardım almayan etnik azınlıklar, şehirli yoksullar, evsiz insanlar, mahkumlar, alkolikler, intravenöz ilaç kullananlar, genel olarak yaşlılar, yüksek prevalanslı yerlerde doğan yabancılar ve aktif tüberkülozlular ile temas edenler arasında tüberkülozun prevalansı daha yüksektir. Günümüzde, HIV enfeksiyonu latent enfeksiyonun aktif tüberküloza dönüşmesinde bilinen en önemli risk faktörüdür ve HIV ile birlikte TB enfeksiyonu, özellikle ilaç direnci de birlikteyse, oldukça yüksek mortaliteli salgınlara sebep olurlar. Ayrıca ilerleme

olasılığı yüksek olan gruplar arasında, son iki yılda infekte olanlar, ≤ 4 yaştaki çocuklar ve AC radyografisinde saptanan kistik ve kanseröz lezyonları olan kişiler de sayılabilir (38,39). Bu hastalarda hastalığı yok etmek zor olduğundan, hastalığın sağlık çalışanları da dahil diğer insanlara yayılması önemli bir halk sağlığı problemi yaratmaktadır. Bu durum özellikle ilaca dirençli *M. tuberculosis* için doğrudur, çünkü uygun olmayan tedavi alan insanlar uzun bir süre bulaştırıcı kalabilirler (31).

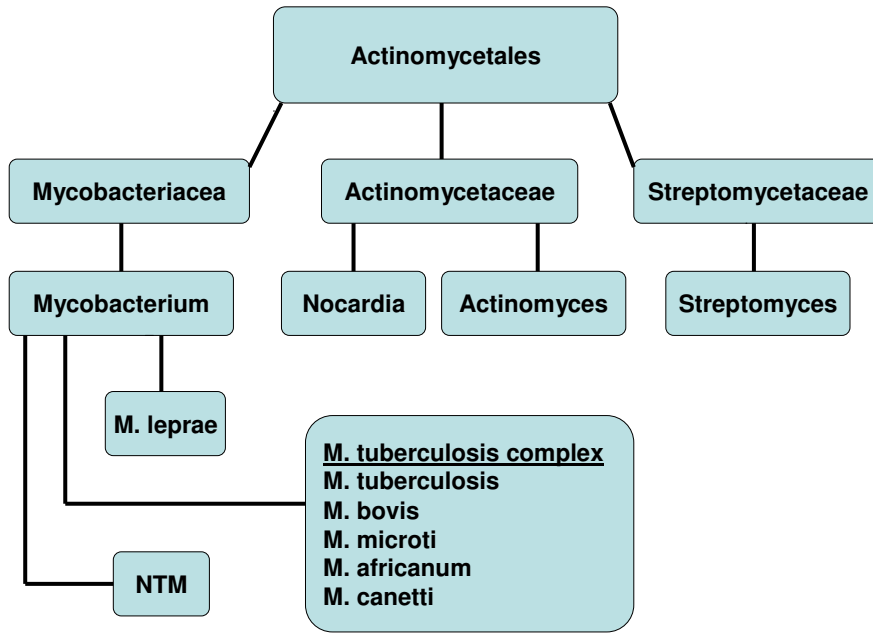
Mycobacterium tuberculosis, pulmoner tüberkülozlu hastaların öksürmesi sonucu oluşan ve havada bulunan partiküller (droplet nuclei) ile taşınır. Bu partiküller 1-5 μm çapında olup, normal hava akımında havada asılı kalırlar. Duyarlı bir kişi bu asılı partikülleri soluduğu zaman infeksiyon oluşur. Alveollerin içinde organizmalar alveoler makrofajlar tarafından yutulurlar. Genellikle, konak hücresel bağışık yanıtı *M. tuberculosis*'in çoğalmasını ve yayılmasını engeller. Bununla beraber, bazı basiller ilk infeksiyondan sonra yıllarca canlı, fakat “dormant” basiller olarak kalabilirler. Latent *M. tuberculosis* infeksiyonu olan hastalarda genellikle, PPD cilt testi pozitif olup asemptomatikler ve bulaştırıcı değildirler. Genel olarak, latent infeksiyonu olan kişilerde, hayatları boyunca aktif TB gelişme riski % 10'dur. Human Immunodeficiency Virus infeksiyonu olan hastalarda yaygın hastalık gelişme riski yılda % 10-15 civarındadır (40).

Mikobakterilerin Genel Özellikleri

Görünüm, boyanma ve kültür özellikleri

Mycobacterium, Yunanca “fungus (myces)” ve “küçük çubuk (bakterion)” kelimelerinden türetilmiştir. İsmi fungus kısmı, bu mikroorganizmanın sıvı besiyerlerinde üreme özelliklerinin küflere benzemesinden kaynaklanmaktadır. *Mycobacterium tuberculosis*, taksonomik olarak *Actinomycetales* takımı, *Mycobacteriaceae* ailesi, *Mycobacterium* cinsine aittir. *Mycobacterium* cinsinde üç tür bulunmaktadır: *M. tuberculosis*, *M. leprae* ve tüberküloz dışı mikobakteriler [non-tuberculous mycobacteria (NTM), eskiden “atipik mikobakteriler” veya “mycobacteria other than tuberculosis” (MOTT) olarak isimlendirilmiştir]. Mikobakterilerin taksonomik sınıflaması Şekil 1’de gösterilmektedir. Aynı soy, değişik aile altında incelenen *Nocardia* ve *Actinomyces* cinsleri gibi, birçok *Mycobacteria* cinsi de çevresel olarak bulunabilmekte ve nadiren hastalık oluşturmaktadır. Günümüzde halen *M. tuberculosis* türü, insanlarda ölümcül hastalığa yol açmaktadır (29,30,41).

Mycobacterium cinsi deoksiribonükleik asitlerindeki (DNA) yüksek guanin (G) ve sitozin (C) içerikli gram (+) bakteri sınıflandırılmasında, *Corynebacterium* ve *Nocardia* ile birlikte *Actinomycetales* takımında sınıflandırılmakta ve *Mycobacteriaceae* ailesi içindeki tek cins olup diğer mikolik asit içeren cinsler ile ilişkisi vardır. Mikobakteri türlerinin yüksek G+C içerikleri [% 61-71 mol, *M. leprae* (% 55 mol) hariç], diğer mikolik asit içeren üyeler olan *Gordonia* (% 63-69 mol), *Tsukamurella* (% 68-74 mol), *Nocardia* (% 64-72 mol) ve *Rhodococcus* (% 63-73 mol) gibi cinslerde olduğu gibidir (42,43,44). *Mycobacterium* cinsi içinde bulunan bakteriler aside dirençlilik, 70-90 karbon içeren mikolik asitlerin varlığı, deoksiribonükleik asitlerindeki yüksek (% 61-71 mol) guanin + sitozin (G+C) içeriği esasına göre sınıflandırılırlar. Bazı bakteri türleri (örneğin; *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella*, *Gordonia*) aside dirençli olabilmelerine karşın daha az yoğunlukta boyanırlar (kısmen aside dirençlidirler) ve mikolik asit zincirleri daha kısadır (29,30,42).



NTM: Non-tuberculous mycobacteria

Şekil 1. Mikobakterilerin taksonomik sınıflaması

Bilimsel literatüre ilk olarak 1896'da giren *Mycobacterium* cinsi içinde bugün 80'den fazla tür tanımlanmıştır. İnsan ve diğer sıcak kanlı hayvanlarda hastalık oluşturan *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* ve *M. canetti*'nin birbirleriyle gösterdikleri

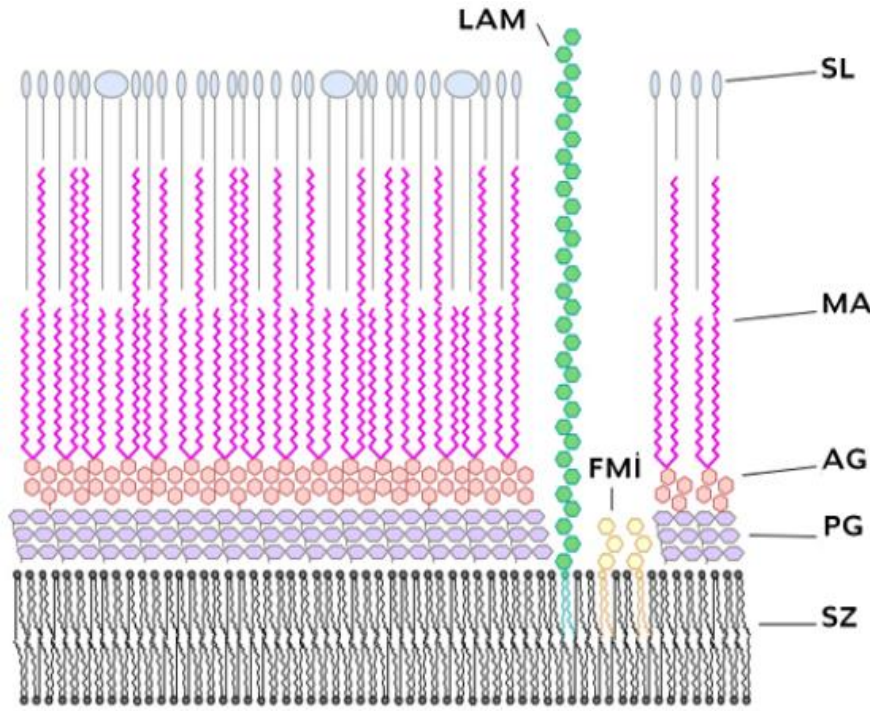
genetik yakınlık temel alınarak bu türler “*M. tuberculosis complex*” adı altında toplanmıştır ve benzer DNA-DNA homolojisi gösterirler (>%95) (43-45).

Mikobakterilerde lipidden zengin karmaşık bir hücre duvarı vardır. Bu hücre duvarı bakterilerin karakteristik özelliklerinin (örneğin; aside dirençlilik, yavaş üreme, deterjanlara dirençli olma, yaygın antibakteriyel antibiyotiklere direnç, antijenisite, kümeleşme) çoğundan sorumludur (31). Peptidoglikolipid hücre duvarı, *meso*-diaminopimelik asit, alanin, glutamik asit, glukozamin, muramik asit, arabinoz ve galaktoz içerir. Mikolik asitler (karbon atomlarının sayısı 70-90 olabilir) serbest lipidler ile birlikte (Örneğin; trehaloz-6,6'-dimokolat) hidrofobik geçirgen bir bariyer oluştururlar (46,47). Diğer önemli yağ asitleri mumlar, fosfolipidler, mikoserozik ve fenoik asitlerdir. Hücresel yağ asitlerinin değişik paternleri arasında (karbon atomlarının sayısı 10-20), *Actinomycetales* üyelerinin birkaçının tek bir hücre komponenti olan tüberkülostearik asit (10-R- methyloc-tadecanoic) bulunur (46).

Mycobacterium tuberculosis'in kuru ağırlığının % 60'ından fazlası lipidlerden oluşur (48). Mikobakterilerin elektron mikroskopuyla yapılan incelemeleri; sitoplazma içinde bol miktarda ribozom, polifosfat granülleri, vakuoller, lipid damlacıkları ve kitle şeklinde fibriller bir DNA bulunduğunu, üç katlı plasma membranının üç katlı bir hücre duvarı ile çevrili olduğunu ortaya koymuştur. Hücre duvarının iskeletini, peptidoglikan ve arabinogalakattan tabaka oluşturur. Peptidoglikan tabakada N-asetil glukozamin ve N-glikolil muramik asit (diğer bakterilerde N-asetil muramik asit), arabinogalakattan tabakada ise D-arabinoz, D-galaktoz ve mikolik asit bulunur. Bu iki tabaka D-arabinoz ve N-glikolil muramik asit arasındaki fosfodiester köprüleri ile birbirine bağlanır (13,29,31).

Glikolil yapısı nedeniyle mikobakteriler lizozime dirençlidir. Arabinogalakattan tabakada D-arabinoz, D-galaktoz ve mikolik asit bulunur. Peptidoglikan, arabinogalakattan (AG) ve mikolik asitler (MA) birbiriyle bağlanarak kompleks bir yapı oluşturur. Bu yapı mikolil-arabinogalakattan-peptidoglikan kompleksi olarak adlandırılmaktadır. Hücre duvarının iskeleti, peptidoglikan ve arabinogalakattan oluşur. En dış tabakada ise mikolik asitlere kovalent olarak bağlanmış serbest lipidler (SL) yer almaktadır. Bunlardan en önemlisi mikolik asitin trehaloz ile oluşturduğu kord faktör olarak da bilinen bir kompleks olan trehaloz dimikolattır. Trehaloz dimikolat bakterinin tween-albumin besiyerinde 37°C'de 10-15 gün içinde çalı demetine benzer görünüm almasından sorumludur. Sülfatid ve sülfatid açıl

trehalozlar, makrofaj içinde fagozomla lizozimin birleşmesini engelleyerek virulansta rol oynar. Mikosidler ise *M. leprae*'de olduğu gibi basilin etrafının kapsül gibi sarar. Serbest lipidler hücre duvar kalınlığından ve büyük oranda aside dirençli boyanma özelliğinden sorumludur. Mikobakteri hücre duvarının diğer önemli komponenti fosfatidil-myo-inozitol (FMİ) uzantılarıyla sitoplazmik zara (SZ) bağlanan lipoarabinomannan (LAM)'dır. Mikobakterilerin hücre duvarı Şekil 2'de gösterilmektedir (13,31,48)



PG: Peptidoglikan, AG: Arabinogalaktan, MA: Mikolik asit, SL: Serbest lipid, FMİ: Fosfatidil-myo-inozitol, SZ: Sitoplazmik zar, LAM: Lipoarabinomannan

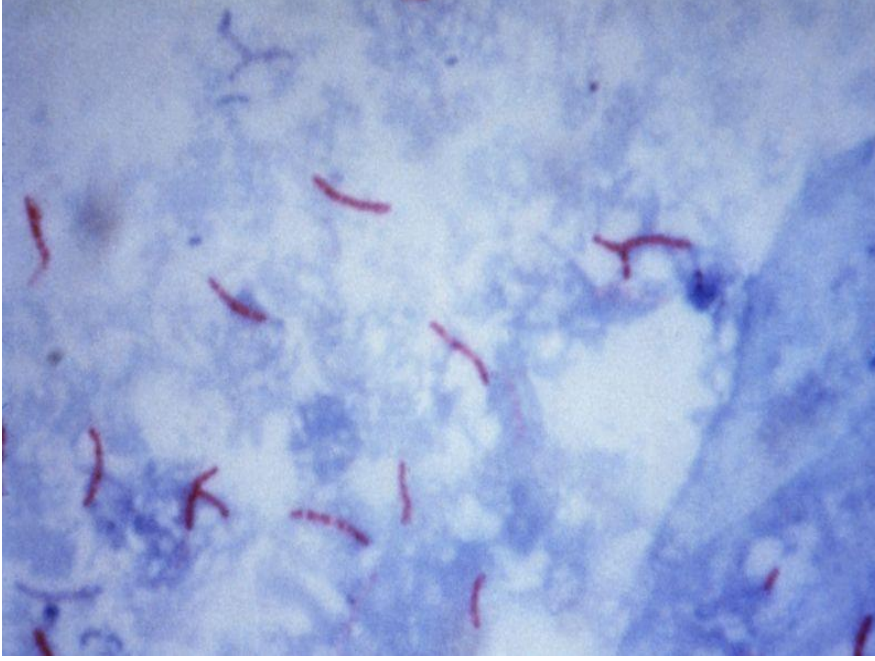
Şekil 2. Mikobakteri hücre duvarı (48)

Mycobacterium tuberculosis silindir şeklinde, uçları yuvarlak, 0,3-0,6 µm en ve 1-4 µm boyunda, düz veya hafif kıvrık, hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz, aerob ortamda üreyebilen ince bir basildir. Bazen dallanmış ve uzun filamentöz şekillerde, bazen kokoidal formda olabilirler. Eski kültürlerden ve kazeöz lenf bezlerinden yapılan preparatlarda dallanmış, filamentöz veya kokoidal formda görülebilir. Klinik örneklerde tek tek veya ikili üçlü küçük gruplar halinde bulunur. *Mycobacterium bovis* ise daha kalın ve kısadır. Bazen nokta gibi granüllü, bazen uzun şekillerde görülür (13,29,44).

Koloni morfolojileri türler arasında değişken olup, düz, kaba veya pürüzlü, pigmentsiz (non-fotokromojen) veya pigmentli olabilir. Pigmentli tiplerin kolonileri, genellikle keratonoid pigmente bağlı olarak, düzenli veya değişken şekilde sarı, portakal veya nadiren pembe renklidir. Bazı türler pigment oluşturabilmek için ışığa gereksinim duyarlar (fotokromojenler); diğer türler ise hem ışıktaki ve hem de karanlıkta pigment yapabilirler (skotokromojenler) (44).

Mycobacterium tuberculosis aside alkole dirençlidir. Hücre duvarı lipidden zengin olup, yüzeyi hidrofobik ve mikobakterileri birçok dezenfektana ve laboratuvarında yaygın kullanılan boyalara karşı dirençli yapmıştır (31). Bakterinin aside dirençli boyanma özelliği, fiziki bütünlüğü yanında hücre duvarındaki mikolik asit ve lipid bariyer sistemine bağlıdır. Yüzey lipidlerinin hidrofilik etkileri, boyanın suda kolay eriyen organik bir madde (fenol) içinde eritilmesi ve ısıtılması ile en aza indirilir. Fenollü fuksin içine yüzey gerilimini azaltan tween 80, dimetil sülfonat ve propilen glikoz gibi maddelerin eklenmesi de boyanma özelliğini kuvvetlendirir (13,29,49). Fenollü fuksin, lipid ortamda alkol ve su ortamına göre daha kolay eridiğinden bakteri lipidlerini kolayca geçer ve bakteriyi boyar (49). Boyanmaları için fenollü ve yoğun boya eriyiklerinin uzun süre ya da sıcaklık etkisi ile uygulanması gerekir. Bu şekilde boyanan aside dirençli bakteriler, bir kez boyandıktan sonra asit, asitli alkol ve diğer renk gidericilerle boyalarını bırakmazlar. Renksizleştirici olarak kullanılan asit ve alkolde daha az eridiğinden, bunların uygulanması ile bakteriyi terk etmez, bu yüzden de aside dirençli bakteriler (acid-fast) olarak adlandırılırlar (31,49). Aside dirençli veya asidorezistan bakteriler (ARB) hücre duvar yapısının büyük bölümünü oluşturan lipidlerin hidrofobik özelliğinden dolayı bakteriyolojik boyalarla zor boyanır (49). Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) yöntemi ile boyanır. Bu yöntemde aside dirençli bakteriler mavi zeminde parlak kırmızı olarak görülür (Resim 1). Karşıt boyamada metilen mavisi yerine pikrik asit kullanılırsa zemin sarı renkte, malaşit yeşili kullanılırsa yeşil renkte boyanır. Eski kültürlerden ve kronik hastaların klinik örneklerinden hazırlanan preparatlarda; bakteri sitoplazmasında bulunan polifosfat granülleri ve vakuollerin değişik derecelerde boya almaları nedeniyle, basiller düzensiz şekilde boyanıp, boncuk dizisi veya tesbih şeklinde görünür. Klinik örneklerdeki mikobakterilerin gösterilmesinde florokrom boyama yöntemlerinden de (Auramine-fenol, Auramine-Rhodamine, Glikerson-Kanner yöntemi v.b.) yararlanılır. En sık kullanılan Auramine-Rhodamine boyamasıdır. Aside dirençli basiller siyah zeminde parlak sarı renkte görülür (Resim 2). Gözü daha az yorması, yüksek oranda olumlu sonuç alınması,

basillerin daha kolay ve daha çabuk görülmesi řüpheli durumlarda tercih edilen bir yöntemdir (13,29,30).



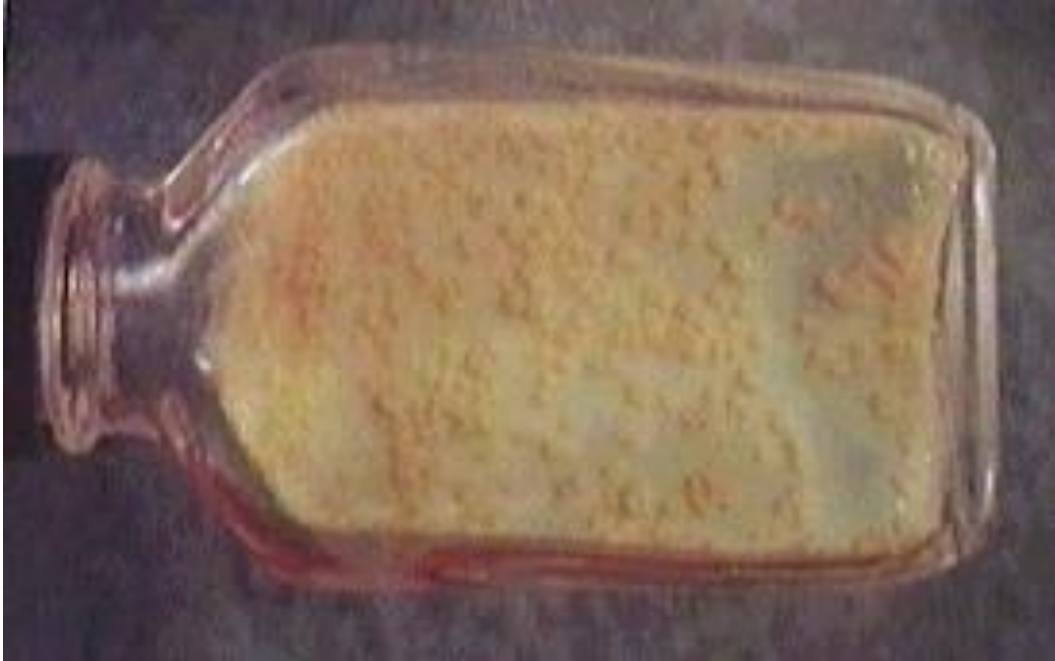
Resim 1. Ehrlich-Ziehl-Neelsen boyama ile *M. tuberculosis* (100X büyütmeli objektif, ışık mikroskobu) (50)



Resim 2. Auramine-Rhodamine boyama ile siyah zeminde parlak sarı renkte görülen aside dirençli basiller (40X büyütmeli objektif, floresan mikroskobu) (51)

Mycobacterium tuberculosis, ürettiği besiyerine niasin salma özelliğine sahip olması ile *M. simiae* dışındaki tüm mikobakterilerden ayrılır. *Mycobacteriu bovis* BCG suşunun bazı kökenleri de, nadiren niasin üretebilir. *Mycobacterium tuberculosis*, pirazinamidaz ve nikotinamidaz enzimine sahiptir. Oysa her iki enzimde *M. bovis*'de bulunmaz. İnsanlarda klinik öneme sahip mikobakteri türleri içinde thiophene-2-carboxylic acid hydrazide (TZH)'ye duyarlı tek tür *M. bovis* 'dir (13,29,30).

Mycobacterium tuberculosis'de ikiye bölünme süresi 15-20 saattir (ortalama 18 saat). Katı besiyerlerinde kolonilerin görülebilmesi için en az iki hafta geçmesi gereklidir. Yumurtalı besiyerlerinde üstü ve kenarları girintili çıkıntılı, kuru, sert, kirli beyaz ve deve tüyü renginde bir-iki mm çaplı pigmentsiz koloniler oluşturur. Zorunlu aeroptur. Üremesi için optimal ısı 37°C, pH 7 ve % 5-10 CO₂ üremeyi arttırır. Enerji gereksinimlerini basit karbon kaynaklarından (gliserol, glikoz) sağlar. İlk izolasyonları için zenginleştirilmiş besiyerleri gerekir. Bu nedenle ilk izolasyonda en sık kullanılan besiyeri LJ'dir (Resim 3). İçinde tam yumurta, patates unu, gliserol, çeşitli tuz-mineraller ve malaşit yeşili vardır (agar yok). Malaşit yeşili, mikobakterileri etkilemeyen ancak birçok bakterinin üremesini engelleyen (inhibitör) bir madde olarak besiyerinde bulunur. Adi besiyerlerinde üreyemezler (13,29,31).



Resim 3. Löwenstein-Jensen besiyerinde *Mycobacterium tuberculosis* kolonileri (29)

Kültürde kullanılan besiyerleri üç grupta incelenebilir;

1.Yumurtalı besiyerleri (Löwenstein-Jensen, Petragnani, Amerikan Toraks Topluluğu)

2.Sıvı besiyerleri (Middlebrook 7H12)

3.Agarlı besiyerleri (Middlebrook 7H10, Middlebrook 7H12)

Löwenstein-Jensen besiyeri kültürde en sık kullanılan besiyeridir. Bakteriolojik tanıda sık kullanılan diğer yöntemler, BACTEC ve MGIT'dir. Tablo I'de *Mycobacterium tuberculosis* için seçici besiyerleri gösterilmiştir (29).

Tablo I. *Mycobacterium tuberculosis* için seçici besiyerleri (29)

Besiyeri	İçerik	İnhibitör
Gruft modifiye Löwenstein-Jensen	Tam yumurta, bazı tuzlar, gliserol, patates unu, RNA 5mg/100 ml	Malaşit yeşili 0,025gr /100 ml Penisilin 50 U/ml Nalidiksik asit 35 mg/ml
Löwenstein-Jensen	Tam yumurta, bazı tuzlar, patates unu, gliserol	Malaşit yeşili 0,025 gr/100 ml Siklohekzimit 400 mg/ml Linkomisin 2 mg/ml Nalidiksik asit 35 mg/ml
Middlebrook 7H10	Bazı tuzlar, vitaminler, kofaktörler, oleik asit, albumin, katalaz, gliserol, glukoz, agar	Malaşit yeşili 0,0025 gr/100 ml Siklohekzimit 360 mg/ml Linkomisin 2 mg/ml Nalidiksik asit 20 mg/ml
Middlebrook 7H11 (Mitchison'ın besiyeri)	Bazı tuzlar, vitaminler, kofaktörler, oleik asit, albumin, katalaz, gliserol, glukoz, kazein hidrolizat, agar	Karbenisilin 50 mg/ml Amfoterisin B 10 mg/ml Polimiksin B 200 U/ml Trimetoprim laktat 20 mg/ml

Direnç

Kuruluğa ve dezenfektanlara diğer sporsuz bakterilere göre daha dirençlidir. Kültür ortamında, besiyeri içinde 12 yıl canlı kalır, infektivitesini korur. Gün ışığına direk

maruz kalınca iki saatte ölür, balgam içinde 20-30 saat dayanır. Kurumamış balgamda haftalarca canlı kalır, karanlık ve soğuk ortamda kuru balgamda altı-sekiz ay canlı kalır (1,13). *Mycobacterium tuberculosis*, özellikle, balgam içinde bulunduğunda kimyasal dezenfektanlara oldukça dirençlidir. Balgam ve dışkı gibi diğer bakterilerle kontamine örneklerden tüberküloz basillerinin saf kültürünü yapmada bu özellikten faydalanılır. Son konsantrasyonu % 2 olan NaOH'li ortamlarda diğer bakterilerin çoğu ölürken mikobakteriler canlılıklarını sürdürür. Ayrıca % 3-8 formaldehit ve % 5 NaOH ile 10-25 dakikada, % 70-95'lik alkol ile 5-10 dakikada, aseton ve tendürdiyot ile hemen ölürler. Malaşit yeşiline, diğer çoğu sporsuz bakteriden daha dirençli olduğundan, tüberküloz bakterileri ve diğer mikobakteri türlerinin üretilmesinde kullanılan besiyerlerinin içine inhibitör madde olarak, malaşit yeşili konur (29,31,52).

Patogenez ve İmmünite

Mycobacterium tuberculosis, hayat boyu infeksiyon oluşturabilen hücre içi bir patojendir (31). Tüberküloz basilleri insan vücuduna çok değişik bölgelerden (solunum, sindirim, deri ve konjunktiva gibi) girebilir. Ancak en önemli bulaş yolu inhalasyondur. Bulaş sonrası infeksiyon oluşup oluşmaması veya hastalık meydana gelip gelmemesi konağın direnci ile bakteriyel virulans arasındaki dengeye bağlıdır (13,29,31).

Mycobacterium tuberculosis genellikle akciğer veya larinks tüberkülozlu hastaların hapşırma, öksürük ve konuşması ile ortama saçılan; içinde canlı basil bulunan damlacık çekirdeklerinin (droplet nuclei) duyarlı kişilerce inhale edilmesi ile insanlara bulaşır. İn hale edilen basillerin çoğu üst hava yollarında tutulur, mukosiliyer aktivite ile dışarı atılır, az bir kısmı ise alveollere ulaşır. Alveollerde aktive olmamış alveolar makrofajlar tarafından tutulur. Basiller makrofajlara; kompleman reseptörleri (CR), mannoz reseptörleri (MR) veya çöpçü reseptörler (SR) denilen reseptörler yolu ile tutunur ve Toll-Like reseptörler (TLR) ile tanınarak girer (53,54). Makrofajların bakterisidal aktivitesi ile basilin virulansı arasındaki denge fagositozu takiben gelişecek olayları belirler. Burada 4 olasılık vardır.

1. Konağın yanıtı etkilidir; basil, makrofaj içinde öldürülür ve infeksiyon gelişmez.
2. Basil makrofaj içinde çoğalmaya başlar, fakat daha sonra gelişen immün yanıtla infeksiyon kontrol altına alınır ve koruyucu immünite gelişir. Bu durum ‘‘primer

infeksiyon’’ olarak bilinir; kişide klinik veya radyolojik bulgular olmamakla birlikte, PPD pozitifleşmesi söz konusudur.

3. Basiller primer infeksiyonu takiben çoğalmaya devam eder ve ‘‘primer tüberküloz’’ meydana gelir. Yani klinik hastalık ortaya çıkar.

4. Primer infeksiyon sonrası meydana gelen kazeöz nekroz içinde canlı kalan basiller; hayatın herhangi bir devresinde herhangi bir nedene bağlı olarak reaktif olabilir ve ‘‘reaktivasyon tüberkülozu ya da sekonder tüberküloz’’ olarak bilinen klinik tabloya neden olur.

Tüberküloza doğal dirençte pek çok genetik faktörün rol oynadığı düşünülmektedir. Örneğin NRAMP-I (natural resistance-associated macrophage protein I) mikobakteriye karşı direnç/duyarlılıkta düzenleyici rol oynayabilir. Makrofajların, basili öldürmesinde gerekli olan nitrik oksit yapımında kullandığı nitratları hücre içine taşıyan bu proteini kodlayan gendeki bir defekt, infeksiyona duyarlılıkla sonlanabilir (55).

Konakçı-bakteri etkileşiminde eğer basiller makrofaj içinde öldürülmezse; çoğalmaya başlar ve makrojlari eriterek dışarı dökülür. Çeşitli kemotaktik faktörlerle kan akımından olay yerine gelen monosit, polimorf nüveli lökosit (PMNL); lizise uğramış makrofajlardan açığa çıkan basilleri ortadan kaldırmaya çalışır. Böylece olay yerine göç eden hücreler tarafından etrafı çevrilerek ‘‘tüberkül’’ denilen spesifik lezyonların oluşması başlar (56-58). Makrofajlar tarafından içeri alınan basiller, hücre içinde çeşitli toksik ürünler (reaktif oksijen ve nitrojen radikallarının sentezlenmesi) üretilerek öldürülmeye çalışılır. Basil de bu mekanizmayı çeşitli yollarla direnç göstererek engellemeye çalışır, bu mekanizmalardan biri fagozom-lizozom füzyonunun önlenmesidir. Basilin lipoarabinomannan komponenti bu aşamada önemlidir. Ayrıca bakteri NH₃ üreterek, fagozom içerisindeki pH’ı alkalen tarafa doğru değiştirir ve öldürücü enzimlerin aktivitesini inhibe etmeye çalışır. Bir diğer önemli nokta ise basilin fagozomdan hemolizinleri aracılığı ile sitoplazmaya kaçışıdır. Bütün bu mekanizmalar ile makrofajlar basili öldürmez ise, apoptoz ile kendini ortadan kaldırarak basil yükünü azaltmaya çalışır (59-61).

İçinde basil bulunan makrofajlar öncelikle sitokinler sentez eder. Bunlardan en önemlileri IL-1, IL-12 ve TNF- α ’dır. IL-1 ateş yanıtını başlatırken; IL-12, IL-15 ile birlikte NK (natural killer) T lenfositleri IFN- γ yapımı için uyarır. IFN- γ , hem makrofajları aktive eder hem de diğer hücreleri uyararak, spesifik immün yanıtın tetiklenmesini sağlar. Uyarılan T hücreleri de bir takım sitokinler salgılayarak spesifik immün yanıtı katkıda bulunur. Bu

sitokinlerin en önemlileri Th 1 (T-helper hücreler)'den üretilen IL-2, IFN- γ 'dır (56-57). IL-2 antijen spesifik T hücre klonlarının oluşmasını sağlarken, IFN- γ makrofajları aktive etmeye başlar. Ortamda IL-12 fazla ise Th 1 yanıtı; IL-4 fazla ise Th 2 yanıtı daha baskındır. Th 1 yanıtının üstün olması hücre aracılıklı immünitenin oluşmasına, Th 2 yanıtının üstün olması ise sıvısal bağışık yanıtın oluşmasına yol açar. IFN- γ Th2 yanıtını, IL-4 ve IL-10 ise Th 1 yanıtını baskılar. *Mycobacterium tuberculosis* organizmada Th 2 yanıtının ortaya çıkmasını sağlamaya çalışıp, Th 1 yanıtını yani IFN- γ sentezini inhibe ederek, immün yanıtı korumaya çalışır. TNF- α ise granülom oluşumu, nitrik oksit üretimi yanı sıra doku hasarından ve tüberkülozun klinik belirtileri olan kilo kaybı ve anemiden sorumludur. İnfekte makrofaj ve hücreler bölgesel lenf bezine giderek enfeksiyonu takip eden ikinci ve dördüncü haftalarda tüberküloza karşı özgül bağışık yanıtın başlamasını sağlarlar. Tüberküloza karşı oluşan bu özgül konakçı yanıtları iki türdür. Bunlardan birisi gecikmiş tip hipersensitivite (GTH) sonucu oluşur. Diğerisi ise hücrel bağışık yanıt ile sonlanan makrofaj aktivite edici yanıttır. Makrofajlar yeteri kadar aktive olamazsa, içindeki basilleri yok edemez ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu ile bu makrofajlar ortadan kaldırılmaya çalışılır. Böylece tekrarlayan GTH reaksiyonları ile doku hasarı olur. Lezyon genişleme eğilimindedir ve hızla çevre dokulara yayılır. Lezyonun merkezindeki makrofajlar aktive olursa, sağlam bir hücrel bağışık yanıt oluşacak ve aktive makrofajların birikmesi ile granümatöz lezyon (tüberkül) meydana gelecektir. Bu lezyonlar lenfositler, epitelioid hücreler ve dev hücreler gibi aktive makrofajlardan oluşur. Tüberkül daha sonra fibrozis ve kalsifikasyonla iyileşir. Ancak içinde her zaman canlı, fakat çoğalmayan tüberküloz basilleri bulunmaktadır. Akciğer parankiminde ve hiler lenf nodüllerindeki bu iyileşmiş ve kalsifiye olan lezyonlara "Ranke kompleksi" denir. Kazeöz materyel erir, kan damarları ve bronş duvarlarını istila eder, çok sayıda basil içeren erimiş yani likefaksiyona uğramış materyal ile kavite oluşur, bronşlara açılır. Kavite içinde tüberküloz basilleri daha fazla çoğalır, hava yollarına ve öksürük ve balgam ile çevreye yayılır. Kazeöz materyalin neden eridiği konusunda kesin bilgiler yoktur. Hücrel immünitede makrofajlar ve lenfositlerin yanı sıra NK ve çift negatif (CD4-CD8-) gama/delta T hücrelerin de önemli rolleri vardır (56-61)

Mycobacterium tuberculosis çeşitli protein antijenlere sahiptir. Bunların bir kısmı sitoplazmada ve hücre duvarında olup bir kısmı sekrete edilen antijenlerdir. Sekrete edilen antijenlerin T hücre yanıtını ortaya çıkarmada daha önemli olduğu bilinmekte olup, bu

antijenlerden 30 kDa (ya da antijen 85 B) ve ESAT-6 (Early Secretory Antigen Target) en önemlileridir (56-61).

İkiye bölünme süresi uzun olduğundan makrofaj içinde yavaş bir şekilde çoğalan *M. tuberculosis*, akciğerde vazodilatasyon, ödem, PMNL ve fibrinöz eksuda ile karakterize erken konak cevabına neden olur. Bazı lezyonlarda fibrinöz karakterde bir reaksiyon meydana gelirken, bazı lezyonlarda basil sayısının rölatif olarak daha fazla olduğu, PMNL'lerden zengin bir reaksiyon gelişir. Belli bir sayıya ulaşan basiller lenf yoluyla hiler lenf bezine gelip lenf bezini büyütür. Sonuçta parankim odağı (Ghon odağı), hiler lenfadenopati ve ikisi arasında lenfanjitten oluşan bir kompleks (primer kompleks, Ranke kompleksi) ortaya çıkar. Bireyde erken hematojen yayılım ile basiller akciğerlerin apeksine yerleşerek Simon odaklarını, beyin-meninkslere yerleşerek Rich odaklarını, büyük damarların intimasında ise Weigert odaklarını oluşturur. Ayrıca karaciğer, dalak, böbrek, böbreküstü bezleri, kemik ve seröz zarlara da yerleşebilir. Buralarda sessiz bir halde bulunan bakteriler yaşamın herhangi bir döneminde erişkin (reinfeksiyon) tipi tüberküloza neden olabilirler (13, 31).

Tüberküloz Hastalığının Tanısı

Tüberküloz, başta *M. tuberculosis* olmak üzere, *M. africanum*, *M. bovis* tarafından oluşturulan, kronik granülomatöz bir infeksiyon hastalığıdır. Olguların % 98'inden *M. tuberculosis* sorumludur. Tüm organlarda görülebilen TB hastalığında en sık tutulan organ % 85 oranıyla akciğerlerdir (61,62).

Tüberküloz tanısı klinik belirti ve bulgular, radyolojik görünüm, tüberkülin deri testi sonucunun değerlendirilmesi, klinik örneklerden hazırlanan preparatlarda mikobakteri görülmesi ve besiyerinde üretilmesiyle mümkün olmaktadır (63-65).

Mikrobiyolojik Tanı

Mycobacterium tuberculosis'in kültürde üretilmesi tanıda altın standarttır. Balgam incelemesi son derece önemli basit ve ucuz bir tekniktir. Balgam örnekleri üç gün üst üste sabahları alınmalıdır. İndüklenmiş balgam örnekleri de incelenebilmekle birlikte bronkoskopi ile alınan bronkoalveolar lavaj (BAL) en iyi materyeldir. Klinik örneklerde standart boyama yöntemi Erlich-Ziehl-Neelsen boyamadır. Mikroskopik inceleme ile akciğer tüberkülozu olgularının % 40-80'inde basil pozitifdir. Bir başka boyama yöntemi auromine rodamine boyamadır. Daha hızlı

ve daha duyarlı bir yöntemdir. Mikroskopik inceleme, yaygın hastalığı veya kaviteli lezyonu bulunanlarda daha başarılı sonuçlar verir. Duyarlılığı % 50-90'dır (29,66,67).

Mycobacterium tuberculosis kültürü klasik olarak yumurtalı ve agarlı katı besiyerlerine yapılır. Bunun için yumurta bazlı LJ besiyeri ve agar bazlı Middlebrook 7H10 / 7H11 gibi besiyerleri kullanılabilir. LJ besiyerinde *M. tuberculosis* 18-24 günde, Middlebrook 7H10/11'de 10-12 günde ürer. Üreme hızı, süresi, pigmentasyon özellikleri ve morfolojileri yanı sıra çeşitli biyokimyasal testler kullanılarak tür tanımlaması yapılabilir. Ayrıca hızlı kültür sistemleri geliştirilmiştir, bu sistemlerin esas sıvı besiyerleridir. Otomatize hızlı kültür yöntemlerinden “Mycobacterium growth indicator tbe” (MGIT) 960 sistemi, BACTEC 460 TB sistemi, BACTEC 9000 MB sistemi, MB / BACT Myco ESP 2 sistemi gibi sistemler sayılabilir. MGIT sisteminde radyoaktif madde kullanılmaması, tüm işlemlerin otomatik yapılması tiplendirme ve duyarlılık testlerinin yapılması avantajdır. BACTEC 460 TB sistemi Dünya Sağlık Örgütü ve NCCLS tarafından altın standart olarak kabul edilmiş yarı otomatize bir sistemdir. Bu yöntemlerle mikobakterilerin hızlı primer izolasyonu, *M. tuberculosis complex* ve tüberküloz dışı mikobakterilerin ayrımı ile mikobakterilerin antitüberküloz ilaçlara duyarlılıklarının saptanması gerçekleştirilmektedir. Radyoaktif materyel kullanımı, deneyimli eleman gereksinimi sistemin dezavantajlarıdır (29,67).

Örneklerin toplanması

Balgam: Pulmoner tüberkülozun tanısında, öksürükle çıkarılan veya indüklenmiş balgam en önemli örnektir. Sabah erken ilk balgam örneği, üç gün üst üste toplanmalıdır. Biriktirilmiş balgam örnekleri, yüksek kontaminasyon nedeniyle mikobakteriyel işlemler için kabul edilebilir değildir (49,68,69). Yayma pozitif örneklerin kültürde üremeleri yüksek olduğu için, akciğer tüberkülozunun ilk değerlendirmesinde, iki ARB yayma pozitif örnek yeterli kabul edilir (49,70).

Bronşiyal aspiratlar, bronkoalveolar lavaj örnekleri, ince iğne aspiratları ve akciğer biyopsi örnekleri: Balgam çıkaramayan bazı hastalarda, AC tüberkülozunu veya mikobakteriyozu tanımlamak için, bronkoskopi gibi invaziv toplama teknikleri gerekli olabilir. Bronkoskopi yapılan daha önceki hastalardan ARB ile çapraz kontaminasyonu önlemek için, bronkoskopların temizliğine özel özen göstermek zorunludur. Aynı zamanda, bronkoskopların çevresel mikobakterileri barındırabilen çeşme suları ile de temas

etmemeleri gerekir, ince iğne aspirasyonu ve açık AC biyopsisi gibi diğer invaziv teknikler, tanı konulamayan zor olgularda önerilebilir (13,30,70).

Gastrik lavaj sıvıları: Yutulmuş balgamin gastrik lavaj ile mideden aspirasyonu, infantlar, çocuklar veya düşkünler için gerekli olabilir. Uyku esnasında yutulan balgamı toplamak için, hastalardan aç karna sabah erken örnek alınmalı ve pH'sı nötrale getirilmiş 5-10 ml kadar örnek, üç gün üst üste toplanmalıdır. Eğer dört saat içinde işleme alınmayacaksa, laboratuvarlar örnek toplama için 100 mg sodyum karbonat içeren steril tek kullanımlık kaplar bulundurmalarıdır. Nötralize edilmeyen örnekler kabul edilmez, çünkü aside uzun süre maruz kalma mikobakteriler için zararlıdır (30,49,70).

İdrar: Sabah ilk orta akım idrar örneği, steril bir kap içinde üç gün üst üste toplanmalıdır. Sabah ilk örnek en iyi sonuçları verir, çünkü gece boyunca organizmalar mesanede birikirler. Kültür için genellikle minimum 40 ml idrar gereklidir. Yirmi dört saat biriktirilen veya miktarı az (daha fazla bir hacimde toplanamazsa) idrar örnekleri kabul edilmez. Eğer orta akım idrarı alınamıyorsa kateter kullanılmalıdır (30,49,70).

Vücut sıvıları: Aspirasyon ile veya cerrahi işlemler esnasında, olabildiğince çok miktarda vücut sıvısı (beyin omurilik, peritoneal, plevral, perikardiyal veya sinovyal sıvılar) aseptik koşullarda toplanmalıdır. Kanlı örneklerin, sodyum polianethol sulfonat gibi antikoagülanlar ile koagülasyonu önlenabilir. Belirli vücut sıvıları (beyin omurilik sıvısı, peritoneal diyaliz atık sıvısı gibi) çok az sayıda mikobakteri içerebildiklerinden, kültürde üremeyi ve mikobakterilerin saptanma şansını arttırmak için, gerektiğinden daha büyük hacimde örneklerin (>5 ml) laboratuvara teslim edilmesi önerilmektedir (30,49,70).

Dokular (lenf nodu, cilt ve diğer biyopsi materyali): Eğer mümkünse en az bir gram doku, steril bir kap içinde aseptik olarak toplanmalıdır. Tuzlu su veya diğer sıvılara batırılmamalı veya gazlı bez ile sarılmamalıdır. Kutanöz ülserler için, biyopsi materyali lezyonun perilerinden alınmalı ve hem 30°C'de ve hem de 37°C'de inkübe edilmelidir. Formalin içinde teslim edilen örnekler yayma ve kültür için kabul edilmez. İnce biyopsi materyali, az bir miktar steril tuzlu su ile nemlendirilebilir (30,49,70).

Apse içerikleri, irin aspiratı ve yara örnekleri: Aseptik koşullarda mümkün olduğu kadar çok materyal aspire edilmelidir. Kutanöz lezyonlarda, materyal lezyonun kenar bölgesinin altından aspire edilmelidir. Aynı zamanda bu tip örnekler için, optimal ısısı daha düşük olan organizmalardan biri (*M. huemophilum*, *M. marinum* veya *M. ulcerans*) enfeksiyon etkeni olabileceğinden, ikinci bir kültür seti 30°C’de inkübe edilmelidir (30,49,70).

Dışkı örnekleri: Dışkı örnekleri (>1 g), HIV’li hastaların gastrointestinal sisteminden *M. avium complex*’in saptanması için, diğer bölgelerden alınan örnekler ile birlikte kullanılmaktadır. Eskiden, eğer işlenmemiş dışkının direkt yayması ARB pozitif ise kültürünün yapılması önerilirdi. Bununla beraber, dışkı yaymasının duyarlılığı sadece %32-34 arasında olup, sonuçları mikobakteriler için kültür yapıp yapılmamasına karar verdirtmez. Bu yüzden yayma ile tarama yapılması, hastalarda yaygın *M. avium complex* enfeksiyonu gelişme riskini tespit eden etkili bir yol değildir (30,49,70).

Uygun olmayan örnekler: Mikobakteriler için uygun olmayan örneklerin işleme alınması, hem personel ve hem de ekonomik kaynakların kaybı demektir. Bir örneğin kabul edilmemesi için birçok neden vardır (klinisyen bilgilendirilmelidir), örnek çok az bir miktarda teslim edilmişse, tükürükten oluşan örnekler, kurumuş silgeçler (biyopsi örnekleri tercih edilir), biriktirilmiş balgam veya idrar, örnek kapları kırılmış olanlar, örnek toplama ile işleme alınması arasındaki süre çok fazla ise (>7 gün) örnek kabul edilmemelidir. Klinik çalışanları, kabul edilemez örneklerin gönderilmesinin önlenmesi için doğru olarak eğitilmelidirler (30,49,70).

Tüberküloz Tanısında Kültüre Dayalı Yöntemler

Kültür yöntemleri geç sonuç vermesine rağmen, tür düzeyinde idendifikasyon işlemleri için gerekli izolatların elde edilebilmesine, bakterilerin canlılıklarının doğrudan gösterilebilmesine, ilaç duyarlılık testlerinin yapılarak hastaların doğru tedavi edilebilmesine, çoğaltılan izolatların daha sonraki araştırmacılar için saklanabilmesine ve epidemiyolojik verilerin elde edilebilmesine imkan sağlamaları açısından TB tanısında halen altın standart olmaya devam etmektedir (29,31,71). Mikobakteri kültür yöntemlerini klasik katı besiyerleri ve hızlı kültür sistemleri olarak ikiye ayırmak mümkündür.

Klasik katı besiyerleri

Katı besiyerlerinde kültür işlemleri zahmetlidir. Koloniler gözle görülebilir hale gelinceye kadar birkaç hafta geçmekte, kesin identifikasyon için ayrıca subkültür işlemleri gerekmektedir. Katı besiyerleri yumurta ve agar bazlı besiyerleri olmak üzere ikiye ayrılır:

a) Yumurta bazlı besiyerleri: Löwenstein-Jensen, Petragnani, American Trudeau Society (ATS)'dir. En yaygın kullanılanı LJ besiyeridir. Kolonilerin görünür hale gelişi 18-24 günü bulmaktadır. Ucuz ve güvenilir yöntemlerdir.

b) Agar bazlı besiyerleri: Middlebrook 7H10 ve 7H11 agar en çok tercih edilenleridir. Besiyerleri şeffaf olduğundan ekim yapıldıktan 10-12 gün sonra mikrokoloniler görülebilir. Ancak pahalı ve raf ömrü nispeten kısa besiyerleridir (29,70,71)..

Hızlı kültür sistemleri

Bu yöntemlerin esasını sıvı besiyerleri oluşturur (TK kültür sistemi haric). Sıvı kültürler ile mikobakterilerin saptanması daha kısa sürede ve daha yüksek duyarlılıkta olmaktadır. İçlerinde MB 7H9 ve Dubos Tween albumin sıvıları yer alır. Hızlı kültür sistemleri cihaz ve bilgisayar ile değerlendirilip değerlendirilmemesine göre manuel, yarı otomatize veya tam otomatize sistemler olarak gruplandırılmaktadır (29,70,71).

a) Otomatize hızlı kültür yöntemleri

MGIT 960 (Mycobacterium Growth Indicator Tube) (BD Biosciences, MD, ABD)

BACTEC 9000 MB (BD Biosciences)

MB/BacT ALERT , BacT / ALERT 3D , BacT / VIEW (bioMerieux)

MycoESP II (Extra Sensing Power) **Sistemi** (Trek Diagnostics Inc., Ohio, ABD)

TK Kültür Sistemi (Salubris A.Ş., İstanbul): TK Medium, TK SLC (selektif), TK PNB, TK İNHRİF-STR-EMB, MYCOLOR TK (29,70,71).

b) Yarı otomatize hızlı kültür sistemi:

BACTEC 460 TB Sistemi (BD Biosciences): Middlebrook 7H12 (BACTEC 12B) veya Middlebrook 7H13 (BACTEC 13A) sıvı besiyerleri ile karbon kaynağı olarak C işaretli palmitik asit içeren radyometrik bir sistemdir. Dünya Sağlık Örgütü ve Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından altın standart kabul edilen sistem ülkemizde halen en çok kullanılan otomatize kültür sistemidir (29,70,71).

c) Manuel hızlı kültür sistemleri:

MB Redoks (Biotest Diagnostics Corp., NJ,A.B.D) : Modifiye Kirchner besiyeri içerir.

SeptiChek AFB (BD Biosciences) : Sıvı (MB 7H9) ve üç tip katı (LJ, MB 7H11, çukulatamsı agar) besiyerini birlikte içeren bifazik bir sistemdir. Ülkemizde bu sistemi kullanan merkez yoktur.

MGIT: Modifiye MB 7H9 sıvı besiyeri içeren ve cihazsız olarak mikobakterilerin üretilmesine dayalı bir yöntemdir. Wood lambası veya transilluminatör dışında başka özel ekipmana gerek yoktur (29,70,71).

Kültür işlemleri sonucunda izole edilen mikobakterilerin tür düzeyine kadar tanımlanabilmesi, halk sağlığı ve hastaların doğru antimikobakteriyel tedavileri için gerekli olup, klasik olarak koloni morfolojilerine ve çeşitli biyokimyasal özelliklerine göre yapılabildiği gibi, son yıllarda türe özgü geliştirilmiş problarla moleküler yöntemler kullanılarak da yapılabilmektedir. Mikobakteriler öncelikle üreme süreleri, üreme ısıları, besiyeri üzerinde oluşturdıkları koloni morfolojisi ve pigment özelliklerine göre gruplandırılıp ve uygun olan biyokimyasal testler saptanarak işleme alınmaktadır (29).

Mikobakterilerin Tanımlanmasında Kullanılan Biyokimyasal Testler

Katalaz testi, arilsülfataz testi, kristal viyolesiz Mc Conkey agarda üreme, demir alımı, niasin birikimi, nitrat indirgenmesi, pirazinamidaz testi, sodyum klorid tolerans testi, tiyofen-2-karboksilik asit hidrazid ile inhibisyon, tellürit indirgenmesi, Tween 80 Hidrolizi, üreaz aktivitesi mikobakterilerin tanımlanmasında kullanılan biyokimyasal testlerdendir. Mikobakterilerin üreme özelliklerinin belirlenmesi ve geleneksel biyokimyasal yöntemlerle tanımlanması yaklaşık üç-altı hafta, hatta bazen daha uzun sürebilmektedir. Günümüzde *Mycobacterium tuberculosis*'in tanımlanmasında artık kullanılmamaktadırlar (49,67,72). Tablo II'de *M. tuberculosis* ve *M. bovis* ayırımında kullanılan bazı özellikler gösterilmiştir.

Hastalıkları Kontrol ve Önleme Komitesi (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) 1993 yılında, mikobakterilerin mümkün olabilecek en kısa sürede tanımlanmasını öngörmüştür ve amaçladığı hedef laboratuvarların nükleik asit problemleri, NAP (p-nitro-asetilamino-hidroksi propiyofenon) testi ve high performance liquid chromatography (HPLC) gibi standardize edilmiş hızlı tanımlama yöntemlerinden birini uygulayarak 21 gün içerisinde klinik örnekte üreyen mikobakterileri tanımlanabilmesidir. BACTEC TB 460 sisteminde kullanılan bir yöntem olan BACTEC NAP testi ile mikobakterilerin, *M. tuberculosis complex* ve *Mycobacterium Other Than M. tuberculosis complex* (MOTT) olarak 3-5 gün içinde ayrımı yapılabilmektedir. Kloramfenikol sentezinde bir ara ürün olan NAP,

MOTT grubundaki mikobakterilerin gelişmesini etkilemez veya çok az etkilerken, *M. tuberculosis complex* grubundaki mikobakterilerin üremesini seçici olarak inhibe eder. High-performance liquid chromatography, mikobakterilerin hücre duvarında bulunan mikolik asit esterlerinin kromatografik yöntemle belirlenmesine dayanan hızlı ve tekrarlanabilir bir yöntemdir. Gas Liquid Chromatography (GLC) ise yine mikobakterilerin hücre duvarında bulunan kısa zincirli yağ asitlerinin gaz kromatografisi ile belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Her iki yöntem de teknik açıdan kompleks olup, pahalı ekipman ve yüksek maliyet gerektirdiğinden yalnızca referans laboratuvarlarının kullanımı için önerilmektedir. Günümüzde mikobakterilerin hızlı tanısında kullanılan moleküler yöntemlerle, direkt olarak klinik örnekten veya kültürden izole edilen mikobakteriler tür düzeyinde tanımlanabilmektedir (29,67,73).

Tablo II. *Mycobacterium tuberculosis* ve *Mycobacterium bovis* ayırımında kullanılan testler (13)

	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
37°C’de koloni oluşturma süresi (gün)	12-28	21-40
31°C’de koloni oluşturma süresi (gün)	21-35	–
Koloni tipi	R	Rt
Niasin	+	–
Nitrat	+	–
Pirazinamidaz	+	–
Nikotinamidaz	+	–
TZH duyarlılığı	–	+

Rt: İnce veya şeffaf-opak TZH: tiophene-2-carboxylic acid hydrazide

NAP (p-nitro-alfa-acetilamino-β-hidroxypropiophenone) testi: *Mycobacterium tuberculosis*’in üremesini engelleyerek atipik mikobakterilerden ayırımını sağlar. Tiofenin-2-karboksilat hidrazid (TCH) ise sadece *M. bovis*’in üremesini engeller ve *M. tuberculosis*’den ayırımını sağlar. Üreme indeksi (Growth Index=GI) 50-100 aralığına geldiğinde ARB pozitif ise NAP testi yapılır. NAP (p-nitro-α-acetylamino-β-hydroxypropiophenone) kloramfenikol

sentezinde ara bileşik olan bir antimikobakteriyel ajandır. *Mycobacterium tuberculosis complex*'in üremesini selektif olarak inhibe eder. Diğer mikobakteri türleri NAP ile inhibe olmaz veya kısmen inhibe olabilir. BACTEC 12B şişesinden 1 ml alınarak NAP şişesine aktarıldıktan sonra 37°C'de bekletilip, haftada iki-altı gün okutulur. İnokülasyondan sonra GI değerinde birbirini izleyen iki önemli azalma *M. tuberculosis complex*, GI değerinde ilk iki günde önemsiz bir artış, sonra bir azalma ve değişmezlik MOTT lehinedir ve MOTT'da günlük GI değerleri dört gün içinde 400'ün üzerine çıkar. İnokülasyondan sonra ilk bir ile üç günde hafif bir azalma veya değişmeme, ardından ikinci günden itibaren, birbirini izleyen iki günde önemli bir artış görülür (49,67,72).

Nükleik asit prob hibridizasyon yöntemleri 1987 yılında kullanılmaya başlanmıştır ve örnekteki hedef nükleik asit dizisi, komplementeri olan işaretli bir prob ile hibritlenmekte ve böylece tanı konmaktadır. Sıvı veya katı besiyerlerinde üreyen mikobakterilerden yaklaşık iki saat gibi bir sürede sonuç alınabilmekte olup bu yöntem geleneksel biyokimyasal yöntemlere bir alternatif oluşturmaktadır. Nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinde ise, hedef DNA (Deoksiribonükleik asit) enzimlerle çoğaltılır, ortaya çıkan ampikon nükleik asit problemleri ile tespit edilir ve sonrasında agaroz jelde yürütülen ampikonların boyanarak gösterilmesi ile tanıya gidilir. Bu yöntemlerden sıklıkla kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), nükleik asitlerin in vitro şartlarda replikasyonu için geliştirilmiş bir test tüp sistemidir. Bu yöntem hedef DNA'nın secici olarak amplifikasyonuna ve birkaç saatte elde edilen bir milyondan fazla DNA sekansının agaroz jelde belirlenmesi esasına dayanır. Böylece klinik örneklerde bulunabilecek etkenin kısa sürede gösterilmesi, tanımlanması, moleküler olarak tiplendirilmesi ve hatta ilaç direncinin saptanabilmesi ile tüberkülozun erken tanı ve tedavisinde büyük kolaylık sağlamaktadır. Son yıllarda çeşitli moleküler parmak izi (fingerprinting) metodları da geliştirilmiştir. Daha çok epidemiyolojik çalışmalarda kullanılan bu yöntem, kromozomal DNA'nın Restriction fragment length polimorfizm (RFLP) analizi ile tanımlanması olarak ifade edilmektedir (67,73).

Tanıda Moleküler Testler

Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile mikobakteri nükleik asitlerinin çoğaltılmasını temel alan çeşitli sistemler geliştirilmiştir. En çok kullanılan hedef bölge tüm *M. tuberculosis complex*'te bulunan IS6110 DNA dizisi veya rRNA'nın çoğaltılmasıdır. Polimeraz zincir reaksiyonu bazlı teknolojilerin esas kullanım amacı ilaç dirençli TB ve ÇİD-TB bakterilerinin

hızlı tanınmasıdır. Polimeraz zincir reaksiyonu ile *rpoB* (RNA polimerase B) geninde saptanan mutasyonlar RIF direncini gösterdiğinden ve RIF dirençli izolatların büyük bölümü INH'e de dirençli olduğundan; RIF direncinin belirlenmesi ÇİD TB olgularının erken saptanmasını sağlar. Bu amaçla fenotipik ve genotipik olarak RIF direncinin belirlenmesi için pek çok teknik geliştirilmektedir (29,67). Birçok çalışmada farklı yöntemlerle RIF direncinin erken saptanabileceği ve RIF dirençli kökenlerde bu dirence neden olan mutasyonların her ülke için farklı olabileceği gösterilmiştir (66,74). Bazı çalışmalarda kültür pozitifliği altın standart olarak alındığında, PZR için yüksek sensitivite ve spesifite bildirilmekle birlikte; laboratuvarların % 70'inin örneklerde ancak 10^5 *M. tuberculosis* bulunduğunda pozitif sonuç verebildiği ve % 22'sinin negatif kontrol örneklerinde bakteri identifikasyonu yaptığı da bildirilmektedir. Polimeraz Zincir Reaksiyonu bazlı teknikler özellikle *M. tuberculosis*'i diğer mikobakterilerden ayırmada ve yayma negatif akciğer olgularında etkeni saptamada kullanılmaktadır. Akciğer dışı tüberküloz olgularında da kullanılmakla birlikte henüz standardizasyon sorunu vardır. Bakteri DNA'sını saptayan PZR ile ilgili bir başka sorun da balgamdaki PZR pozitifliğinin tedavi esnasında ve klinik kürden sonra da devam etmesidir. Bu sistemler birkaç saat gibi kısa sürede tüberküloz tanısını koymaya yardımcı olurken, yüksek maliyet, düşük duyarlılık ve yalancı pozitiflikler nedeni ile rutin uygulamaları kısıtlıdır (75,76).

Serolojik Tanı

Çoğu laboratuvarlarda rutin olarak kullanılmamaktadır. Çeşitli mikobakteriyel proteinler kullanılarak antikorların aranmasına yönelik Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) testleri geliştirilmiştir. Örneğin; 16 kDa hsp, 30 kDa antijen, 38 kDa antijen ve Antijen 85, Antijen A60 gibi. Antikor testinin duyarlılığı yeteri kadar yüksek değildir. Ayrıca infeksiyon bölgesindeki antikorların saptanmasına yönelik lokal testlerin yararı kanıtlanmamıştır. Kültür negatif bireylerde antikor düzeyleri düşüktür, antikor seviyelerindeki değişimler de tedaviye klinik yanıt izlemede yararlı değildir. Dünya Sağlık Örgütü, serolojik testlerin kültürün yerini alabilmesi için, duyarlılığının % 80, özgüllüğünün % 95'in üzerinde olması gerektiğini bildirmektedir.(13,67,77).

Hasta örneklerinde ELISA yöntemi ile antijen aranması da tanıda kullanılan serolojik testlerdendir. Örneğin balgamda ELISA ile, BOS'da ise hem ELISA hemde latex aglütinasyon tekniği ile TB antijenleri aranabilmektedir (77).

Henüz fazla deneyim olmamasına karşın, son zamanlarda geliştirilen, ticari olarak temin edilebilen tam kan gama interferon testleri, tüberküloz infeksiyonu için, özellikle eğer cilt testleri belirsiz ise, mevcut tanısal doğruluğun seviyesini geliştirmek için umut verici adaylardır. Latent *M. tuberculosis* infeksiyonunun tanısında QuantiFERON-TB testinin kullanımı için ana esaslar mevcuttur. Ferrara ve ark., QuantiFERON-TB Gold testinin, seçilmiş popülasyon için kullanıldığında, tüberkülin cilt testinden daha fazla özgüllüğe sahip olduğunu göstermişlerdir. QuantiFERON-TB Gold testi, aşılama için kullanılan BCG'den yaygın cilt testlerine göre daha az etkilenir, NTM'ye bağlı yanıtları ayırt edebilir ve değişkenliğe ve tüberkülin cilt testinin okunması ve yeri ile ilgili subjektiviteye daha az eğilimlidir. Diğer yaklaşım, *M. tuberculosis* ESAT-6 ve CFP-10 antijenlerinin örtüşmesi temeline dayanmaktadır ve benzer olarak, yakında maruz kalınmış *M. tuberculosis* infeksiyonu için gama interferon saptanmasında bir in-vitro enzyme-linked immunospot testi içinde kullanıldığında, PPD deri testine göre yüksek bir özgüllük sağladığı bildirilmiştir (30).

Tanıda Klinik Yaklaşım

Tüberkülozun kesin tanısı, hasta çıkartıları ve dokuda TB basilinin gösterilmesi ile konur. Ancak klinik olarak anormal solunum semptomları ile gelen bir hastada tüberkülozdan kuşkulanan tanı için önemlidir. Herhangi bir immün baskılanma olmaksızın solunum semptomları ile gelen ve öyküsü uygun kişilerde, akciğer grafisinde tipik kaviter üst lop lezyonlarında şiddetle tüberkülozdan kuşkulandırılmalı ve çeşitli örneklerde TB basili aranmalıdır. Ayrıca gerekli hallerde ultrason, bilgisayarlı tomografi veya magnetik rezonans incelemeleri de yapılabilir. Karaciğer biyopsisi ve kemik iliği aspirasyonu hastalık tanısında incelenmesi gereken örneklerdendir Hastanın bilinç durumunu bozulması durumunda TB menejiti de akılda bulundurulmalıdır (75,78).

PPD (Purified protein derivative) Cilt Testi

Mycobacterium tuberculosis ile infeksiyonun taramasında sık kullanılan bir testtir. Duyarlılık ve özgüllüğü düşük olduğu için aktif hastalık tanısındaki yeri sınırlıdır. İmmün baskılanmış kişilerde ve ağır tüberküloz olgularında % 25 yalancı negatif sonuçlar elde edilir. Pozitif reaksiyonlar *M. tuberculosis* ile karşılaşmış olduğunu ya da BCG aşısı yapılmış olduğunu

gösterir. BCG aşısı yapılmamış kişilerde veya tüberküloz prevalansının düşük olduğu bölgelerde, PPD pozitifliği tanıyı destekleyebilir (13,77).

Radyolojik Tanı

Akciğer grafisi de tanıyı destekleyebilir ancak kesin değildir yalnız PA (posterior-anterior) grafilerde kaviter gözden kaçabilir. Bilgisayarlı tomografi genellikle gerekmez ancak özellikle olası milier veya kaviter hastalığı değerlendirmede yararlıdır. Magnetik rezonans daha çok spinal ve yumuşak doku tutulumu olan hastalarda yararlıdır (13,67,77).

Latent Tüberküloz Enfeksiyonu Tanısı:

Tüberküloz ile infekte kişilerin % 90'ında aktif hastalık gelişmez, ancak bu kişilerin sağaltımı gelecekte reaktivasyon riskini düşürebilir. Yeniden gözden geçirilen CDC önerilerine göre; hastane ve hapishaneler gibi yüksek riskli bölgelerde çalışanların taraması hariç, PPD pozitifliğinin tedavi edilmesi önerilmektedir. Purified Protein Derivative testi genelde immünosupresyon, ek riskler nedeni ile reaktivasyon riski olan ve artmış enfeksiyon riski olan kişilere yapılmalıdır. Latent tüberküloz tanısı için PPD yanı sıra Quantiferon-TB ve ELISPOT (Enzyme-linked immunosorbent spot) gibi testler bulunmaktadır (77).

Ayırıcı Tanı

Akciğer tüberkülozu için, en önemli ayırıcı tanı akciğer tümörleri ile yapılmalıdır. Ayrıca bu iki hastalık aynı anda da olabilir, o takdirde antitüberküloz sağaltıma karşın radyolojik bulgulara gerilememe; diğer tanısal girişimlerin yapılması için zemin hazırlamaktadır. Bakteriyel akciğer apseleri, diğer granülomatöz enfeksiyonlar klinik ve radyolojik olarak tüberküloza benzer. Histoplazmoz, koksidioidomikoz, blastomikoz, kriptokokoz ve diğer mikobakteriler de tüberkülozu taklit edebilir (31,67,77).

Tedavi

Tüberküloz tedavisine yaklaşım: *Mycobacterium tuberculosis*'te direnç spontan kromozomal mutasyonlar ile oluştuğu için tedavide tek ilaç değil, mutlaka birkaç ilaç birlikte kullanılmalıdır (79).

Tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlar birinci seçenek (primer, majör) ve ikinci seçenek (sekonder, minör) olarak iki grup altında incelenebilir.

Birinci seçenek ilaçlar; INH, RIF, PZA, SM ve EMB'den oluşmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde kullanılan thioasetazone'da bu grup içinde değerlendirilebilir. Bu ilaçların, EMB ve thioasetazone dışında, bakterisidal etki gösterdikleri kabul edilmektedir. Ancak diğer antimikrobiyal ajanlarda olduğu gibi bu ilaçları bakteriyostatik ve bakterisidal olarak sınıflamak pek uygun görülmemektedir. Çünkü alınan dozlara, birlikte kullanılan diğer ilaçlara ve in vivo etkinliğe bağlı olarak bakteriyostatik ve bakterisidal etkinliklerin değişikliğe uğrayabildiği farklı klinik çalışmalarla gösterilmiştir. Sözü edilen bu ilaçların toksisiteleri çok azdır ve kombine şekilde kullanıldıklarında oldukça etkililerdir. Basiller duyarlı olduğu sürece tüberküloz tedavisi bu ilaçlardan oluşan tedavi rejimleri ile yapılmalıdır. Tüberküloz tedavisinde kullanılan birinci seçenek antitüberküloz ilaç dozları ve tedavi süreleri Tablo III'de gösterilmiştir (79-82).

İkinci seçenek ilaçlar; kapreomisin, kanamisin, etionamid, para-aminosalisilik asit, ofloksasin, siproflaksasin ve sikloserin'den oluşmaktadır. Bu grup ilaçlar, birinci seçeneklere göre daha az etkili, daha çok toksik ve daha az tolere edilebilen ilaçlardır. Genellikle birinci seçenek ilaçlara karşı direnç geliştiği ya da toksik etki meydana geldiği durumlarda kullanılırlar. Yeni geliştirilen ve etkinlikleri henüz geniş klinik çalışmalarda incelenmemiş olan deneme aşamasındaki ilaçlar (kinolonlar, amikasin, rifabutin, klofazimin ve beta laktam beta laktamaz inhibitör kombinasyonları) da bu grup içinde değerlendirilebilir (79-82).

Dünya Sağlık Örgütü tedavide DGTS önermektedir. Başlangıç fazı bakterisidal faz olup genellikle dördü antitüberküloz ilaçlar kullanılır. Bunlar INH, RIF, PZA ve SM veya EMB olup 2 ay süre ile verilmelidir. Daha sonra idame fazına geçilir. 4 ay süre ile INH ve RIF verilir (77,79).

Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı'nın, Türkiye'de Tüberküloz Kontrolü İçin Başvuru Kitabı'nda yer alan ve ülkemizde TB tedavisi yapan tüm merkezlerde uygulanması önerilen tedavi şeması Tablo IV'de gösterilmiştir (83).

Tablo III. Tüberküloz tedavisinde kullanılan birinci seçenek ilaçlar ve tedavi süreleri (77)

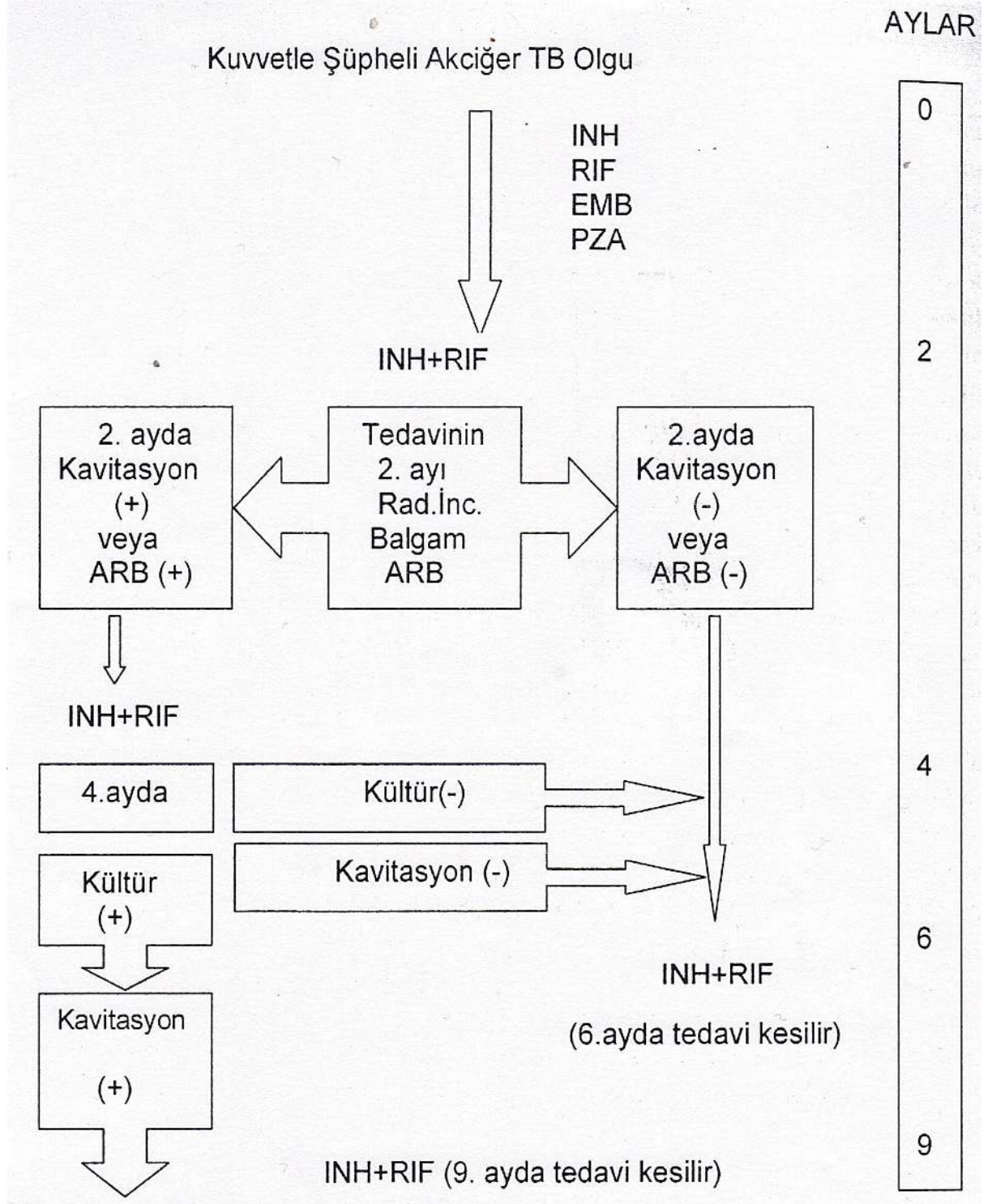
İlaç	Aktivite	Toksisite	Doz	Süre
İzoniazid	Bakterisidal	Hepatik, nörotoksik	5 mg/kg/gün, max 300 mg	6 ay
Rifampisin	Bakterisidal	Hepatotoksik	10 mg/kg/gün, max 600 mg	6 ay
Pirazinamid	Bakterisidal	Ürik asit, döküntü	15-35 mg/kg/gün, max 2 gr	2 ay
Etambutol	Bakteriyostatik	Nöropati, optik nörit	15-25 mg/kg/gün, max 2,5 g	2 ay
Streptomisin	Bakterisidal	Nefrotoksik, ototoksik	15 mg/kg/gün, max 1 gr	2 ay

Tablo IV. Tedavi şeması (83,84)

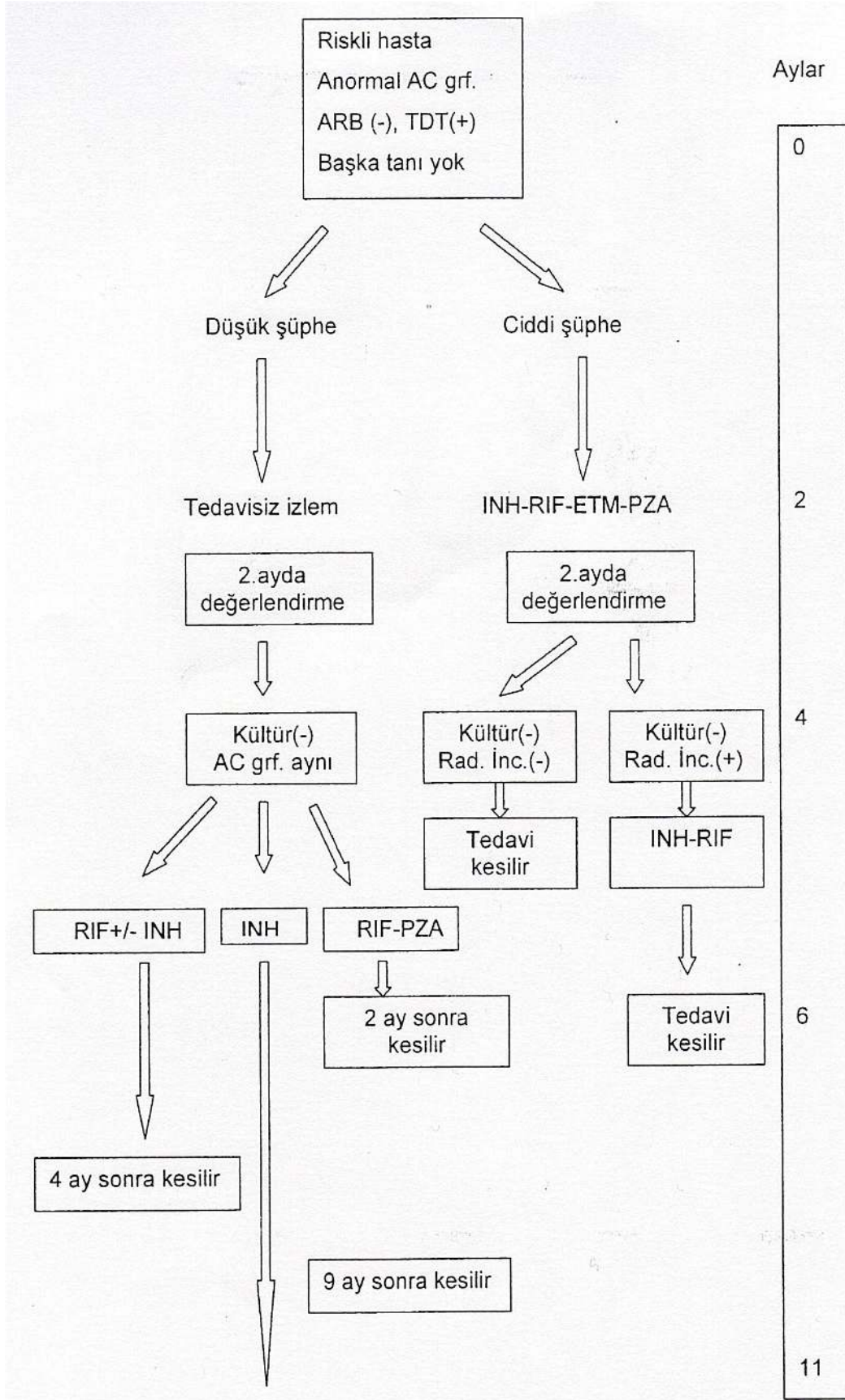
OLGU TANIMI	BAŞLANGIÇ DÖNEMİ	İDAME DÖNEMİ
Yeni olgu	2 ay HRZE ya da HRZS	4 ay HR
Çocuk TB	2 ay HRZ	4 ay HR
Menenjit, miliyer, kemik-eklem TB	2 ay HRZE ya da HRZS	7-10 ay HR
Tedaviyi terkten dönen olgu Nüks olgu	2 ay HRZES 1 ay HRZE	5 ay HRE
Tedavi başarısızlığı Kronik olgu	Uzmanlaşmış merkezlerde ikinci grup ilaçlarla tedavi	

TB: Tüberküloz, H: İzoniazid, R: Rifampisin, Z: Pirazinamid, E: Etambutol, S: Streptomisin

Tüberküloz hastaları tedavileri süresince her ay gerek klinik gerekse bakteriyolojik yönden kontrol edilmelidir. Her kontrolde hastanın balgam incelemesi yapılmalı, gerekirse akciğer filmi çekilmelidir. İkinci ay sonunda balgam incelemesi hala pozitif olan olgularda başlangıç tedavisi bir ay daha uzatılır. Üçüncü ay sonunda balgam yayması negatif olursa idame tedavisine geçilir, pozitif ise antibiyotik duyarlılık testi için laboratuara gönderilir ve aynı ilaçlarla tedavi sürdürülür. Akciğer tüberkülozunda tedavi akış şeması Şekil 3’de, kültür negatif ve inaktif TB tedavi akış şeması Şekil 4’de gösterilmiştir (77,79).



Şekil 3. Akciğer tüberkülozunda tedavi akış şeması (77)



Şekil 4. Kültür negatif ve inaktif tüberküloz tedavi akış şeması (77)

***Mycobacterium tuberculosis*'de İlaç Direnci**

İzoniazid, PZA ve EMB sadece *Mycobacterium tuberculosis complex*'e ve bazı mikobakterilere etkili olmakla birlikte, SM, RIF ve florokinolon grubu antibiyotikler geniş spektrumludur ve diğer bakterilere benzer direnç mekanizmalarına sahiptir. *Mycobacterium tuberculosis complex*'de plazmidlere bağlı antitüberküloz ilaç direnci tanımlanmamış olup, bu konuda bakteriler arası genetik bilgi aktarımı söz konusu değildir. Direnç spontan kromozomal mutasyonlara bağlı olarak gelişmektedir. Yetersiz veya düzensiz antitüberküloz ilaç kullanımı, ilaca duyarlı bakterilerin ölmesine ve canlı kalan mutasyona uğramış dirençli bakterilerin seçilip, çoğalmasına neden olmaktadır. Spontan direnç gelişim sıklığı INH ve EMB için 10^{-6} , RIF için 10^{-8} ve SM için 10^{-5} olarak belirlenmiştir (85,86)

Antitüberküloz İlaçlar

İzoniazid: Sadece *Mycobacterium tuberculosis complex* ve bazı mikobakteriler üzerine etki etmesi ile dar spektrumlu antitüberküloz ilaçtır. Piridin halkası ve hidrazid grubu içeren basit bir yapıya sahiptir. Katalaz peroksidaz, pigment prekürsörleri, nikotinamid adenin dinükleotid ve peroksidazları içeren mekanizmalarla ilaç TB basilinin içine alınır. Peroksidazın etkisi ile izoniazid hidrazin ve izonikotinik aside dönüşür, izonikotinik asid nikotinik asidin anti-metaboliti olarak etki yapar ve bu reaksiyondaki koenzim A sentezini bozar. Hidrojen peroksit yıkılamaz ve hücrede toksik özellikteki bu maddenin yüksek düzeyde birikimine bağlı olarak hücre ölür. Ayrıca başka bir mekanizma ile mikolik asid sentezinin inhibisyonuna neden olur (87).

İzoniazide karşı en önemli direnç katalaz-peroksidaz eksikliğine bağlı gözlenmektedir. Katalaz-peroksidaz enzimleri gerek INH'ın basil içine alınmasından, gerek ise aktif metabolite dönüşümünden sorumlu olduğu için *katG* geninde oluşan bazı mutasyonlar katalaz ve peroksidaz aktivitelerinin kaybına neden olur. Ayrıca *inhA*, *kasA*, *mabA* ve *ahpC* gibi gen bölgesi mutasyonlarında da göreceli olarak INH'a karşı direnç gelişiminde rol oynamaktadır (88).

KatG geninin değişik bölgelerinde gelişen mutasyon değişen derecelerde enzim eksikliğine, dolayısı ile değişik oranlarda INH direnci gelişmesine neden olmaktadır. Yüksek düzey INH direnci [MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu) >50ng/ml] olan *Mycobacterium tuberculosis complex* izolatlarında katalaz-peroksidaz aktivitesinde rol oynayan *katG* geninde *missense* mutasyonlar, küçük delesyonlar ve insersiyonlar saptanmaktadır.

İzoniazide dirençli kökenlerde *katG* geninde en sık 315. kodonda Ser315Thr mutasyonu gözlenmektedir. Nadir görülen ancak dirence neden olduğu düşünülen diğer mutasyonlar Asp63Glu, His108Gln, Thr262Arg, Ala350Ser ve Gly628Ser'dir. Birçok katalaz negatif izolatta *ahpC* bölgesinin promoter bölgesinde mutasyon saptanmaktadır. *AhpC* genindeki mutasyonların INH tedavisi sırasında seçilen ve katalaz-peroksidaz aktivitesi azalmış kökenlerde daha sonra kompensatuvar rol oynadığı ortaya çıktığı anlaşılmıştır (89).

Enoil redüktaz mikolik asit sentezinde rol oynayan bir enzimdir. *Mycobacterium tuberculosis complex*'de aktive olan INH, *inhA* geni tarafından kodlanan enoil redüktaz enzimine bağlanarak redüktaz aktivitesi önler ve mikolik asid yapımını önler. Bitişik "open reading frame"lerden oluşan iki genlik *mabA-inhA* operonun kodladığı ürünler hem INH hem de etionamid direncine yol açmaktadır. *mabA* proteininin 3-ketoasıl-ACP redüktaz, *inhA* proteininin enoil-ACP redüktaz enzimlerini kodladığı düşünülmektedir. *InhA* proteininin NADH bağlayan bölgesinde oluşan amino asit değişiklikleri mikolik asit biyosentezinin inhibisyonunu önleyerek INH direncine yol açmaktadır. İzoniazide dirençli kökenlerde *mabA* geninde herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. İzoniazide dirençli izolatların % 10-15'inde *inhA* ve *katG* geninde mutasyon saptanamamaktadır (90).

Mikolik asit sentezinde rol oynayan diğer bir enzim β -ketoasıl ACP sentetaz olup, bu enzimi kodlayan *kasA* geni INH için hedef olduğu yeni anlaşılmış bir gen bölgesidir. İzoniazide dirençli kökenlerin yanı sıra INH'a duyarlı kökenlerde de *kasA* mutasyonları saptanmaktadır. İzoniazide dirençli kökenlerde *kasA* mutasyonunun yanında çoğu kez *katG* ve *inhA* mutasyonları da bulunmaktadır (91).

Sonuç olarak çok sayıda farklı gen INH direnci ile ilişkilidir. Bütün bu bilinenlere karşın bir kısım INH'a dirençli kökende direncin mekanizması henüz tam olarak aydınlanamamıştır (92).

Rifampisin: *Streptomyces mediterranei*'den elde edilen rifampisin B'nin semisentetik bir derivativesidir. Bakterinin DNA'ya bağımlı RNA (Ribonükleik asit) polimerazın potent inhibitörüdür. Rifampisin RNA polimerazı *rpoB* geni tarafından kodlanan β alt ünitesine bağlanarak inhibe eder. *Mycobacterium tuberculosis complex*'de sıklıkla RIF direnci ile birlikte INH direnci de gözlenir. Rifampisine dirençli MTBC kökenlerinin %95'inden fazlasında RNA polimeraz enziminin β -alt ünitesini kodlayan *rpoB* genin 507-533. kodonları arasındaki 81 baz çifti uzunluğundaki RIF *resistance determining region* (RRDR) veya *hot spot*

adı verilen bölgede *missense* mutasyonların, küçük delesyon veya insersiyonların olduğu gösterilmiştir. Yapılan çok sayıda çalışmada RIF'e dirençli kökenlerin yaklaşık % 34-57'sinde *rpoB* geninin 531. kodonunda Ser531Leu mutasyonu saptanmıştır. Bunu 526. kodondaki mutasyonlar izlemektedir (87-91).

Pirazinamid: Pirazinamid nikotinamidle yapısal benzerlik gösteren sentetik bir antitüberküloz ilaçtır. Mikobakterilerin pirazinamide duyarlılığı spesifik amidazın varlığına bağlıdır. Çünkü, PZA hücre içi bir nikotinamidaz yardımı ile pirazinoik aside dönüşerek etkin hale dönüşür. Makrofaj fagolizozomlarında pH 5,5'de aktif hale geçer. Pirazinamide karşı direnç kolay gelişir, ancak diğer ilaçlarla çapraz direnç gelişimi söz konusu değildir. Direnç gelişiminde nikotinamidaz aktivitesindeki azalma sorumlu tutulmaktadır. Pirazinamide dirençli kökenlerin % 72-94'ünde pirazinamidaz enzimini kodlayan *pncA* geninde çeşitli tipte mutasyonların olduğu bilinmektedir. Mutasyonlarının çok fazla değişkenlik göstermesi ve gen boyunca dağılmış olması *pncA* dışındaki direnç genlerinde görülmeyen bir durumdur. Buna karşın *pncA* geninin üç bölgesinde mutasyonlar (3-17, 61-85 ve 132-142. kodonlar arasında) belli bir kümeleşme göstermektedir. Bu bölgede *missense* mutasyonların yanı sıra delesyon, insersiyon ve terminasyon mutasyonlarının da olabileceği bilinmektedir (87-91).

Etambutol: Kimyasal yapısı dietilendiamin hidroklorürün dekstro şeklidir. Etambutol arabinozil transferaz enzimini inhibe ederek arabinogalakattan ve lipoarabinomannanın hücre duvarına taşınmasını engellemektedir. Arabinozil transferaz enzimini kodlayan üç gen *embC*, *embA* ve *embB* genleri 10 kbp'lik bir operon (*embCAB*) oluşturacak şekilde organize olmuştur. *EmbCAB*'ın sekonder yapısal analizi ile bu proteinin 12 adet transmembran domaini içeren bir integral transmembran proteini olduğu gösterilmiştir. *EmbB* proteininin sitoplazmik lupunda *EMB-resistance determining region* (ERDR)'nin yer aldığı ve bu bölgenin farklı mikobakteri türlerinde bulunan ve iyi korunan bir bölge olduğu öne sürülmektedir. Muhtemelen EMB bir arabinoz analogu *EmbB* ise bir arabinozil transferazdır. Etambutol direncinin % 47-65'inden *embB* genindeki mutasyonlar sorumludur. Etambutole dirençli kökenlerde *embB* geninde en sık

rastlanan mutasyonlar 306. kodondaki missense mutasyonlardır. Yine Phe285Leu, Phe330Val ve Thr630Ile diğer sık görülen mutasyonlardır (87-91).

Streptomisin: Aminoglikozid grubundan bir antitüberküloz ilaç olup, ribozomların ribozomal S12 proteini ve 16S rRNA alt grubuna etkileyerek ribozom fonksiyonlarını ve dolayısı ile protein sentezini bozar. Streptomisin etkisini ribozomal proteinlere bağlanıp translasyonu engelleyerek gösterdiği düşünülmektedir. *Mycobacterium tuberculosis*'de streptomisin direncinin % 80'inde iki tür mutasyon saptanmıştır. Birincisi ribozomal S12 proteinini kodlayan *rpsL* geninde nokta mutasyonu olmakta bu da tek amino asit değişimine neden olmaktadır. Amino asit değişimi 88. kodonda lizinin arjinine, 43. kodonda ise Lys43Arg veya Lys43Thr değişimi olarak gerçekleşmektedir. Diğer mutasyon ise 16S RNA'yı kodlayan *rrs* geninde olmaktadır. Burada 530. ve 904. nükleotidlerinin çevresindeki bölgesinde mutasyonlar olmaktadır. Streptomisine dirençli kökenlerin % 65-75'inde *rpsL* veya *rrs* geninde mutasyon saptanabilmektedir. *RpsL* proteinindeki amino asit değişiklikleri yüksek düzey (MİK>500 µg/ml) SM direncine neden olurken *rrs* genindeki mutasyonlar orta düzey (MİK<250 µg/ml) SM direncine yol açmaktadırlar. Düşük düzey SM direnci (MİK<50 µg/ml) olan kökenlerde ise *rpsL* ve *rrs* genlerinde mutasyon saptanamamaktadır. (87-91).

Florokinolonlar: Florokinolonların hedefi DNA'nın negatif süpersarmal oluşturmasını katalizleyen ve bir ATP-bağımlı tip II DNA topoizomeraaz olan DNA girazdır. Bu enzimin inhibisyonu ile DNA'nın süpersarmal yapısı bozulur ve bakteri hayatını sürdüremez. Bu durumdan insan DNA'sı etkilenmez. Siprofloksasin, ofloksasin, levofloksasin ve sparfloksasin'in 0,1-4 µgr/ml'lik konsantrasyonları MTBC'ye etkili olup, birinci seçenek antitüberküloz ilaçlara dirençli vakalarda alternatif olarak kullanılmaktadır. DNA giraz enzimi 2A ve 2B alt ünitelerinden oluşmuş bir heterotetramerdir. Bunlar *gyrA* ve *gyrB* genleri tarafından kodlanır. Dirençli kökenlerde *gyrA* ve *gyrB* genlerinde mutasyonlar saptanmıştır. Yüksek düzeyde siprofloksasin direnci *gyrA* geninin 90. kodonu civarındaki mutasyonlarla ilişkili bulunmuştur. Yüksek düzeyde florokinolon direnci saptanan kökenlerde bu bölgedeki 40 amino asitlik kısa bir bölümündeki *quinolone resistance determining region* (QRDR) olarak adlandırılan

bölgeyi kodlayan gen bölgesinde mutasyonlar bulunmaktadır. MTBC kökenlerinde kazanılmış florokinolon direncinin % 75-94'ünden QRDR bölgesindeki *gyrA* mutasyonlarının sorumlu olduğu gösterilmiştir. *Mycobacterium tuberculosis complex*'de ilaç direncine yol açan mutasyonlar ve ilaçların etki mekanizmaları Tablo V'de özetlenmiştir (87-92).

Tablo V. *Mycobacterium tuberculosis complex*'de ilaç direncinin mekanizmaları (87,93)

İlaç	Etki mekanizması	Dirence yol açan genler	Görevi	Mutasyonun sıklığı (%)
İzoniazid	Mikolik asit biyosentez inhibisyonu ve DNA, lipidler, karbonhidratlardaki diğer potansiyel çoklu etkiler ve NAD metabolizması	<i>katG</i> <i>inhA</i> <i>kasA</i> <i>ahpC</i>	İlacın aktivasyonu İlaç hedefi İlaç hedefi Direnc göstergesi	42-58 21-34 ? 10-15
Rifampisin	Transkripsiyon inhibisyonu	<i>rpoB</i>	İlaç hedefi	96-100
Pirazinamid	Sitoplazma asitleşmesi Enerjisi tükenmiş membran? Yağ asit sentezi inhibisyonu?	<i>pncA</i> <i>fasI</i> ?	İlacın aktivasyonu İlaç hedefi	72-97 NTM
Etambutol	Arabinogalakattan sentez inhibisyonu	<i>embCAB</i>	ilaç hedefi	47-65
Streptomisin	Protein sentez inhibisyonu	<i>rpsL</i> <i>rrs</i> (16S RNA)	İlaç hedefi İlaç hedefi	52-59 8-21
Fluorokinolon	DNA giraz inhibisyonu	<i>gyrA</i> <i>gyrB</i> <i>IfrA</i>	İlaç hedefi İlaç bağlanmasına katılır? Taşıyıcı	75-94 ? NTM
Etionamid	Mikolik asit biyosentez	<i>inhA</i>	İlaç hedefi	?

NTM: Non-tuberculous mycobacteria.

Antitüberküloz İlaçların Etki Mekanizmaları ve Bunlara Karşı Dirence Yol Açan Mutasyonlar

Hücre duvarı yapımını bozan antitüberkülozlara karşı direnç

İzoniazid ve Etionamid direnci: İzoniazid ve etionamid mikolik asit yapımını bozan ilaçlardır. Kimyasal yapıları ve etki mekanizmaları birbirine benzer (94). İzoniazide dirençli birçok *M. tuberculosis* kökeninin katalaz enzimini yapamadığı ya da çok az miktarda yapabildiği gözlenmiştir (95). Katalaz eksikliği olan bakterilerde ikinci bir mutasyon ile alkil hidroperoksidaz enziminin normalden fazla yapılmaya başladığı ve katalazın işlevini üstlendiği gösterilmiştir (96). Bu durumun INH direnci ile ilgisi araştırıldığında INH'ın aslında bir önilaç olduğu ve katalaz tarafından aktive edildiği saptanmıştır. Katalaz enzimini dizginleyen *katG* geninde ortaya çıkan ve katalazın işlevini bozan mutasyonlar INH direncine yol açmaktadır. *KatG* geninde en sık 315. kodonda Ser315Thr mutasyonu gözlenmektedir. Asp63Glu, His108Gln, Thr262Arg, Ala350Ser ve Gly628Ser nadir olarak rastlanan mutasyonlardır. Katalaz-peroksidaz aktivitesi azalmış kökenlerde *ahpC* geni promotor bölgesinde mutasyonlar saptanmış bunların azalan bu enzim aktivitesinden ortaya çıkan biyokimyasal durumu düzeltme görevini yerine getirdiği düşünülmüştür (97).

İzoniazid ve etionamid aktif taşıma ile mikobakteri içine alınırlar. İzoniazid katalaz tarafından aktive edilerek asıl hedefi olan ve mikolik asit sentezinde rol oynayan enoil redüktaz enzimine bağlanarak onu inhibe eder. Enoil redüktaz, NADH bağlayan bir enzimdir ve CoA veya açıl taşıyıcı protein (ACP) üzerindeki trans-enoil-tiyoesterlerin indirgenmesini sağlar. İnhibe edilen enoil redüktaz, *inhA* isimli gen tarafından kodlanır ve bunda ortaya çıkan mutasyon hem INH hem de etionamid direncine yol açar. Bu gende bir timinin guanine değişmesi 94. amino asitin alaninden serine değişmesine ve böylece direnç oluşmasına neden olmaktadır. Bir başka direnç nedeni ise bu genin promotor bölgesinde ortaya çıkan bir mutasyon ile enoil redüktaz yapımının çok artmasıdır. Böylece enzim moleküllerinin bir kısmı ilaç tarafından inhibe edilse bile, geriye kalan kısım gerekli mikolik asit yapımını sürdürebilmektedir (98).

Etambutol direnci: Etambutol de INH gibi *M. tuberculosis*'te hücre duvar sentezini bozar. Mikolik asitlerin peptidoglikana bağlanmalarında köprü görevi üstlenen

arabinogalakattan hücre duvarına eklenmesini engeller. Mikolik asitler duvara katılamadıkları için dimikolat ve trehaloz birikimine yol açar. Arabinogalakattan, arabinozların polimerizasyonu ile yapılır. Bunu sağlayan arabinoziltransferazların EMB'un hedefi olduğu belirlenmiştir. Etambutol direncinden sorumlu bu enzimleri kodlayan, üç genden oluşan bir operon saptanmış ve genlere *embA*, *embB* ve *embC* adı verilmiştir. Daha sonra EMB'e dirençli hale gelen mikobakterilerin % 89'unda *embB* geninin 306. kodonunda mutasyon (Met306Leu, Met306Val) olduğu saptanmıştır. Ayrıca Phe285Leu, Phe330Val ve Thr630Ile diğer sık görülen mutasyonlardır (99).

Protein yapım inhibitörlerine karşı direnç

Streptomisin ve diğer aminoglikozidlere karşı direnç: Streptomisin ve diğer aminoglikozid antibiyotikler bakterilerde protein yapımını bozarak etki gösterirler. Bunu, ribozomlarda mRNA'dan proteine çevirinin başlamasını engelleyerek yaparlar. Birçok bakteri türünde aminoglikozid direnci, ilacın enzimatik olarak modifikasyonu sonucu inaktivasyonu ile ortaya çıkar. Başka bakteri türlerinde son derece yaygın olan bu direnç türüne *M. tuberculosis*'te rastlanmamıştır. Bu bakteride direnç, mutasyonlar sonucu ribozomlarda ortaya çıkan değişiklikler, bunların ilaca afiniteyi azaltması sonucunda oluşur (100). Bilindiği gibi ribozomlar protein ve RNA'dan oluşur. Aminoglikozid direncine neden olan mutasyonlar ribozomal protein veya RNA'larda, mutasyonlar sonucu ortaya çıkan değişiklikler ile olabilir. Ribozomal proteinlerden, S12 proteinini dizginleyen gen, *rpsL*'de ortaya çıkan mutasyonlar ile bu proteinin, 43 ve 88. aminoasitlerini oluşturan lizinlerden ilki arginin veya treonin, ikincisi ise arginine değişir. Kökenlerin % 80'inde direnç bu mutasyonlara bağlıdır. *Escherichia coli*'de aynı bölgelerde mutasyonların dirence neden olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde 16S ribozomal RNA *rrs* bölgesindeki mutasyonlar da SM direncine yol açabilmektedir. Bu bölgenin S12 ribozomal proteini ile ilişkide olduğu sanılmaktadır. Dirence neden olan gen değişikliklerinin, 16S ribozomal RNA'nın 530 kıvrımını dizgeleyen bölgede, 491, 512, 516 da C'den T'ye, 513'te A'dan C'ye ayrıca 913'te A'dan G'ye mutasyonlar sonucu ortaya çıktığı belirlenmiştir. *Escherichia coli*'de de aynı mutasyonların SM direncine yol açtığı saptanmıştır (101).

Mycobacterium tuberculosis'te ortaya çıkan SM direncinin tek iyi tarafı, TB tedavisinde kullanılabilen diğer aminoglikozidler olan kanamisin, amikasin, kapreomisin ile

çapraz direnç yaratmamasıdır. Yani SM'e karşı direnç saptanacak olursa bunun yerine diğer aminoglikozidler tedavide kullanılabilir (102).

Nükleik asit sentezini bozan ilaçlara karşı direnç

Rifampisin direnci: *Streptomyces mediterranei* kültürlerinden elde edilen rifamisin yarı sentetik türevi olan RIF, RNA polimeraz enzimini inhibe ederek DNA'dan RNA yapımını durdurur. Hızlı bakterisidal bir antibiyotiktir ve tedavi süresinin kısaltılmasında önemli rol oynamıştır. Direnç RNA polimeraz enzimi, B altbirimini kodlayan genin, 25 amino asitlik bir bölgedeki mutasyonları ile ortaya çıkar (103). Değişikliklerin % 80'i 526 ve 531. amino asitte, % 17'si 513, 516 ve komşuluğundaki amino asitlerde görülür. 531 ve 513. amino asitlerindeki değişiklikler tüm rifamisin türevlerine (rifampin, ritabutin, rifapentin ve rifalazile) karşı çapraz direnç oluştururken, 516. amino asit değişiklikleri rifabutine direnç oluşturmamakta, 526. amino asit değişikliklerinde rifabutinin direnci ise amino asidin çeşidine bağlı olmaktadır. Bu tür mutasyonların moleküler tanı yöntemleri ile belirlenmesi rifampisine dirençli kökenlerin ritabutin ile tedavisine olanak tanıyabilir (104,105).

Florokinolon direnci: Çok ilaca dirençli *M. tuberculosis* infeksiyonlarının tedavisinde kullanılabilen florokinolonlar, hücre içinde DNA'yı süpersarmal hale getirerek, hücre içine sığdırılmasını sağlayan, DNA giraz enziminin inhibitörüdür. Son yıllarda farklı bakteri türlerinde ilacın başka hedeflerinin de olabildiği saptanmakla beraber, *M. tuberculosis*'te direnç en sıklıkla DNA giraz alfa altünitesini kodlayan gende 90, 91 ve 94. amino asit kodonlarındaki mutasyonlar sonucunda ortaya çıkar (106). Bir araştırmada β altünitesinde oluşan değişiklik (495. amino asitin aspartik asitten arginin veya histidine değişmesi) ve bakteri duvarında geçirgenlik azalmasına bağlı olarak da direnç gelişebileceği saptanmıştır (107).

Pirazinamid direnci: İlk kez 1952'de etkinliği gösterilmiş olan PZA 1980'lerde yaygın olarak TB tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle dormant (aktif olarak çoğalmayan) basillerin öldürülmesinde önemli olan bu ilaç, mikobakterilerin canlılığını sürdürdüğü makrofaj fagolizozomu gibi asit pH'larda etkili olabilmektedir. Nikotinamid analogudur ve etkinliği bir amidaz varlığını gerektirir. Ön ilaç olarak hücre içine girip,

pirazinamidaz adı verilen bu enzimle, pirazinoik aside çevrilir. Pirazinamide dirençli kökenler pirazinoik aside duyarlıdır ancak pirazinoik asit farmakokinetik özelliklerinden dolayı in vivo etkisizdir. Pirazinamid direncinin, % 72-94 kadar olguda, pirazinamidazı dizginleyen gen *pncA*'da ortaya çıkan mutasyonlar ile amidaz aktivitesindeki azalmaya bağlı olduğu belirlenmiştir. Direnç enzimin işlevinin bozulmasına bağlı olduğu için mutasyonlar *pncA*'da çok çeşitli ve değişik bölgelerde, delesyon, insersiyon ve terminasyon şeklindedir (108).

Diğerler bazı tüberküloz ilaçlarıyla ilgili direnç mekanizmaları

Ofloksasin ve siprofloksasin: Florokinolon grubundan olup, bakterideki DNA giraza bağlanarak DNA sentezini inhibe ederler. Mikobakterilerdeki DNA giraz, *gyrA* ve *gyrB* genlerinde kodlanmaktadır. Bu gruptaki ilaçlara karşı ortaya çıkan dirençten *gyrA* geninde meydana gelen mutasyon sorumludur (109,110).

Rifabutin: Rifampisin S'nin sentetik türevidir. Rifampisin-rifabutin arasında çapraz direnç bulunmaktadır ve bu direnç *rpoB* mutasyonları ile ilişkilidir (109,110).

Kapreomisin-viomisin polipeptid yapıda, ***kanamisin-amikasin*** ise aminoglikozid yapıda ilaçlardır. Kanamisin-kapreomisin, kanamisin-viomisin, kanamisin-amikasin arasında çapraz direnç görülebilmektedir. Streptomisin de amikasin gibi aminoglikozid olmalarına rağmen kanamisin ve amikasinin SM ile arasında çapraz direnç bulunmamaktadır (109,110).

Tiasetazon-etionamid: *EtaA* mutasyonuna bağlı olarak değişen oranlarda (% 29-79) çapraz direnç mevcuttur. Çoğu çalışmada % 68'in üzerinde rapor edilmiştir. *Mycobacterium tuberculosis*'de direnç mekanizmaları ve direnç gelişimine yol açan mutasyonların oluşturduğu genler Tablo VI ve Tablo VII'de özetlenmiştir (109,110).

Tablo VI. *Mycobacterium tuberculosis*'de direnç gelişme mekanizmalarının özeti (109)

Mekanizma	İlaç
Hedefin aşırı salgılanması	İzoniazid
Artmış efflux	Pirozinoik asid, Florokinolon, İzoniazid
Antibiyotik hedeflerindeki değişiklik	İzoniazid, Rifampisin, Etambutol, Streptomisin, Kanamisin
Ön ilacın aktif ilaç haline dönüşümünden sorumlu enzim kaybı veya azalması	İzoniazid, Pirazinamid, Etambutol
İlacın hücre içine alınmasında azalma	(Dormant bakteriler)

Tablo VII. *Mycobacterium tuberculosis*'de ilaç direnci gelişimine yol açan mutasyonların oluşturduğu genler (109)

İlaç	Dirence yol açan genler
İzoniazid	<i>katG, inhA, kasA, ahpC, ndh</i>
Rifampisin	<i>rpoB</i>
Pirazinamid	<i>pncA</i>
Etambutol	<i>embCAB (embC, A, B)</i>
Streptomisin	<i>rpsL, rrs</i>
Florokinolon	<i>gryA, gryB</i>
Etionamid	<i>inhA, etaA veya B</i>

***Mycobacterium tuberculosis*'in Antitüberküloz İlaçlara Duyarlılığının Saptanmasında Fenotipik ve Genotipik Yöntemler**

Fenotipik Duyarlılık Testleri

Klasik kültür besiyerleri ile yapılan duyarlılık testleri: Bu testler ilaç katılmış besiyerlerinde *M. tuberculosis* kökenlerinin üremesinin inhibe olup olmadığına bakılarak o antitüberküloz ilaçlara karşı dirençli olup olmadığının saptanması esasına dayanır. En sıklıkla kullanılan besiyerleri LJ ve MB besiyerleridir. Besiyerlerinde test için bulundurulması gereken ilaç konsantrasyonları, uygun dozda ilaç alındığı zaman serumda ve dokularda ulaşılabilen ilaç konsantrasyonu ile ilişkilidir. Eğer bu konsantrasyonlarda bakterinin üremesi durdurulabiliyorsa, ilacın o bakteriye etkili olduğu söylenebilir. Besiyerinde bulunan ilacın son konsantrasyonu, besiyerinin içeriği ve hazırlanış şekline göre etkilenebilmektedir. İlaçlar besiyerindeki maddelere değişik oranlarda bağlandığından, bakterilere asıl etkiyi gösterecek olan serbest ilaç konsantrasyonu besiyerine hazırlanma sırasında konan miktardan farklılık gösterebilmektedir, ilaç konsantrasyonunu bir başka etkileyen önemli faktör besiyerinin hazırlanma şeklidir. Örneğin LJ besiyerine ilaçlar katıldıktan sonra besiyerinin katılaştırılması için 50 dakika 85°C'de bekletilmesi gerekmektedir. Bu pişirme sırasında ısıya duyarlı ilaçlar büyük oranda inaktif olabilir. Rifampisin MB besiyerinde bir µg/ml derişiminde kullanılırken, LJ besiyerinde 20 veya 40 µg/ml olacak şekilde katılmaktadır. Middlebrook besiyeri şeffaf olduğu için *M. tuberculosis* üremesi LJ besiyerine göre daha kolay görülebilmekte ve

daha erken saptanabilmektedir. Klasik kültür besiyerleri ile duyarlılık testleri, kültürde üretilmiş bakteriye dolaylı olarak uygulanabileceği gibi, mikroskopide aside dirençli basil saptanan örneklerle doğrudan da uygulanabilmektedir (111,112,113).

Tüm bakterilerde olduğu gibi mikobakteri toplulukları içerisinde de ilaçlara dirençli doğal mutantlar bulunmaktadır. Hatta mikobakterilerde dirençli mutant bulunma olasılığının diğer bakteri türlerine göre daha yüksek oranda (10^{-6} - 10^{-5}) olduğu gösterilmiştir. Hastalığı oluşturan mikobakteri topluluğu içerisinde dirençli olanların oranı genelde % 1'in üzerinde olursa, ilacın tedavide etkili olamayacağı, ilaç verilmesi ile birlikte duyarlı bakterilerin öldürülüp dirençlilerin seçileceği düşünülmektedir. Bu nedenle duyarlılık testleri yapılırken, mikobakteri topluluğu içerisinde dirençli bakteri yüzdesini de ortaya çıkaracak yöntemler tanımlanmış ve kullanıma sokulmuştur (111,112).

Orantı (proportion) yöntemi: Canetti, Rist ve Grosset tarafından 1963 yılında tanımlanan bu yöntem uygulama koşullarından en az etkilenen ve bu nedenle sonuçları güvenilir kabul edilen bir yöntemdir (114). Kültürde üretilmiş bakteri kökenine (dolaylı) uygulanabildiği gibi, mikroskopide aside dirençli basil saptanmış örneklerle doğrudan da uygulanabilmektedir. Bunlardan hangisi yapılırsa yapılsın önemli olan TB basil topluluğu içerisinde, ilaç türüne göre % 1 veya % 10'dan fazla dirençli bakterinin olup olmadığının ortaya çıkartılmasıdır. Bunun yapılabilmesi için besiyeri tüplerinde uygun koloni sayısını oluşturacak yoğunlukta bakteri ekilmesi önemlidir. İlaçsız kontrol besiyerinde 200-300 koloni oluşturan ekim örneği, bu yöntem için en uygun örnektir. Bu yoğunlukta basil içeren örneğin doğru olarak elde edilebilmesi için, önce kültürde üretilmiş bakteriden 1,0 Mc Farland bulanıklığında süspansiyon hazırlanır. Mikobakterilerden aşırı hidrofobik yapıları nedeni ile su içerisinde homojen bir süspansiyon elde edebilmek oldukça zordur. Homojen bir süspansiyon elde edebilmek için doku ezicileri veya yumuşak bir deterjan (Tween 80) içeren cam boncuklu süspansiyon tüpleri kullanılabilir. Hazırlanmış homojen süspansiyondan 10^{-1} , 10^{-3} ve 10^{-5} veya 10^{-2} ve 10^{-4} 'lük seyreltimler hazırlanmaktadır. Bu seyreltimlerden ilaçsız kontrol besiyerine ve ilaç içeren besiyerlerine ekim yapılır. Ekim yapılmış tüpler üç ile dört hafta inkübe edildikten sonra oluşan koloniler sayılır. Kontrol besiyerine göre ilaçlı besiyerinde ilaç türüne göre % 1 veya % 10'dan daha fazla sayıda koloni oluşmuşsa bakterinin o ilaca dirençli olduğu kabul edilir (111,112,113). Löwenstein-Jensen besiyeri ve MB besiyerleri için direnci belirleyecek kritik ilaç

konsantrasyonu ve bu besiyerlerinde kritik dirençli bakteri oranı Tablo VIII’de gösterilmiştir (111).

Tablo VIII. Löwenstein-Jensen besiyeri ve Middlebrook besiyerleri için direnci belirleyecek kritik ilaç konsantrasyonları ve kritik dirençli bakteri oranları (111)

İlaç	Kritik İlaç Konsantrasyonu µg/ml		Kritik Dirençli Bakteri Oranı (%)
	Löwenstein Jensen	Middlebrook	
İzoniiazid	0,2	0,2	1
Rifampisin	40	1	1
Streptomisin	4	2	10
Etambutol	2	2	1
Pirazinamid	100	50	10
Para Amino Salisilat	0,5	2	1
Sikloserin	30	20	10
Etionamid	20	5	10
Kanamisin	20	5	10
Viomisin	30	5	10

Direnç oranı (ratio) yöntemi: Mitchisson tarafından 1957 yılında tanımlanan bu yöntem, duyarlılık araştırılan *M. tuberculosis* kökeninin, antitüberküloz ilaçların hepsine duyarlı olduğu bilinen *M. tuberculosis* H37Ra ile karşılaştırılması esasına dayanır. Farklı derişimlerde ilaç içeren besiyerlerine ekilen bakteriler için ilaçların minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) saptanır. Duyarlılığı araştırılan hasta kökeninin MİK değeri kontrol köken *M. tuberculosis* H37Ra’nın MİK değerinden 8 kat veya daha fazla yüksek ise, o ilaca dirençli olduğu kabul edilir. Uygulaması zor bir yöntem olduğu için yaygın kullanım alanı bulamamıştır (111,112,113).

Mutlak konsantrasyon (absolute concentration) yöntemi: Meissner tarafından 1961 yılında tanımlanan bu yöntemde bakteri miktarı çok iyi ayarlanmış (2.000-10.000 CFU) ekim örneği ile yapılan incelemede, ilaçlı besiyerinde 20 koloniden fazla oluşması o ilaca bakterinin dirençli olduğunu gösterir. Ekim örneğinin bu kadar hassas bir şekilde hazırlanmasının zorluğu nedeni ile yaygın kullanım alanı bulamamıştır (111,112,113).

Hızlı kültür sistemleri ile yapılan duyarlılık testleri

Radyometrik kültür sistemi (BACTEC 460 TB): Kültür şişelerinde sıvı besiyeri (MB 7H12) vardır. Sıvı besiyeri karbon kaynağı olarak ^{14}C içeren palmitik asit içerir. Mikobakterilerin kullandığı ^{14}C 'den radyoaktif CO_2 oluşur. Radyoaktif gazı saptayan okuyucu vardır. Sonuç verme süresi yaklaşık 2 haftadır (29,49,72). Bu sistemde kültür besiyerinde bulunan radyoaktif palmitik asit mikobakteriler tarafından kullanılır ve açığa çıkan radyoaktif CO_2 ölçülerek bakterinin üremesi erken saptanır. Bu şekilde klinik örneklerdeki mikobakterilerin varlığı kültür ile erken saptanabildiği gibi duyarlılık testleri de erken sonuçlandırılabilir (115). Polimiksin B, amfoterisin B, nalidiksik asit, trimetoprim, azlosilin (PANTA) şişelere inoküle etmeden önce eklenir. Antibiyotik karışımı PANTA: 2000 U/ml polimiksin B, 200 µg/ml amfoterisin B, 800 µg/ml nalidiksik asit, 200 µg/ml trimetoprim, 200 µg/ml azlosilin'den oluşur (29,49,113). Mikobakteriler antibiyotik içeren ve içermeyen Bactec 12B (MB 7H12, 7H9 broth, sığır serum albümini, kazein hidrolizat, katalaz ve ^{14}C işaretli substrat içerir) şişelerine ekilir ve 37°C'de inkübe edilir. Kontrol şişesine ekilen mikroorganizma sayısı ilaç içeren şişeye göre 100 kat azdır. Şişeler günlük olarak Bactec 460 TB cihazında okutulur. Antimikobakteriyal inhibisyon olmadığında, mikobakteriler ürer ve besiyerindeki ^{14}C işaretli substratı kullanır. Böylelikle CO_2 oluşur ve Bactec 460 cihazında Growth Index (GI) terimiyle kantitatif olarak ölçülür. Duyarlılık sonuçları, kontrol ve ilaç içeren şişelerin günlük GI değeri artışlarının karşılaştırılmasıyla yorumlanır. Antitüberküloz ilaç içeren besiyerinde, duyarlı mikobakterilerin üremesi inhibe olur ve bu GI okumalarıyla kaydedilen günlük CO_2 üretiminde artmama veya azalmayla sonuçlanır. Mikobakteriler test edilen ilaca dirençliyse, üremenin inhibisyonu söz konusu olmayacak ve GI günlük olarak artacaktır. Günlük GI değerindeki artış, test kültürünün dirençlilik derecesiyle orantılıdır (29,112,113).

Duyarlılık testi için antitüberküloz ilaç içeren kültür şişeleri hazırlanır. Bu sistemde duyarlılık belirlenmesi için önerilen ilaç derişimleri INH için 0.2 µg/ml, rifampisin

için 2 µg/ml, EMB için 7.5 µg/ml ve SM için 6 µg/ml'dir. Bu yöntemde de bakteri topluluğu içerisinde % 1'den fazla dirençli bakteri olup olmadığının saptanması amacı ile ilaç içermeyen kontrol şişesine ekilecek ekim örneği 1/100 oranında seyreltilir. Ekim yapıldıktan sonra inkübe edilen şişelerden hergün radyoaktif CO₂ ölçülür ve bir önceki gün ölçülen değer ile arasındaki fark (büyüme indeksi) hesaplanır. Kontrol şişesinde büyüme indeksi 30'a ulaşınca sonuçlar değerlendirilir. Büyüme indeksi ilaçlı şişede kontrol şişedekine göre eşit veya daha büyükse, bu ilaca karşı bakterinin dirençli olduğu kabul edilir (115).

Floresan kültür sistemi (MGIT): Bu hızlı kültür sistemi MB besiyeri içeren tüplerin dibindeki jel içerisinde yer alan ve indirgendiği zaman ultraviyole ışığında floresan veren bir indikatörle üremenin erken saptanması esasına dayanmaktadır. Besiyerinde üreyen mikobakterilerin oksijeni tüketip CO₂ üretmeleri sonucunda indirgenen indikatörün oluşturduğu floresan ile üreme varlığı belirlenmektedir. Duyarlılık testi için, ilaçsız ve ilaçlı tüplere eşit miktarda bakteri ekimi yapıp bu tüplerdeki üreme karşılaştırılır, ilaçsız tüpte üreme saptandıktan sonra 48 saat içerisinde ilaçlı bir tüpte üreme olursa, bakterinin o ilaca dirençli olduğu kabul edilir (113,116).

Kolorimetrik kültür sistemi (TK Kültür Sistemi): En son geliştirilmiş bu sistemde, besiyerindeki renk indikatörleri, mikobakteri metabolizmasına bağlı besiyerinin rengini değiştirmesini sağlar. Böylece koloniler görünmeden üreme erkenden saptanmış olur. Diğer hızlı kültür sistemlerinden farklı olarak klinik örneklerden mikobakteri saptanması veya duyarlılık belirleme işlemleri sırasında kontaminasyon olursa bunu gerçek mikobakteri üremesinden ayırt edebilmesidir. Mikobakteri üremesi ile kırmızıdan sarıya dönen besiyeri, mantar, gram negatif bakteri gibi birçok başka mikroorganizmanın üremesi ile yeşile dönmektedir. Katı besiyeri ile çalışan ve kolonilerin görünmesine olanak veren tek hızlı kültür sistemidir. Duyarlılık testi yapılması için ilaçlı ve ilaçsız besiyerlerine eşit miktarda bakteri ekilir. Kontrol besiyerinde üreme saptandıktan sonra 48 saat içerisinde ilaçlı besiyerinde üreme saptanırsa, bakterinin o ilaca dirençli olduğu kabul edilir. Bu kültür sistemi ile yapılan duyarlılık testi çalışmaları, diğer besiyerleri ile yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında büyük oranda uyum göstermektedir, ilaçlı besiyerinin kullanıma hazır olması, hiçbir ön hazırlık gerektirmemesi TK kültür sistemini çok kullanışlı ve güvenilir kılmaktadır, ikincil tüberküloz ilaçları için de test olanağı vardır (116-118).

Bakteriyofailara Dayalı Hızlı Duyarlılık Yöntemleri

Lusiferaz bildirici genli bakteriyofaj sistemleri: Bu sistemde canlı mikobakteri varlığını saptamak amacı ile mikobakterilerde çoğalabilen ve bildirici gen olarak lusiferaz geni klonlanmış mikobakteriyofajlar kullanılmaktadır. Bu fajlar ile mikobakteriler infekte edildiğinde, bakteri içerisinde lusiferaz enzimi üretilmekte, ortama lusiferin bulunduğu ATP kullanılarak bundan ışık üretilmektedir. Duyarlılık testi yapılması için mikobakteriler kısa süre ilaçlı ve ilaçsız besiyerlerinde inkübe edilmekte, daha sonra mikobakteriyofajlar ile infekte edilip ışık üretimi araştırılmaktadır. İlaçsız kontrol ile birlikte mikroskop altında ışıldayan ilaçlı tüplerden alınan örnekler, bakterinin ilaca rağmen çoğaldığını yani o ilaca dirençli olduğunu gösterir, ilk elde edilen lusiferaz genli bakteriyofajlar litik infeksiyon yaptığı için bakterileri parçalamakta ve ışık çıkaran bakterilerin saptanmasını zorlaştırmakta iken, yeni elde edilen ve 37°C’de litik infeksiyon yapamayan sıcaklığa duyarlı mutantlar yöntemin duyarlılığını arttırmıştır (119,120).

Faj çoğaltma sistemi: Bu sistemde hem *M. tuberculosis*, hem de hızlı üreyen *M. smegmatis*’te çoğalabilen bir mikobakteriyofaj kullanılır. Önce duyarlılık araştırılacak *M. tuberculosis* kökeni ilaçsız ve ilaçlı besiyerlerinde inkübe edilir. Daha sonra bunlara mikobakteriyofajlar eklenir. Bunlar sadece canlı mikobakteriler içerisine girebilir ve çoğalmaya başlar. Dışarıda kalan mikobakteriyofajlar tüpe eklenen ferrus amonyum sülfat ile nötralize edilerek mikobakteri içerisine girebilme yetenekleri ortadan kaldırılır, ilaçlı tüplerde ilaca dirençli ne kadar canlı bakteri varsa, o kadar fazla bakteriyofaj korunmuş olur. Sonra tüplere *M. smegmatis* eklenir ve agarlı bir besiyeri ile birlikte petri kutularına dökülür. *Mycobacterium tuberculosis* içinde korunmuş fajlar bu kez *M. smegmatis* içerisinde çoğalarak faj plaklarını oluştururlar, ilaçlı tüplerden belli bir oranın üzerinde faj plağı elde edilirse bakterinin o ilaca dirençli olduğu anlaşılır (121).

Akım hücreölçerinde (flow cytometry) duyarlılık belirleme: Canlı mikobakteriler florosein asetat ile işaretlenip akım hücreölçerinde sayılabilmektedir. İlaçlı ve ilaçsız ortamda üç gün inkübe edilen mikobakteriler işaretlendikten sonra akım hücreölçerinden geçirilirler ve ilaçlı tüplerden gelen örneklerde sayımda azalma olup olmadığı incelenir. Yandan fazla düşmeye neden olan ilaçların etkili olduğu kabul edilir (122).

***Mycobacterium tuberculosis*'te İlaç Direncine Neden Olan Mutasyonların Saptanması**

Genetik değişiklikleri gösterebilmek için bu değişikliklerin görüldüğü gen bölgeleri genelde önce PZR ile çoğaltılmaktadır. Aynı DNA örneğinden çok sayıda bulunması, bu genetik incelemelerin yapılmasını olanaklı hale getirmektedir (87,123).

Ters hibridizasyon yöntemi: Bu yöntemde mutasyon araştırılacak gen bölgesine ait dizileri içeren proplar bir nitroselüloz kağıt üzerine çizgiler halinde yapıştırılmıştır (Inno-Lipa, Innogenetics). Proplar içerisinde hem normal diziye, hem de mutant dizilere özgül olanlar bulunur. Dirençten sorumlu gen bölgelerine ait DNA molekülleri PZR ile çoğaltıldıktan sonra bu proplar ile hibridizasyona sokulur. İlaç direncinin varlığı DNA'nın normal veya mutant dizileri taşıyan proplara bağlanmasına göre saptanabilir (124).

DNA dizi analizi: Mutasyonların kesin olarak tanımlanması, DNA dizi analizi ile yapılır. DNA dizi analizi için Sanger'in tanımladığı zincir sonlandırma yöntemi kullanılmaktadır. Bu sistemlerde dizi analizi yapılan kalıp DNA üzerinde DNA polimeraz ile DNA sentezi yapılırken zincirler herbiri farklı floresan boya ile işaretli dideoksinükleotitlerin zincirlere girmesi ile sonlandırılır. Farklı boylardaki bu zincirler kapiler elektroforezle birbirinden ayrılıp optik okuyucu ile değerlendirilir (87,125).

Tek zincir biçim çeşitliliği (single strand conformation polymorphism-SSCP): *Mycobacterium tuberculosis*'te ilaç direncine neden olan mutasyonların hızlı bir şekilde saptanmasında kullanılan yöntemlerden biri “tek zincir biçim çeşitliliği” (single strand conformation polymorphism-SSCP) diye adlandırılan yöntemdir. Bu yöntemde, ilaç direncinden sorumlu gen bölgesi PZR ile çoğaltılır. Çoğaltılan çift zincirli DNA, denatüre edici şartlarda iki tek zincire ayrılır ve bu şekilde elektroforez uygulanır. Her zincir içerdiği nükleotit dizisine göre belli kıvrılmalar göstererek kendine özgü bir üç boyutlu şekle bürünür. Bu şekil, elektroforez sırasında, molekülün jel gözeneklerinden geçiş hızını etkiler. Sonuçta DNA dizisi, molekülün elektroforezdeki hızını belirlemiş olur. İlaça duyarlı bir kontrol bakteriden elde edilen SSCP biçimi, hastadan elde edilen bakterininki ile karşılaştırılır. İkisi arasında farklılık olması, o gende bir mutasyon olduğunu ortaya çıkarır.

Tek zincirli DNA'nın elektroforez jelinde görülebilmesi için genellikle radyoaktif bir madde ile işaretlenmesi gerekir (126,127).

Heterodubleks analizi: İlaç direncine yol açan mutasyonların belirlenmesinde kullanımı daha kolay olan bir yöntem heterodubleks analizidir. Bu yöntemde ilaç direncine neden olan gen bölgesi, hem hastadan izole edilen basilden, hem de ilaca duyarlı olduğu bilinen bir kontrol kökenden PZR ile çoğaltılır. Çoğaltma ürünlerinden eşit miktarda bir tüpte karıştırılıp, 95°C'ye kadar ısıtılarak DNA zincirlerinin birbirinden ayrılması sağlanır. Sonra tüp yavaş yavaş oda sıcaklığına soğutulduğu sırada zincirler yeniden eşleşerek birleşir. Bu sırada farklı bakteriden gelen ancak birbirine uygunluk gösteren tek zincirler de bir araya gelerek heterodubleksleri oluşturur (87). Eğer hastadan gelen bakteride bu gende bir mutasyon yok ise, yani dizi, ilaca duyarlı kontrol bakteri ile tamamen aynı ise, bu birleşme tam düzgün olarak gerçekleşir ve çift zincirli DNA'nın doğal çifte sarmal biçimi oluşur. Buna karşın hastadan elde edilen bakteride bir mutasyon varsa, heterodubleksler arasında mutasyon noktasında eşleşme bozukluğu olur. Bu durum çift sarmal yapıyı bozar, zincirde bükülmeye neden olur ve böylece molekülün üç boyutlu yapısı değişir. Bu değişiklik elektroforez sırasında molekülün, mutasyon bulunmayan düzgün birleşmiş kontrol DNA'dan farklı hızda yürümesine neden olur. Bu farkın gözlemlendiği durumlarda bakterinin ilaca dirençli olduğu kabul edilir. Elektroforezde heterodublekslerin birbirinden ayrılabilmesi için genellikle, “mutasyon saptama jeli” adı verilen özel bir akrilamid türevi gerekir. Çift zincirlerin etidyum bromür ile boyanıp, ultraviyole transillüminatörde hemen gözlemlenebilir olması yöntemin en azından SSCP'den daha kullanışlı olmasını sağlamaktadır (87,104,105).

Anında İzlenebilen (Real Time) PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu ile DNA çoğaltması sırasında tüp içerisinde doğrudan DNA artışını belirleyebilen, bunun özgül bir ürün olduğunu saptayan, daha da önemlisi elektroforeze ve DNA dizi incelemesine gerek kalmaksızın mutasyonların varlığını belirleyebilen aletler geliştirilmiştir. Bu aletler, PZR sırasında tepkimenin gerçekleştirildiği tüplerdeki floresansı izleyebilen optik bir düzenek ile donatılmıştır. DNA artışı, sadece çift zincirli DNA'ya bağlanan ve ancak DNA'ya bağlı olduğu sırada floresan veren, “SYBR Green 1” gibi bir boya veya floresan boya ile işaretli DNA proplarının kullanılması ile saptanır. Bu amaçla floresan rezonans enerji transferinden

(FRET) yararlanılmaktadır. Floresan rezonans enerji transferi, birbirine yeterince yaklaşmış elektronları uyarılmış iki floresan boya molekülü arasında enerji aktarılmasıdır. Bir proba bağlanmış elektronu yüksek enerji düzeyine uyarılmış olan verici molekül, bu fazla enerjiyi foton olarak salıvermeksizin bir başka proba bağlanmış alıcı moleküle aktarır. Alıcı molekülün elektronu yüksek bir enerji düzeyine ulaşmış olur ve bu fazla enerjiyi bir foton olarak salıverir. Polimeraz zincir reaksiyonu sırasında DNA çoğaldıkça, bu DNA'nın bir zinciri üzerinde yan yana bağlanan proplar floresan oluşmasına ve artışına neden olur. Floresan artışının izlenmesi ile de DNA artışı saptanır. Ayrıca DNA dizisi bilinen bir PZR ürününde mutasyonların saptanabilmesi için de FRET propları kullanılabilir (87) Bu amaçla kullanılan verici boya molekülünü taşıyan proba “bağlantı probu”, alıcı boya molekülünü taşıyan proba ise “saptama probu” adı verilir. Saptama probu mutasyon görülen dizilerin bulunduğu bölgeyi kapsayacak şekilde hazırlanır ve 5' ucuna alıcı boya molekülü bağlanır. Bağlantı probu ise saptama probunun hemen komşuluğundaki bölgeye bağlanacak şekilde hazırlanır ve 3' ucu verici boya ile işaretlenir. Böylece proplar, incelenen DNA zincirine bağlandığında verici ve alıcı boya molekülleri yan yana gelir. Polimeraz zincir reaksiyonu tamamlanıp ürün elde edildikten sonra tüpler yavaş yavaş (55°C'dan 95°C'a dek) ısıtılır. Belli bir sıcaklığa erişilince, saptama probu bağlandığı yerden ayrılır. Bu ayrılma sıcaklığı, mutasyon varlığında eşleşme bozukluğu olduğu için daha erken gerçekleşir. Ayrılma sıcaklığındaki düşmelere bakılarak mutasyonlar ve dolayısı ile ilaç direnci belirlenmiş olur. Mutasyon saptama, kendi üzerine katlanabilen ve tokaya (beacon) benzer şekil oluşturan, alıcı ve verici floresan boyaların aynı zincir üzerinde bulunduğu proplar ile de yapılabilir (87,128,129).

DNA Yongaları (DNA Chip): Küçük bir alana çok sayıda DNA prop çeşidi bağlanarak elde edilen DNA yongaları antitüberküloz ilaçlara karşı dirençte rol oynayan genetik değişikliklerin tanımlanmasında kullanılabilir. Floresan bir boya ile işaretlenmiş PZR ürünleri DNA yongalarındaki proplar ile yakalanarak incelenirler. DNA dizilerinde değişme varsa bu proplara bağlanma özelliğinde değişiklik görülür. Böylece bir DNA yongası üzerinde çok sayıda DNA dizisi incelenebilir ve ilaç direncine neden olan mutasyonlar araştırılabilir (87,130).

PZR- Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Temel teknik olan RFLP’de genomik DNA doğrudan restriksiyon enzimler ile kesilir. Oluşan bant paterni doğrudan agaroz jel görüntüsüne göre değerlendirilebileceği gibi, Southern blot yolu ile bir membran üzerine aktarılan ürünler komplementer probalar ile hibridize edilerek daha kolay ve özgün değerlendirilebilir hale getirilebilir. Her bir band bir allel kabul edilir ve bandın varlık ya da yokluğuna göre paternler birbiri ile kıyaslanır.

Restriksiyon enzimler çift iplikli DNA’yı kesen enzimlerdir. Kesme işlemi bazlara zarar vermeksizin şeker fosfat omurgası üzerinde ve her iki iplikçikte gerçekleşir. Enzimatik olarak kesilmiş DNA, jel elektroforez yöntemleri ile ayrıştırılarak incelenir. Agaroz jel üzerine yüklenen DNA örnekleri elektriksel alanda sahip oldukları negatif yüke bağlı olarak pozitif elektroda doğru büyüklükleri ile ters, net yükleri ile doğru orantılı bir hızda göç ederler. Elektroforez sonrasında etidium bromid gibi DNA boyaları görünür hale getirilerek incelenirler (131). Bir çalışmada izoniazid direnci için *katG* mutasyonunu saptamada PZR-RFLP’nin duyarlılığı % 80 ve özgüllüğü % 100 bulunmuştur (2).

Tanımlamalar

Mikroskopi veya Yayma: Hastanın balgamının ya da başka incelenecek örneğinin bir lama yayılarak mikroskopi ile değerlendirilmesini anlatır. Pozitif, basilin gösterilmesidir. Negatif ise basilin görülmemesidir.

Aside Dirençli Basil (ARB): Tüberküloz basili, ısıtılarak özel boya ile boyandığında, asit ile bu boyayı vermediğinden, mikroskopta farklı renkte görülür, buna ARB denilir.

Kültür: Balgam ya da başka bir örnek materyal mikroskopta incelenirken TB basilinin çoğalması için özel hazırlanmış besiyerine ekilir. Bu besiyerinde 15 gün ile 45 gün arasında basil üreyerek çoğalır. Üreme var ise kültür pozitif, üreme yok ise kültür negatif denilir.

İlaç Duyarlılık Testi (İDT): İlaçlı hazırlanmış besiyerine ekilen basil eğer burada çoğalıyorsa o ilaca dirençlidir. Eğer, ilaçsız besiyerinde üreme olurken, ilaçlı besiyerinde üreme olmaz ise, ilaç etkilidir, yani basil o ilaca duyarlıdır.

Tanıdaki balgam yayması sonucuna göre akciğer tutulumu olan olgular ikiye ayrılır:

Yayma Pozitif TB Olgusu: Tanı sırasında en az iki balgam ya da indüklenmiş balgam yaymasında aside dirençli basil (ARB) pozitifliği saptanan hastalar ya da balgam ya da indüklenmiş balgamda bir kez ARB pozitif bulunan ve radyolojik bulguları akciğer tüberkülozu ile uyumlu olan ve bir hekim tarafından TB tedavisi kararı verilen hastalar ya da

balgam ve indüklenmiş balgam yaymasında bir kez ARB pozitif bulunan ve bu örneğin kültürü de pozitif gelen hastalardır. Avrupa TB veri standartlarına göre açlık mide suyu (AMS), bronkoalveolar lavaj (BAL) ve diğer materyalin mikroskopi pozitifliği kayda alınmamaktadır. Kültür sonuçlarında ise bütün materyallerin sonuçları dahil edilmiştir.

Yayma Negatif TB Olgusu: İki hafta ara ile balgam örnekleri alınan ve her seferinde yayma negatif olan, fakat radyolojik olarak TB ile uyumlu bulguları olan ve en az bir hafta geniş spektrumlu antibiyotik kullanılmasına rağmen klinik yanıt alınamayan ve ayırıcı tanı olanakları olan bir hastanede TB tedavisine karar verilen hastalardır. Örneklerinde yayma negatif bulunan fakat kültürde üreme olan hastalardır.

Yeni olgu: Daha önce TB tedavisi görmemiş veya bir aydan daha az süre tedavi almış hastalardır.

Eski olgu: Daha önce en az bir ay tedavi görmüş TB hastasıdır. Bu tanım, nüks, tedavi başarısızlığından dönen, tedaviyi terkten dönen ve kronik olguları içermektedir.

Nüks olgu (relapse): Daha önce TB tanısı konup tedavisini başarıyla tamamlamış olan hastada yeniden TB tanısı konulur, yani basil pozitifliği saptanırsa nüks olarak kabul edilir. Yaymasında basil negatif ise ve klinik ve radyolojik olarak TB düşünülüyorsa bu olgular ayırıcı tanı olanaklarının olduğu bir merkezde tedavi edilmelidirler.

Tedavi başarısızlığından dönen olgu (failure): Yeni tanı konulmuş ve tedavinin başlangıcından beş ay ya da daha sonra alınan balgam örneklerinde yayma veya kültür ile basil gösterilen hastadır.

Tedaviyi terkten dönen olgu: Tedaviye iki ay veya daha uzun ara verdikten (tedaviyi terk) sonra yeniden yayma pozitif olarak başvuran hastalardır.

Kronik olgu: Nüks, ara verme veya tedavi başarısızlığı nedeniyle uygulanan yeniden tedavi rejiminin sonunda hala basil pozitif olan hastalardır.

Başlangıç dönemi: Hızlı çoğalan basillerin temizlendiği dönemdir. Bu dönemde dört ilaç (nüks ve tedaviyi terkten dönenlerde beş ilaç) kullanılır. Bakterisidal aktivite ve direnç gelişimini önleyici aktivite söz konusudur. Genellikle 2 ay sürer. Bu dönemde tedavi bırakılırsa, tedavi başarısızlığı olabilir ve ilaç direnci gelişme olasılığı yüksektir.

İdame dönemi: Bu dönemde sterilizasyon gerçekleştirilir. Yani zaman zaman aktivasyon gösteren, aralıklı çoğalan basiller temizlenir. Yeni olgularda genellikle 4 ay sürer. Bu dönemde tedavi terk edilirse nüks gelişebilir ve genellikle basil ilaçlara duyarlıdır

Yeni olguda ilaç direnci: Bir aydan daha kısa süre tedavi görmüş ya da hiç tedavi görmemiş hastadaki ilaç direncidir. Bu tanım daha önce “primer ilaç direnci” olarak adlandırılıyordu.

Tedavi görmüş olguda ilaç direnci: Bir aydan daha uzun süre tedavi görmüş hastadaki ilaç direncidir. Bu ilaç direnci, ilk tedaviden önce varsa “primer”, eğer başlangıçta yok ve tedavi sonrası gelişti ise “sekonder” ilaç direnci olabilir.

Çok ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD TB) [Multi drug resistant tuberculosis (MDR TB)]: İzoniazid ve rifampisine dirençli TB’dir. Bu iki ilaca ek başka ilaç direnci de olabilir.

Yaygın ilaç dirençli tüberküloz (YİD TB) [Extensive drug resistant tuberculosis (XDR TB)]: İzoniazid, rifampisine direnç ve bir kinolona direnç ve de parenteral kullanılan ilaçlardan (kanamisin, kapreomisin, amikasin) birisine direnç olması olarak tanımlanmaktadır (84,132,133).

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma 1 Ocak 2009-1 Haziran 2010 tarihleri arasında Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Çalışma grubu

Prospektif olarak 1 Ocak 2009- 1 Haziran 2010 tarihleri arasında Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi ve Aydın ili Verem Savaş Dispanseri'ne başvuran, toplam 63 TB olgusu çalışmaya dahil edilmiştir. Her olgunun birden fazla gönderilen klinik örneğinden izole edilen sadece tek köken çalışmaya dahil edilmiştir.

Aynı zamanda kültüründe *M. tuberculosis* üreyen TB hastaları tarafından demografik bilgiler (yaş, cinsiyet, yaşadığı yer, öğrenim durumu, gelir durumu), temas öyküsü, daha önce tedavi alıp almadığı ve başvuru tarihi gibi verilerin yer aldığı anket ve bilgilendirilmiş olur formu doldurulmuştur (Ek-1, Ek-2). Çalışma için yerel etik kurulu onayı alınmıştır.

Örnek Toplanması ve İşlenmesi

Bu çalışmada toplam 63 olgunun klinik örnekleri çalışılmıştır. Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'nda 63 olgunun klinik örneklerine sırasıyla standart homojenizasyon-dekontaminasyon işlemi, EZN boyama ve şüpheli olgularda Auramine-Rhodamine boyama ile LJ (Becton Dickinson, ABD) katı besiyeri ve BACTEC 12B (Becton Dickinson, ABD) sıvı besiyeri şişelerine kültür için ekim yapılmıştır. Toplam 63 olgunun 63'ünde de (% 100,0) *M. tuberculosis* kökeni üretilmiş ve BACTEC 12B sıvı besiyeri şişelerinde üreme saptandığında fenotipik olarak BACTEC 460 TB (Becton Dickinson, ABD) sistemi ile NAP testi ve genotipik olarak da PZR, PZR-RFLP ve TB Direnç Kiti (Autoimmun Diagnostika GmbH, Almanya) ile tür düzeyinde identifikasyon yapılmıştır. Kökenlerin antibiyotik duyarlılıkları için fenotipik yöntem olarak radyometrik BACTEC 460 TB sistemi kullanılarak dört major ilaç (INH, RIF, EMB, SM) için duyarlılık testi yapılmıştır. Genotipik yöntem olarak ise BACTEC 12B sıvı besiyeri şişelerinde üreme saptandığında TB Direnç Kiti ile antibiyotik direnç genleri saptanmıştır. Çalışmaların tüm aşamaları sınıf II biyolojik güvenlik kabini (Nuair Class II Biological Safety Cabinets, ABD) içerisinde yapılmıştır.

Klinik örnekler çalışılırken N 95 standardında koruyucu filtreli maske (3M, ABD) kullanılmıştır.

Standart Homojenizasyon-Dekontaminasyon Metodu

Asetilsistein-alkali digestant hazırlanması: Öncelikle 50 ml % 2,94'lük trisodyum sitrat-3 H₂O ile 50 ml % 4'lük sodyum hidroksit (NaOH) karıştırılmış ve sonra 0,5 gr toz N-acetyl-L-cysteine (NALC) ilave edilmiştir. İşlenen tüm örnekler için sıkı kapaklı 50 ml'lik plastik santrifüj tüpleri (falcon tüpü) kullanılmıştır. Plastik santrifüj tüpü içerisindeki örnek miktarı kadar üzerine NaOH-NALC karışımı eklenmiştir. Genellikle 10 ml örnek kullanılmıştır. Tüpün kapağı sıkıca kapatılmıştır. Karışım vortekste 15-20 saniye iyice karıştırılarak homojenize edilmiştir. Sonra 15 dakika oda ısısında dik olarak tutulmuştur (arada döndürülmüştür). Homojenizasyon-dekontaminasyon basamağından sonra pH 6,8 fosfat tampon solüsyonu tüpün üst çizgisine kadar doldurulmuştur. Örnek 4°C'de 4000 rpm'de 15 dakika çevrilerek konsantre edilmiştir. Yüksek hızda oluşan ısı mikobakterilerin ölmesine neden olup kültürde üremesini engellediğinden soğutmalı santrifüj (Hettich UNIVERSAL 32 R Zentrifugen, Almanya) kullanılmıştır. Santrifüjleme sonrası üstte kalan bölüm (süpernatant) % 0,6'lık klorlu dezenfektan içeren kap içine dikkatlice atılmıştır. Tüpün kapağı % 70'lik izopropil alkol batırılmış pamuk ile silinmiştir. Santrifüj sonrası dipteki kısımdan temiz bir lama EZN boyama ve şüpheli olguların örneklerinde Auramine-Rhodamine floresan boyama için yayma hazırlanmıştır. BACTEC 12B sıvı besiyeri içeren şişeye ve LJ katı besiyerine 500 µl kültür için ekim yapılmıştır ve ependorf tüpte 1 ml homojenize dekontamine örnek moleküler testlerde kullanılmak için -20°C'de saklanmıştır (29,30,49,70).

Aside Dirençli (Asidorezistan) Bakterilerin Boyanması

Homojenizasyon dekontaminasyon işleminden sonra hazırlanan preparatlar EZN ve Auramine-Rhodamine boyama yöntemi ile boyanmıştır.

Ehrlich-Ziehl-Neelsen boyama yöntemi ile preparatların boyanması

Bu yöntemde kural, preparatların önce ısıtılarak uygulanan fenollü fuksin ile boyanmaları sonra hidroklorik asitli alkol ile renksizleştirilmesi ve en son bir zıt boya ile boyanmalarıdır.

Gerekli eriyikler:

a) Erlich-Ziehl-Neelsen fenollü fuksin (Karböl -fuksin)

Bazik fuksin	1 gr
Fenöl kristalize	5 gr
% 98'lik etil alkol	10 ml
Distile su	100 ml

Öncelikle 5 gr fenöl, 100 ml saf suda eritilip % 5 eriyik hazırlanmıştır. Bunun 50 ml'si, 100 ml'lik bir balon jojeye aktarılmıştır. Bazik fuksin cam havanda ezilerek alkol ile karıştırılmıştır. Bu eriyik balondaki fenollü suya eklenip, suyun bir kısmıyla havandaki boya kalıntıları da temizlenerek balona aktarılmıştır. Boya 24 saat oda sıcaklığında bekletilip, süzgeç kağıdında süzülerek renkli cam şişeye konulmuştur.

b) Asit - Alkol eriyiğı:

HCl	3 ml
% 96'lık etil alkol	97 ml

Karıştırılarak renkli cam şişede saklanmıştır.

c) Löffler'in metilen mavisi eriyiğı:

Metilen mavisi	0,3 gr
% 96'lık etil alkol	30 ml
% 10'luk KOH eriyiğı	0,1 ml
Distile su	100 ml

Cam havanda metilen mavisi alkolle ezilerek eritilip, bir balon jojeye aktarılmıştır. Sonra 100 ml distile suya %10'luk KOH eriyiğinden 0,1 ml eklenerek karıştırılmıştır. Havan bu su ile yıkanıp boyaya aktarılmıştır. Son olarak 24 saat oda sıcaklığında bekletilip süzgeç kağıdından süzölüp, renkli cam şişeye konulmuştur.

Boyama yöntemi: Havada kurutulan preparatlar, metanolle 2-5 dakika tespit edildikten sonra boyama küveti üzerindeki boyama tel sehпасına konulmuştur. Üzerine preparatı tam kaplayacak biçimde bolca fenollü fuksin eriyiğinden dökülmüştür. Preparat burada buhar çıkacak ancak kaynamayacak şekilde ısıtılmıştır. Bunun için bir telin ucuna bolca hidrofil pamuktan sarılmıştır. Alkole bandırılan pamuk yakılmıştır. Bu alev zaman zaman preparatın altına yaklaştırılıp uzaklaştırılarak beş dakika süre ile buhar çıkacak ancak kaynamayacak derecede ısıtılmıştır. Bu arada preparatın üzerindeki boya

eriyiği azalırsa üzerine damla damla eklenerek preparatın kurumaması sağlanmıştır. Bu süre sonunda preparat su ile yıkanmıştır. Renksizleştirme işlemi için asitli alkol eriyiği kullanılmıştır. Bu aşama yaklaşık bir-iki dakika sürmüştür. Renksizleştirme işlemi sonunda preparat su ile yıkanmıştır. Zıt boyama için Löffler'in metilen mavisi eriyiği kullanılmıştır. Boya preparata dökülmüştür. Yaklaşık iki-üç dakika bekletilip su ile yıkanmıştır. Daha sonra mikroskopik inceleme için preparatlar havada kurutulmaya bırakılmıştır (29,49,134).

Floresan Boyalarla Asidorezistan Bakterilerin Boyanması

Ehrlich-Ziehl-Neelsen boyama yöntemiyle boyanan preparatlar, mikroskopta incelenip şüpheli olarak rapor edildiğinde Auramine-Rhodamine boyama yöntemi ile de boyanıp floresan mikroskopta incelenmiştir.

Ana ilke fenollü fuksinin yerine floresan boyalar kullanılarak bakterilerin incelenmesidir.

Auramine- Rhodamine ile boyama yöntemi

a) Auramine-Rhodamine boya eriyiği:

Auramine O	1,5 gr
Rhodamine B	0,75 gr
Gliserol	75 ml
Sıvı fenol	10 ml
Saf su	50 ml

Önce fenol suda eritilmiştir. Boyalar sıra ile eklenerek karıştırılarak onlar da eritilmiştir. En son gliserol eklenmiştir. Süzülüp ve cam kapaklı koyu renkli şişede saklanmıştır.

b) Renksizleştirme eriyiği:

Sodium klorür	0,5 gr
HCl	0,5 gr
% 70'lik metil alkol	99 ml

Karıştırılarak eritilir.

c) Karşıt boyama eriyiği:

% 0,1'lik potasyum permanganat eriyiği (saf suda)

Boyama yöntemi: Tesbit edilmiş preparatın üzerine boya dökülüp ısıtılmaksızın 15 dakika beklendikten sonra preparat su ile yıkanmıştır. Daha sonra preparatın üzerine asit ve alkol (sülfirik asit) döküp iki dakika beklenmiş ve bu süre sonunda su ile preparat yıkanmıştır. En son aşamada preparatın üzerine potasyum permanganat döküp iki dakika beklenmiştir. Preparat havada kurumaya bırakılmıştır (29,49,135).

Preparatların mikropkopik incelenmesi: Preparatlar EZN yöntemi ile boyanan preparatlar 100x büyütme objektifte immersiyon yağı kullanılarak ışık mikroskobu (Olympus BX51) ile incelenip mavi zeminde kırmızı renkte asidorezistan basiller görüldüğünde sonuçlar pozitif olarak değerlendirilmiştir. Bu boyama ile zemini oluşturan hücreler, lifler, asidorezistan olmayan diğer bakteriler mavi renkte, aside dirençli bakteriler ise koyu parlak kırmızı renkte boyanmıştır. Ayrıca ARB’de şüpheli olarak değerlendirilen preparatlar floresan mikroskopta (Nikon) 40X büyütme objektifte de incelenmiştir. Siyah zeminde parlak sarı renkte floresan veren çomaklar görüldüğünde sonuç pozitif olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar negatif, şüpheli, (+), (++) , (+++) ve (++++) olarak değerlendirilmiştir. Tablo IX’da boyalı preparattaki basillerin raporlanması gösterilmiştir. (29,49,134,135).

Tablo IX. Boyalı preparatta aside dirençli basillerin raporlanması (29)

Sonuç	Aside Dirençli Basil Sayısı /Mikroskop alanı		
	EZN yöntemi (1000X)	Florokrom Boyama (250X) (450x)	
Aside dirençli basil görülmedi	0	0	0
Şüpheli (yeni örnek ile tekrar edilmeli)	1-2/300	1-2/30	1-2/70
(+)	1-9/100	1-9/10	2-18/50
(++)	1-9/10	1-9/1	4-36/10
(+++)	1-9/1	10-90/1	4-36/1
(++++)	>9/1	>90/1	>36/1

Kültür

Homojenizasyon dekontaminasyon işleminden sonra plastik sanrifüj tüpünün süpernatant kısmı atılarak dipte kalan kısımdaki sedimentten DSÖ'nün önerdiği şekilde 500 µl klasik LJ ve radyometrik BACTEC 12B besiyerlerine (PANTA antibiyotik karışımı: 2000 U/ml polimiksin B, 200 µg/ml amfoterisin B, 800 µg/ml nalidiksik asit, 200 µg/ml trimetoprim, 200 µg/ml azlosilin ilavesiyle) inoküle edilmiştir. Daha sonra LJ besiyeri 35-37°C'de 8 hafta süresince HEPA filtre sistemi bulunan CO₂'li etüvde (NUAIRE DH AUTOFLOW CO₂ Air-Jacketed Incubator, ABD) inkübasyona bırakılmıştır. Tüm LJ kültürlerinde inokülasyonun üçüncü veya beşinci gününde, daha sonra ise haftada iki-üç kez üreme kontrolleri yapılmıştır. Üreme saptandığında ARB boyama yapılmıştır. Sekiz hafta sonunda üreme görülmeyen besiyerleri, kültür sonucu negatif olarak değerlendirilmiştir. BACTEC 12B şişeleri ise ekilmeden önce okutulmuştur ve GI<10 (Growth Index, üreme indeksi) olanlar işleme alınmıştır. Bactec 12B şişeleri ise etüve (memmert, A.B.D.) kaldırılıp inkübasyona bırakılıp ilk üç haftada üçer kez, daha sonraki haftalarda ise birer kez BACTEC 460 TB cihazında okutularak üreme indeksleri değerlendirilmiştir. Ekim öncesi 0,2 ml PANTA (polimiksin B, amfoterisin B, nalidiksik asit, trimetoprim, azlosilin) şişelere ilave edilmiştir. Daha sonra 0,5 ml homojenize örnek şişelere eklenmiştir. Şişeler haftada 2-3 kez Bactec 460 TB cihazında okutulmuştur. Değerlendirme ise GI 50-100 değerleri arasına geldiğinde ARB boyama ve GI 500-800 değerleri arasına geldiğinde antitüberküloz duyarlılık testi şeklinde yapılmıştır. *M. tuberculosis complex* ve tüberküloz dışı mikobakterilerin (MOTT) ayrımı BACTEC 460 TB cihazında fenotipik yöntem NAP testi ile yapılmıştır (29,49,70)

NAP (P-nitro-alfa-acetilamino-β-hidroxypropiofenone) testi

Üreme indeksi 50-100 aralığına geldiğinde ARB pozitif ise NAP testi yapılmıştır. BACTEC 12B şişesinden bir ml alınarak NAP şişesine aktarılmıştır. Daha sonra 37°C'de inkübasyona bırakılıp, BACTEC 460 TB cihazında iki-altı gün okutulmuştur. İnokülasyondan sonra GI değerinde birbirini izleyen iki önemli azalma *M. tuberculosis complex*, GI değerinde ilk iki günde önemsiz bir artış, sonra bir azalma ve değişmezlik MOTT lehine olarak değerlendirilmiştir. Tüberküloz dışı mikobakterilerde günlük GI değerleri dört gün içinde 400'ün üzerine çıkar. *M. tuberculosis complex*'de inokülasyondan sonra ilk bir ile üç günde hafif bir azalma veya değişmeme, ardından ikinci günden itibaren, birbirini izleyen

iki günde önemli bir artış görülür. NAP testinin kalite kontrol işlemleri için standart *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) kökeni kullanılmıştır (29,49,67,72).

***Mycobacterium tuberculosis complex* Kökenlerin Birinci Seçenek Antitüberküloz İlaçlarına (INH, RIF, SM ve EMB) Karşı Duyarlılıklarının Fenotipik Yöntem Radyometrik BACTEC 460 TB ile saptanması.**

BACTEC 12B kültür şişeleri BACTEC 460 TB cihazında test edilerek, inkübe edilen kökenin oluşturduğu CO₂ değeri cihaz tarafından sayısal olarak ölçülmüş ve üreme indeksi (GI) olarak belirlenmiştir. Üreme indeks değeri 500-800 arasına ulaştığında, aside dirençli basil varlığı EZN boyama ile doğrulanan kökenlere antitüberküloz ilaçlar için duyarlılık testi yapılmıştır. Üreme indeks değeri 800'ü geçen kökenler dilüsyon sıvısı ile 1:1 oranında dilüe edildikten sonra antibiyotik duyarlılık testine tabi tutulmuştur. Duyarlılık testinde, INH, RIF, SM ve EMB antibiyotikleri için birer, kontrol için de ayrı bir BACTEC 12B olmak üzere her köken için toplam beş adet BACTEC 12B besiyeri kullanılmıştır. Primer antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılık testi; BACTEC 460 TB kültür sistemi ile, son konsantrasyonları INH için 0,1 µg/ml, SM için 2.0 µg/ml, RIF için 2.0 µg/ml ve EMB için 2.5 µg/ml olacak şekilde hazırlanarak uygulanmış ve 37°C'de inkübe edilmiştir. Antibiyotiklerin stok solüsyonları Tablo X'da belirtilen kritik konsantrasyonlar elde edilecek şekilde üretici firmanın önerileri doğrultusunda (BACTEC TB System Product and Procedure Manual, Becton Dickinson and Company) sulandırılmış ve her BACTEC 12B besiyerine 0,1 ml ilave edilmiştir. Pozitif BACTEC 12B şişesindeki bakteri içeren besiyeri, enjektör ile alınıp verilmek suretiyle iyice karıştırılmış ve daha sonra 0,1 ml alınarak ilaç içeren her bir 12B şişesine aktarılmıştır. Kontrol şişesi için 1:100'lük dilüsyon gerektiğinden, süspansiyondan 0,1 ml alınarak 9,9 ml dilüsyon sıvısı içeren şişeye konmuş ve iyice karıştırıldıktan sonra, bu karışımdan tekrar 0,1 ml alınarak kontrol olarak kullanılacak BACTEC 12B şişesine aktarılmıştır. İnokülasyonlardan sonra bütün BACTEC 12B şişelerinin kapakları % 70'lik izopropil alkolle silinmiş ve ardından şişeler 37°C etüvde iki gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi boyunca şişeler her gün aynı saatte (± 2 saat) BACTEC 460 TB cihazında okutulmuş ve elde edilen GI değerleri not edilmiştir (29,113,136)

Tablo X. BACTEC 460 TB duyarlılık testinde liyofilize antibiyotiklerden stok solüsyon hazırlama ve BACTEC 12B besiyerindeki son antibiyotik konsantrasyonları (113)

Antibiyotik	Şişedeki liyofilize miktar	Sulandırım için steril distile su	Sulandırım sonrası konsantrasyon	BACTEC 12B'ye aktarılan miktar	BACTEC 12B'deki final konsantrasyon
İzoniazid	0,02 mg	5 ml	4 µg/ml	0,1 ml	0,1 µg/ml
Rifampisin	0,4 mg	5 ml	80 µg/ml	0,1 ml	2.0 µg/ml
Etambutol	1,5 mg	5 ml, sonra 1:3 dilüsyon	100 µg/ml	0,1 ml	2.5 µg/ml
Streptomisin	1,2 mg	5 ml, sonra 1:3 dilüsyon	80 µg/ml	0,1 ml	2.0 µg/ml

Sonuçların yorumlanması: Günlük okutulan GI ile bir önceki günün GI' sı arasındaki fark ΔGI olarak belirtilmektedir. Negatif ΔGI , üremede ve GI değerinde bir azalmayı gösterirken, pozitif ΔGI için tersi söz konusudur. Kontrol GI>30 üzerinde olduğunda 4. gün değerinden 3. gün değeri çıkarılmıştır. Sonuçlar aşağıdaki gibi değerlendirilmiştir.

ΔGI (kontrol) > ΔGI (ilaçlı) → duyarlı

ΔGI (kontrol) < ΔGI (ilaçlı) → dirençli

ΔGI (kontrol) > ΔGI (ilaçlı) → borderline (test tekrarlanmıştır)

Kalite Kontrol: Her antibiyotik duyarlılık test gününde *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) kalite kontrol kökeni de test edilmiştir. Bu kökenin test sonucunda test edilen antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlı olduğu saptanmıştır. *M. tuberculosis* H37Rv içeren kontrol şişesi üç-beş gün içinde 30'dan büyük bir GI değerine ulaşmıştır (29,113,136)

PZR-RFLP Yöntemi ile Mikobakteri Türlerinin İdentifikasyonu

Çalışma üç aşamada yapılmıştır:

1. Mikobakteri DNA'sının izole edilmesi.
2. Mikobakteri DNA'sının saptanması.

a-) *Mycobacterium tuberculosis complex*'e spesifik IS6110 PZR: Sadece tüberküloz basilleri kompleksini tanımlar.

b-) Tüm mikobakterilere spesifik 65 kilo daltonluk ısı şok proteini bölgesine ait PZR: Tüberküloz basilleri kompleksi dışındaki mikobakteriler de tiplendirilebilir.

c-) Agaroz jel elektroforezi

3. Tüm mikobakterilere spesifik 65 kilo daltonluk ısı şok proteini bölgesine ait PZR ürününün restriksiyon enzimleri ile kesilerek mikobakteri türlerinin belirlenmesi (137).

Mikobakteri DNA'sının İzole Edilmesi

Ekstraksiyon işlemi için BACTEC 12B şişeleri iyice vortekslenmiştir. Şişenin lastik tıpası % 70'lik izopropil alkol ile iyice silinmiştir. Üremiş kültürden 1 ml'lik enjektörle 0,5 ml alınıp 1,5 ml'lik eppendorf tüpüne konulmuştur. Löwenstein-Jensen'de üreyen *M. tuberculosis*'in DNA'sı izole edilecekse bir öze dolusu yeni üremiş koloni alınıp 500 µl distile suda süspansiyon yapılmış ve eppendorf üzerine hasta numarası yazılıp 500 µl örnek eppendorfa konulmuştur. Eppendorf parafilm ile sarılmıştır. Isı bloğunda (Techne, İngiltere) 80°C'de bir saat bekletilmiştir. Santrifüj cihazında (Hettich Mikro 120 Zentrifugen, Almanya) 14.000 devirde 15 dakika santrifüj edilmiştir. Üstteki süpernatant kısım pipetle çekilip atılmıştır. Üzerine 50 µl TE Buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA) ilave edilmiş ve 95°C'de 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra -20°C'de 15 dakika bekletilip 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üstteki süpernatant kısım başka bir eppendorfa konulmuştur. Hazır hale gelen ekstrakte ürün PZR çalışmasına kadar -20°C'de derin dondurucuda (Indesit, Türkiye) saklanmıştır.

Mikobakteri DNA'sının saptanması

Mycobacterium tuberculosis complex'e spesifik IS6110 PZR: Öncelikle *M. tuberculosis complex*'e spesifik IS6110 bölgesine ait primerler; T4: 5'-CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG -3' ve T5: 5'-CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG -3' kullanılarak klasik PZR yapılmıştır. Böylece *M. tuberculosis complex*'in atipik mikobakterilerden ayrımı yapılmıştır. *Mycobacterium tuberculosis complex*'e spesifik IS6110 PZR için termal cykler (eppendorf, A.B.D.) PZR siklusu: bir siklusta 94°C'de 5 dakika; 35 siklusta 94°C'de bir dakika, 60°C'de bir dakika, 72°C'de iki dakika ve bir siklusta 72°C'de sekiz dakika ve son olarak 4°C'de bekleme (137-139).

PZR karışımının hazırlanması:

Distile su	30,75	µl
PZR Bufer (10x konsantrasyonda) (Fermentas, Kanada)	5	µl
MgCl ₂ (25 mM) (Fermentas, Kanada)	3	µl
dNTP (10 mM) (Fermentas, Kanada)	1	µl
Primer 1 (10 pmol/ul) (Invitrogen, A.B.D.)	2,5	µl
Primer 2 (10 pmol/ul) (Invitrogen, A.B.D.)	2,5	µl
Taq polimeraz (5 U/ µl) (Fermentas, Kanada)	0,25	µl
<u>Örnek DNA</u>	<u>5</u>	<u>µl</u>
Toplam hacim	50	µl

Tüm mikobakterilere spesifik 65 kilo daltonluk ısı şok proteini bölgesine ait

PZR: Tüm mikobakterilerin PZR ile saptanması için TB11: 5' ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT-3' ve TB12: 5'-CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT-3' primerleri kullanılmıştır. Karışım 1.5 ml'lik reaksiyon tüpünde hazırlanmıştır.

PZR karışımının hazırlanması:

Distile su	30,75	µl
PZR Bufer (10x konsantrasyonda) (Fermentas, Kanada)	5	µl
MgCl ₂ (25 mM) (Fermentas, Kanada)	3	µl
dNTP (10 mM) (Fermentas, Kanada)	1	µl
Primer 1 (10 pmol/ul) (Invitrogen, A.B.D.)	2,5	µl
Primer 2 (10 pmol/ul) (Invitrogen, A.B.D.)	2,5	µl
Taq polimeraz (5 U/ µl) (Fermentas, Kanada)	0,25	µl
<u>Örnek DNA</u>	<u>5</u>	<u>µl</u>
Toplam hacim	50	µl

Karışım vorteksenerek karıştırılmıştır. Çalışılacak örnek sayısının çarpımı kadar hazırlanan karışım 45'er µl olarak örnek numaraları yazılmış 0,2 ml'lik (Thermal cycler'ın bloğuna bağlı olarak) eppendorf tüplerine dağıtılmıştır. Üzerine 5 µl mikobakteri DNA'sı eklenerek thermal cycler cihazına yerleştirilmiştir. Thermal cycler cihazında tüm mikobakterilere spesifik PZR Programı: 1 siklusa 94°C'de 5 dakika; 35 siklusa 94°C'de 1

dakika, 60°C’de 1 dakika, 72°C’de 2 dakika ve 1 siklusa 72°C ’de 8 dakika ve 4°C ’de bekleme (137,138,140).

PZR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi:

Üç gram (% 1.5’lik agaroz jel için) agaroz (Basica Le, Prona, İspanya) tartılıp 150 ml 0.5 x TBE tamponuna ilave edilmiştir. Stok 10x TBE bufer (50 gr Tris base, 27.5 gr Boric acid, 20 ml 0.5 M EDTA pH:8.0, bir litre distile suda eritilmiştir) 20 kez distile suda sulandırılarak 0.5x TBE bufer kullanma solüsyonu hazırlanmış ve 150 ml 0.5x TBE bufer behere konulmuştur. Üzerine tartılan agaroz eklenerek karıştırılmıştır. Mikrodalga fırında (Regal, Türkiye) 400 watt ısıda bir dakika tutulmuştur. Arada bir karıştırılarak agaroz eritilmiştir. Karıştırıldıktan sonra soğuması için beklenirken agaroz jelin döküleceği plak hazırlanmıştır. Örnek sayısına göre tarak yerleştirilmiştir. Bu sırada 50°C civarına kadar soğuyan 150 ml’lik agaroz 15 µl floresan boya içeren Syber Safe Invitrogen, A.B.D.) eklenmiştir. Karıştırıldıktan sonra jel dökülmüştür. Jel donduktan sonra (yaklaşık 30 dakika oda ısısında) plağın iki tarafındaki lastikler ve tarak çıkarılmıştır. Her örnek için plak üzerine bir µl yükleme solüsyonu (250 mg Bromophenol blue, üç ml gliserol, yedi ml distile su) 6x Loading dye (Fermentas, Kanada) konmuştur. Ardından 10’ar µl PZR ürünü bir µl yükleme solüsyonu ile karıştırıldıktan sonra sırayla agaroz jele yüklendikten sonra 100 voltta 40 dakika elektroforezde (Thermo, ABD) yürütülmüştür. Elektroforez durdurulduktan sonra jel görüntüleme sistemi ultraviyole transilluminatör (Vilber Lourmat, Almanya) ile görüntüler bilgisayara aktarılmış ve Bio1D jel analiz programı kullanılarak oluşan bantlar değerlendirilmiştir. Oluşan bantların moleküler ağırlıklarını tespit etmek için 100 bp DNA ladder (Fermentas, Kanada) kullanılmıştır. DNA ekstraksiyonu ve PZR’da pozitif kontrol olarak referans *M. tuberculosis* (H37Rv) ATCC 25618 kökeni ve negatif kontrol olarak distile su kullanılmıştır. Beklenen yerde bant görülen örnekler pozitif kabul edilmiştir (137,138).

Tüm Mikobakterilere Spesifik 65 Kilo Daltonluk Isı Şok Proteini Bölgesine Ait PZR Ürününün Restriksiyon Enzimleri ile Kesilerek Mikobakteri Türlerinin Belirlenmesi

Uygun (beklenen yerde ve yeterli yoğunlukta) bant görülen örneklerin 11’er µl’si *HaeIII* (*BsuRI*) ve *BstEII* (*Eco91I*) enzimleri ile kesilerek mikobakteri türleri identifiye edilmiştir.

*Hae*III ile PZR ürününün kesilmesi:

Distile su	2,0 µl
Bufer R ⁺ (Fermentas, Kanada)	1,5 µl
<i>Hae</i> III (10 ünite 0.5 µl) (Fermentas, Kanada)	0,5 µl
<u>PZR ürünü</u>	<u>11,0 µl</u>
Toplam	15,0 µl

*Bst*EII ile PZR ürününün kesilmesi:

Distile su	2,0 µl
Bufer R ⁺ (Fermentas, Kanada)	1,5 µl
<i>Bst</i> EII (10 ünite 0.5 µl) (Fermentas, Kanada)	0,5 µl
<u>PZR ürünü</u>	<u>11,0 µl</u>
Toplam	15,0 µl

Enzim ve bufer karışımları örnek sayısınca hazırlandıktan sonra 0,2 ml'lik eppendorf tüplerine dörder µl olarak bölünmüştür. Üzerlerine 11'er µl PZR ürünü eklenmiştir ve 37°C'de dört saat thermal cycler'da tutulmuştur. Daha sonra mikobakteri türlerinin identifikasyonu için restriksiyon enzimleri ile kesilen ve kesilmeyen ürünler birlikte % 3'lük agaroz jelde yürütülmüştür. PZR ürününün kesilmesi ile ortaya çıkan bantlar değerlendirilerek mikobakteri türleri identifiye edilmiştir. Çalışmada kontrol kökeni olarak *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) ATCC 25618 kullanılmıştır. *Mycobacterium tuberculosis*'in PZR-RFLP ile identifikasyonunda; *Bst*EII enzimi ile 240/120/85 bç'de bantlar oluşurken, *Hae*III enzimi ile 150/130/70 bç'de bantlar oluşmuştur (137,140,141). Tablo XI'de mikobakterilerin PZR-RFLP ile identifikasyonunda, enzim kesme ile değerlendirilmesi gösterilmiştir.

Tablo XI. PZR-RFLP ile mikobakterilerin identifikasyonu (137)

<i>Bst</i> EI	<i>Hae</i> III	Türlerin Adı	<i>Bst</i> EI	<i>Hae</i> III	Türlerin Adı
440	170-130-0	<i>M. trivale</i> type 1	240-210	125-110-0	<i>M. interjectum</i> type 1
	160-85-55	<i>M. flavescens</i> type 3		120-115-110	<i>M. intracellulare</i> type 4
	145-130-0	<i>M. lentiflavum</i> type 1	240-135-80	110-105-0	<i>M. asiaticum</i> type 1
	140-100-90	<i>M. new</i> type 1			
	140-55-50	<i>M. flavescens</i> type 1		140-105-70	<i>M. shimodei</i> type 1
	130-115-70-55	<i>M. aurum</i> type 2		160-85-55	<i>M. species</i> type 1
	130-110-0	<i>M. new</i>		145-140-100-60	<i>M. peregrinum</i> type 3
	130-105-70	<i>M. szulgai</i> type 1		145-125-60	<i>M. smegmatis</i> type 1
				130-105-80	<i>M. celatum</i> type 2
325-130	200-60-55	<i>M. chelonae</i> type 1	240-130-85	130-105-70	<i>M. gastrit</i> type 1
	160-110-0	<i>M. haemoophilum</i> type 1		130-105-0	<i>M. kansasii</i> type 2
325-120	185-140-0	<i>M. terrae</i> type 1		130-100-75	<i>M. kansasii</i> type 6
	170-40-0	<i>M. neoaurum</i> type 1		130-90-70	<i>M. kansasii</i> type 3
	145-130-50	<i>M. simiae</i> type 4		130-95	<i>M. lentiflavum</i> type 4
	140-85-55	<i>M. chitae</i> type 1	240-120-100	165-115-0	<i>M. gordonae</i> type 9
	140-60-55	<i>M. nonchromogenicum</i> type 2		160-110-60	<i>M. gordonae</i> type 7
	130-115-60	<i>M. gordonae</i> type 4		145-130-60	<i>M. intracellulare</i> type 1
	130-110-70-55	<i>M. gordonae</i> type 8		145-130-0	<i>M. lentiflavum</i> type 3
	130-105-0	<i>M. genavense</i> type 1		140-105-80	<i>M. maffmoense</i> type 1
	130-95-75-60	<i>M. kansasii</i> type 5		140-60-0	<i>M. hibemae</i> type 1
				130-110-0	<i>M. gordonae</i> type 3
				130-95-60	<i>M. intracellulare</i> type 4
240-210	200-70-60	<i>M. abscessus</i> type 1	240-120-85	220-110-0	<i>M. gordonae</i> type 2
	180-135-70-50	<i>M. thermoresidibite</i> type 1		185-140-50	<i>M. senegalense</i> type 1
	180-130-0	<i>M. simiae</i> type 1		160-115-60	<i>M. gordonae</i> type 1
	180-100-50	<i>M. new</i> type 1		160-105-60	<i>M. xenopi</i> type 1
	145-140-100-55	<i>M. peregrinum</i> type 1		150-130-70	<i>M. tuberculosis complex</i>
	145-130-95	<i>M. scrofulaceum</i> type 1		150-60-55	<i>M. nonchromogenicum</i> type 1
	145-130-0	<i>M. intracellulare</i> type 1		145-120-55-50	<i>M. fortuitum</i> type 1
	145-105-80	<i>M. marinum</i> type 1		140-125-55-50	<i>M. faridnogenes</i> type 1
	145-105-60	<i>M. new</i> type 1		140-95-90	<i>M. fortuitum</i> type 2
	145-70-60-50	<i>M. abscessus</i> type 1		130-115-70-50	<i>M. kansasii</i> type 4
	140-120-100-60	<i>M. peregrinum</i> type 2			
	140-105-80	<i>M. intracellulare</i> type 2			
	140-80-60-50	<i>M. phlei</i> type 1			
	130-115-0	<i>M. gordonae</i> type 5			
	130-105-80	<i>M. kansasii</i> type 1			
	130-105-60	<i>M. avium</i> type 1			
	130-105-0	<i>M. avium</i> type 2			
	130-80-60	<i>M. cetatum</i> type 1			

Tüberküloz Direnç Kiti ile *M. tuberculosis complex*'in İdentifikasyonu ve İlaç Direnç (İzoniazid, Rifampisin, Streptomisin, Aminoglikozidler ve Kinolonlar) Genlerinin Saptanması

DNA ekstraksiyonu

BACTEC 12B sıvı besiyerinden direkt bir ml kültür alınmış ve 15 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısım atılmış ve bakteri pelleti 200 µl distile su içerisinde vortekslenerek çözülmüştür. Hazırlanan bakteri süspansiyonları 95 °C'de 20 dakika ısı bloğunda inkübe edilmiştir. Ardından 15 dakika ultrasonik su banyosunda (Elma, Türkiye) sonike edilmiştir. Örnekler beş dakika 14.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatandan 5 µl alınarak PZR için kullanılmıştır.

PZR karışımının hazırlanması

PN-mix (TB-Res1 resp. TB-Res2)	15,0 µl
10x polymerase buffer	2,5 µl
MgC ₂ solüsyonu (Toplam konsantrasyon 1,5 mM MgCl ₂)	2,5 µl
Thermostable DNA polymerase	0,3 µl
Örnek DNA (yaklaşık 150 - 300 ng)	5,0 µl
Toplam hacim	25,3 µl

Thermal cycler program

Bir siklusta 95 °C'de 5 dakika; 14 siklusta 95 °C'de 30 saniye, 60 °C'de iki dakika; 26 siklusta 95 °C'de 10 saniye 55°C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniye; bir siklusta 72°C'de sekiz dakika ve 4°C'de bekleme olarak PZR programı termal cycler'de ayarlanmıştır.

Test prosedürü

Üretici firmanın önerilerine göre; öncelikle hibridizasyon tamponu ve Stringent yıkama solüsyonu çözüldükten sonra 47°C'ye getirilmiş, ayrıca diğer tüm solüsyonlar oda ısısına getirilmiştir. Ardından 5X konsantrasyondaki hibridizasyon tamponu ve rinse solüsyonu distile su ile 1X konsantrasyona getirilmiştir. İnkübasyon tepsilerinin işaretli

kuyucuklarına pipetle 40 µl denatürasyon reagent eklenmiştir. Denatürasyon reagent'e PZR karışımların (TB-Res1 resp. TB-Res2) her amplikonundan 20 µl eklenmiş, karışım iyice pipetlenmiş ve oda ısısında beş dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra bir ml hibridizasyon solüsyonu eklenmiştir. Stripler yerleştirilmiştir. Isıtma ve çalkalama cihazı (TwinCubator, Almanya)'nda 30 dakika 47°C'de 300 rpm hızında çalkalanmıştır. Hibridizasyon tamponu tamamen dökülmüştür ve sonra bir ml önceden ısıtılmış Stringent yıkama solüsyonu ile stripler bir dakika yıkanmış ve solüsyon dökülmüştür. Bu işlem üç kere tekrar edilmiştir. Üçüncü işlemde inkübasyon süresi 15 dakikadır. Daha sonra 25 °C'de bir ml 1X Rinse solüsyonu ile bir dakika kuyucuklardaki stripler yıkanmıştır. Bir ml 1:100'lük konjugat buffer eklenip 30 dakika inkübe edilmiştir. Üç kere bir ml rinse solüsyonu ile birer dakika yıkanmıştır. Bir ml substrat eklenip ve 10-12 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra distile su ile reaksiyon durdurulmuştur. Striplerde oluşan bantlara göre *M. tuberculosis complex* identifikasyonu ve antibiyotik direnç genleri saptanmıştır. Kalite kontrol kökeni olarak *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) kullanılmıştır. Bu köken test edilen antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlı bulunmuştur.

Verilerin istatistiksel analizi

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için istatistik SPSS 14.0 paket programı kullanılmıştır. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metotların (Ortalama, Standart Sapma) yanı sıra niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Ki-kare testi kullanılmıştır. Niceliksel verilerin karşılaştırılmasında iki grup durumunda, normal dağılım gösteren parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Bağımsız Örnekler (Independent Samples) t testi kullanılmıştır. Sonuçlar % 95'lik güven aralığında, anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Çalışmamızda, 1 Ocak 2009-1 Haziran 2010 tarihleri arasında Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi ve Aydın ili Verem Savaş Dispanseri'ne başvuran TB hastalarının klinik örneklerden izole edilen toplam 63 *Mycobacterium tuberculosis* kökeni çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışma kapsamına alınan bu 63 (% 26,8) *Mycobacterium tuberculosis* kökeninin identifikasyonunda NAP, PZR IS6110, PZR-RFLP, antitüberküloz ilaç direncinin saptanmasında BACTEC 460 TB sistemi ve TB direnç kiti kullanılmıştır. Kültürde *Mycobacterium tuberculosis*'in üremesi saptandığında fenotipik yöntem BACTEC 460 TB sistemi ile antibiyotik duyarlılık testleri yapılmış ve genotipik yöntem TB Direnç Kiti ile antiyotik direnç genleri saptanmıştır.

Çalışmaya dahil edilen toplam 63 hastanın 48'i (% 76,2) erkek, 15'i (% 23,8) kadındır. Erkek/kadın oranı 3,2'dir. Tüm hastalar Aydın ilinde yaşamaktadır. Tablo XII'de hastaların cinsiyete göre dağılımı gösterilmiştir.

Tablo XII. Hastaların cinsiyete göre dağılımı

Cinsiyet	Sayı (%)	χ^2	p
Erkek	48 (% 76,2)	17.286	0.000
Kadın	15 (% 23,8)		
Toplam	63 (% 100,0)		

χ^2 : Ki-kare testi, $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı

Tüberküloz hastalarında erkeklerin oranı kadınlara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.000$, $p < 0,05$, $\chi^2 = 17.286$).

Çalışmaya dahil edilen toplam 63 hastanın yaşları 13 ile 85 (ortalama $46,4 \pm 18,5$) arasındaydı.

Çalışmaya dahil edilen toplam 63 hastanın biri (% 1,6) 5-14 yaşları arasında, dokuzu (% 14,3) 15-24 yaşları arasında, dokuzu (% 14,3) 25-34 yaşları arasında, sekizi (% 12,7) 35-44 yaşları arasında, 19'u (% 30,2) 45-54 yaşları arasında, dördü (% 6,3) 55-64

yaşları arasında ve 13'ü (% 20,6) 65 yaş ve üzerindedir. Tablo XIII'de TB olgularının yaş gruplarına ve cinsiyete göre dağılımı gösterilmiştir.

Tablo XIII. Tüberküloz olgularının yaş gruplarına ve cinsiyete göre dağılımı

YAŞ GRUBU	Erkek	Kadın	Toplam
	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)
0-4	0 (% 0,0)	0 (% 0,0)	0 (%0,0)
5-14	1 (% 2,1)	0 (% 0,0)	1 (% 1,6)
15-24	6 (% 12,5)	3 (% 20,0)	9 (%14,3)
25-34	5 (% 10,4)	4 (% 26,7)	9 (%14,3)
35-44	6 (% 12,5)	2 (% 13,2)	8 (%12,7)
45-54	18 (% 37,5)	1 (% 6,7)	19 (%30,2)
55-64	3 (% 6,3)	1 (% 6,7)	4 (%6,3)
>65	9 (% 18,7)	4 (% 26, 7)	13 (%20,6)
TOPLAM	48 (% 100,0)	15 (% 100)	63 (% 100,0)

Çalışmaya dahil edilen hastalarda 45-54 yaş oranı (%30,2) yüksek bulunurken, 5-14 yaş oranı (%1,6) anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p=0.001$, $p<0,05$, $\chi^2=22.889$).

Çalışmaya dahil edilen toplam 63 hastanın dördü (% 6,3) okur-yazar değil, biri (% 1,6) okur-yazar, 32'si (% 50,8) ilkokul, sekizi (% 12,7) ortaokul, 13'ü (% 20,6) lise, beşi (% 7,9) yüksekokul mezunuydu. Tablo XIV'de hastaların öğrenim durumlarına göre dağılımı gösterilmiştir.

Tablo XIV. Hastaların öğrenim durumuna göre dağılımı

Öğrenim Durumu	Sayı (%)	χ^2	p
Okur-yazar değil	4 (% 6,3)	60.714	0.000
Okur-yazar	1 (% 1,6)		
İlkokul	32 (% 50,8)		
Ortaokul	8 (% 12,7)		
Lise	13 (% 20,6)		
Yüksekokul	5 (% 7,9)		
Toplam	63 (% 100,0)		

χ^2 : Ki-kare testi, $p<0.05$ düzeyinde anlamlı

Çalışmaya dahil edilen hastalarda ilkokul mezunu olma oranı (%50,8); diğer eğitim düzeylerine göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. ($p=0.000$, $p<0,05$, $\chi^2=60.714$).

Çalışmaya dahil edilen toplam 63 hastanın altısı (% 9,5) çok düşük, 17 (% 27,0) düşük, 35'i (% 55,6) orta, dördü (% 6,3) iyi, biri (% 1,6) yüksek gelir düzeyine sahipti. Tablo XV'de hastaların gelir durumuna göre dağılımı gösterilmiştir.

Tablo XV. Hastaların gelir durumuna göre dağılımı

Gelir Durumu	Sayı (%)	χ^2	p
Çok düşük	6 (% 9,5)	61,365	0,000
Düşük	17 (% 27,0)		
Orta	35 (% 55,6)		
İyi	4 (% 6,3)		
Yüksek	1 (% 1,6)		
Toplam	63 (% 100,0)		

χ^2 : Ki-kare testi, $p<0.05$ düzeyinde anlamlı

Çalışmaya dahil edilen hastalarda gelir düzeyi orta olma oranı (%55,6); diğer gelir düzeylerine göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0,000$, $p<0,05$, $\chi^2=61,365$).

Çalışmaya dahil edilen toplam 63 hastanın dördü (% 6,3) daha önce tedavi almış (eski olgu), 59'u (% 93,7) daha önce tedavi almamış (yeni olgu) hastalardı. Tablo XVI'da hastaların daha önce aldıkları tedavi durumuna (yeni olgu/eski olgu) göre dağılımları gösterilmiştir.

Tablo XVI. Hastaların daha önce aldıkları tedavi durumuna (yeni olgu/eski olgu) göre dağılımı

Daha önce tedavi	Sayı (%)
Var (eski olgu)	4 (% 6,3)
Yok (yeni olgu)	59 (% 93,7)
Toplam	63 (% 100,0)

χ^2 : Ki-kare testi, $p<0.05$ düzeyinde anlamlı

Çalışmaya dahil edilen toplam 63 hastanın 13'ünde (% 20,6) temas öyküsü varken, 50'sinde (% 79,4) temas öyküsü yoktu. Tablo XVII'de TB hastalarının temas öyküsüne göre dağılımları gösterilmiştir.

Tablo XVII. Hastaların temas öyküsüne göre dağılımı

Temas öyküsü	Sayı (%)
Var	13 (% 20,6)
Yok	50 (% 79,4)
Toplam	63 (% 100,0)

χ^2 : Ki-kare testi, $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı

Toplam 63 hastaya ait klinik örneğin; 56'sı (% 88,9)'u balgam, beşi (% 7,9) bronş lavajı, biri BAL (bronkoalveolar lavaj) ve biri AMS (açlık mide suyu) yedisi (% 3,0) AMS (açlık mide suyu) idi. Çalışmada TB hastalarından toplanan toplam balgam örnek sayısı diğer klinik örneklerden daha yüksekti. Tablo XVIII'de alınan örneklerin dağılımı gösterilmiştir.

Tablo XVIII. Alınan örneklerin dağılımı

Örnek	Sayı (%)
Balgam	56 (% 88,9)
Bronş Lavajı	5 (% 7,9)
BAL	1 (% 1,6)
AMS	1 (% 1,6)
Toplam	63 (% 100,0)

BAL: Bronkoalveolar lavaj, AMS: Açlık mide suyu

Tablo XIX'da ARB ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması gösterilmiştir.

Tablo XIX. ARB ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması

		Kültür Pozitif
		Sayı (%)
ARB	Negatif	18 (% 7,6)
	Pozitif	45 (% 19,1)
	Toplam	63 (% 26,8)

ARB: Asidorezistan basil, LJ: Löwenstein-Jensen

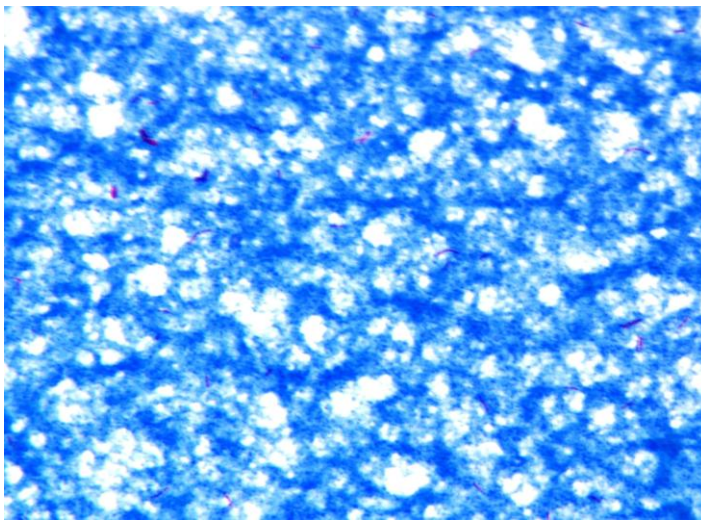
Kültüründe *M. tuberculosis complex* üreyen hastaların ARB sonuçları değerlendirildiğinde; olguların yedisinde (% 11,1) ARB (++++), dokuzunda (% 14,3) ARB (+++), 19’unda (% 30,1) ARB (++) , 10’unda (% 15,9) ARB (+) saptanırken, 18 (% 28,6) hastada ARB negatif bulunmuştur. Tablo XX’de kültür pozitif hastalarda ARB sonuçları gösterilmiştir.

Tablo XX. Kültür pozitif hastalarda ARB sonuçları

Mikroskopik Değerlendirme (ARB)	Sayı (%)
Negatif	18 (% 28,6)
(+)	10 (% 15,9)
(++)	19 (% 30,1)
(+++)	9 (% 14,3)
(++++)	7 (% 11,1)

ARB: Asidorezistan basil

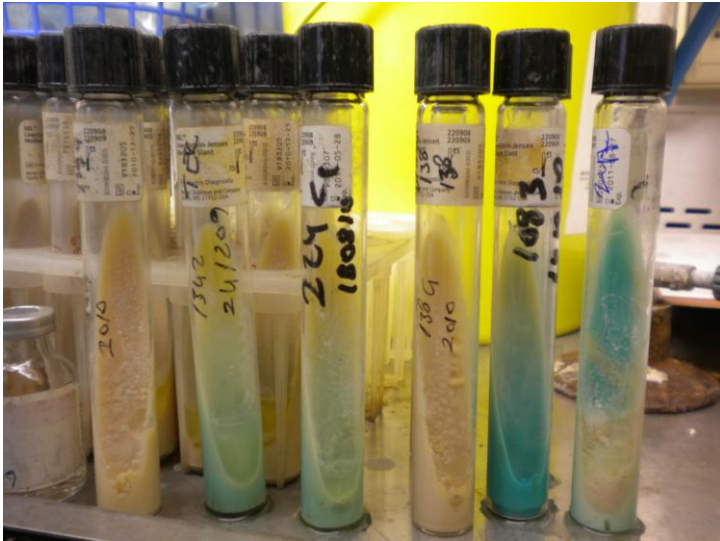
Resim 4’de çalışmamızda Ehrlich-Ziehl-Neelsen boyama yöntemi ile boyanan asidorezistan bakteriler, resim 5’de Auramine-Rhodamine boyama yöntemi ile boyanan asidorezistan bakteriler ve resim 6’da Löwenstein-Jensen besiyerinde üreyen *M. tuberculosis* kolonileri gösterilmiştir.



Resim 4. Çalışmamızda Ehrlich-Ziehl-Neelsen boyama yöntemi ile boyanan asidorezistan bakteriler (100X büyütme objektif, ışık mikroskobu)



Resim 5. Çalışmamızda Auramine-Rhodamine boyama yöntemi ile boyanan asidorezistan bakteriler (40X büyütmeli objektif, floresan mikroskobu)



Resim 6. Çalışmamızda Löwenstein-Jensen besiyerinde üreyen *Mycobacterium tuberculosis* kolonileri

Çalışmamızda *M. tuberculosis*'in kültürde üremesi altın standart olarak kabul edildiğinde; ARB'nin duyarlılığı % 71,4, özgüllüğü % 100,0, yalancı negatif oranı % 28,6, yalancı pozitif oranı % 0,0, doğruluğu % 92,3, prevalansı % 26,8, pozitif kestirim (öngörü) değeri % 100,0 ve negatif kestirim değeri % 90,5 olarak bulunmuştur.

Çalışmaya dahil edilen toplam 63 hastanın klinik örneklerinin kültüründe *M. tuberculosis*'in BACTEC 12B'de üreme süreleri 8-25 (ortalama 16,1) gün, LJ'de üreme

süreleri 21-40 (ortalama 28,7) gün olarak saptanmıştır. Tablo XXI’de *M. tuberculosis*’in BACTEC 12B ve LJ’de üreme süreleri (gün) gösterilmiştir.

Tablo XXI. *Mycobacterium tuberculosis*’in BACTEC 12B ve Löwenstein-Jensen’de üreme süreleri (gün)

Kültür Yöntemi	Minimum Üreme Süresi (gün)	Maksimum Üreme Süresi (gün)	Ortalama Üreme Süresi (gün)
BACTEC 12B	8	25	16,1
LJ	21	40	28,7

LJ: Löwenstein-Jensen

Çalışmaya dahil edilen toplam 63 hastanın klinik örneklerinin ARB yayması negatif, (+), (++) , (+++) ve (++++) durumlarına göre, ortalama üreme gün sayıları sırasıyla BACTEC 460 TB kültür sisteminde 23,0, 16,0, 14,6, 11,1 ve 8,9 gün ve LJ besiyerinde 37,1, 27,7, 26,3, 23,6 ve 22,0 gün olarak saptanmıştır. Tablo XXII’de ARB sonuçları ile *M. tuberculosis*’in kültürde üreme zamanı arasındaki ilişki gösterilmiştir.

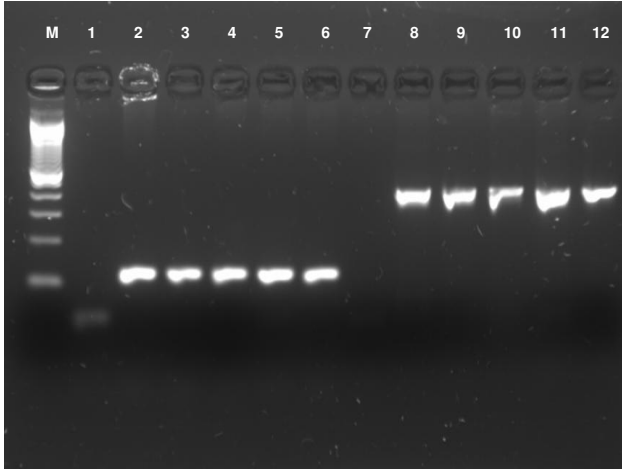
Tablo XXII. ARB sonuçları ile *M. tuberculosis*’in kültürde ortalama üreme süreleri (gün) arasındaki ilişki

Mikroskopik Değerlendirme (ARB)	Kültür	
	BACTEC 12B	LJ
Negatif	23,0	37,1
(+)	16,0	27,7
(++)	14,6	26,3
(+++)	11,1	23,6
(++++)	8,9	22,0

ARB: Asidorezistan basil, LJ: Löwenstein-Jensen

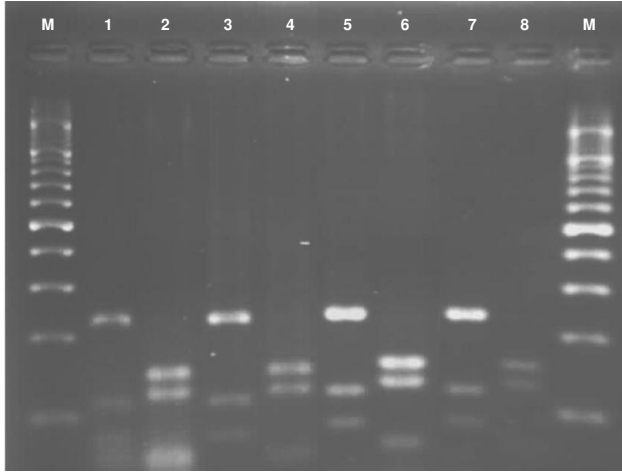
Çalışmada *M. tuberculosis complex*’in identifikasyonunda kullanılan fenotipik yöntem NAP testi ile genotipik yöntem PZR IS6110, PZR-RFLP ve TB Direnç Kiti yöntemlerinin dördü de *M. tuberculosis complex*’in identifikasyonunda % 100 uyumlu bulunmuştur. Bu dört yöntem de pozitif kontrolleri ve *M. tuberculosis complex*’i doğru olarak tanımlamıştır.

Çalışmada kullanılan genotipik yöntemlerle elde edilen sonuçlar Şekil 5,6,7’de gösterilmiştir.



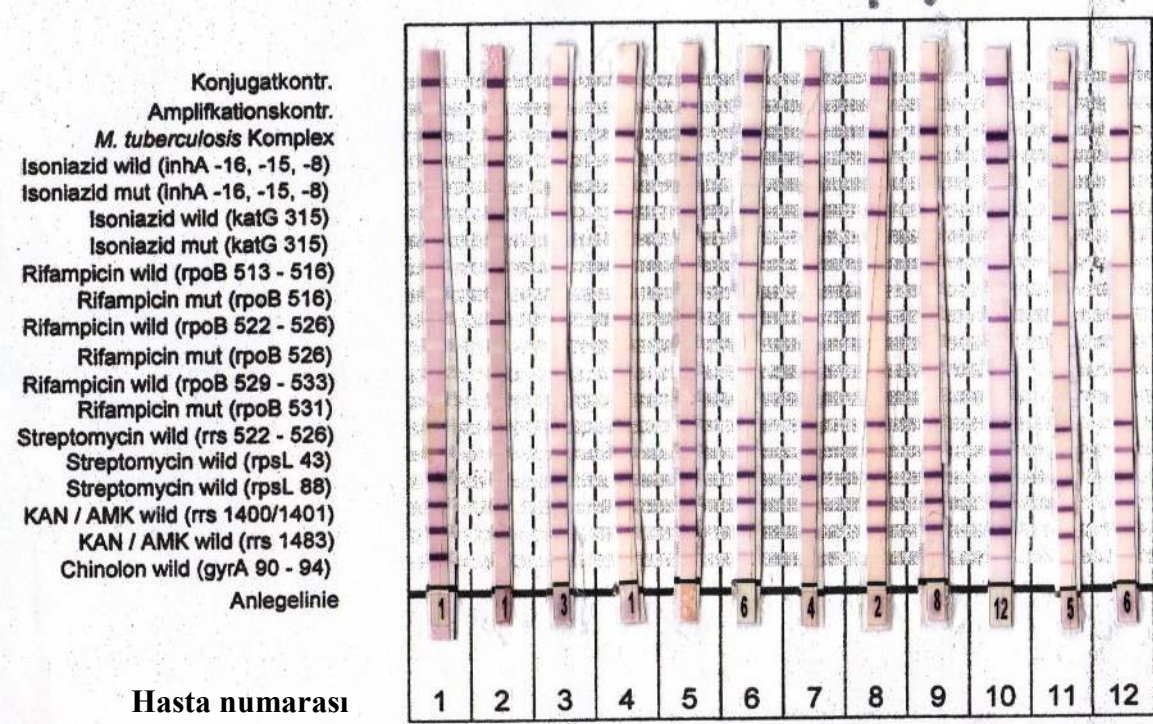
M: 100 bç Marker, 1,7: Negatif kontrol, 2,8: Pozitif kontrol, 3-6: *Mycobacterium tuberculosis* complex’e ait IS6110 PZR (235 bç), 9-12: Tüm mikobakterilerde bulunan ısı şok proteini (631bç)

Resim 7. *Mycobacterium tuberculosis* complex’e spesifik IS6110 PZR ve tüm mikobakterilere spesifik 65kDa’luk ısı şok proteini bölgesine ait sonuçların % 2’lik agarozdaki görüntüsü



PZR-RFLP ile kontrol ve klinik örneklerde *Mycobacterium tuberculosis* kökenlerinin *HaeIII* ve *BstEII* ile kesilmesinden sonra oluşan bantlar aynıdır. M: 100 bç Marker, 1,3,5,7: *BstEII* enzimi, 2,4,6,8: *HaeIII* enzimi 1,2: Pozitif kontrol, 3-8: *Mycobacterium tuberculosis* klinik kökenler

Resim 8. *Mycobacterium tuberculosis* (*BstEII* enzimi: 240/120/85 bç, *HaeIII* enzimi: 150/130/70 bç)’de ısı şok proteinini kodlayan gen bölgesinin ampifikasyon ürününün *HaeIII* ve *BstEII* enzimleri ile kesilmesi sonucu elde edilen bant paternlerinin % 3’lük agarozdaki görüntüleri



1: izoniazid (*katG* 315) mutasyonu, 2: streptomisin (*rpsL* 43 ve *rpsL* 88) mutasyonu, kinolon (*gyrA* 90-94) mutasyonu, 7,8: kinolon (*gyrA* 90-94) mutasyonu, 10: izoniazid (*inhA* 16,15,8) mutasyonu, 3,4,5,6,9,12: mutasyon yok

Resim 9. Tüberküloz Direnç Kiti stripleri ile *Mycobacterium tuberculosis* kökenlerinde direnç mutasyonlarının saptanması

Çalışmaya dahil edilen toplam 63 hastanın ikisinde (% 3,2) BACTEC 460 TB ile antitüberküloz ilaçlardan birine karşı direnç saptanmıştır. BACTEC 460 TB ile antitüberküloz ilaçlara direnç araştırılırken ÇİD TB saptanmamıştır. *Mycobacterium tuberculosis complex* kökenlerinde BACTEC 460 TB ile antitüberküloz ilaçlara direnç paternlerinin dağılımı Tablo XXIII'de gösterilmiştir.

Tablo XXIII. *Mycobacterium tuberculosis complex* kökenlerinde BACTEC 460 TB ile antitüberküloz ilaçlara direnç paternlerinin dağılımı

Test edilen İlaçlar		Sayı (%)
İsoniazid	Dirençli	1 (% 1,6)
	Hassas	62 (% 98,4)
Rifampisin	Hassas	63 (% 100,0)
Streptomisin	Dirençli	1 (% 1,6)
	Hassas	62 (% 98,4)
Etambutol	Hassas	63 (% 100,0)

χ^2 : Ki-kare testi, $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı

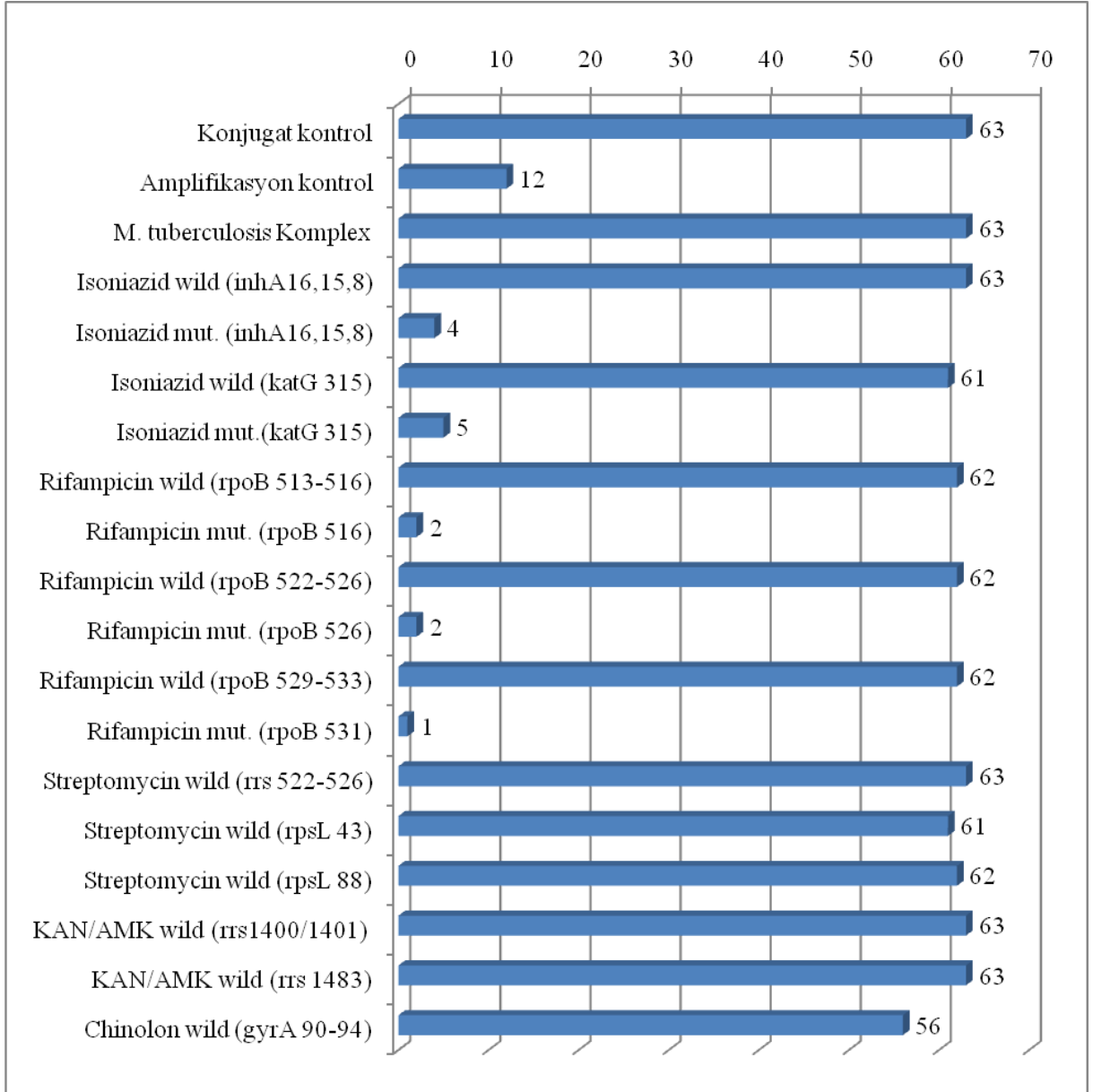
Çalışmamızda kültürde üreyen 63 *Mycobacterium tuberculosis* kökeninin, ilaç direncine neden olan mutasyonların saptanmasında TB Direnç Kiti kullanılmıştır. Çalışılan tüm örneklerde konjugat kontrol ve *M. tuberculosis complex* bantları pozitif olarak görülmüştür. Amplifikasyon kontrol bandı incelendiğinde 12 (% 19) hastada bant gözlenirken 51 (% 81) hastada bant gözlenmemiştir.

Çalışılan 63 örneğin 16'sında (% 25,4) dirence neden olan mutasyon saptanırken, 47'sinde (% 74,6) mutasyon saptanmamıştır. Saptanan mutasyonlar değerlendirildiğinde: yedi (% 11,1) kinolon (*gyrA* 90-94) mutasyonu, beş (% 7,9) INH mutasyonu (*katG* 315), dört (% 6,3) INH mutasyonu (*inhA* 16,15,8), iki (% 3,2) RIF mutasyonu (*rpoB* 516), iki (% 3,2) RIF mutasyonu (*rpoB* 526), bir (% 1,6) RIF mutasyonu (*rpoB* 513-516) , bir (%1,6) RIF mutasyonu (*rpoB* 522-526), bir RIF mutasyonu (*rpoB* 529-533), iki (% 3,2) SM mutasyonu (*rpsL* 43), bir (% 1,6) SM mutasyonu (*rpsL* 88) saptanmıştır.

Saptanan mutasyonların kökenlere göre dağılımına bakıldığında; bir kökende RIF mutasyonu (*rpoB* 516), kinolon mutasyonu (*gyrA* 90-94); bir kökende SM mutasyonu (*rpsL* 43), SM mutasyonu (*rpsL* 88), kinolon mutasyonu (*gyrA* 90-94); bir kökende INH mutasyonu (*katG* 315), RIF mutasyonu (*rpoB* 513-516), RIF mutasyonu (*rpoB* 526), SM mutasyonu (*rpsL* 43); iki kökende INH mutasyonu (*inhA* 16,15,8); bir kökende INH mutasyonu (*katG* 315), RIF mutasyonu (*rpoB* 526); iki kökende kinolon mutasyonu (*gyrA* 90-94); bir kökende INH mutasyonu (*inhA* 16,15,8), kinolon mutasyonu (*gyrA* 90-94); bir kökende INH mutasyonu (*katG* 315), kinolon mutasyonu (*gyrA* 90-94); bir kökende RIF mutasyonu (*rpoB* 526); bir kökende INH mutasyonu (*inhA* 16,15,8), RIF mutasyonu (*rpoB* 516); bir kökende INH mutasyonu (*inhA* 16,15,8), INH mutasyonu (*katG* 315); bir kökende RIF mutasyonu (*rpoB* 526), RIF mutasyonu (*rpoB* 522-526), RIF mutasyonu (*rpoB* 531), RIF mutasyonu (*rpoB* 529-533); bir kökende INH mutasyonu (*katG* 315); bir kökende RIF mutasyonu (*rpoB* 531), kinolon mutasyonu (*gyrA* 90-94) saptanmıştır. XXIV ve Şekil 5'de TB Direnç Kiti ile antibiyotik direncine sebep olan mutasyonların dağılımı ve Tablo XXV'de TB Direnç Kiti ile TB hastalarında saptanan antitüberküloz ilaçlara karşı direnç mutasyon oranları gösterilmiştir.

Tablo XXIV. Tüberküloz Direnç Kiti ile antibiyotik direncine sebep olan mutasyonların dağılımı

Bant	Sonuç	Sayı (%)
Konjugat kontrol	+	63 (% 100,0)
Amplifikasyon kontrol	-	51 (% 81,0)
	+	12 (% 19,0)
M. tuberculosis complex	+	63 (% 100,0)
Isoniazid wild (inhA 16,15,8)	+	63 (% 100,0)
Isoniazid mut (inhA 16,15,8)	-	59 (% 93,7)
	+	4 (% 6,3)
Isoniazid wild (katG 315)	-	2 (% 3,2)
	+	61 (% 96,8)
Isoniazid mut.(katG 315)	-	58 (% 92,1)
	+	5 (% 7,9)
Rifampicin wild (rpoB 513-516)	-	1 (% 1,6)
	+	62 (% 98,4)
Rifampicin mut (rpoB 516)	-	61 (% 96,8)
	+	2 (% 3,2)
Rifampicin wild (rpoB 522-526)	-	1 (% 1,6)
	+	62 (% 98,4)
Rifampicin mut (rpoB 526)	-	61 (% 96,8)
	+	2 (% 3,2)
Rifampicin wild (rpoB 529-533)	-	1 (% 1,6)
	+	62 (% 98,4)
Rifampicin mut (rpoB 531)	-	62 (% 98,4)
	+	1 (% 1,6)
Streptomycin wild (rrs 522-526)	+	63 (% 100,0)
Streptomycin wild (rpsL 43)	-	2 (% 3,2)
	+	61 (% 96,8)
Streptomycin wild (rpsL 88)	-	1 (% 1,6)
	+	62 (% 98,4)
KAN/AMK wild (rrs1400/1401)	+	63 (% 100,0)
KAN/AMK wild (rrs 1483)	+	63 (% 100,0)
Chinolon wild (gyrA 90-94)	-	7 (% 11,1)
	+	56 (% 88,9)



Şekil 5. Tüberküloz Direnç Kiti ile antibiyotik direncine sebep olan mutasyonların dağılımı

Tablo XXV. Tüberküloz Direnç Kiti ile tüberküloz hastalarında saptanan antitüberküloz ilaçlara karşı direnç mutasyon oranları

	Sayı (%)
Vakaların sayısı	63 (% 100,0)
Mutasyon yok	47 (% 74,6)
En az bir ilaca direnç mutasyonu	16 (% 25,4)
Toplam mutasyon oranları	
INH	9 (% 14,3)
RIF	7 (% 11,1)
SM	2 (% 3,2)
Kinolon	7 (% 11,1)
Tek ilaca karşı direnç mutasyonu	
INH	4 (% 6,3)
RIF	2 (% 3,2)
Kinolon	2 (% 3,2)
İki ilaca karşı direnç mutasyonu	
INH+RIF	2 (% 3,2)
INH+Kinolon	2 (% 3,2)
RIF +Kinolon	2 (% 3,2)
SM+Kinolon	1 (% 1,6)
Üç ilaca karşı direnç mutasyonu	
INH+RIF+SM	1 (% 1,6)

INH: İzoniazid, RIF: Rifampisin, SM: Streptomisin

TARTIŞMA

Tüberküloz dünya genelinde önemli bir halk sağlığı sorunudur (29,30,142). Dünya Sağlık Örgütü dünya nüfusunun üçte birinin *M. tuberculosis* ile infekte olduğunu tahmin etmektedir. *Mycobacterium tuberculosis* infeksiyonunun gerçek global prevalansı yaklaşık 1,9 milyar (% 32) kişidir. Her yıl yaklaşık sekiz milyon yeni TB olgusunun, 3,5 milyonunun balgam yayması pozitifdir ve bunlardan iki-üç milyonunun öldüğü bildirilmektedir (3,77,143). Bu bireylerin büyük bir kısmı düşük ve orta gelirli ülkelerde yaşamaktadır. İnfeksiyonun yayılma riski için en önemli faktör, toplumda balgam yayması pozitif olguların prevalansıdır. Bulaştırıcılığı en yüksek olan olgular; kaviteli, öksürükle basil çıkaran, balgam yaymasında basil pozitif olan olgulardır. Dolayısı ile bu risk sadece erken tanı ve etkili tedavi programlarının uygulanması ile azaltılabilir (77,144).

Tüberküloz önemli bir ölüm nedeni olmaya devam etmektedir (29,30,145). Epidemiyolojik araştırmalar, global olarak yeni vaka sayılarının arttığını, fakat daha fazla sayıda insanın tedavi edildiğini ve ölüm oranlarının azaldığını göstermektedir. Tüberkülozun küresel kontrolünde DSÖ 1997 yılından itibaren her yıl rapor yayınlamaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2010 hedefleri; yayma pozitif olguların % 70'ini saptamak ve bu olguların % 85'ini başarıyla tedavi etmek, 2015 yılında TB insidansını azaltmak ve TB prevalansını ve ölüm oranlarını 1990 ile 2015 yılları arasında yarıya indirmektir (146).

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, 2006 yılında 9,2 milyon yeni pulmoner TB vakası olduğu (vaka oranı 139/100.000) ve bunların 4.1 milyonunun yayma pozitif olduğu (bu yüzden oldukça bulaşıcı) tahmin edilmektedir. Muhtemelen aynı yıl içinde, HIV ile ko-infekte hastaların (200.000 kişi) da içinde bulunduğu 1,7 milyon insan tüberkülozdan ölmüştür. (31,147,148). Prevalans ve ölüm oranları da insidanstan daha hızlı bir şekilde düşmektedir. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre TB insidansı artış hızı 1995 yılında pik yaparak yılda % 1,5'e ulaşmıştır. 2003 yılında ise bu artış %1'in altında bulunmuştur (33,149).

Dünya Sağlık Örgütü ÇİD TB ve YİD TB 2008 raporuna göre her yıl tahmini olarak 490.000 ÇİD TB vakası görülmekte olup bunların 110.000'i ölmektedir. ÇİD-TB, standart TB tedavisine altı ay yanıt vermeyen ve INH ile RIF'e direnç durumu olarak tanımlanır. Dünyada ortalama ÇİD TB oranı % 5,3 civarında tahmin edilmektedir. Veriler 81 ülkeden ve 91.577 hastadan derlenmiştir. En yüksek ÇİD TB oranları eski Sovyetler Birliği ülkeleri ve Çin'dedir. Örneğin Estonya'da % 13,3, Litvanya'da % 10,8, Ermenistan'da % 9,4, Çin'de % 7,3 civarındadır (34,35).

Dünya Sağlık Örgütü 2008 küresel raporunda yeni TB olgu sayısı 21.752 olarak tahmin edilmiştir (tahmini insidans 29/100000), kayıt altına alınan hasta sayısı 18.544 (insidans 25/100.000) olup olgu bulma oranı % 85'tir. Yeni yayma pozitif TB olgu sayısı 9,788 olup, kayıt altına alınan hasta sayısı 7.866 olduğundan olgu bulma oranı % 80 olarak hesaplanmıştır. Tahmini prevalansın 32/100.000 olduğu düşünülmektedir (32,150).

Tüberkülozun 2009 yılındaki tahmin edilen küresel yükü; insidans 9,4 (8,9-9,9) milyon olgu, prevalans 14 (12-16) milyon olgu, HIV negatif olgularda 1,3 (1,2-1,5) milyon ölüm, HIV pozitif olgularda 380.000 (320.000-450.000) ölümdür. Güney Doğu Asya (% 35), Afrika (% 30) ve Batı Pasifik Bölgeleri (% 20) TB olgularının çoğunlukta bulunduğu yerlerdir. Dünyada HIV pozitif olguların insidansı % 11-13 olup, bu olguların yaklaşık %80'ini Afrika kıtasındaki olgular oluşturmaktadır. Bildirim yapılan TB olgularının 2009 yılındaki oranı % 63 (5,8 milyon) iken 2008 yılında bu oran % 61'dir. İki bin dokuz yılında balgam yayması pozitif AC tüberkülozu hastalarının % 86'sı başarıyla tedavi edilmiş ve TB hastalarında 250.000 (230.000-270.000) ÇİD TB tahmin edilmektedir. Ancak ÇİD TB olgularından sadece 30.000'inin (% 12) tanısı konulup tedavi edilmiştir. Bu nedenle dünya çapında ÇİD TB tanı ve tedavisinin hızla genişletilmesi gerekmektedir (146). Amerika Birleşik Devletleri'nde TB insidansı 1992'den itibaren düzenli olarak düşmektedir. İki bin altı yılında 14.000'den daha az vaka bildirilmiş olup bu infeksiyonların yaklaşık olarak % 60 kadarının kaynağı yabancı ülke doğumlulardır (31).

Ülkemizde son zamanlarda yapılan düzenlemelere rağmen kayıt ve bildirim sistemlerinde hala aksaklıklar olmaktadır. Bu yüzden TB ile ilgili elde edilen veriler tam olarak gerçeği yansıtmayabilir. Dünya Sağlık Örgütü ve diğer ilgili kuruluşlara gönderilen veriler, Verem Savaşı Daire Başkanlığı'ndan elde edilen VSD verileridir. Verem Savaşı Daire Başkanlığı 2008 raporuna göre Türkiye vaka bulmada yayma pozitiflerde % 80, tüm vakalarda % 85 oranına, tedavi başarısında da % 89 oranına ulaşmıştır. Bu oranlar ile de DSÖ'nün koymuş olduğu hedeflerin her ikisini de geçmiştir. Dünya Sağlık Örgütü'ne veri gönderen 202 ülkeden 32'si bu hedeflere ulaşmıştır (150).

"Dünya Sağlık Örgütü Küresel Tüberküloz Kontrolü 2009 Raporu" verilerine göre; Avrupa Bölgesi'nde 2008 yılı TB insidansı yüz binde 48 iken, Türkiye'nin TB insidansı yüz binde 30 ve Avrupa Bölgesi'nde 2008 yılı TB nokta prevalansı yüz binde 39 iken Türkiye için bu rakam yüz binde 22 olarak bildirilmiştir.(84).

Dünya Sağlık Örgütü'nün TB insidansı ile ilgili hedefi 2015 yılına kadar insidans hızı artışının durdurularak geriye çevrilmesidir. Türkiye'nin TB insidans hızı, yıllara göre azalmakta olup 2002 yılında yüz binde 40 iken 2008 yılında yüz binde 30'dur. Tüberküloz nokta prevalans düşüş hızı 1990-2002 arasındaki 12 yıllık dönemde Türkiye'de sadece % 11 iken, Avrupa Bölgesi'nde % 46 olmuştur. Prevalans düşüş hızı 2002–2008 arasındaki dönemde ise Türkiye'de % 53'e ulaşmışken Avrupa Bölgesi'nde bu rakam % 20'dir (84).

Türkiye'de toplam 18.452 TB hastası 2008 yılında verem VSD kayıtlarına girmiştir. Toplam olgu hızı yüz bin nüfusta 27,9'dan 25,8'e (% 7,5) düşüş göstermiştir. Hastaların 11.476'sı (% 62,2) erkek, 6.976'sı (% 37,8) kadındır. Erkek/kadın oranı 1,6'dır. Olgu hızı erkeklerde 100.000'de 32,0 ve kadınlarda 100.000'de 19,6'dır. Olgu hızının yaş gruplarına dağılımı incelendiğinde, 15-24 yaş grubundan başlayarak yüksek bir düzey izlemekte ve 55-64 ile 65 ve üzeri yaşlarda en yüksek düzeye ulaştığı görülmektedir (84). Çalışmamızda toplam 63 (% 26,8) TB hastasının yaşları 13 ile 85 arasında değişmekle beraber ortalama yaş $46,40 \pm 18,47$ 'dir. Bu hastaların 48'i (% 76,2) erkek, 15'i (% 23,8) kadın hastadır. Erkek/kadın oranı 3,2'dir. Toplam 63 TB hastasının 19'u (% 30,2) 45-54 yaşları arasında, 13'ü (% 20,6) 65 yaş ve üzerindedir. Çalışmamızda TB hastalığının ileri yaşlarda ve erkek nüfusunda daha fazla görülmesi Türkiye Verem Savaşı 2010 Raporu'nun verileriyle karşılaştırıldığında benzer bulunmuştur. İleri yaşlarda immün sistemin zayıflaması ve erkek popülasyonun TB basili bulaşıyla karşılaşma riskinin daha yüksek olması nedenler arasında sayılabilir.

Tüberkülozdaki artış gelişmekte olan ülkelerde daha yüksektir. Düşük sosyoekonomik düzey, kalabalık yaşam ve HIV infekte kişilerin çok olması TB epidemisinin yüksek olmasının nedenleri arasındadır (3,75,151,152). *Mycobacterium tuberculosis*'in oluşturduğu TB hastalığı için yüksek risk altında olan diğer insanlar, evsizler, ilaç ve alkol alışkanlığı olanlar, mahkumlardır (31). Çalışmamıza dahil edilen 63 TB hastasının 32'si (% 50,8) ilkokul ve 13'ü (% 20,6) lise mezunuydu. Okur-yazar (% 1,6) ve okur-yazar değil (% 6,3) oranı ise daha düşük bulunmuştur. Bunun nedenleri arasında okur-yazar ve okur-yazar olmayan kişilere ulaşamaması sonucu bu hastaların tespit edilemeyişi ve bu hastaların doktora başvurma alışkanlıklarının olmayışı sayılabilir. Özellikle lise mezunu TB hastalarında saptanan yüksek oran ise bu hastaların daha bilinçli olup hastalığın semptomları başladığında doktora başvurmaları ile tespit edilmiş olmalarıdır. Çalışmamızdaki TB hastalarının gelir durumları ise 35 (% 55,6) hastada orta düzeyde ve 17 (% 27) hastada düşük olarak

bulunmuştur. Orta düzeyde gelir durumuna sahip hastaların fazla olmasının nedeni, bu hastaların yapılan ankette düşük gelir düzeyine sahip olsalar bile bunu belirtmek istemeyişleri olabilir.

Mikobakterilerde antitüberküloz ilaçlara karşı direnç primer veya sekonder olabilir. Primer ilaç direnci, daha önce antimikobakteriyel tedavi görmemiş kişilerde ortaya çıkarken, sekonder ilaç direnci geçmişte tüberküloz tedavisi uygulanan hastalarda ortaya çıkan dirençtir. İlaçlara dirençli tüberkülozlu hastayla temas, dirençli olguların yüksek olduğu toplumda yaşamak, düzensiz ilaç kullanımı gibi faktörler primer ilaç direnci için risk faktörleri olarak belirlenmektedir (136). Çalışmamıza dahil edilen 63 TB hastasının 59'u (% 93,7) daha önce tedavi almadığından bu hastalarda saptanan direncin çoğunluğu primer ilaç direncidir.

Boyalı preparatların mikroskopik incelemesi kolay ve hızlı bir yöntem olmasına rağmen düşük duyarlılık oranına sahiptir. Kültür, boyalı preparatın mikroskopik incelemesine göre oldukça duyarlıdır ve örneğin mililitresindeki 10 basil bile saptanabilmektedir. Ülkemizdeki rutin klinik laboratuvarların çoğunda hala tanı, ARB yayma ve genellikle LJ gibi katı besiyerlerinde yapılan kültür ile kuyulmaktadır. Önceki yapılmış çalışmalar, sıvı besiyerlerinin katı besiyerlerine göre mikobakterileri üretme yönünden daha hassas olduğunu göstermiştir (153-155).

Tüberkülozun tanısında yayma mikroskopi hala en ucuz ve en hızlı yöntemlerden biridir. Normalde ekspektore *M. tuberculosis* için pozitif kestirim değeri >% 90'dır. Bununla beraber, yayma mikroskopinin güvenilirliği, sadece laboratuvar teknisyeninin deneyimine değil, aynı zamanda örnekte bulunan ARB sayısına da büyük oranda bağlıdır. Bu nedenle 10^6 ARB/ml örnekler genellikle pozitif yayma ile sonuçlanırken, 10^4 ARB/ml olan örneklerin sadece % 60'ı pozitifdir. Yaymadaki duyarlılık genelde % 22-80 arasında bildirilmektedir. Kültür, boyalı preparatın mikroskopik incelemesine göre oldukça duyarlıdır ve örneğin mililitresindeki 10 basil bile saptanabilmektedir. Örnekte bulunan 10^1 - 10^2 canlı organizma/ml kadar az organizmayı saptamak için kültür yaymadan daha duyarlıdır. Mikobakterilerin saptanmasında yaymanın özgüllüğü çok yüksektir (>% 98). Pulmoner tüberkülozlu hastalar, uygun tedavi esnasında (ortalama 2-10 hafta için) yayma pozitif ve kültür negatif olabilirler (29,30). Türkiye'de Verem Savaşı 2010 Raporu'nda AC TB hastalarında 2008 yılında bakteriyolojik tetkikler incelendiğinde, mikroskopi yapılma oranı % 89,1, mikroskopi pozitiflik oranı % 63; kültür yapılma oranı % 62,8, kültür pozitiflik oranı % 51,1; ilaç

duyarlılık testi yapılma oranı % 26,9 bulunmuştur. Yayma negatif olduğu halde, kültür pozitifliği saptanarak bakteriyolojik tanı konulan akciğer tüberküloz hastalarının oranı % 10,5 bulunmuştur (84). Çalışmamızda *Mycobacterium tuberculosis*'in kültürde üremesi altın standart olarak kabul edildiğinde; ARB'nin duyarlılığı % 71,4, özgüllüğü % 100,0, yalancı negatif oranı % 28,6, yalancı pozitif oranı % 0,0, doğruluğu % 92,3, prevalansı % 26,8, pozitif kestirim değeri % 100,0 ve negatif kestirim değeri % 90,5 olarak bulunmuştur. Kültüründe *M. tuberculosis complex* üreyen hastaların ARB sonuçları değerlendirildiğinde; olguların 19'unda (% 30,1) ARB (++) saptanırken, 18 (% 28,6) hastada ARB negatif bulunmuştur. Çalışmamızdaki ARB'nin duyarlılık oranının yüksek çıkması laboratuvarımızda standart homojenizasyon-dekontaminasyon kurallarına uyulması ve şüpheli örneklerde Auramine-Rhodamine boyamanın eklenmesi ile açıklanabilir. Ayrıca TB tanısı alan hastaların tedavisinin başarısı yönünden tedavilerinin birinci ayında ARB'leri tekrar değerlendirildiğinde, bütün hastalarda ARB negatif bulunmuştur. Bunun nedeni Aydın ilinde VSD tarafından TB hastalarının tedavisinde DGTS programına tamamen uyulması olabilir.

Tüberküloz kontrol programlarında; TB hastalarının erken tanıları, etkili ve düzenli tedavileri ve tedavilerinin uygun takipleri çok önemlidir. Tüberkülozun kesin tanısında, *M. tuberculosis*'in kültürde üretilmesi “altın standart” olarak kabul edilmektedir. Birçok laboratuvar, kültür yöntemi olarak LJ gibi katı besiyerlerini kullanırken, sonuçların alınması altı-sekiz hafta gibi uzun bir süreyi gerektirmektedir. Sıvı besiyerlerinde bu süre daha kısadır. Bu amaçla, *M. tuberculosis*'in saptanması için gerekli süreyi ortalama 8-18 güne düşüren MB/BacT (Organon Teknika, Turnhout, Belçika), MGIT, BACTEC 460 TB ve BACTEC 9000 MB (Becton Dickinson Diagnostic Instruments, Sparks, MD, ABD) gibi otomatize sistemler geliştirilmiştir (156,157).

BACTEC 460 TB kültür sisteminde, kültür şişelerinin okutma işlemlerinin otomatize olmaması, çapraz kontaminasyon riskinin bulunması, radyoaktif atıkların birikimi söz konusu olduğundan bu sistemin kullanılabilirliği kısıtlanmaktadır (29,49,155). Belirtilen dezavantajlarına rağmen, mikobakterilerin izolasyon sürelerini 10-14 güne indirmesi, tanıda yüksek duyarlılığı, *M. tuberculosis complex* ile MOTT izolatlarını birbirinden ayırt edebilmesi, *M. tuberculosis complex* üyelerine antitüberküloz duyarlılık testlerinin uygulanabilir olması nedeniyle BACTEC 460 TB kültür yöntemi tüm dünyada altın test olarak kabul görmekte ve yeni geliştirilen kültür yöntemlerinin karşılaştırılmasında standart olarak kullanılmaktadır (29,30,156).

Roggenkamp ve ark. (158) çalışmalarında, örneklerde mikobakterilerin ortalama üreme zamanını BACTEC 460 TB kültür sisteminde 15,4, LJ besiyerinde ise 29,8 gün olarak belirlemişlerdir. Kocagöz ve ark. (159) çalışmalarında, ürettikleri 50 *M. tuberculosis complex* MTC ARB yayma pozitifliğinin artışının derecesiyle ters orantılı olarak BACTEC ve LJ besiyerlerinde üreme gün sayılarının azaldığını belirtmişlerdir. ARB yayma (+), (++), (+++), (++++), durumlarına göre, ortalama üreme gün sayılarını sırasıyla BACTEC 460 TB kültür sisteminde 10,0, 9,3, 8,6 ve 4,5 (ortalama 8,3 gün) ve LJ besiyerinde 27,4, 26,9, 23,7 ve 22,0 gün (ortalama 25,7) olarak belirlemişlerdir. Bu nedenle ARB yayma derecelendirmesinde pozitiflik oranı arttıkça, bakteri sayısındaki artışa paralel olarak mikobakterilerin besiyerlerinde ortalama üreme zamanları kısalmaktadır. Yapılan çalışmalar göstermektedir ki, geleneksel yöntem ile 24,1 gün gibi bir sürede *M. tuberculosis*'in % 79'u izole edilebilirken, BACTEC 460 TB ile bu süre ortalama 15,2 gün, BACTEC MGIT 960 ile ise ortalama 14,4 güne kadar kısalmaktadır. Geleneksel solid besiyerleri ile BACTEC 460 TB'nin birlikte kullanılması ile izolasyon oranları % 97 düzeylerine çıktığı ifade edilmektedir (160). Çalışmamızda toplam 63 (% 26,8) hastanın klinik örneklerinin kültüründe *Mycobacterium tuberculosis*'in BACTEC 12B'de üreme süreleri 8-25 (ortalama 16,1) gün, LJ'de üreme süreleri 21-40 (ortalama 28,7) gün olarak saptanmıştır ve daha önce yapılan çalışmalarla uyum göstermektedir. Çalışmamıza dahil edilen toplam 63 (% 26,8) hastanın klinik örneklerinin ARB yayma negatif, (+), (++), (+++) ve (++++), durumlarına göre, ortalama üreme gün sayıları sırasıyla BACTEC 460 TB kültür sisteminde 23,0, 16,0, 14,6, ve 8,9 gün ve LJ besiyerinde 37,1, 27,7, 26,3, 23,6 ve 22,0 gün olarak saptanmıştır. Tüberküloz hastalarının hastalığı başkalarına bulaştırmadan tedavilerine en kısa sürede başlanmasında hızlı kültür sistemleri önemli bir yere sahiptir. Her mikobakteriyoloji laboratuvarında konvansiyonel solid besiyerleri ile sıvı bazlı hızlı kültür sistemleri birlikte kullanılmalıdır. Tablo XXVI'da akciğer tüberkülozu hastalarında 2005-2008 yılları arasında mikroskopi ve kültür sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi gösterilmiştir (84). Tablo incelendiğinde yayma negatif kültür pozitif hastaların % 6,6'dan % 9,9'a arttığı görülmektedir. Bizim çalışmamızda bu oran % 28,6 gibi Türkiye ortalamasından fazla çıkmıştır. Tüberküloz şüpheli hastaların erken yakalanması ve bu dönemde balgamın mililitresindeki basil sayısının az olmasının neden olabileceği düşünülmüştür. Türkiye'deki veriler incelendiğinde yayma ve kültür sonuçları tam olarak bilinmeyen yaklaşık % 38'lik bir grubun olması da bu farka sebep olabilir. Hastaların yayma negatifken yakalanması da TB kontrolü açısından çok önemlidir.

Çalışmamızda özellikle ARB yayma negatif hastalarda hızlı kültür sistemleri kullanılarak LJ besiyerinde ortalama 37,1 gün olarak saptanan üreme süresi BACTEC 460 TB kültür sisteminde ortalama 23,0 gün olarak saptanmıştır. Hızlı kültür sistemleri sayesinde ARB negatif hastalar daha erken tespit edilmekte ve hastaların erken tedaviye başlanması sağlanmaktadır. İki bin sekiz verilerine bakıldığında TB hastalarının % 37,1'inin kültür sonuçlarının bilinmediği görülmektedir. Bu çalışma sayesinde Aydın il merkezinde TB şüpheli hastaların tümünün ARB, kültür ve antitüberküloz duyarlılık testleri hızlı, doğru ve tam olarak saptanmış bu sayede TB kontrolüne büyük katkı sağlanmıştır.

Tablo XXVI. Akciğer tüberkülozu hastalarında 2005-2008 yılları arasında mikroskopi ve kültür sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi (84).

Mikrobiyolojik tetkik yapılma durumu	2005		2006		2007		2008	
	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde
Y?, K?	2.884	19,3	1.982	13,4	1.424	10,4	1.306	10,2
Y?, K-	56	0,4	93	0,6	8	0,1	21	0,2
Y?, K+	181	1,2	235	1,6	39	0,3	68	0,6
Y-, K?	1.505	10,0	1.099	7,5	1.119	8,2	1.017	7,9
Y-, K-	872	5,8	1.008	6,8	1.018	7,4	1.054	8,2
Y-, K+	984	6,6	1.191	8,1	1.285	9,4	1.274	9,9
Y+, K?	3.627	24,2	3.448	23,4	2.768	20,2	2.440	19,0
Y+, K-	335	2,2	491	3,3	485	3,5	430	3,4
Y+, K+	4.543	30,3	5.193	35,2	5.544	40,5	5.203	40,6
Toplam Akciğer TB	14.987	100,0	14.740	100,0	13.690	100,0	12.813	100,0

(+) : Pozitif, (-) : Negatif, (?) : Bakılmadı

Tüberküloz, halen dünyada en yaygın ve ölümcül bulaşıcı hastalıklardan biri olmaya devam etmektedir. *Mycobacterium tuberculosis*, tek bir enfeksiyöz etkene bağlı ölümlerin sebebi olarak ilk sıralarda yer almaktadır. Son yıllarda HIV epidemisi ile yeniden önem kazanan TB epidemisinde bir diğer önemli gelişme de günümüzde gelişmiş toplumları da tehdit eden bir tehlike haline dönüşmüş olan çoklu ilaç direnci gösteren kökenlerin popülasyondaki artışı ve süratli yayılışıdır (32,147,161).

Tüberkülozun kontrolünde en önemli unsur balgamında TB basili bulunan hastaların erken saptanması ve başkalarına hastalığı bulaştırmadan etkili ilaç tedavisi ile iyileştirilmeleridir. Çok ilaca dirençli TB olgularının artışı, TB ile savaşı güçleştirmektedir. Löwenstein-Jensen gibi besiyerlerinde TB basilinin üretilerek antitüberküloz ilaçlara duyarlılığının belirlenmesi haftalar aldığından özellikle çok ilaca dirençli TB olgularının erken tedavi edilmesi ve dirençli kökenlerin yayılmasının önlenmesi zorlaşmaktadır (162). Hızlı kültür sistemleri duyarlılık saptanmasını bir iki haftaya indirmiştir. Son yıllarda antitüberküloz ilaçlara karşı direnç gelişmesinde rol oynayan moleküler mekanizmalar belirlendikçe, bunların moleküler tanı yöntemleri ile saptanması, kısa sürede ilaç direncinin belirlenmesini sağlamıştır (163). Moleküler tanı yöntemlerinin ucuzlaması ve kullanımlarının kolaylaşması, bu yöntemlerin giderek daha yaygın kullanılmasını sağlamaktadır. *Mycobacterium tuberculosis*'te ilaç direncine neden olan genetik değişikliklerin büyük çoğunluğunun tanımlanmış olmasına karşın hala bilinen direnç genlerinde değişiklik saptanamayan ilaç dirençli suşlar bulunabilmekte, farklı kökenlerde bulunan aynı mutasyonlar bile zaman zaman farklı düzeyde minimal inhibitör konsantrasyon oluşturabilmektedir. Bu nedenle, daha uzun süre, kültüre dayalı yöntemleri tamamen terk ederek moleküler tanı yöntemlerini kullanmak olası görünmemektedir (87,164). Antitüberküloz ilaçların düzenli kullanılmaması, HIV pandemisi ve kötü tüberküloz kontrol programları ÇİD TB sorununa zemin hazırlamıştır. Bu durum tüberküloz tanı ve direnç tayininde daha hızlı ve güvenilir sonuçlar veren yeni yöntemlere gereksinimi artırmıştır (85,86).

Sanayileşmiş ülkelerde göçlerle gelen TB olguları, o ülkelerde artış nedenlerinden birisini oluşturmaktadır. Tüberküloz hasta sayılarındaki artışlar ve TB kontrolü çabalarının yeterince başarı sağlayamaması nedeniyle, DSÖ, 1993 yılında TB için acil durum ilan etmiştir. Dünyada bir hastalık için ilk kez acil durum ilan edildiği bilinmektedir. 1994 yılında da verem savaşının yeni doğrultusunu ortaya koymuştu. Böylece DSÖ öncülüğünde 1991'den bu yana yeni bir TB kontrol stratejisi hızla yayılmış ve günümüzde TB kontrolünün temel yöntemi olarak kabul gören strateji DGTS'dir (132,165).

Tüberküloz problemini azaltmak, büyük ölçüde DGTS programlarının nasıl hızlı uygulanabileceğine bağlıdır. Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi programının yaygınlaşmasının önünde duran engeller arasında; eğitilmiş personel eksikliği, politik desteğin olmayışı, zayıf laboratuvar servisleri ve çoklu ilaç direncinin global etkisi ile

birlikte, HIV ile infekte kişilerde olduğu gibi sıklıkla çok ilaca dirençli vakaların yetersiz tedavi edilmesi sayılabilir. Batı Yarımküre’de rapor edilen vakaların sayısında devamlı bir azalma, sağlık otoriteleri tarafından uygulanan kontrol önlemlerinin ve korunma stratejilerinin etkisini göstermektedir. Bunlar arasında, *M. tuberculosis*’i tespit etmek ve antitüberküloz ilaçlar ile duyarlılık testlerinin yapılması için daha hızlı ve etkili laboratuvar algoritmalarının kullanılması sayılabilir. Bu bağlamda, klinik mikobakteriyoloji laboratuvarları önemli bir rol oynamaktadır (30,32). DGTS stratejisi:

1. Tüberküloz kontrolü ile ilgili uygulamalar için politik iradenin ortaya konması,
2. Semptomatik hastalarda pasif yöntemler ile bakteriyolojik tanının konması,
3. Gözetimli kısa süreli tedavi,
4. Ücretsiz ve sürekli ilaç sağlanması
5. Kayıt-raporlama-analiz sistematığının kurulması unsurlarını içermektedir

Bu çerçevede, ülkemizde 2000 yılında ilk uygulamaları başlayan DGTS, 2003 yılı itibariyle pilot olarak uygulanmış, 2006 yılında tüm ülke geneline yaygınlaştırılmış bulunmaktadır (32,132,165).

Günümüzde Türkiye’de VSD’lerde kayıt altına alınan hastaların % 96,6’sının tedavilerine doğrudan gözetim altında başlanmıştır. Türkiye’de tüberkülozdan ölüm oranlarında önemli ölçüde azalma olmuştur. Resmi verilere göre bu oran 2001 yılında yüzbinde 1,9’dur. Verem Savaşı Daire Başkanlığı 2008 raporuna göre ölüm oranı % 2,7’dir. Ancak DSÖ Türkiye’deki tüberküloz mortalitesini yüzbinde 5 olarak tahmin etmektedir (149-150). Aydın ilinde de DGTS ilk başlayan illerden bir tanesidir ve programa uygun bir şekilde yapılmaktadır. Çalışmamızda altın standart olarak kabul edilen BACTEC 460 TB sistemi ile çalışılan antitüberküloz duyarlılık testleri sonuçlarında düşük direnç oranlarının saptanmasının en önemli nedeni Aydın ilinde DGTS programına tamamen uyulmasıdır.

Antitüberküloz tedavisinde önemli bir yeri olan TB ilaçlarından INH ve/veya RIF’e dirençte büyük bir artış gözlenmiştir. Türkiye’de ortalama % 3,6 oranında primer ÇİD-TB görülmektedir. Çok ilaca dirençli TB olgularının tedavisi ise oldukça zor ve pahalıdır. Mikrobiyoloji laboratuvarının en önemli görevi basilin direkt mikrobiyolojik incelenmesi, izolasyonu, tanımlanması ve ilaç duyarlılık testlerinin yapılmasıdır. *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarının ilaç duyarlılığının belirlenmesi hastaya uygulanan tedavi rejimini doğrular veya tedavinin kesilmesi konusunda bilgi verir. Ayrıca direnç gelişen olgularda uygun tedavi rejimlerine geçilmesine ve tedavi programlarının belirlenmesine yardımcı olur.

İlaç direncinin hızlı tanısı, toplum için önemli bir tehdit unsuru olan ÇİD TB'un bulaş zincirinin kırılmasında önemlidir (144).

Tüberkülozun tedavisi uzun süreli çoğul ilaç kullanımını gerektirmektedir. Tüberkülozda tanıdaki gecikme, yetersiz ve/veya yanlış tedavi uygulamaları antitüberküloz ilaçlara karşı dirençli *M. tuberculosis* kökenlerinin giderek artış göstermesine neden olmaktadır. Dünya genelinde yapılmış pek çok çalışmada en sık direncin INH'e karşı olduğu bildirilmektedir. Ancak bazı ülkelerde RIF, SM ve EMB de ilk sırayı alabilmektedir. Ülkemizde 1990-1995 yılları arasında yapılan çalışmalarda en fazla başlangıç direnci SM ve INH'a karşı bildirilmekteydi. Daha sonra 1995-1997 yılları arasında yapılan çalışmalarda ise RIF karşı direnç INH direncinden fazla bulunmuştur. Son dönemde Türkiye'de yapılan çalışmalarda INH ve SM ilk sırada olarak bildirilmiştir. Bu farklılık ya ilaç direnç paternlerinin yıllar içerisinde değiştiğini ya da ilaç duyarlılık testlerinde kullanılan yöntemlerden kaynaklanan bir farklılık olabileceğini düşündürmektedir. Çok ilaca direnc için ülkeler arasındaki farklılıkların; hastaların demografik özellikleri, ülkelerin genel ilaç kullanım özellikleri, ilaç duyarlılık testlerinde kullanılan yöntemler (BACTEC, LJ vb), ya da ilaç konsantrasyon oranlarındaki değişikliklerden kaynaklanabileceği bildirilmektedir (24,136,166). Durmaz ve ark. (167) Türkiye genelinde yaptıkları çok merkezli çalışmada 88 TB kökeninde primer antitüberküloz ilaçlardan en az birine karşı olan direnç oranı % 32,95, birden fazla ilaca karşı direnç oranı % 10,23 olarak bildirilmektedir. Tek ilaca karşı direnç oranları SM için % 7,95, INH için % 10,22, etiyonamid için % 4,54 ve RIF için % 0,00 olarak saptanırken, iki kökende çoklu ilaç direnci belirlendiği bildirilmiştir. Balcı ve ark. (168) BACTEC 460 TB sistemi kullanarak antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılık belirledikleri araştırmada kökenlerin % 54,8'inin birinci seçenek ilaçlara duyarlı olduğu bildirilmiştir. Bir veya birden fazla ilaca direncin % 45,2, sadece bir ilaca direncin % 17,6, iki ilaca direncin % 15,6, üç ilaca direncin ise % 12,0 olduğu belirtilmiştir. İlaçların tümüne dirençli olgu belirtilmemiştir. Tansel ve ark. (169) *M. tuberculosis complex* kökenlerinin SM, INH, RIF ve etiyonamid'e direnç oranlarını sırasıyla % 2,2, % 9,0, % 4,5, % 1,5 olarak, en az bir ilaca direnç oranını % 6,0, INH ve RIF'e birlikte direnç oranını % 3,0 olarak belirlemişlerdir. Türkiye'de Verem Savaşı 2010 Raporu'nda toplam 18.452 hastada yeni olguların oranı % 90,8 (16.760 kişi) iken daha önce tedavi görmüş olguların oranı % 9,2 (1.692 kişi) bulunmuştur. Tedavi görmüşlerin içinde en büyük grup toplam vaka sayısının % 7,1 (1.314 kişi) oranıyla nüks olgulardır. İlaç duyarlılık testi yapılan toplam 4.963 hastanın sonuçları incelendiğinde;

% 19,1’inde en az bir ilaca direnç saptanırken, en yüksek oranlarda direncin de INH’e karşı geliştiği görülmüştür. İlaç duyarlılık testi yapılan olguların % 5,3’ü (263 kişi) ÇİD TB bulunmuş olup, bu oranı yeni olgularda %3, tedavi görmüş olgularda % 18,6 olarak saptanmıştır (84). Çalışmamızda ise kültüründe *Mycobacterium tuberculosis* üreyen 63 hastanın dördü (% 6,3) daha önce tedavi görmüş olgulardı. Bu dört hasta fenotipik yöntem BACTEC 460 TB ile antitüberküloz ilaçlara karşı direnç araştırıldığında; dördünde de test edilen antibiyotiklere karşı hassas olduğu saptanmıştır. Tüberküloz Direnç Kiti ile direnç genleri araştırıldığında ise sadece bir hastada RIF’e karşı direnç mutasyonları saptanmıştır. Bu mutasyonlar, RIF mutasyonu (rpoB 526), RIF mutasyonu (rpoB 522-526), RIF mutasyonu (rpoB 531), RIF mutasyonu (rpoB 529-533)’dur. Türkiye’de Verem Savaşı 2010 Raporu’nda Tablo XXVII’de ilaç duyarlılık testi (İDT) çalışılan hastalarda olgu tanımına göre her bir TB ilacı için 2005-2008 yılları arasında toplam direnç sonuçları gösterilmiştir (84).

Çalışmamızda BACTEC 460 TB ile 63 *Mycobacterium tuberculosis* kökeninin 61’inde (% 96,8) antitüberküloz ilaçlar (izoniazid, rifampisin, etambutol, streptomisin) hassas bulunmuş ve ikisinde (% 3,2) antitüberküloz ilaçlardan birine karşı direnç saptanmıştır [bir (% 1,6) hastada isoniazid direnci, bir hastada (% 1,6) streptomisin direnci]. BACTEC 460 TB ile ÇİD TB saptanmamıştır.

Saniç ve ark. (170) çok merkezli çalışmasında RIF dirençli 227 kökenin 216’sında (% 95,2’sinde) *rpoB* geninde 8 farklı kodonda 20 farklı nokta mutasyonu, iki delesyon ve bir insersiyon saptamışlardır. INH dirençli kökenlerde, *katG* geninde % 67,8, *inhA* geninde %20,4 oranında mutasyon bulunmuştur. *rpoB* geninde en sık TTG 531., *katG* için ACC 315., *inhA* için TGA209. kodonda mutasyon saptanmıştır. Ayrıca bu çalışmada *rspL* geninde 43 kodonda % 28,8, *embB* geni 306. kodonda % 45,0 oranında mutasyon saptanmıştır.

Çalışmamızda TB Direnç Kiti ile test edilen antitüberküloz ilaçlara karşı direnç mutasyonları araştırıldığında, çalışılan 63 örneğin 16’sında (% 25,4) dirence neden olan mutasyon saptanırken, 47’sinde (% 74,6) mutasyon saptanmamıştır. Saptanan mutasyonlar değerlendirildiğinde: yedi (% 11,1) kinolon (gyrA 90-94) mutasyonu, beş (% 7,9) INH mutasyonu (katG 315), dört (% 6,3) INH mutasyonu (inhA16,15,8), iki (% 3,2) RIF mutasyonu (rpoB 516), iki (% 3,2) RIF mutasyonu (rpoB 526), bir (% 1,6) RIF mutasyonu (rpoB 513-516) , bir (%1,6) RIF mutasyonu (rpoB 522-526), bir RIF mutasyonu (rpoB 529-533), iki (% 3,2) SM mutasyonu (rpsL 43), bir (% 1,6) SM mutasyonu (rpsL 88) saptanmıştır.

Tablo XXVII. İlaç duyarlılık testi (İDT) çalışılan hastalarda olgu tanımına göre her bir TB ilacı için toplam direnç sonuçları*, 2005-2008 (84).

OLGU TANIMI	2005**		2006		2007		2008	
	Dirençli Sayı	Dirençli %	Dirençli Sayı	Dirençli %	Dirençli Sayı	Dirençli %	Dirençli Sayı	Dirençli %
Yeni Hastalar	(n=3.237)		(n=4.135)		(n=4.142)		(n=4.221)	
İzoniyaizid	291	9,0	444	10,7	492	11,9	479	11,3
Rifampisin	144	4,4	185	4,5	202	4,9	166	3,9
Etambutol	97	3,0	147	3,6	115	2,8	143	3,4
Streptomisin	227	7,0	348	8,4	296	7,1	275	6,5
ÇİD	101	3,1	131	3,2	120	2,9	125	3,0
Tedavi Görmüş Hastalar	(n=508)		(n=711)		(n=775)		(n=742)	
İzoniyaizid	139	27,4	169	23,8	214	27,6	207	27,9
Rifampisin	107	21,1	141	19,8	145	18,7	162	21,8
Etambutol	51	10,0	94	13,2	64	8,3	71	9,6
Streptomisin	77	15,2	121	17,0	107	13,8	96	12,9
ÇİD	90	17,7	118	16,6	120	15,5	138	18,6
Tüm Hastalar	(n= 3.745)		(n=4.846)		(n=4.917)		(n=4.963)	
İzoniyaizid	430	11,5	613	12,6	706	14,4	686	13,8
Rifampisin	251	6,7	326	6,7	347	7,1	328	6,6
Etambutol	148	4,0	241	5,0	179	3,6	214	4,3
Streptomisin	304	8,1	469	9,7	403	8,2	371	7,5
ÇİD	191	5,1	249	5,1	240	4,9	263	5,3

*Her bir ilaç için toplam dirençli hasta sayısı belirlenirken, diğer ilaçlara dirençli ya da duyarlı olması dikkate alınmamıştır.

** 2005 yılında etambutol için 3 yeni, 1 tedavi görmüş; streptomisin için 1 yeni, 1 tedavi görmüş hastanın İDT sonucu bulunmamaktadır. 2006 yılı için 2 yeni hastada etambutol, 1 yeni 1 nüks hastada streptomisin için İDT sonucu yoktur.

Saptanan mutasyonların kökenlere göre dağılımına bakıldığında; 1 kökende RIF mutasyonu (rpoB 516), kinolon mutasyonu (gyrA 90-94); bir kökende SM mutasyonu (rpsL 43), SM mutasyonu (rpsL 88), kinolon mutasyonu (gyrA 90-94); bir kökende INH mutasyonu (katG 315), RIF mutasyonu (rpoB 513-516), RIF mutasyonu (rpoB 526), SM mutasyonu (rpsL 43); iki kökende INH mutasyonu (inhA 16,15,8); bir kökende INH mutasyonu (katG 315), RIF mutasyonu (rpoB 526); iki kökende kinolon mutasyonu (gyrA 90-94); bir kökende

INH mutasyonu (inhA 16,15,8), kinolon mutasyonu (gyrA 90-94); bir kökünde INH mutasyonu (katG 315), kinolon mutasyonu (gyrA 90-94); bir kökünde RIF mutasyonu (rpoB 526); bir kökünde INH mutasyonu (inhA 16,15,8), RIF mutasyonu (rpoB 516); bir kökünde INH mutasyonu (inhA16,15,8), INH mutasyonu (katG 315); bir kökünde RIF mutasyonu (rpoB 526), RIF mutasyonu (rpoB 522-526), RIF mutasyonu (rpoB 531), RIF mutasyonu (rpoB 529-533); bir kökünde INH mutasyonu (katG 315); bir kökünde RIF mutasyonu (rpoB 531), kinolon mutasyonu (gyrA 90-94) saptanmıştır.

BACTEC 460 TB ile INH direnci saptanan hastada; TB Direnç Kiti ile INH mutasyonu.(katG 315) saptanırken, BACTEC 460 TB ile SM direnci saptanan hastada ise SM mutasyonu (rpsL 43), SM mutasyonu (rpsL 88), kinolon mutasyonu (gyrA 90-94) saptanmıştır. BACTEC 460 TB ile iki farklı hastada antitüberküloz ilaçlardan sadece INH (% 1,6) ve SM'de (% 1,6) direnç saptanırken, TB Direnç Kiti ile INH 9 (% 14,3), RIF 7 (% 11,1) ve kinolonda 7 (% 11,1) mutasyon yüksek oranda saptanmıştır. Türkiye'de yapılmış diğer çalışmalarda görüldüğü gibi çalışmamızda da INH direnci en yüksek oranda bulunmuştur. Fenotipik ve genotipik testlerdeki bu uyumsuzluğun nedeni fenotipe yansımamış direnç genlerinin genotipik olarak saptanmış olmasıdır. Bu saptanan antibiyotik direnç sonuçları, Türkiye'de yapılan diğer çalışmaların sonuçlarıyla uyum göstermektedir. INH ve RIF direncinin tedavi başarısı ile ters orantılı olduğu bilinmektedir.

Daha önce en az bir ay tüberküloz tedavisi gören, dirençli tüberküloz olgusu ile temas öyküsü bulunan, üç aylık tedaviden sonra yayma ve kültür pozitifliği devam eden, yüksek ilaç direnci bulunan (primer INH direnci % 4'den fazla) bölgede yaşayan, HIV ile infekte olup kaviter lezyonları bulunan, düşük sosyoekonomik koşullarda yaşayan TB hastalarının kesinlikle direnç varlığı yönünden irdelenmesi önerilmektedir (136).

Çok ilaca dirençli TB, en az izoniazid ve rifampisine birlikte direnç görülmesidir. YİD-TB ise primer ilaçlardan en az izoniazid ve rifampisine direnç görülmesi ile birlikte sekonder ilaçlardan florokinolonlar ve üç paranteral ilaçtan (amikasin, kanamisin veya kapreomisin) en az birine direnç görülmesidir. Yaygın ilaç dirençli TB, ÇİD-TB'nin kontrol altına alınamaması sonucu ortaya çıkan aşırı ilaç direnci durumudur. YİD-TB vakası doğrulanan 37 ülke vardır (171). Dünya Sağlık Örgütü 2008 raporuna göre, ÇİD-TB olgu sayısının en fazla Çin, Hindistan, Rusya'da olduğu ve ÇİD-TB oranları Merkez Avrupa'da % 2,4, Doğu Avrupa'da % 19,2, Latin Amerika'da % 3,5, Güneydoğu Asya'da % 4,3, Batı Pasifik Bölgesinde % 7,0, Afrika'da % 4,4 olarak bildirilmiştir (172). Eyigör ve ark. (173)

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji laboratuvarında 2000-2007 yılları arasında izole edilen 46 *Mycobacterium tuberculosis complex* izolatlarının antitüberküloz ilaç dirençlerini BACTEC 460 TB sistemi kullanılarak saptamışlardır. İncelenen 46 kökenin 41'i (%89.1) INH, RIF, SM ve EMB'e hassas bulunmuştur. Üç kökende (%6.5) INH, iki kökende (%4,3) RIF, ve birer kökende (%2.2) SM ve EMB direnci saptanmıştır. Kökenlerin bir tanesi (%2.2) çok ilaca dirençli (INH, RIF ve SM direnci) olarak saptanmıştır. Çalışmamızda ise ÇİD TB saptanmamıştır. Aydın ilinde yapılmış bu iki çalışma karşılaştırıldığında; çalışmamızdaki düşük direnç oranları ve ÇİD TB saptanmamasının nedenleri, Aydın ili VSD tarafından TB tedavisinde DGTS programının düzeli bir şekilde uygulanması ve TB hastalarının hastalığı başkalarına bulaştırmadan erken tespiti ve tedavilerinin düzenli takibi ile açıklanabilir. Tablo XXVIII'de Türkiye'deki çeşitli çalışmalarda antitüberküloz ilaçlara karşı saptanan direnç oranları (%) gösterilmiştir.

Toplumdaki dirençli TB olguları, gelecekte antitüberküloz ilaçlarına karşı primer direnç sorununun daha ciddi boyutlara gelebileceğini düşündürmektedir. Tedavi edilmeyen olgular ilaçlara hassas basille başkalarının enfekte olmalarına neden olup sonunda ölürlerken, yetersiz olarak tedavi edilen olgular uzun süre yaşamakta, fakat kronikleşip dirençli basille çok sayıda kişiyi enfekte etmektedirler. Bu durum ülkemizde TB tedavisinin düzenli, yeterli yapılmadığının ve toplumda tedavi edilemeyen tüberkülozluların önemli bir bölümünün dirençli basillerle bulaştırmalarını sürdürmekte olduklarının da bir göstergesi olabilir. Ülkemizde de ÇİD TB olguları tedavisi oldukça zor ve pahalı olmasıyla TB kontrolünün önemli bir problemidir.

Sonuç olarak, *M. tuberculosis*'in antitüberküloz ilaçlara karşı artan ilaç direnci, tedavinin etkili bir şekilde yapılabilmesini engellemekte ve duyarlılık testlerinin yapılmasını gerekli hale getirmektedir. *Mycobacterium tuberculosis*, yavaş üreyen bir bakteri olduğundan duyarlılık testlerinin klasik kültür yöntemleri yerine daha kısa sürede sonuç veren hızlı kültür yöntemleri ile yapılması gerekmektedir. Tüberkülozun tedavisinde çok ilaca dirençli tüberküloz önemli bir problemidir. Çok ilaca dirençli tüberküloz olgularının artışı, tüberküloz ile mücadeleyi güçleştirmektedir. Bu nedenle çok ilaca dirençli tüberkülozun erken saptanmasında ve yayılmasının önlenmesinde duyarlılık testlerinin klasik kültür yöntemleri yerine daha kısa sürede sonuç veren hızlı yöntemler ile yapılması gerekmektedir. Genotipik

yöntemler epidemiyolojik çalışmalarda yararlı olabilir. Ancak mutasyon her zaman fenotipik dirence yansımadağı için mutlaka fenotipik ve genotipik yöntemler birlikte kullanılmalıdır.

Tablo XXVIII. Türkiye’deki çeşitli çalışmalarda antitüberküloz ilaçlara karşı saptanan direnç oranları (%)

Kaynak	İl	Yıl	Yöntem	Örnek sayısı	INH	RIF	SM	EMB	İki ilaca direnç	Üç ilaca direnç	Dört ilaca direnç	ÇİD TB
Talay ve ark (174)	İstanbul	97-00	*	189	12,6	8,5	14,8	5,3	3,7	3,7	2,1	6,8
Orhan ve ark (175)	Gaziantep	98-01	BACTEC	201	13,93	2,98	1,99	3,48	7,95	9,44	0,99	12,93
Tansel ve ark (169)	Edirne	99-01	BACTEC	134	9	4,5	2,2	1,5	*	*	*	3
Baylan ve ark (176)	Ankara	2002	BACTEC	63	11,1	1,6	4,8	1,6	1,6	0	1,6	1,6
Esen ve ark (177)	İzmir	00-02	Agar PP	237	6,8	9,3	5,1	4,2	*	*	*	1,7
Özekinci ve ark(178)	Diyarbakır	01-03	BACTEC	100	24	11	13	10	7,0	5,0	3,0	8,0
Korkmaz ve ark(179)	Gaziantep	02-03	BACTEC	104	25	10,58	2,89	18,27	5,76	3,84	0	*
Korkmaz ve ark (179)	Gaziantep	02-03	Agar PP	104	24,04	10,58	2,89	25,96	6,72	4,81	0	*
İşitez ve ark (180)	Afyon	02-03	LJ PP	26	3,8	*	3,8	7,7	19,1	*	3,8	*
Şenol ve ark (181)	İzmir	02-03	LJ PP	996	16	9,9	12,6	3,2	2	3,7	2,5	8,2
Doğan ve ark (182)	Sivas	99-04	MGIT	385	21	5,2	5,2	2,9	*	*	*	3,4
Zer ve ark (183)	Gaziantep	04-06	BACTEC	216	6,01	2,77	2,77	2,31	5,55	1,85	2,31	*
Yaylı ve ark (184)	Isparta	*	MGIT	108	9,3	0,9	0,9	0,9	2,7	1,9	0	2,8
T.C. VS Raporu (84)	Türkiye	2005	*	3.745	11,5	6,7	4,0	8,1	3,9	2,7	1,3	5,1
T.C. VS Raporu (84)	Türkiye	2006	*	4.846	12,6	6,7	5,0	9,7	*	*	*	5,1
Eyigör ve ark (173)	Aydın	00-07	BACTEC	46	6,5	4,3	2,2	2,2	2,2	2,2	0	2,2
T.C. VS Raporu (84)	Türkiye	2007	*	4.917	14,4	7,1	3,6	8,2	*	*	*	4,9
T.C. VS Raporu (84)	Türkiye	2008	*	4.963	13,8	6,6	4,3	7,5	4,4	1,9	1,5	5,3
Çalışmamızda	Aydın	2010	BACTEC	63	1,6	0,0	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

INH:İzoniazid, RIF:Rifampisin, SM: Streptomisin, EMB: Etambutol, ÇİD TB: Çok ilaca dirençli tüberküloz

PP:Proporsiyon, LJ:Löwenstein Jensen, MGIT:Mycobacteria Growth Indicator Tube, VS: Verem Savaşı

*: Test edilmemiş ya da ilgili makalede ve yayında bilgiye ulaşılamamıştır.

SONUÇLAR

Mycobacterium tuberculosis kökenlerinde ilaç direncinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırıldığı çalışmamızda;

1. Çalışmaya dahil edilen toplam 63 (% 26,8) hastanın 48'i (% 76,2) erkek, 15'i (% 23,8) kadındır. Erkek/kadın oranı 3,2'dir.

2. Çalışmaya dahil edilen toplam 63 (% 26,8) hastanın yaşları 13 ile 85 (ortalama 46,4±18,5) arasındaydı.

3. Toplam 235 olguya ait klinik örneğin 172'sinde (% 73,2) *Mycobacterium tuberculosis* kültürde üremezken, 63'ünde (% 26,8) *M. tuberculosis* kültürde üremiştir.

4. Tüberkülozdan şüphelenilen toplam 235 olgunun klinik örneğinin mikroskopik incelemesinde; 172 (% 73,2) ARB negatif klinik örneğin kültüründe *M. tuberculosis*'in üremesi saptanmazken, 18 (% 7,6) ARB negatif klinik örneğin kültüründe *M. tuberculosis* üremiştir.

5. Kültüründe *M. tuberculosis complex* üreyen hastaların ARB sonuçları değerlendirildiğinde; olguların 19'unda (% 30,1) ARB (++) saptanırken, 18 (% 28,6) hastada ARB negatif bulunmuştur.

6. Çalışmamızda *M. tuberculosis*'in kültürde üremesi altın standart olarak kabul edildiğinde; ARB'nin duyarlılığı % 71,4, özgüllüğü % 100,0, yalancı negatif oranı % 28,6, yalancı pozitif oranı % 0,0, doğruluğu % 92,3, prevalansı % 26,8, pozitif kestirim değeri % 100,0 ve negatif kestirim değeri % 90,5 olarak bulunmuştur.

7. Çalışmaya dahil edilen toplam 63 (% 26,8) hastanın klinik örneklerinin kültüründe *M. tuberculosis*'in BACTEC 12B'de üreme süreleri 8-25 (ortalama 16,1) gün, LJ'de üreme süreleri 21-40 (ortalama 28,7) gün olarak saptanmıştır.

8. Çalışmada *M. tuberculosis complex*'in identifikasyonunda kullanılan fenotipik yöntem NAP testi ile genotipik yöntem PZR IS6110, PZR-RFLP ve TB Direnç Kiti yöntemlerinin dördü de *M. tuberculosis complex*'in identifikasyonunda % 100 uyumlu bulunmuştur. Bu dört yöntem de pozitif kontrolleri ve *M. tuberculosis complex*'i doğru olarak tanımlamıştır.

9. Çalışmada BACTEC 460 TB ile 63 *M. tuberculosis* kökeninin 61'inde (% 96,8) antitüberküloz ilaçlar (izoniazid, rifampisin, etambutol, streptomisin) hassas bulunmuş ve ikisinde (% 3,2) antitüberküloz ilaçlardan birine karşı direnç saptanmıştır (bir (% 1,6) hastada

izoniazid direnci, bir hastada (% 1,6) streptomisin direnci). BACTEC 460 TB ile antitüberküloz ilaçlara direnç araştırılırken ÇİD-TB saptanmamıştır.

10. Çalışılan 63 örneğin 16'sında (% 25,4) dirence neden olan mutasyon saptanırken, 47'sinde (% 74,6) mutasyon saptanmamıştır. Saptanan mutasyonlar değerlendirildiğinde: yedi (% 11,1) kinolon (gyrA 90-94) mutasyonu, beş (% 7,9) INH mutasyonu (katG 315), dört (% 6,3) INH mutasyonu (inhA16,15,8), iki (% 3,2) RIF mutasyonu (rpoB 516), iki (% 3,2) RIF mutasyonu (rpoB 526), bir (% 1,6) RIF mutasyonu (rpoB 513-516) , bir (%1,6) RIF mutasyonu (rpoB 522-526), bir RIF mutasyonu (rpoB 529-533), iki (% 3,2) SM mutasyonu (rpsL 43), bir (% 1,6) SM mutasyonu (rpsL 88) saptanmıştır.

11. Genotipik yöntem TB Direnç Kiti ile antitüberküloz ilaçlara karşı direnç mutasyonları araştırıldığında, bu mutasyonların 16 *M. tuberculosis* kökenine göre dağılımına bakıldığında; bir kökende RIF mutasyonu (rpoB 516), kinolon mutasyonu (gyrA 90-94); bir kökende SM mutasyonu (rpsL 43), SM mutasyonu (rpsL 88), kinolon mutasyonu (gyrA 90-94); bir kökende INH mutasyonu (katG 315), RIF mutasyonu (rpoB 513-516), RIF mutasyonu (rpoB 526), SM mutasyonu (rpsL 43); iki kökende INH mutasyonu (inhA 16,15,8); bir kökende INH mutasyonu (katG 315), RIF mutasyonu (rpoB 526); iki kökende kinolon mutasyonu (gyrA 90-94); bir kökende INH mutasyonu (inhA 16,15,8), kinolon mutasyonu (gyrA 90-94); bir kökende INH mutasyonu (katG 315), kinolon mutasyonu (gyrA 90-94); bir kökende RIF mutasyonu (rpoB 526); bir kökende INH mutasyonu (inhA 16,15,8), RIF mutasyonu (rpoB 516); bir kökende INH mutasyonu (inhA16,15,8), INH mutasyonu (katG 315); bir kökende RIF mutasyonu (rpoB 526), RIF mutasyonu (rpoB 522-526), RIF mutasyonu (rpoB 531), RIF mutasyonu (rpoB 529-533); bir kökende INH mutasyonu (katG 315); bir kökende RIF mutasyonu (rpoB 531), kinolon mutasyonu (gyrA 90-94) saptanmıştır. Tüberküloz Direnç Kiti ile 47 (%74,6) TB hastasında test edilen antibiyotiklere karşı mutasyon saptanmamıştır.

12. BACTEC 460 TB ile INH direnci saptanan hastada; TB Direnç Kiti ile INH mutasyonu.(katG 315) saptanırken, BACTEC 460 TB ile SM direnci saptanan hastada ise SM mutasyonu (rpsL 43), SM mutasyonu (rpsL 88), kinolon mutasyonu (gyrA 90-94) saptanmıştır.

13. BACTEC 460 TB ile iki farklı hastada antitüberküloz ilaçlardan sadece INH (% 1,6) ve SM'de (% 1,6) direnç saptanırken, TB Direnç Kiti ile INH dokuz (% 14,3), RIF yedi (% 11,1) ve kinolonda yedi (% 11,1) mutasyon en yüksek oranda saptanmıştır.

14. Çalışmamızda ise kültüründe *M. tuberculosis* üreyen 63 hastanın 4'ü (% 6,3) daha önce tedavi görmüş olgulardı. Bu 4 hasta fenotipik yöntem BACTEC 460 TB ile antitüberküloz ilaçlara karşı direnç araştırıldığında; 4'ünde de test edilen antibiyotiklere karşı hassas olduğu bulunmuştur. Tüberküloz Direnç Kiti ile direnç genleri araştırıldığında ise sadece bir hastada RIF'e karşı direnç mutasyonları saptanmıştır. Bu mutasyonlar, RIF mutasyonu (rpoB 526), RIF mutasyonu (rpoB 522-526), RIF mutasyonu (rpoB 531), RIF mutasyonu (rpoB 529-533)'dur.

Sonuç olarak; *Mycobacterium tuberculosis*'in antitüberküloz ilaçlara artan ilaç direnci, tedavinin etkili bir şekilde yapılabilmesini engellemekte ve duyarlılık testlerinin yapılmasını gerekli hale getirmektedir. Tüberkülozun tedavisinde ÇİD TB önemli bir problemdir. Bu nedenle ÇİD TB'nin erken saptanmasında ve yayılmasının önlenmesinde özellikle *M. tuberculosis*, yavaş üreyen bir bakteri olduğundan duyarlılık testlerinin klasik kültür yöntemleri yerine daha kısa sürede sonuç veren hızlı yöntemler ile yapılması gerekmektedir. Çok ilaca dirençli tüberküloz olgularının artışı, tüberküloz ile savaşı güçleştirmektedir. Hızlı kültür sistemleriyle duyarlılık saptanması bir iki haftaya inmesine karşın, konvansiyonel yöntemlerle tüberküloz basilinin üretilerek antitüberküloz ilaçlara duyarlılığının belirlenmesi haftalar almaktadır. Bu nedenle özellikle ÇİD TB olgularının erken tedavi edilmesi ve dirençli kökenlerin yayılmasının önlenmesi zorlaşmaktadır. Çok ilaca dirençli TB olgularının belirlenmesinde hızlı yöntemlerin kullanılması ile erken tanı yapılarak tedaviye erkenden başlanması sağlanabilecektir. Ancak bu test yöntemlerinin standardize edilerek kullanımı gerekmektedir.

ÖZET

Amaç ve Hipotez: Tüberküloz, halen dünyada en yaygın ve ölümcül bulaşıcı hastalıklardan biri olmaya devam etmektedir. Tüberküloz kontrolünde en önemli konu, balgamında tüberküloz basili bulunan hastaları erken saptamak ve başkalarına bulaştırmadan etkili ilaçlarla en kısa sürede tedavi etmektir. Bu çalışmada, hastanemize ve Aydın ili Verem Savaş Dispanseri'ne başvuran tüberküloz olgularında tüberküloz hastalığı nedeni olan *Mycobacterium tuberculosis*'in saptanması, demografik veriler, antitüberküloz ilaçlara direnç oranlarının ve dirence yol açan mutasyonların saptanması, bölgemizdeki tüberküloz hastalara yaklaşımda yol gösterecek verilerin elde edilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu çalışma 1 Ocak 2009-1 Haziran 2010 tarihleri arasında Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteri Laboratuvarında yapılmıştır. Tüberküloz hastası toplam 63 kişiden 63 (% 100,0) *M. tuberculosis* kökeni izole edilmiştir. Çalışma kapsamına alınan bu kökenlerin identifikasyonunda NAP, PZR IS6110, PZR-RFLP; antitüberküloz ilaç direncinin saptanmasında BACTEC 460 TB (Becton Dickinson, ABD) sistemi ve direnç genlerinin saptanmasında Tüberküloz Direnç Kiti (Autoimmun Diagnostika GmbH, Almanya) kullanılmıştır.

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen toplam 63 (% 26,8) hastanın 48'i (% 76,2) erkek, 15'i (% 23,8) kadındı ve hastaların yaşları 13 ile 85 (ortalama 46,4±18,5) arasındaydı. Hastaların ARB sonuçları değerlendirildiğinde; 45 hastada (% 71,4) ARB pozitif, 18 (% 28,6) hastada ARB negatif bulunmuştur. BACTEC 460 TB ile 63 *M. tuberculosis* kökeninin 61'inde (% 96,8) antitüberküloz ilaçlar (izoniazid, rifampisin, etambutol, streptomisin) hassas bulunmuş ve ikisinde (% 3,2) antitüberküloz ilaçlardan birine karşı direnç saptanmıştır (bir (% 1,6) hastada izoniazid direnci, bir hastada (% 1,6) streptomisin direnci). BACTEC 460 TB ile çok ilaca dirençli tüberküloz saptanmamıştır. Tüberküloz Direnç Kiti ile test edilen antitüberküloz ilaçlara karşı direnç mutasyonları araştırıldığında, 47 (% 74,6) hastada herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. Kalan 16 (% 25,4) hastada toplam 25 mutasyon saptanmıştır. Dört kökende sadece izoniazid mutasyonu, iki kökende sadece rifampisin mutasyonu, iki kökende sadece kinolon mutasyonu, iki kökende izoniazid ve rifampisin mutasyonu, iki kökende izoniazid ve kinolon mutasyonu, iki kökende rifampisin kinolon mutasyonu, bir kökende streptomisin ve kinolon mutasyonu, bir kökende ise izoniazid,

rifampisin ve streptomisin mutasyonu saptanmıştır. İzoniazid mutasyonu saptanan dokuz kökenin beşinde *katG* 315 mutasyonu, dördünde *inhA*16,15,8 mutasyonu; rifampisin mutasyonu saptanan yedi kökenin ikisinde *rpoB* 516 mutasyonu, ikisinde *rpoB* 526 mutasyonu, birinde *rpoB* 513-516 mutasyonu, birinde *rpoB* 522-526 mutasyonu, birinde *rpoB* 529-533 mutasyonu; streptomisin mutasyonu saptanan iki kökenin ikisinde *rpsL* 43 mutasyonu, birinde *rpsL* 88 mutasyonu; kinolon mutasyonu saptanan yedi kökenin yedisinde *gyrA* 90-94 mutasyonu saptanmıştır

Sonuç: *Mycobacterium tuberculosis*'in antitüberküloz ilaçlara karşı artan ilaç direnci, tedavinin etkili bir şekilde yapılabilmesini engellemekte ve duyarlılık testlerinin yapılmasını gerekli hale getirmektedir. Tüberkülozun tedavisinde çok ilaca dirençli tüberküloz önemli bir problemdir. Çok ilaca dirençli tüberküloz olgularının artışı, tüberküloz ile mücadeleyi güçleştirmektedir. Bu nedenle çok ilaca dirençli tüberkülozun erken saptanmasında ve yayılmasının önlenmesinde duyarlılık testlerinin klasik kültür yöntemleri yerine daha kısa sürede sonuç veren hızlı yöntemler ile yapılması gerekmektedir. Genotipik yöntemler epidemiyolojik çalışmalarda yararlı olabilir. Ancak mutasyon her zaman fenotipik dirence yansımadağı için mutlaka fenotipik ve genotipik yöntemler birlikte kullanılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis*, Tüberküloz, Çok ilaca dirençli tüberküloz, BACTEC 460 TB, Tüberküloz Direnç Kiti

Yazışma Adresi: Dr. Metin GÖRENEKLİ

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, AYDIN

Tel: (+90) (256) 2142040 / 3035

E-posta: metingorenekli_1979@hotmail.com

SUMMARY

Aim and hypotesis: Tuberculosis is still one of the most common and deadly infectious diseases in the world. Early detection of bacillus in the sputum and treatment of the patients with appropriate drugs before contamination of others are the most important factors to control dissemination of tuberculosis. In the present study, tuberculosis cases admitted to our hospital and Aydın Tuberculosis Dispensary are included and demographic data, as well as rates of resistance to antituberculosis drugs and detection of mutations leading to resistance were studied to obtain data to guide the management of patients with tuberculosis in our region.

Method: This study was done at Mycobacteria Laboratory of Department of Medical Microbiology, Adnan Menderes University Research Hospital, between 1th January 2009 and 1th June 2010. Sixty three (100,0 %) *M. tuberculosis* strains were isolated from 63 tuberculosis patients. NAP, IS6110 PCR, PCR-RFLP were used for identification of strains included in the study; BACTEC 460 TB (Becton Dickinson, USA) system was used for detection of antituberculosis drug resistance and Tuberculosis Resistance Kit (Autoimmun Diagnostika GmbH, Germany) was used for detection of resistance genes.

Results: Among 63 (26,8%) patients included to present study 48 (76,2%) were male and 15 (23,8%) were female. The ages of patients were from 13 to 85 (mean $46,4 \pm 18,5$). The AFP results of patients showed that 45 patients (71,4 %) were AFB positive, and 18 (28,6 %) patients were AFP negative. Among 63 *M. tuberculosis* isolates 61 (96,8 %) were susceptible to antituberculosis drugs (isoniazid, rifampicin, ethambutol, streptomycin) with BACTEC 460 TB and in two isolates (3,2 %), resistance to antituberculosis drugs were detected: one isolate was resistant to isoniasid and one other strain was resistant to streptomycin (% 1,6). Multidrug-resistant tuberculosis was not detected with the BACTEC 460 TB. Presence of mutations that cause antituberculosis drug resistance was investigated with Tuberculosis Resistance Kit, and no mutation was detected in 47 (74,6 %) isolates. A total of 25 mutations were detected in the remaining 16 (25,4 %) isolates. A total of four isolates had mutation for only isoniazid resistance, two strains had mutations for only rifampicin resistance, two isolates had only quinolone resistance mutation, two isolates had both isoniazid and rifampicin resistance mutations two isolates had both isoniazid and quinolone resistance mutations, two strains had rifampicin and quinolone resistance

mutations, one isolate carried both streptomycin and quinolone resistance mutations , and one strain had isoniazid, rifampicin and streptomycin resistance mutations. Of nine isolate with isoniasid resistance mutation, five had *katG* 315 mutation and, four had *inhA* 16,15,8 mutation. Of seven strains with rifampicin resistance mutation, two had *rpoB* 526 mutations, one had *rpoB* 513-516 mutation, one had *rpoB* 522-526 mutation, and one had *rpoB* 529-533 mutation. Of two strains with streptomycin resistance mutation, both had *rpsL* 43 mutations, and one had *rpsL* 88 mutation in addition. Of seven strains quinolon resistance mutations all had *gyrA* 90-94 mutations.

Conclusion: Increasing drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to antituberculosis drugs, the treatment can be made effective in preventing and makes it necessary to carry out sensitivity tests. In the treatment of tuberculosis is an important problem multidrug-resistant tuberculosis. Increase in cases of multidrug-resistant tuberculosis, difficult struggle with tuberculosis. Therefore, early detection of multidrug-resistant tuberculosis and the prevention of the spread of classical culture methods of susceptibility testing methods instead of a quick conclusion to be made in less time. Genotypic methods may be useful in epidemiological studies. However, phenotypic and genotypic methods should be used together for the mutation is not always reflected to phenotypic resistance.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Tuberculosis, Multidrug-resistant tuberculosis, BACTEC 460 TB, Tuberculosis Resistance Kit

Correpondence Author: Dr. Metin GORENEKLI

Adnan Menderes University, Faculty of Medicine

Department of Medical Microbiology, AYDIN

Tel: (+90) (256) 2142040 / 3035

E-mail: metingorenekli_1979@hotmail.com

KAYNAKLAR

1. Hass DW. Mycobacterial Diseases: *Mycobacterium tuberculosis*. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases, 5th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2000: 2: 2576-607.
2. Caws M, Tho QD, Duy PM, Lan NTN, Hoa DV. PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism for Rapid, Low-Cost Identification of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Clinical Microbiology 2007; 1789-93.
3. Raviglion MC. The new stop TB strategy and global plan to stop TB, 2006-2015. Buletin of the WHO 2007; 85: 327.
4. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, and Financing. World Health Organization Report 2005. Geneva, Switzerland. World Health Organization (WHO/HTM/ TB/ 2005).
5. Çavuşoğlu C. Tüberkülozda direncin belirlenmesinde moleküler yöntemlerin yeri. Ağaçfıdan A, Erturan Z (ed.ler). 13. Türk Mikrobiyoloji Kongresi. Bodrum. 2008: 437-42.
6. Saniç A. *Mycobacterium tuberculosis*'de ilaç direnci. Bakterilerde Antimikrobiyal Direncin Belirlenmesinde Moleküler Yöntemlerin Kullanımı Kursu Teorik Konu Kitabı. İzmir. 2008: 45-50.
7. Palomino JC. Nonconventional and new methods in the dragnosis of tuberculosis: feasibility and applicabilty in the field. Eur Respir J 2005; 26: 339-50.
8. Kocagöz T. *Mycobacterium tuberculosis*'in ilaçlara duyarlılığının saptanmasında fenotipik ve genotipik yöntemler. Bakterilerde Antimikrobiyal Direncin Belirlenmesinde Moleküler Yöntemlerin Kullanımı Kursu. İzmir. 2008: 51-60.
9. Aslan G, Delialioğlu N, Emekdaş G, Otağ F, Yıldız Ç, Çalıkoğlu M, Özdemir Ö. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının izoniyazid, rifampisin, streptomisin ve etambutol duyarlılıklarının BACTEC yöntemi ile belirlenmesi. Ankem Derg 2005; 19(1): 43-7.
10. Alpaslan A. Moleküler Tanı Yöntemlerinde Yenilikler. VI. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu Kitabı. Kızılcahamam. 2006: 165-9.
11. Albay A. Tüberküloz Aşı Çalışmaları. XXXII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı. Belek / Antalya. 2006: 219-21.
12. Kılıçarşlan Z. Dünyada ve Türkiye'de Tüberküloz Epidemiyolojisi ve Kontrolü. Enfeksiyon Hastalıkları Serisi 2001; 4: 5-13.

13. Kıyan M. *Mycobacteriaceae*. Ustaçelebi Ş (ed.). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Birinci Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 419-56.
14. Barış Yİ. Çağlar boyu tüberküloz. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu. Samsun. 2003: 1-7.
15. Koçoğlu F. Verem Savaşı. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı Yayını 1986; 36-86.
16. Iseman MD. Tuberculosis therapy: past, present and future. Eur Respir J 2002; 20: 87-94.
17. Medikal Research Council. Treatment of pulmonary tuberculosis with streptomycin and paraamino salicylic acid. BMJ 1950; 2: 1073-85.
18. Medikal Research Council. Various combinations of isoniazid with streptomycin or with PAS in the treatment of pulmonary tuberculosis. BMJ 1955; 1: 435-45.
19. Doster B, Murray FJ, Newman R, Woolpert SF. Ethambutol in the initial treatment of pulmonary tuberculosis. U.S. Public Health Service, Tuberculosis Therapy Trials. Am Rev Respir Dis 1973; 107: 177-90.
20. Davidson PT, Le HQ. Drug treatment of tuberculosis. Drugs 1992; 43: 651-73.
21. East African/British Medical Research Council. Second East African/British Medical Research Council Study. Controlled clinical trial of four six-months regimens of chemotherapy for pulmonary tuberculosis. Second report. Am Rev Respir Dis 1976; 114: 471-75.
22. Hong Kong Chest Service, BMR Council. Controlled trial of 6-months and 8-months regimens in the treatment of pulmonary tuberculosis: The results up to 24 months. Tubercle 1979; 60: 201-10.
23. Singapore Tuberculosis Service, BMR Council. Long term follow-up of a clinical trial of six-month and four-months regimens of chemotherapy in the treatment of pulmonary tuberculosis. Am Rev Respir Dis 1986; 133: 779-83.
24. Doğan ÖT, Özşahin SL, Kaya S, Bakıcı MZ, Yıldız AI. Cumhuriyet Üniversitesi Hastanesi'nde 1999 Yılından İtibaren Takip Edilen Ardışık 385 Olguda Anti-Tüberküloz İlaç Direnci. C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi 2004; 26: 81- 4.
25. Kocabaş A. Akciğer Tüberkülozu. Topçu A. W, Söyletir G, Doğanay M (ed.ler) Enfeksiyon Hastalıkları, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 1996: 391-443.
26. Mendez AP, Raviglione MC, Laslo A. Global surveillance for anti-tuberculosis drug resistance 1994-1997. New Eng J Med 1998; 338: 1641-9.

27. Goble M, Iseman MD, Madsen LA, et al. Treatment of 171 patients with pulmonary tuberculosis resistant to isoniazid and rifampin. *New Eng J Med* 1993; 328: 527-32.
28. Çalışır H, Yılmaz H, Sarıoğlu N. Tüberkülozda inisial izoniazid ve rifampisin dirençlerinin prognoza etkileri. *Solunum Hastalıkları* 1997; 8: 217-24.
29. Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL. Mycobacteria. In: Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL (eds). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 6th ed. Philadelphia: Lippincott Company, 2006: 1064-124.
30. Pfyffer GE, Brown-Elliott BA, Wallace RJ. Mycobacterium: General Characteristics, Isolation, and Staining Procedures. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover JC (eds). *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. Washington: ASM Press, 2003: 532-59.
31. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Çeviren: Albay A. Mikobakteri. Başustaoglu AC (Çeviri ed.). *Tıbbi Mikrobiyoloji, Altıncı Baskı*. Ankara: Atlas Kitapçılık, 2010: 277-90.
32. World Health Organization: Global Tuberculosis Control, Surveillance, Planning, Financing. WHO Report 2008 Geneva (WHO/HTM/TB/2008).
33. World Health Organization: Tuberculosis MDR-TB & XDR-TB the 2008 Report. WHO Geneva.
34. World Health Organization: The Global MDR-TB & XDR-TB Tuberculosis Response Plan 2007-2008. WHO Geneva.
35. World Health Organization: Anti-Tuberculosis Drug Resistance in the World. Report No:4 WHO 2008 Geneva.
36. TB/HIV A clinical manual second edition. 36 WHO/HTM/TB/2004.
37. The PIH Guide to the Medical Management of Multidrug-Resistant Tuberculosis. International Edition. Partners in health, 2003.
38. Centers for Disease Control and Prevention. USPHS/IDSA guidelines for the prevention of opportunistic infections in persons infected with human immunodeficiency virus. *Morb Mortal Wkly Rep* 1997; 46: 1-46.
39. Centers for Disease Control and Prevention. Tuberculosis morbidity-United States, 1997. *Morb Mortal Wkly Rep* 1998; 47: 253-7.

40. Alien S, Batungwanayo J, Kerlikowske K, Lifson AR, Wolf W, Granich R, Taelman H, Van de Perre R, Serufilira A, Bogaerts J. Two-year incidence of tuberculosis in cohorts of HIV-infected and uninfected urban Rwandan women. *Am Aspir Dis* 1993; 146: 1439-44.
41. Corbett L, Raviglione M. Global burden of tuberculosis: past, present, and future. In: Cole ST, Eisenach KD, McMurray DN, Jacobs WR Jr (eds). *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*. Washington: ASM Pres, 2005: 3-12.
42. Prescott LM, Harley JP, Klein DA. Bacteria: The high G+C gram positives. In: Prescott LM, Harley JP, Klein DA (eds). *Microbiology*, Washington: McGraw-Hill, 1999: 506.
43. Metchock BG, Nolte FS, Wallace RJ. *Mycobacterium*. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH (eds). *Manual of Clinical Microbiology*, Washington: ASM Pres, 1999: 399.
44. Pfyffer GE, Vincent V. *Mycobacterium tuberculosis complex, Mycobacterium leprae*, and other slowly growing mycobacteria. In: Beriello SE, Murray ER, Funke G (eds). *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections: Bacteriology*, 10th ed. London: Hodder Arnold, 2005: 1181-235.
45. Bilgehan H. Özel bakteriyoloji ve bakteri infeksiyonları. Bilgehan H (ed). *Klinik Mikrobiyoloji*, Onuncu baskı. İzmir: Barış Yayınları, 2000: 439-89.
46. Kremer L, Besra GS. A waxy tale, by *Mycobacterium tuberculosis*. In: Cole ST, Eisenach KD, McMurray DN, Jacobs R, Jr (eds). *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*, Washington: ASM Pres, 2005: 287-305
47. Mahapatra S, Basu J, Brennan PJ, Crick DC. Structure, biosynthesis, and genetics of the mycolic acid-arabinogalactan-peptidoglycan complex. In: Cole ST, Eisenach KD, McMurray DN, Jacobs R Jr (eds). *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*, Washington: ASM Pres, 2005: 275-85.
48. Çavuşoğlu C, Gürsel D, Saniç A, Durmaz R. *Mycobacterium tuberculosis*'in hücre duvarı. Çavuşoğlu C, Gürsel D, Saniç A, Durmaz R (ed.ler). *M. tuberculosis*'de rpoB, katG, inhA Genlerinde Direnç Yol Açan Mutasyonların, Stafilokoklarda mecA ve Enterokoklarda vanA, vanB ve vanC Direnç Genlerinin Saptanmasında Kullanılan Moleküler Yöntemler: Bakterilerde Antimikrobiyal Direncin Belirlenmesinde Moleküler Yöntemlerin Kullanımı Kursu Uygulama Konu Kitabı. İzmir. 2008: 5.
49. Bilgehan H. *Mycobacteriumlar*. Klinik Mikrobiyolojik Tanı, 3. Baskı. İzmir: Barış Yayınları, 2002: 571-93.

50. <http://health.state.tn.us/ceds/tb/guidelines.htm> Erişim tarihi: 18.03.2011.
51. www.lung.ca/tb/abouttb/what/causes_tb.html Erişim tarihi: 18.03.2011.
52. Best M, Sattar SA, Springthorpe VS, Kennedy ME. Efficacies of selected disinfectants against *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1990; 28: 2234-39
53. Zellweger JP. Pathogenesis and transmission of tuberculosis. Eur Respir Mon 1997; 4: 1-13.
54. Schlesinger LS. Phagocytosis and Toll-Like Receptors in Tuberculosis. In: Rom WN, Garay SM (eds). Tuberculosis, Second ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2004: 203-15.
55. Buschman E, Skamene E, Schurr E. The Role of Nramp 1 Gene in Mycobacterial Infections. In: Rom WN, Garay SM (eds). Tuberculosis, Second ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2004: 193-203.
56. Garay SM. Pulmonary Tuberculosis. In: Rom WN, Garay SM (eds). Tuberculosis, Second ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2004: 345-95
57. Salyers AA, Whitt DD. Bacterial Pathogenesis. A Molecular Approach. Tuberculosis. Second edition. Washington: ASM Pres 2002; 19: 291-310.
58. Roitt I. The production of effectors. In: Roitt I (ed). Roitt's Essential Immunology, 9th ed. London; Blacwell Science, 1997: 179-200.
59. Chan J, Kaufmann HE. Immune Mechanisms of Protection. In: Bloom BR (ed). Tuberculosis Pathogenesis, Protection and Control. Washington: ASM Pres, 1994: 389-415.
60. Ulrichs T, Kaufmann SHE. Cell-Mediated Immun Response. In: Rom WN, Garay SM (eds). Tuberculosis, Second ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2004: 251-63.
61. Nathan CF, Ehrt S. Nitric oxide in Tuberculosis. In: Rom WN, Garay SM (eds). Tuberculosis, Second ed. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins, 2004: 215-37.
62. Arseven O. Akciğer Hastalıkları: İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Temel ve Klinik Bilimler Ders Kitapları. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti, 2002: 285-304.
63. Cooksey RC, Crowford JT, Jacobs WR. A rapid method for screening antimicrobial agents for activities against a strain of mycobacterium tuberculosis. Antimicrobial Agents and Chemoterapy 1996; 40: 1186-88.

64. Collins CH, Grange JM, Yates MD. Tuberculosis Bacteriology. In: Collins CH, Grange JM, Yates MD (eds). 2nd ed. Reed Educational and Professional, Washington: Publishing Ltd, 1997: 238-43.
65. Crawford JT. Application of molecular methods to epidemiology of tuberculosis. 9th Forum in Microbiology. Paris. 1993.
66. Canda T, Yüce A, Özbakkaloğlu B, Canda MS. Tüberküloz basili saptanan balgam yaymalarındaki sitolojik özellikler (104 olgu) Siprofloksasinin Mycobacterium tuberculosis suşlarına in vitro etkisi. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 1992; 6: 52-55.
67. Vincent V, Brown-Elliott BA, Jost KC, Wallace RJ. Mycobacterium: Phenotypic and Genotypic Identification, In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds). Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington: ASM Pres, 2003: 560-84.
68. Kent PT, Kubica GP. Public Health Mycobacteriology: a Guide for the level 111 Laboratory. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control, Atlanta, Ga. 1985.
69. Stone BL, Burman WJ, Hildred MV, Jarboe EA, Reves RR, Wilson ML. The diagnostic yield of acid-fast bacillus smear-positive specimens. J Clin Microbiol 1997; 35: 1030-31.
70. Uzun M. Klinik Örneklerin Alınması ve Laboratuvara Gönderilmesi/Örneklerin İşlenmesi ve Kültür Yöntemleri. Yüce A, Ayyıldız A, Özyurt M, Uzun M, Sürücüoğlu S, Sarıgüzel Sar N (ed.ler). VIII. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulama Kursu Kitabı. Erzurum. 2009: 11-23.
71. Baylan O. Tüberküloz Tanısında Kültüre Dayalı Yöntemler. 5. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu. İzmir. 2004: 65-72
72. Sürücüoğlu S. Tüberküloz basiliinin klasik yöntemlerle identifikasyonu. Yüce A, Ayyıldız A, Özyurt M, Uzun M, Sürücüoğlu S, Sarıgüzel Sar N (ed.ler). VIII. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulama Kursu Kitabı. Erzurum. 2009: 36-48.
73. Durmaz R. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Durmaz R (ed). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2001: 15-35.
74. Murray JF. Cursed duet: HIV infection and tuberculosis. Respiration 1990; 57 :210-20.
75. Fitzgerald D, Hass DW. Mycobacterium tuberculosis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th ed. USA: Elsevier, 2005: 2852-86.

76. Laal S. Immunodiagnosis. In: Rom WN, Garay SM (eds). Tuberculosis, Second ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2004: 185-93.
77. Yüce A, Şener A. Akciğer tüberkülozu. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (ed.ler). Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi, Üçüncü Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008: 832-49
78. Fennelly KP, Ellner JJ. Tuberculosis. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR (eds). Infectious Diseases, 3th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2004: 1379-88.
79. Centers for Diseases Control and Prevention. Treatment of Tuberculosis. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2003; 52: 1-88.
80. Iseman MD, Çeviren: Şeref Özkara. Klinisyenler İçin Tüberküloz Kılavuzu, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., 2002: 271-276.
81. Evans CC. Historical background. Davies PDO (ed). Clinical Tuberculosis, 2nd ed. London: Chapman Hall Med, 1998: 3-20.
82. Kochi A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the WHO. Tubercle 1991; 72: 1-26.
83. Özkara Ş. Dünya’da ve Türkiye’de çok ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD TB). Albay A, Kısa Ö (ed.ler). 6. Ulusal Mikobakteri Sempozyum Kitabı. Ankara. 2006: 197-204.
84. T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaşı Daire Başkanlığı, Türkiye’de Verem Savaşı 2010 Raporu. Ankara 2010.
85. Zhang Y, Telenti A. Genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In: Hatful GF, Jacobs WR (eds). Molecular Genetics of Mycobacteria, Washington: ASM Press, 2000: 235.
86. Saniç A. Antitüberküloz ilaçlar. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S (ed.ler). Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler, Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2003: 509.
87. Çavuşoğlu C. *Mycobacterium tuberculosis*’de moleküler antibiyotik duyarlılık test yöntemleri. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu Sempozyum Kitabı, Samsun: Otak Form-Ofset Basım San Tic AŞ, 2003: 369-86.
88. Musser JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: Molecular genetic instgths. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 496.
89. Stephen HG. Evolution of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Clinical and Molecular Perspective. Antimicrobial Agents And Chemotherapy 2002; 46: 267.

90. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tubercle and Lung Dis* 1998; 79: 3-29.
91. Riska PF, Jakobs WR, Aliand D. Molecular determinants of drug resistance in tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4-10.
92. Slayden RA, Barry CE. The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes and Infection* 2000; 2: 659.
93. Wade M, Zang MY. Mechanism of drugs resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Biosci* 2004; 9: 975-94.
94. Zhang Y, Young DB. Molecular mechanisms of Isoniazid: a drug at the front line of tuberculosis control. *Trends Microbiol* 1993; 1: 109-13.
95. Altamirano M, Marostenmaki J, Wong A, FitzGerald M, Black WA, Smith JA. Mutations in the catalase-peroxidase gene from isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Infect Dis* 1994; 169: 1362-5.
96. Sherman DR, Mdluli K, Hickey MJ, Arain TM, Morris SL, Barry CE, Stover CK. Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 1996; 272: 1641-3.
97. Rouse DA, Li Z, Bai GH, Morris SL. Characterization of the *katG* and *inhA* genes of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2472-7.
98. Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Sun Um K, Wilson T, Collins D, De Lisle G, Jacobs WR. *InhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 1994; 263: 227-30.
99. Sreevatsan S, Stockbauer KE, Pan X, Kreiswirth BN, Moghazeh SL, Jacobs WR, Telenti A, Musser JM. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Critical role of *embB* mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1677-81.
100. Meler A, Sander P, Schaper KJ, Scholz M, Bottger EC. Correlation of molecular resistance mechanisms and phenotypic resistance levels in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2452-4.
101. Nair J, Rouse DA, Bai GH, Morris SL. The *rpsL* gene and streptomycin resistance in single and multiple drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 1993; 10: 521-7.

102. Bianchard CS. Molecular mechanisms of drug resistance in *M. tuberculosis*. Annu Rev Biochem 1996; 65: 215-39.
103. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Çöle S, Colston MJ, Matter L, Schopfer K, Bodmer T. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet 1993; 341: 647-50.
104. Williams DL, Spring L, Collins L, Miller L, Hetfets L, Gangadharam PRJ, Gillis TP. Contribution of *rpoB* mutations to development of rifamycin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents and Chemother 1998; 42: 1853-57.
105. Sarıbaş Z, Kocagöz T, Alp A, Günalp A. Rapid Detection of Rifampin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates by Heteroduplex Analysis and Determination of Rifamycin Cross-Resistance in Rifampin-Resistant Isolates. J Clin Microbiol 2003; 41: 816-8.
106. Cambau E, Sougakoff W, Besson M, Truffot-Pernot C, Grosset J, Jarlier V. Selection of a *gyrA* mutant of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to fluoroquinolones during treatment with ofloxacin. J Infect Dis 1994; 170: 479-83.
107. Kocagöz T, Hackbarth CJ, Ünsal İ, Rosenberg EY, Nikaido H, Chambers HF. Gyrase mutations in laboratory-selected, fluoroquinolone-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 1768-74.
108. Scorpio A, Zhang Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. Nat Med 1996; 2: 662-7.
109. Saniç A. Tüberkülozda Direnç Mekanizmaları. 5. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu. İzmir. 2004: 24-35.
110. Şatana D. Çoğul ilaca dirençli *M. tuberculosis* kompleksi suşlarının sekonder ilaçlara duyarlılığının BACTEC ve agar proporsiyon yöntemleri ile araştırılması. Doktora Tezi. 2002.
111. Gümüşlü F, Ceyhan İ, Kocagöz T, Sönmez N. Tüberküloz Laboratuvar Rehberi. T.C. Sağlık Bakanlığı, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, Ankara. 1998.
112. Inderlied CB, Pfyffer GE. Susceptibility Test Methods: *Mycobacteria*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover MC (eds). Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington: ASM Press, 2003: 1149-77.

113. Özkütük N. Antibiyotik Duyarlılık Test Yöntemleri. Yüce A, Ayyıldız A, Özyurt M, Uzun M, Sürücüoğlu S, Sarıgüzel Sar N (ed.ler). VIII. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulama Kursu Kitabı. Erzurum. 2009: 49-74.
114. Canetti G, Rist N, Grosset J. Mesure de la sensibilite du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la methode de proportions. Rev Tuberculose et Pneumol 1963; 27: 217-272.
115. Laszlo A, Gill P, Handzel V, Hodgkin MM, Helbecque DM. Conventional and radiometric drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis complex*. J Clin Microbiol 1983; 18: 1335-9.
116. Rüsç-Gerdes S, Domehl C, Nardi G, Gismondo MR, Welscher HM, Pfyffer GE. Multicenter Evaluation of the Mycobacteria Growth Indicator Tube for Testing Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to First-Line Drugs. J Clin Microbiol 1999; 37: 45-8.
117. Kocagoz T, O'Brien R, Perkins M. A new colorimetric culture system for the diagnosis of tuberculosis. 2004; 8: 1512-13.
118. Baylan O, Kisa O, Albay A, Doganci L. Evaluation of a new automated, rapid, colorimetric culture system using solid medium for laboratory diagnosis of tuberculosis and determination of anti-tuberculosis drug susceptibility. Int J Tuberc Lung Dis 2004; 8: 772-7.
119. Carriere C, Riska PF, Zimhony O, Kriakov J, Bardarov S, Burns J, Chan J, Jacobs WR. Conditionally replicating luciferase reporter phages: improved sensitivity for rapid detection and assessment of drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1997; 35: 3232-9.
120. Riska PF, Jakobs WR, Aliand D. Molecular determinants of drug resistance in tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis 2000; 4-10.
121. Wilson SM, Al-Suwaidi Z, McNerney R, Drobniewski FA. Evaluation of a new rapid bacteriophage-based method for the drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Nat Med 1997; 3: 465-8
122. Moore AV, Kirk SM, Callister SM, Mazurek GH, Schell RF. Safe Determination of Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Antimycobacterial Agents by Flow Cytometry. J Clin Microbiol 1999; 37: 479-483.

123. Cockeril FR. Genetic methods for assessing antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 199-212.
124. Rossau R, Traore H, De Beenhouwer H, Mijs W, Jannes G, De Rijk P, Portaels F. Evaluation of the INNO-LIPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis complex* and its resistance to rifampin. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2093-98.
125. Marshall VM, Lew AM. Direct automated DNA sequencing of DS and SS PCR products. In: Griffin HG, Griffin AMJ (eds). *PCR Technology Current Innovations*. London: CRC Pres, 1994: 85-100.
126. Kim BJ, Lee KH, Park BN, Kim SJ, Park EM, Park YG, Bai GH, Kim SJ, Kook YH. Detection of rifampin-resisfant *Mycobacterium tuberculosis* in sputa by nested PCR-linked single-strand conformation polymorphism and DNA sequencing. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2610-17.
127. Scarpellini P, Braglia S, Brambilia AM, Dalessandro M, Cichero P, Gori A, Lazzarin A. Detection of rifampin resistance by single-strand conformation polymorphism analysis of cerebrospinal fluid of patients with tuberculosis of the central nervous system. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2802-6.
128. Selvin PR. The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. *Nature* 2000; 7: 730-734.
129. Torres MJ, Criado A, Palomares JC, Aznar J. Use of real-time PCR and fluorimetry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance-associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3194-9
130. Yue J, Shi W, Xie J, Li Y, Zeng E, Liang L, Wang H. Detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by using a specialized oligonucleotide microarray. *Diagn Microbiot Infect Dis* 2004; 48: 47-54.
131. Saraçlı MA. Restriksiyon Enzimlerine Dayalı Yöntemler: Plazmit Tipleme, PFGE, PZR-RFLP, AFLP. Ağaçfıdan A, Erturan Z (ed.ler). 13. Türk Mikrobiyoloji Kongresi. Bodrum. 2008: 45-51.
132. Özkara Ş, Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı, Türkiye’de Tüberküloz Kontrolü İçin Başvuru Kitabı. Ankara. Rekmay Ltd Şti. 2003.

133. Özkara Ş. Dünya’da ve Türkiye’de çok ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD TB). Albay A, Kısa Ö (ed.ler). 6. Ulusal Mikobakteri Sempozyum Kitabı. Ankara. 2006: 197-204.
134. Sar Sarıgüzel N. Direk Mikroskopi Teknikleri ve Değerlendirilmesi. Yüce A, Ayyıldız A, Özyurt M, Uzun M, Sürücüoğlu S, Sarıgüzel Sar N (ed.ler). VIII. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulama Kursu Kitabı. Erzurum. 2009: 24-30
135. Akvan Oğuz V. Auramine-Rhodamine Floresan Boyama. Yüce A, Ayyıldız A, Özyurt M, Uzun M, Sürücüoğlu S, Sarıgüzel Sar N (ed.ler). VIII. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulama Kursu Kitabı. Erzurum. 2009: 31-35.
136. Aslan G, Delialioğlu N, Emekdaş G, Otağ F, Yıldız Ç, Çalikoğlu M, Özdemir Ö. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının izoniazid, rifampisin, streptomisin ve etambutol duyarlılıklarının BACTEC yöntemi ile belirlenmesi. Ankem Derg 2005; 19: 43-7.
137. Saniç A, Kizirgil A. Tüberküloz Tanısında Klasik PCR: PCR ve RFLP Yöntemleri ile *Mycobacterium* Türlerinin İdentifikasyonu. Yüce A, Ayyıldız A, Özyurt M, Uzun M, Sürücüoğlu S, Sarıgüzel Sar N (ed.ler). VIII. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kursu Kitabı. Erzurum. 2009: 75-86.
138. Sambrook J, Russell DW. Preparation and analysis of eukaryotic genomic DNA. In: Sambrook J, Russell DW (eds). Molecular Cloning: A laboratory Manual. 3th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 8: 1-24.
139. Hellyer TJ, DesJardin LE, Assaf MK, Bates JH, Cave MD, Eisenach KD. Specificity of IS6110-based amplification assays for *Mycobacterium tuberculosis complex*. J Clin Microbiol 1996; 34: 2843–46.
140. Taylor TB, Patterson C, Hale Y, Safranek WW. Routine Use of PCR Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Identification of Mycobacteria Growing in Liquid Media. J Clin Microbiol 1997; 35: 79-85.
141. Khosravil AD, Hashemi A. Application of Restriction Enzyme Analysis Technique Based on 65 kDa Heat Shock Protein Gene for Fingerprinting and Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Strains Isolated from Tuberculosis Patients in Ahwaz. Iran Pak J Med Sci 2007; 23: 216-19.
142. Corbett L, Raviglion M. Global burden of tuberculosis: past, present, and future. In: Cole ST, Eisenach KD, McMurray DN, Jacobs WR (eds). Tuberculosis and the Tubercle Bacillus, Washington: ASM Pres, 2005: 3-12.

143. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Global burden of tuberculosis. Estimated incidence, prevalence, and mortality by country. JAMA 1999; 282: 677-86.
144. Çetin M, Günaydın M, Saniç A. *Mycobacterium tuberculosis* Kompleksinde İzoniazid ve Rifampisin Direncinin Real-Time PCR ile Hızlı Tanısı. Ankem Derg 2008; 22: 32-6
145. Hart CA, Beeching NJ, Duerden BI. Tuberculosis into the next century. J Med Microbiol 1996; 44: 1-34
146. Global Tuberculosis Control 2010. WHO Report 2010. World Health Organization (WHO/HTM/TB/2010.7).
147. Köksal F. Mikobakterilerin evrimi. VI. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu Kitabı. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti. Kızılcahamam. 2006: 93-6.
148. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2006. Geneva. World Health Organization (WHO/HTM/TB/2006).
149. Kılıçaslan Z. Dünyada ve Türkiye'de Tüberküloz. Ankem Dergisi 2007; 21: 78-80.
150. T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaşı Daire Başkanlığı, Türkiye'de Verem Savaşı 2008 Raporu. Ankara 2008.
151. MMWR Recommendations and reports. Prevention and control of tuberculosis in corectional and detention facilities: recommendations from CDC. 2006; 55: 1-64.
152. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/whol04/en/> Erişim tarihi: 01.03.2011
153. Mirovic V, Lepsanovic Z: Evaluation of the MB/BacT system for recovery of mycobacteria from clinical specimens in comparison to Lowenstein-Jensen medium. Clin Microbiol Infect 2002; 8: 709-14.
154. Samra Z, Kaufman L, Bechor J, Bahar J: Comparative study of three culture systems for optimal recovery of mycobacteria from different clinical specimens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000; 19: 750-4.
155. Piersimoni C, Scarparo C, Cichero P, De Pezzo M, Covelli I, Gesu G, Nista D, Scagnelli M, Mandler F: Multicenter evaluation of the MB-Redox medium compared with radiometric BACTEC system, mycobacteria growth indicator tube (MGIT), and Lowenstein-Jensen medium for detection and recovery of acid-fast bacilli. Diagn Microbiol Infect Dis 1999; 34: 293-9.
156. Mikhailovich V, Lapa S, Gryadunov D, Sobolev A, Strizhkov B, Chernyh N, Skotnikova O, Irtuganova O, Moroz A, Litvinov V, Vladimirkii M, Perelman M,

- Chernousova L, Erokhin V, Zasedatelev A, Mirzabekov A. Identification of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by hibridization, PCR, and ligase detection eaction on oligonucleotide microchips. J Clin Microbiol 2001; 39: 2531-40.
- 157.** Brunello F, Favari F, Fontana R. Comparison of the MB/BacT and BACTEC 460 TB systems for recovery of Mycobacteria from various clinical specimens. J Clin Microbiol 1999; 37: 1206-9.
- 158.** Roggenkamp A, Hornef MW, Masch A, Aigner B, Autenrieth IB, Heesemann J: Comparison of MB/BacT and BACTEC 460 TB systems for recovery of mycobacteria in a routine diagnostic laboratory. J Clin Microbiol 1999; 37: 3711-2.
- 159.** Kocagoz T, Alp A, Albay A: A new rapid nonradioactive medium for culturing mycobacteria, that also enable visually differentiation of mycobacterial growth from contamination. American Society for Microbiology General Meeting, Los Angeles: USA, Poster, 2000; 21-5
- 160.** Özakin C. Gedikoğlu S. Tüberküloz Tanısında Tüberküloz laboratuvarlarının Rolü: 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun 2002
- 161.** Bilgiç H. Dünyada Tüberkülozun Durumu. VI. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu Kitabı. Kızılcahamam. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti. 2006: 17-21.
- 162.** Bloom BR, Murray C J. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. Science 1992; 257:1055-64.
- 163.** Bianchard CS. Molecular mechanisms of drug resistance in *M. tuberculosis*. Annu Rev.Biochem 1996; 65: 215-39.
- 164.** Morris S, Bai GH, Suffys P, Portillo-Gomez L, Fairchok M, Rouse D. Molecular mechanisms of multiple drug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis 1995; 171: 4954-60.
- 165.** Gümüşlü F. Türkiye’de Tüberküloz Kontrol Programı. VI. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu Kitabı. Kızılcahamam. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti. 2006: 22-7
- 166.** Kartaloğlu Z, Bozkanat E, Öztürkeri H, Okutan O, İlvan A. BACTEC yöntemi kullanılarak primer antituberkuloz ilaçlara direnci saptanan 365 tüberkuloz olgusu, Solunum 2002; 4: 443-8.
- 167.** Durmaz R, Özerol İH, Durmaz B, Günal, Şenoğlu A, Evliyaoğlu E. Primary drug resistance and molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from

- patients in a population with high tuberculosis incidence in Turkey, *Microbial Drug Res* 2003; 9: 361-6.
168. Balcı İ, Bayram A, Filiz A. *Mycobacterium tuberculosis*'de birinci secenek ilaclarla direnç. *İnfeksiyon Derg* 1999; 13: 512-25.
169. Tansel Ö, Yüksel P, Kuloğlu F, Akata F. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının antitüberküloz ilaclarla direnci: Trakya Üniversitesi Hastanesi'nin iki yıllık sonuçları. *İnf. Derg* 2003; 17: 23-6.
170. Sanic A, Eroglu C, Gunaydin M, Leblebicioglu H, Seber E, Avkan Oğuz V, Atasever M, Uruk I, Ceyhan J, Durmaz R, Yaman A, Tansel O, Karadağ A, Ozturk E, Durmaz B, Güneri S, Yüce A, Aslan G. Mutations in the *rpoB*, *katG*, and *inhA* genes leading to rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Turkey. 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease Denmark, Copenhagen, CMI, 2005: 565.
171. <http://www.cdc.gov/tb/pubs/tbfactsheets/xdrtb.htm> Erişim tarihi: 20.01.2011
172. The WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance 2002-2007. WHO/HTM/TB/2008.394
173. Eyigör M, Gültekin B, Telli M, Görenekli M, Okulu Y, Aydın N. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks izolatlarında antitüberküloz ilaclarla direnç oranları. Ağaçfıdan A, Erturan Z (ed.ler). XXXIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kongre Kitabı. Bodrum. 2008: 863.
174. Talay F, Altın S, Karasulu L, Kümbetli Ş. İstanbul Eyüp verem savaş dispanserinde 1997-2000 yıllarında belirlenen ilaç direnç oranları. *Van Tıp Derg.* 2003; 10: 10-5.
175. Orhan G, Zer Y, Balcı İ, Bayram A, Korkmaz G. Mikobakteriyoloji laboratuvarında incelenen örneklerin retrospektif olarak değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2002; 32: 225-9.
176. Baylan O, Kısa Ö, Albay A, Doğancı L. Mikobakteriyoloji laboratuvarımızda 2002 yılında tüberküloz olgularından izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTC) suşları ve antitüberküloz ilaç duyarlılık sonuçları. *Gülhane Tıp Derg* 2003; 45: 256-62.
177. Esen N, Gündüz AT. Dokuz Eylül Üniversitesi'nde izle edilen *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarında ilaç direnci. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2003; 33: 337-42

178. Özekinci T, Özbek E, Gedik M, Temiz H, Atmaca S. 2001-2003 yılları arasında izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* suşlarında ilaç direnci. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2006; 36: 31-4.
179. Korkmaz G, Balcı İ, Bayram A, Karslıgil T. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks kökenlerinin birinci seçenek antitüberküloz ilaçlara duyarlılığının saptanmasında BACTEC ve agar proporsiyon yöntemlerinin karşılaştırılması. Enfeksiyon Derg 2006; 20: 7-14.
180. İşitez M, Çetinkaya Z, Altındış M, Çiftçi İH, Fidan F. Afyon bölgesinde Löwenstein-Jensen, BACTEC ve TK Medium yöntemleri ile izole edilen 51 *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının dört major ilaca karşı dirençlerinin belirlenmesi. Kocatepe Tıp Derg 2004; 5: 45-8.
181. Şenol G, Coşkun M, Biçmen C, Erer OF. Aktif akciğer tüberkülozlu hastalardan izole edile *Mycobacterium tuberculosis* kökenlerinin ilaç direnç oranlarının değerlendirilmesi. Klimik Derg 2006; 19: 71-4.
182. Doğan ÖT, Özşahin SL, Kaya S, Bakıcı MZ, Yıldız AI. Cumhuriyet Üniversitesi Hastanesi'nde 1999 yılından itibaren takip edilen ardışık 385 olguda antitüberküloz ilaç direnci. C.Ü. Tıp Fakültesi Derg. 2004; 26: 81-4.
183. Zer Y, Çiçek H, Mehli M, Bayıl S, Balcı İ. Gaziantep Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 2004-2006 yılları arasında tüberküloz hastalarından soyutlanan mikobakterilerin antitüberküloz ilaç direnci. Klimik Derg 2007; 20: 20-2.
184. Yaylı G, Sözen H, Ağalar C. Isparta yöresinden izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının antitüberküloz ilaçlara duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2003; 33: 24-30.

BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR METNİ

- Bu çalışma bir araştırmadır
- Araştırmanın amacı; Aydın ilindeki tüberküloz hastalarında, tüberküloz ilaçlarına karşı direnç oranlarının saptanmasıdır.
- Araştırma kapsamındaki hastaların kullandığı ilaçların etkili olup olmadığı araştırılıp, hastalar tedavi başarısı yönünden takip edilecektir
- Araştırma sırasında hastaya zarar verebilecek herhangi bir girişim yapılmayacaktır. Sadece hastanın balgamı bu çalışmada incelenip değerlendirilecektir.
- Gönüllü olarak sorumluluğunuz; araştırma süresince gerektiği zaman sizinle irtibata geçip, biz araştırmacılara yardımcı olmanızdır.
- Sizden alacağımız balgam örneği Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteri laboratuvarında çalışılacaktır.
- Bu çalışmada sizden alacağımız balgam örneğinin size herhangi bir zarar vermeyeceği gibi, sizde herhangi risk oluşturmamaktadır.
- Aydın ilinde antitüberküloz ilaç direncini saptayacak Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi’den başka bir sağlık merkezi bulunmamaktadır. Bu nedenle Aydın ilinde yapılacak ilk çalışmadır. Bu çalışma ile hastalığın tedavi başarısında ve takibinde faydalı olunacaktır.
- Balgam örneği alma dışında herhangi bir girişim yapılmayacaktır.
- Eğer bu çalışmada herhangi bir zarar görmeniz durumunda tüm masraflar tarafımızca karşılanacaktır.
- Gönüllü olarak bu çalışmaya katılmakla sizden herhangi bir para talep edilmeyeceği gibi size para ödenmeyecektir.
- Gönüllü olarak bu çalışmaya katılmakla tüm masraflar tarafımızca karşılanacaktır.
- Bu çalışmayı isteğinize bağlı olarak herhangi bir aşamada terk edebilirsiniz. Bu durum cezaya veya gönüllünün yararlarına engel duruma yol açmayacaktır.
- Gönüllü olarak bu çalışmaya katılmakla sizden alacağımız balgam örneği ile önemli verilere ulaşılabilecek ve bu veriler bize bu ciddi hastalığın tedavisinde ve tedaviye yön verilmesinde faydalı olacaktır.
- Bu çalışma ile kullandığınız tüberküloz ilaçlarının hastalığınızın tedavisinde başarılı olup olmadığına karar verilip, gerektiği durumlarda yani tedavi başarısızlığında hekiminize bu konuda bilgi verilecektir.,
- İzleyicilerin, yoklama yapanların, etik kurulların, resmi makamların gönüllüye ait tıbbi bilgilere ulaşabileceği, ancak bu bilgilerin gizli tutulacağı, gönüllünün veya yasal temsilcinin bilgilendirilmiş olur formunu imzalamakla bunu kabul etmiş oluyorsunuz.
- Gönüllünün kimliğini ortaya koyacak kayıtlar gizli tutulacaktır
- Araştırma sırasında ortaya çıkan, gönüllüleri ilgilendirebilecek bir bilgi söz konusu olduğunda, bu, gönüllüye veya yasal temsilcisine derhal bildirilecektir.
- Araştırma hakkında ek bilgi alabileceğiniz kişiler; Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalından Doç. Dr. Mete Eyigör ve Dr. Metin Görenekli ve Aydın ili Verem Savaş Dispanseri’nden Dr. Hayrettin Amasya’dır.
- Araştırmaya bağlı bir zarar olduğu takdirde ilgili makamlara; Aydın il sağlık müdürlüğüne dilekçe ile başvurabilirsiniz

- Gönüllünün isteği dışında araştırmadan çıkarılacağı durumlar, çalışılan balgam örneğinde istenilen verilere ulaşılamaması durumunda çalışmadan çıkarılacaksınız.
- Gönüllünün araştırmada yer alması için öngörülen süre 1.5 yıldır
- Araştırmada yer alacak gönüllülerin sayısı yaklaşık 50 kişi olarak planlanmıştır.

Çalışmada kullanılacak ilaç, testler ve diğer tetkiklerin ücretleri tarafınıza ve kurumunuza ödettirilmeyecektir. Tüm çalışma boyunca tarafımızdan karşılanacaktır.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik Araştırmaya kendi rızamla, hiç bir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı, İmzası, Tarih, Adresi (telefon no, varsa faks no.)

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin Adı, İmzası, Tarih, Adresi (telefon no varsa faks no)

Açıklamalar yapan araştırmacının Adı, İmzası, Tarih

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin Adı, İmzası, Tarih, Görevi:

* Çalışmadaki gönüllülere sunulan bilgilendirilmiş olur metni formlarının gönüllüler tarafından bizzat kendilerinin kendi adı-soyadını yazması ve imzalamasının sağlanması ile adreslerinin eksiksiz olarak formlara yazılmasına dikkat edilmelidir.

+ Bu belgenin birer kopyası gönüllüye ve hekime verilecek ve hasta dosyasına eklenecektir

**TÜBERKÜLOZ HASTALARINDA *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
İLAÇ DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI
ANKET FORMU**

Çalışma sıra no:

Tarih:

Ad Soyad:

Adres:

Yaş:

Cinsiyet:

Telefon:

Meslek:

Ev halkı nüfusu:

Bağlı bulunduğunuz Sağlık Ocağı:

Öğrenim durumunuz;

- () 1) Okur-yazar değil
() 2) Okur-yazar
() 3) İlkokul mezunu
() 4) Ortaokul mezunu
() 5) Lise mezunu
() 6) Yüksekokul mezunu

Yaşadığınız ev türü

- () 1) Apartman katı
() 2) Betonarme müstakil ev
() 3) Ahşap ev
() 4) Yığma (kerpiç) bina
() 5) Gecekondu

Evde kullanılan su

- () 1) Şebeke suyu
() 2) Kuyu suyu
() 3) Ortak kullanılan çeşme
() 4) Taşıma su
() 5) Depo suyu

Gelir durumunuz

- () 1) çok yüksek
() 2) yüksek
() 3) orta
() 4) düşük
() 5) çok düşük

		VAR	YOK	Cevap Var ise Ek açıklama
1	Tüberküloz hastası ile temas	☐	☐	Ne zaman?
2	Ailede başka tüberküloz hastası	☐	☐	Kimler?
3	Tüberküloz ilaç kullanımı	☐	☐	Hangi ilaçlar? Ne zamandan beri?

4	Düzenli ilaç kullanımı	☐	☐	
5	İlaç kullanımı sonrası klinik iyileşme	☐	☐	Ne zamandan beri?
6	Öksürük	☐	☐	
7	Balgam	☐	☐	Niteliği?
8	Ateş	☐	☐	
9	Yorgunluk	☐	☐	
10	İştahsızlık	☐	☐	
11	Kilo kaybı	☐	☐	
12	Gece terlemesi	☐	☐	
13	Kan tükürme (hemoptizi)	☐	☐	
14	Göğüs ağrısı	☐	☐	
15	Nefes darlığı	☐	☐	
16	Hırıltılı solunum	☐	☐	
17	Solukluk	☐	☐	
18	Lenfadenopati	☐	☐	
19	BCG aşısı	☐	☐	
20	PPD	☐	☐	
21	Altta yatan hastalık	☐	☐	
22	Sigara	☐	☐	Kaç paket/yıl ?
23	AIDS	☐	☐	
	Varsa diğer özellikler	☐	☐	
24		☐	☐	
25		☐	☐	
26		☐	☐	
27		☐	☐	
28		☐	☐	
29		☐	☐	
30		☐	☐	